

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

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

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 秋葉 道宏

令和2（2020）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	-----	3
秋葉道宏		
II. 分担研究報告		
1. 状態空間モデルを用いたダム湖における 藻類異常発生予測モデルの構築	-----	13
秋葉道宏, 西村修, 今本博臣, 佐野大輔, 三浦尚之		
2. 海外におけるアオコ等の水質汚濁対策の検証等	-----	19
柳橋泰生		
3. カビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築へ向けた 全国水道水源での存在実態調査	-----	27
秋葉道宏, 藤本尚志, 浅田安廣, 江崎敦		
4. 精密分析による水道水原水中溶存有機物の特性解析	-----	39
秋葉道宏, 越後信哉		
5. 粉末活性炭による2-MIB吸着に対する競合有機物成分の推定	-----	49
秋葉道宏, 浅田安廣, 神里良太		
6. 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	-----	57
秋葉道宏, 高梨啓和, 小倉明生, 北村壽朗		
7. 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	-----	67
秋葉道宏, 清水和哉, 藤本尚志, 高梨啓和		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	77

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

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

令和元年度 総括研究報告書

研究代表者 秋葉 道宏
(国立保健医療科学院)

令和2(2020)年 3月

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

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

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長

研究要旨

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

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

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

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

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

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

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

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

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

研究分担者

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

A. 研究目的

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

- ① 流域での障害生物の発生状況やそのメカニズムを把握
- ② 流域スケールでの生物障害発生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策を例示

B. 研究方法

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

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

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

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

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

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

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

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

C. 研究結果およびD. 考察

予測精度を評価するために、予測値-測定値プロ

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

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

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

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

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

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

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

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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。) 該当なし

状態空間モデルを用いたダム湖における
藻類異常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	今本	博臣
研究協力者	佐野	大輔
研究協力者	三浦	尚之

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：状態空間モデルを用いたダム湖における藻類異常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 今本 博臣 水資源機構総合技術センター
研究協力者 佐野 大輔 東北大学大学院環境科学研究科 准教授
研究協力者 三浦 尚之 国立保健医療科学院 生活環境研究部 主任研究官

研究要旨

本研究では、質データ、気象データ、及び状態空間モデルを用いることで、ダム湖における藻類異常発生予測モデルを構築することを試みた。奈良県宇陀市に位置する室生ダムを対象とし、藻類バイオマス量との相関の高いクロロフィル a 濃度を目的変数とした予測モデルを構築した。状態空間モデルは、ダム湖内のクロロフィル a 濃度の真値が気象条件によってどのように変化するかを記述する状態方程式と、真値から観測値が得られるプロセスを記述する観測方程式とで構成した。その結果、大きく予測が外れた 2 点を除くことで予測精度が向上した。例年の傾向から外れた際の予測、及び藻類種差を考慮したモデルの構築が今後の課題として挙げられた。

A. 研究目的

日本においてダム湖は約 5 割を占める重要な取水源となっている。一方で、夏季を中心に発生するアオコ等による藻類発生現象は、浄水システムにおいてカビ臭等の藻類障害を引き起こしている。藻類発生時期を事前に予測することが可能であれば、取水位置の変更や凝集剤使用量の増加に備えた準備等、工学的対策を前もって施すことが可能となる。そこで本研究においては、ダム湖における藻類異常発生予測モデルの構築を試みた。以下にその結果を報告する。

B. 研究方法

奈良県宇陀市に位置する室生ダムを対象とし、藻類バイオマス量との相関の高いクロロフィル a 濃度を目的変数とした予測モデルを構築した。クロロフィル a 濃度については水資源機構による月 1 回の定期水質調査の結果を用いた。気象データについては室生ダム近傍の針気象観測所のデータを気象庁 HP (<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>) よりダウンロードして用いた。本研究では、1983

年から 2016 年のデータによりモデルを構築し、作成したモデルを用いて 2017 年の予測を行い、実際の観測データとの比較をすることでモデルの検証を行った。

予測モデル構築には状態空間モデルを用いた。状態空間モデルとは、観測されない「状態」を仮定し、状態変化と観測誤差とを切り離して考える時系列モデルの一つである。本研究では、ダム湖内のクロロフィル a 濃度の真値が気象条件によってどのように変化するかを記述する状態方程式と、真値から観測値が得られるプロセスを記述する観測方程式とで構成した。また季節の周期性を考慮して季節調整項を組み込んだ。以下に時間 t における状態方程式を示す。

$$\mu[t] = \mu[t - 1] + w[t] + season[t]$$

$$w[t] = coef_{Temp} * AveMaxTemp7[t] + coef_{Sun} * Sun7[t] + coef_{Rain} * Rain7 + coef_{Wind} * AveWind7$$

ここでモデル式内の $\mu [t]$ は時間 t におけるクロロフィル a 濃度の平均値, $w[t]$ は時間 t における気象条件がクロロフィル a 濃度に及ぼす影響による変化, $season[t]$ は時間 t における季節調整項を示している。 $coef_{Temp}$, $coef_{Sun}$, $coef_{Rain}$, $coef_{Wind}$ はそれぞれ前 7 日間最高気温平均値, 前 7 日間日照時間合計, 前 7 日間降水量合計, 前 7 日間平均風速がクロロフィル濃度に与える影響を表す係数である。モデルの適用には統計ソフトウェアの R, MCMC 計算には Stan を用いた。

C. 研究結果および D. 考察

予測精度を評価するために, 予測値-測定値プロットによる視覚的評価と決定係数 R^2 , および二乗平均平方根誤差 Root Mean Squared Error (RMSE) による定量的評価を行った。図 1 は実際の測定値を横軸に, モデルによる予測値を縦軸にプロットしたものである。 R^2 および RMSE は観測地点 (網場及び取水口付近) ごとに算出した。その結果, 決定係数は網場と取水口付近でそれぞれ $R^2=0.157$, $R^2=0.0360$ に留まった (表 1)。網場については, 8, 9 月の高濃度に発生する時期における測定値が例年に比べ低かったことが原因であると考えられた。取水口付近については, 大きく予測を外れた 2 点 (5 月 8 日及び 10 月 12 日) により精度が低く留まったと考えられる。この 2 点については, 例年とは発生時期が異なることから, 対象ダムにおける優占種とは異なる種が発生したと考えられた。これらのデータを除き再計算したところ, $R^2=0.671$, $RMSE=4.53$ となり, 予測精度が向上した。今後は, 藻類種ごとの種差を考慮したモデルについて, 階層ベイズモデル等を用いて研究を進めていく必要があると考えられる。

E. 結論

本研究では, 状態空間モデルを用いたダム湖内におけるクロロフィル a 濃度の予測モデルの構築を行った。予測には予測日の前 7 日間の気象データを用いた。取水口付近の予測について, 大きく

予測を外れた 2 点を除くことにより予測精度が向上した。今後の課題として, 藻類種差を考慮したモデルの構築が挙げられた。

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

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

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

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, 田中和明: 生物障害の発生および対策の実態, 国立保健医療科学院, 水道における生物障害に関するシンポジウム, 2013.
- 2) 馬場真哉: 時系列分析と状態空間モデルの基礎. R と Stan で学ぶ理論と実装, プレアデス出版, 2018.

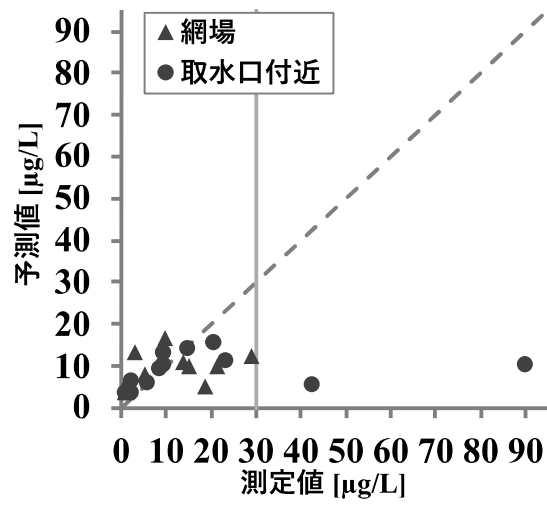


図 1 予測値-測定値プロット

表 1 決定係数 R^2 及び RMSE

	網場	取水口	取水口*
R2	0.157	0.0360	0.671
RMSE	8.48	25.6	4.53

* 5/8及び10/12のデータを除いて再計算

海外におけるアオコ等の水質汚濁対策の検証等
(導水事業の水質改善の効果および生態系への影響に関する研究)

研究分担者 柳橋 泰生

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：海外におけるアオコ等の水質汚濁対策の検証等
(導水事業の水質改善の効果および生態系への影響に関する研究)

研究分担者 柳橋 泰生 福岡大学工学部 教授

研究要旨

経済発展を遂げつつも、種々の対策により水質の改善がみられる中国に焦点をあて、導水事業による水質の改善効果と環境への影響についてとりまとめた。中国において盛んに実施されている導水事業による水質改善や環境影響に関する報告が増加している。報告の内容を整理したところ、太湖、金銀湖、滇池では概ね水質改善効果があったが、南水北調東線の途中の東興澤湖では改善されておらず、個々の条件により結果が左右されることが見て取れた。導水事業に係る研究の手法は、実測、モデルシミュレーション、景観評価、制度的考察など多岐に亘っており、昨今の中国において導水事業に対する関心が高くなっていることを窺い知ることができた。

A. 研究目的

中国では工業化・都市化が進み、急速な経済発展とともに、水汚染事故が多発し、湖沼の富栄養化、有機汚染、水量減少、生態破壊が深刻な問題になっている¹⁾。中国における湖沼等の水環境保全の特徴的な対策として導水事業がある。1949年以來137の導水事業が実施され110事業が建設済であり、2015年時点で総延長は約16,000kmに達し、350km以上のものが約4分の1を占める²⁾。著名な南水北調のように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、水質改善を目的とした導水事業も実施されている。日本でも、魅力ある身近な環境づくりに向けて、環境用水の導入が進められ、環境省により事例集が発行されている³⁾。この数年、中国における導水事業について、環境改善および生態系への影響等に関する論文が多数報告されていることから、それらの内容をまとめた。

B. 研究方法

文献データベースにおいて英文の論文については、「water diversion」をキーワードとして検索し文献を入手し、とりまとめた。中国語の論文に

ついては、中国学術雑誌全文データベースにおいて、導水事業を示す「調水」で検索し、文献を入手し、翻訳・整理した。

C. 研究結果

2007年の太湖でのアオコ大発生事件を契機に以前から行われていた長江の水を太湖に導水する「引江濟太」の水質改善効果が注目され、Huら(2008)⁴⁾、Huら(2010)⁵⁾、Liら(2011)⁶⁾により研究成果が報告された。Huら(2008)は、2002年の冬-春と2003年の夏-秋に行われた長江から太湖への2つの導水実験について、いくつかの湖区における植物プランクトン濃度、全窒素および溶存酸素の状況改善に顕著な効果があることを報告している⁴⁾。

その後、太湖と並ぶ中国における重点対策湖沼である滇池(てんち)における導水事業の効果に関する研究が進められ、Liuら(2014)⁷⁾、Zhangら(2016)²⁾により報告された。Liuら(2014)は、滇池における工事中の導水事業に関してシナリオ分析を行い、クロロフィルaの年間平均およびピーク濃度の最大削減はそれぞれ11%および5%であり、流域負荷の66%削減と導水を組み合わせ

ると、滇池の溶存酸素が低い水域の割合が 6.82% から 3.00% に改善し、水の華の発生を減少させることを報告している⁷⁾。

さらに、南水北調の中継地点となる東興澤湖に関して Wu ら (2018) により報告された⁸⁾。雨季 (4~9 月)、通常季 (10~12 月)、乾季 (1-3 月) の 3 つの季節別に東興澤湖の 4 つの測定点群の水質変化を調べたところ、通常季と雨季には影響は見いだせなかったが、乾季は、南水北調東線が富栄養化を改善しているというよりむしろ悪影響を与えていることを報告している。

2018 年には、導水事業の効果・影響に関して総括する報告が出されており、その概要は次のとおりである。Wu ら (2018) は、導水による湖沼の環境改善に関する研究のレビューを行った⁹⁾。アメリカのグリーン湖の導水事業は湖の栄養塩濃度とプランクトン含有量を著しく低下させ、富栄養化状況は明らかに改善した。玄武湖 (南京市) は水を換えることにより、効果的に水域の流動性と酸素のレベルを増加させた。導水によって、滞留時間を人工的に短縮させ藍藻の異常増殖を早く解消することができるとしている。また、引江济太、引江济巢および牛欄江-滇池導水では湖全体や一部の湖区における全窒素、全リン濃度を一定程度低減し、水質が改善されたとしている。さらに、引江济巢の導水試験では、西半湖の栄養塩濃度は増加したが、東半湖の総窒素と有機物濃度は明らかに減少したとしている。Zhang ら (2018) は、導水の放流先の水域と水源の水域について、生態 (水生生態、陸生生態) と環境 (自然環境、人文環境) に対する影響を総括した¹⁰⁾。また、導水事業が生態環境にもたらす悪影響に関して対策案を提示した。放流先の水域について、水生生態系の影響は、多様性が増加したとし、陸生生態の影響は、良い影響があったとしている。植生の被覆も向上し、農業の生態環境も改良された。水環境の影響は、自浄能力が向上し、汚染物質の分解能力が強化され、水質が改善された。土壌に対する影響は、塩基化の可能性に言及している。大気への影響としては、湿度を増加させ、降雨量を増加させるとしている。また、水源の水域について、水生生態系の影響は、生物種の変化を引き起こす可能性があり、陸生の生態影響は、良い影響より悪い影響の方が大きくなるとしている。水環境の影響としては、水量が減少し、水質が変化す

るとし、大気への影響は、湿度が低下し、降雨量が減少するとしている。

2019 年になり、中国各地の「生態調水」と称する環境改善を目的とした導水事業に関する報告が急増し、手法も多岐にわたっている。

Zhang ら (2019) は上海市の河川への導水の水質影響について研究し¹¹⁾、Huang ら (2019) は、雲南省の滇中 (雲南省) の導水工事における目標の実現可能性について報告した¹²⁾。Qu ら (2019) らは、武漢市の金銀湖の水質について MIKE 21 ソフトを使って導水事業による改善効果のシミュレーションを行った¹³⁾。Liu (2019) は、黒河流域における導水事業について、過去 20 年間の経済的、社会的、生態学的な達成状況をレビューした¹⁴⁾。Dong らは、黒河流域の導水事業によるオアシスの植生に及ぼす影響をリモートセンシング技術により評価した¹⁵⁾。Cai (2019) は、流域間の導水事業により環境への影響が発生した際の補償に関する法制度の改善について考察を行い、導水事業の規模により、国家、省、地域レベルでの法の制定・適用を図るべきことを報告した¹⁶⁾。Du (2019) は、南水北調の中央ルート第 1 フェーズである白亀山ダム貯水池への環境保全目的の導水の経験を報告した¹⁷⁾。Liao (2019) は、湖北省北部導水事業地域を対象に包括的な評価インデックスを用いた景観の評価を行い報告した¹⁸⁾。Sun (2019) は、黄河から青島への「引黄济青」について、管理部署が不明瞭であること、不法な水利用があること等の管理上の課題を列挙し、管理者の明確化等の改善策を提案した¹⁹⁾。Cao (2019) は、膠東導水の生態系の改善を目指し、現状分析を行った²⁰⁾。Jin ら (2019) は、黄河上流の南水北調の西ルート建設による堆砂問題を取り上げ²¹⁾、Zhen ら (2019) は、江漢平原の導水事業について気候変動により水位が低下した場合の影響を報告した²²⁾。

D. 考察

主要な文献について、導水事業の水質改善の効果と環境への影響に関する記述を表 1 に整理した。太湖、金銀湖や滇池では概ね水質改善効果があったが、南水北調東線の途中の東興澤湖では改善されておらず、個々の条件により結果が左右されることが見て取れる。研究手法は、実測、モデルシミュレーション、景観評価、制度的研究など多岐

に亘っており、昨今の中国において導水事業に対する関心が高くなっていることを窺い知ることができる。

中国では人口・産業と水の分布の不一致度が高く、流域を跨いだ大規模な導水事業により補正していると言える。大河と大河・湖沼を導水事業による水路で縦横に結び、水の量・質を満たしている。日本の現状とは異なるが、将来の気候変動による水賦存量の地域変化等の可能性を考慮すると、あり得る手法として注目される。

E. 結論

中国において導水事業による水質改善や環境影響に関する報告が増加している。太湖、金銀湖、滇池では概ね水質改善効果があったが、南水北調東線の途中の東興澤湖では改善されておらず、個々の条件により結果が左右されることが見て取れた。

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

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

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

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

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) Xiong Y., Wei Y., Zhang Z., Wei J., Evolution of China's water issues as framed in Chinese mainstream newspaper, *Ambio*, 2016, 45, 241-253.

2) Zhang X., Zou R., Wang Y. *et al.*, Is water age a reliable indicator for evaluating water quality effectiveness of water diversion projects in eutrophic lakes?, *Journal of Hydrology*, 2016, 542, 281-291.

3) 環境省水・大気環境局水環境課, 環境用水の導入事例集, 2007.3.

4) Hu W., Zhai S., Zhu Z., Han H., Impacts of the Yangtze River water transfer on the restoration of Lake Taihu, *Ecological Engineering*, 2008, 34, 30-49.

5) Hu L., Hu W., Zhai S. *et al.*, Effects on water quality following water transfer in Lake Taihu, China, *Ecological Engineering*, 2010, 36, 471-481.

6) Li Y., Acharya K., Yu Z., Modeling impacts of Yangtze River water transfer on water ages in Lake Taihu, China, *Ecological Engineering*, 2011, 37, 325-334.

7) Liu Y., Wang Y., Sheng H. *et al.*, Quantitative evaluation of lake eutrophication responses under alternative water diversion scenarios: A water quality modeling based statistical analysis approach, *Science and Total Environment*, 2014, 468-469, 219-227.

8) Wu Y. *et al.*, Statistical assessment of water quality issues in Hongze Lake, China, related to the operation of a water diversion project, *Sustainability*, 2018, 10, 1885.

9) Wu S., Dai J., Shi D., Progress in assessment of hydro-ecological effects in lakes induced by water diversion, *Journal of Nanchang Institute of Technology*, 2018, 37(6), 14-26(Chinese).

10) Zhang L., Fang J., The research progress of ecological environmental impact of water diversion engineering, *山東農業工程院院學報*, 2018, 35(5), 21-24(Chinese).

11) Zhang S., Wang C., Analysis of the influence of water transfer on the water quality of the river in Hongkou district, *Journal of Green Science and Technology*, 2019, 12, 115-116(Chinese).

12) Huang W., Peng W., Xiang C., Wang Z., Research on key technologies of water quantity and quality protection in inter-basin water transfer project, *Environmental Impact Assessment*, 2019, 141(6), 12-

15+32(Chinese).

13) Qu C., Qiao S., Liu B, Zou C., Numerical simulation of water diversion based on water quality Improvement: a case study on Jinyin Lake of Wuhan, Ecology and Environmental Monitoring of Three Gorges, 2019, 14(4), 9-17(Chinese).

14) Liu G., Du D., Dong G., Ponder on the major issues of ecological scheduling for water resources in the Heihe river basin, Yellow River, 2019, 41(7), 1-4+22(Chinese).

15) Dong G., Lian Y., Fan Z., Chang X., Gu J., Vegetation changes of Ejina oasis in the lower reaches of Heihe river before and after ecological scheduling for water resources, Yellow River, 2019, 41(7), 5-9(Chinese).

16) Cai H., Improvement of the legal system of inter-basin water transfer ecological compensation in China, Safety and Environmental Engineering, 2019, 26(3), 16-21(Chinese).

17) Du Y., Practice of ecological water diversion to Baiguishan reservoir in the first phase of the middle route of south-to-north water diversion project, 水利建设与管理, 2019, 6, 42-45(Chinese).

18) Liao Q., Huang S., Song L., Landscape evaluation of the northern Hubei water transfer project and its core areas based on GIS, Safety and Environmental Engineering, 2019, 26(5), 61-72(Chinese).

19) Sun B., Research and practice on optimization and promotion of Jiaodong water transfer project management, 水生态保护, 2019, 12, 49-53.

20) Cao Q., Present situation analysis and improvement measures of ecological construction of Jiaodong water transfer project, 水生态保护与管理, 2019, 11, 37-41+66(Chinese).

21) Jin W., Wang Y, Bai T, Yunyun Li, Jingtao Shi, Study on potentiality of water and sediment regulation affected by the West Route of South-to-North water transfer project in Upper Yellow River, Journal of Basic Science and Engineering, 2019, 27(06), 1189-1201 (Chinese).

22) Zhen W., Wang R., Guo W., Kong W., Wang Z., Zhao A., Influence of climate change on water transfer pattern in Jiangnan plain, Resources and Environment in the Yangtze Basin, 2019, 28(11), 2753-2762 (Chinese).

表 1 主な文献における中国の導水事業の水質改善の効果と環境への影響

文献（「題名」は仮訳）	効果	環境への影響
W. Huら ⁴⁾ 「長江導水事業による太湖の修復に対する影響」 2008	太湖の導水試験により、いくつかの湖区においてアモニウム、TNおよびDOの濃度を改善させることに顕著な効果を有する。Chl-aが最も改善された。	TPに対して、あまり影響はなかった。太湖の導水事業は緊急対策として使用できるが、そうであれば富栄養化のリスクを高めることになると考えられる。
L. Huら ⁵⁾ 「引江济太により水質への影響」 2010		引江济太は一部の湖区の改善に著しい役割を果たしたが、湖全体の水質改善効果は見られない。
Y. Liら ⁶⁾ 「長江導水事業により中国の太湖の回転率の影響モデリング」 2011	導水と風により、水質が改善できる。富栄養化状況を緩和する最もいい条件は、夏の南東風、流速は約100m ³ /sである。	
Y. Liuら ⁷⁾ 「多様な導水シナリオに湖の富栄養化反応の定量的評価：水質モデリングに基づく統計解析アプローチ」 2014	導水により、TP、TN、Chl-aのピーク濃度を低下させた。藻類の異常増殖回数を減少させた。季節により、効果が違う。雨季では藻類減少の効果が見られる。	
X. Zhangら ²⁾ 「回転率は富栄養湖における導水事業の水質効果を評価するための信頼できる指標か？」 2016	演池の導水により、T-P、T-N、Chl-aが13.5-32.2%改善されることを示した。	
Y. Wuら ⁸⁾ 「導水事業の運営に関する中国の興澤湖における水質問題の統計的評価」 2018		南水北調の東線は富栄養化を改善する効果が見られない。逆に乾燥の季節に富栄養化に悪い影響を及ぼした。
S. Wuら ⁹⁾ 「導水事業における湖の生態効果の評価研究」 2018	引江济太、引江济巢と牛欄江一演池導水は一定の程度で湖と一部の湖区の水の環境の品質を改善して、効果的に湖のT-N、T-P濃度を下げた。引江济巢の導水試験では、西半湖の栄養塩濃度が増加したが、東半湖の総窒素と有機物濃度は明らかに減少した。	
L. Zhangら ¹⁰⁾ 「導水工事の生態環境に対する影響研究」 2018	導水事業は水域の水質環境を改善した。導水先の水量が増加し、水体の自浄能力が向上した。導水でDOが増加し、水の分解能力が強くなり、水質環境が改善された。	導水事業により、導水先の一部の土壌は塩分が多くなり、引水先の湿度を低下させ、降雨量が少なくなった。
S. Zhangら ¹¹⁾ 「導水事業による虹口区河道の水質に対する水の影響の分析」 2019	導水に関わらず、河口部の過マンガン酸塩指数、アンモニウム窒素、総リン濃度は常に河川中間点の濃度より高く、春季の汚染物質濃度は夏季より高くなった。導水後、過マンガン酸カリウム指数、アンモニウム窒素、総リンは河口部で蓄積しやすく、中間点の汚染物質濃度は減少した。	
W. Huangら ¹²⁾ 「流域を越えた導水プロジェクトの水量と水質保護の主要技術に関する研究」 2019		滇中導水事業の水源とした金沙江と南盤江の水量は減少し、CODの負荷量が増加し、総負荷量の約40%を占めた。
C. Quら ¹³⁾ 「水質が改善された湖沼に基づいたシミュレーション研究：武漢市の金銀湖の事例研究」 2019	金銀湖（武漢市）を例にして、導水量の増加に伴い、金銀湖の水質指標の改善度は増加しつつあるが、増加率は低下傾向にある。	

カビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築へ向けた
全国水道水源での存在実態調査

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	江崎	敦

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ー構築へ向けた全国水道水源での存在実態調査

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 生活環境研究部 主任研究官
研究協力者 江崎 敦 国立保健医療科学院 生活環境研究部 研究生

研究要旨

カビ臭が発生した全国水源から単藻培養した藍藻類 50 株に対して、カビ臭原因物質産生藍藻類ライブラリーの構築を目標に、形態情報、16S rRNA 遺伝子解析、カビ臭物質合成酵素遺伝子解析、カビ臭原因物質産生の有無について調査を行った。ジェオスミン産生種は *Aphanizomenon* 属と *Dolichospermum* 属の計 11 株で、2-MIB 産生種は *Pseudanabaena* 属、*Phormidium* 属、*Microcoleus* 属、*Planktothricoides* 属の計 14 株が確認され、これらの形態情報について整理・比較した。そして、形態情報のみではカビ臭原因物質産生種の同定までは難しいことが示されたが、カビ臭が発生した場合の産生種を絞り込む判断に対しては、得られた形態情報は有益であることが指摘できた。

また本研究で蓄積したカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の配列情報より、水源試料を用いた遺伝子解析により早期に産生種の属レベルでの存在把握が可能であることが示唆された。また配列解析を実施した場合、2-MIB 合成酵素遺伝子については種まで同定ができる可能性を指摘した。このように顕微鏡による形態観察と遺伝子検出によるカビ臭原因物質産生種の早期存在把握の組み合わせが水源でのカビ臭原因物質産生藍藻類のモニタリングには重要となる。

A. 研究目的

湖沼の富栄養化等による水源水質の悪化に伴う藻類の異常増殖等により、水道水の異臭味被害が生じている。その中でもカビ臭発生事例は日本全国多くの事業体で確認されおり、その監視・制御が求められている。

カビ臭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、水源監視を行う上ではカビ臭原因物質産生種について形態上の特徴について整理し、顕微鏡で監視するためのカビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築が必要となる。

一方、辻ら (2018) によると *Pseudanabaena* 属の産生種/非産生種の判定には形態学的特徴では困難であり、カビ臭原因物質自体の測定やカビ臭原因物質産生に関与する遺伝子 (カビ臭原因物質合成酵素遺伝子) の検出との組み合わせが重要となると指摘している¹⁾。また *Dolichospermum* 属 (旧名称: *Anabaena* 属) についてジェオスミン合成酵素遺伝子を対象とした PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) による検出において、水源でジェオスミンが上昇する際にターゲット遺伝子が検出す

る結果を示している²⁾。このように形態学的判定が困難な場合においても遺伝子検出を応用することにより、カビ臭原因物質産生種の発生状況を早期に捉えることができる可能性がある。

以上の背景を踏まえ、本研究ではカビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築と遺伝子検出を用いたカビ臭原因物質産生藍藻類の早期把握を目的とし、以下の二項目について検討を行った。

- ・カビ臭原因物質産生藍藻類について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子の塩基配列、カビ臭産生の有無に関するデータ集積
- ・カビ臭が発生した水源でのカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出ならびに産生種同定の試み

B. 研究方法

1. 対象試料

本研究は、平成 31 年 4 月～令和元年 10 月でカビ臭が発生した水源 21 か所の試料を用いた。試料は水道事業体に協力をいただき、滅菌処理したガラス瓶またはポリ容器を用いて採水し、国立保健医療科学院へ冷蔵便にて送付した。到着後はインキュベータ (CDB-41LA: 大和冷機, 条件: 温度 20 °C, 昼白色 (照度 1000 Lux), 明暗 12 時間)

にて保存し、到着後2日以内にフィルターろ過ならびに単離作業を行った。

またカビ臭原因物質産生藍藻類の情報をより多く集積するために、国立環境研究所微生物保存施設に保有する藍藻株（以降、NIES株と記載）、水道事業体保有の藍藻株（以降、分譲株と記載）についても調査を行った。

2. カビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築

ピペット洗浄法により各試料から藍藻類の単藻を試みた。単藻株はCT培地を用いてインキュベータ（CDB-41LA：大和冷機）内で、20℃、昼白色（照度1000Lux）、明暗12時間の条件で培養を行った。そしてNIES株、分譲株と共に同条件で継代培養を行い、形態観察、遺伝子解析とカビ臭原因物質検出に供した。

形態観察は光学顕微鏡（BX60，オリンパス）にて行い、イメージングソフトウェア（cellSens，オリンパス）を用いて写真撮影および細胞計測を行った。ネンジュモ目の藍藻類については、トリコーム、栄養細胞、異質細胞、アキネートを観察し、細胞1個当たりの幅と長さ及びらせん間隔、らせん直径を計測した。ユレモ目の藍藻類については、トリコーム、栄養細胞を観察し、栄養細胞の幅と節間隔について計測を行った。また、プレパラート作成時に墨汁を添加し鞘の有無についても観察を行った。

遺伝子解析ではまず、培養液を0.8μm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³⁾、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子解析(*geoA*遺伝子、2-MIB合成酵素遺伝子)⁴⁾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。

カビ臭原因物質検出には、培養液を超純水製造装置(MilliQ A10, Millipore)で作製した超純水(以降、超純水と記載)で100倍希釈した試料を用いて、固相マイクロ抽出-ガスクロマトグラフ質量分析法(SPME-GC/MS法)によりジェオスミンと2-MIBの検出を試みた。

3. カビ臭発生水源でのカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出

水源試料100mLについて、孔径0.22μmのセルロースアセテートタイプのメンブレンフィルタ(ADVANTEC)で吸引ろ過し、藻体を捕捉し、-20℃にて冷凍保存した。その後、DNA抽出キット(DNeasy Power Water Kit または DNeasy Power Soil Kit, Gelman社)を用いて、説明書に従い、DNA抽出を行った。そして、カビ臭原因物質合成

関連遺伝子についてPCRによる増幅・精製した後、TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing, with One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher Scientific)でクローニングを行った。最後に得られたDNA試料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。

C. 研究結果およびD. 考察

1. カビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築

本調査では、50株の藍藻類が単藻培養でき、SPME-GC-MSの検出結果より、ジェオスミン産生種は*Aphanizomenon*属と*Dolichospermum*属の計11株で、2-MIB産生種は*Pseudanabaena*属、*Phormidium*属、*Microcoleus*属、*Planktothricoides*属の計14株であった。産生種について形態情報ならびに16S rRNA遺伝子の相同性解析結果に基づき、種同定を試みた。各水源で単離した代表的な産生種の情報を表1ならびに図1-17に示す。なお、形態情報による種同定において、ネンジュモ目の藍藻類判定には、*Dolichospermum*属について新山ら(2012)の判定基準⁵⁾、*Aphanizomenon*属についてKomárekら(2006)の判定基準⁶⁾を参照した。またユレモ目については、新山(2012)⁷⁾と辻ら(2018)⁸⁾の判定基準に従った。

*Dolichospermum*属において、本研究では直鎖型とらせん型の両方について産生種を獲得することができた。直鎖型については、*Dolichospermum smithii*と*Dolichospermum planctomicum*の2種類であり、形態上の差異はアキネートの形状のみであった。つまり、アキネートが形成していない場合に種を同定することは困難であると予想される。らせん型については、*Dolichospermum cilcinale*と*Dolichospermum crassum*が確認された。これら2種についてもアキネートによる差異が重要となるが、それ以外にも*Dolichospermum cilcinale*のらせん形の大きさは*Dolichospermum crassum*よりも大きい傾向にあった。

*Pseudanabaena*属においては、培養を経過した試料の観察を行うことで種ごとの微小な差異を確認可能であるが、実試料からその差異を判断するのは困難であった。また本研究では16S rRNA遺伝子解析を実施しており、*Pseudanabaena*属の種同定の2次情報として利用可能であることが明らかとなった。

Microcoleus autumnalis (旧名称：*Phormidium autumnale*)は形態上の特性と共に付着性という観点から他の種と区別が可能である。しかしながら、貯水池Iより単離された*Phormidium* sp.とは形態上の差異はわずかであった。共に2-MIB産生種であるが野生状態での形態での区別は難しいと予

想される。

続いて、同種に対する産生種、非産生種の形態上の違いについて整理する。本研究で得られた株の中で同種である中で、産生種、非産生種が存在することが確認された(図 18)。さらにこれらの区別は形態情報からは判断できないことが明らかとなった。*Pseudanabaena* 属については辻ら(2018)が指摘しており、本研究でも同様の結果が示された。そのため、産生種の判定において本研究で得られた情報は確定をもたらすものではないことが考えられる。しかし、カビ臭が発生した場合の産生種の可能性を絞り込む判断に対しては有益な情報であるといえる。

続いて、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子の解析について検証する。*geoA* 遺伝子の系統樹を図 19 に 2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹を図 20 に示す。*geoA* 遺伝子については *Dolichospermum* 属自体は種ごとにほとんど配列に差異はなく、*geoA* 遺伝子により種判定が難しいことが指摘できる。一方、データベースから取得した *Aphanizomenon* 属とは差異があるため、遺伝子検出により属レベルでの判定ができる可能性が考えられる。また、本研究で新たにデータベースに加えられたジェオスミン産生の *Oscillatoria* 属、*Phormidium* 属は付着性の特徴を有している。近年、日本で付着性藍藻によるジェオスミン産生によるカビ臭問題はあまり取り上げられていないが、今後の拡大の可能性も考慮し遺伝子、カビ臭原因物質産生能などに関する情報を収集していく必要があるといえる。

2-MIB 合成酵素遺伝子については、本研究により配列情報を充実させることに成功した。その結果、遺伝子配列情報により *Pseudanabaena* 属、*Microcoleus* 属、*Planktothricoides* 属で大きく区分けができ、2-MIB 合成酵素遺伝子の検出で属判定ができる可能性がある。しかしながら、*Dolichospermum* 属と同様に種判定までは難しいと考えられる。*Microcoleus* 属に配列情報が近い *Oscillatoria* 属、*Phormidium* 属については形態情報も含め、情報の蓄積が課題となる。

以上より、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子の相同性解析により属判定までは可能であることが明らかとなったが、属判定であれば顕微鏡観察で可能であることから、本解析を産生種同定に使用することの有用性は低いといえる。一方、本調査によりカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の配列情報を多く蓄積することができたことから、この配列情報を利用して、属レベルでの遺伝子検出系を構築し、早期モニタリングへの適用が今後の展開として望まれる。

2. カビ臭発生水源でのカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出

各水源試料でのカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の検出結果と単離した産生種が保有する遺伝

子検出結果はほぼ一致した(表 2)。その中でも水源試料から対象遺伝子が検出したが、単離培養株からは産生種を確認できなかったケースがある。その可能性としては、試料中の産生種存在数が少なく、ピペット洗浄法では回収できなかったことが考えられる。水源試料からの遺伝子解析では試料 100 mL を利用する一方でピペット洗浄法では数 mL しか利用しない。この点を考慮した場合、カビ臭原因物質産生種の早期検出には、試料量を多く設定できる遺伝子検出が有用であるといえる。

最後に水源試料から検出したカビ臭合成酵素遺伝子の配列情報から、産生種の同定を試みた(図 19,20)。その結果、*geoA* 遺伝子については *Dolichospermum* 属までの判定となった。一方、2-MIB 合成酵素遺伝子については、各水源試料から得られた遺伝子配列と単離培養株の遺伝子配列がほぼ一致する結果となり、本研究で遺伝子データベースを構築したことから、本データベースを用いれば 2-MIB 合成酵素遺伝子の配列情報から種同定が可能であることが示唆された。これは培養よりも早く判定できることから、産生種同定のサポート情報として有用であるといえる。

以上、本研究にてカビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築ならびに関連物質合成遺伝子の配列情報の蓄積に成功した。水源での監視において本研究で得られた情報を活用し、顕微鏡による形態観察と遺伝子検出によるカビ臭原因物質産生種の早期存在把握の組み合わせによりカビ臭原因物質産生藍藻類のモニタリングが今後重要となる。

E. 結論

カビ臭が発生した水源を対象として、単藻培養できた藍藻類 50 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い、カビ臭原因物質産生藍藻類ライブラリーの構築を試みた。その結果、ジェオスミン産生種は *Aphanizomenon* 属と *Dolichospermum* 属の計 11 株で、2-MIB 産生種は *Pseudanabaena* 属、*Phormidium* 属、*Microcoleus* 属、*Planktothricoides* 属の計 14 株が産生種であることが確認された。その中で産生種と非産生種の形態が類似するケースが確認されたが、カビ臭が発生した場合の産生種を絞り込む判断に対しては、本研究で得られた情報は有益であることが指摘できた。

また本研究で蓄積したカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の配列情報より、水源試料を用いた遺伝子解析により早期に産生種の属レベルでの存在把握が可能であることが示唆された。また配列解析を実施した場合、2-MIB 合成酵素遺伝子については種まで同定ができ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

浅田安廣, 藤本尚志, 井上拓也, 秋葉道宏. 遺伝子解析に基づいた水環境中のカビ臭原因物質産生藍藻類同定の試み. 2019.11.6-8 日; 函館. 令和元年度全国会議(水道研究発表会)講演集. 242-243.

江崎敦, 浅田安廣, 藤本尚志, 田中美帆, 早坂泰彦, 鈴木孝俊, 山田晃平, 秋葉道宏: 全国水道水源を対象としたカビ臭原因物質産生藍藻類の同定. 第54回日本水環境学会年会; 2020年3月; 盛岡. 同講演集. p.123. (学会中止, 誌上发表)

野口暁生, 横井貴大, 船岡英彰, 小倉明生, 浅田安廣: 琵琶湖で発生した *Anabaena* 属の形態的特徴による種分類及びカビ臭産生能評価の試み. 第54回日本水環境学会年会; 2020年3月; 盛岡. 同講演集. p.367. (学会中止, 誌上发表)

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) 辻 彰洋, 新山 優子 (2018) *Pseudanabaena* 属 (シアノバクテリア) の分類とカビ臭産生の判別

形質, 日本水処理生物学会誌, 54(4), 115-120.

2) 平健司, 矢野留実子 (2019) 浄水場原水中の藍藻類のかび臭産生関連遺伝子の検出方法の検討, 水道協会雑誌, 88(12), 3-9.

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

4) Suurnäkki S, Gomez-Saez GV, Rantala-Ylinen A, Jokela J, Fewer DP, Sivonen K (2015) Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds, Water Res., 68, 56-66.

5) 新山 優子, 辻 彰洋 (2012) 藍藻ネンジュモ目の浮遊性種の分類学的変更と類似種の比較, 陸水学雑誌, 74(3), 153-164.

6) Komárek J, Komárková J (2006) Diversity of Aphanizomenon-like cyanobacteria, Czech Phycology, 6, 1-32.

7) 新山優子 (2012) 藍藻類ユレモ目の新分類体系の紹介, 陸水学雑誌, 73(3), 187-196.

J. 謝辞

水道原水をご提供いただいた全国の水道事業者及び藍藻類試料を提供いただいた国立環境研究所に謝意を表す。また, 本研究の一部は国立保健医療科学令和元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仙台市水道局早坂泰彦氏, 水戸市上下水道局山田晃平氏, 川崎市上下水道局鈴木孝俊充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 本研究で得られた代表的なカビ臭原因物質産生藍藻類のまとめ

発生水源	属	種	トリコーム	栄養細胞	異質細胞	アキネート	さや	浮遊性/付着性	臭気検出 (GCMS)
湖沼A	<i>Aphanizomenon</i>	<i>gracile</i>	直線	楕円	楕円	長楕円	無	浮遊性	geosmin
湖沼B	<i>Aphanizomenon</i>	<i>gracile</i>	直線	円筒	楕円	長楕円	無	浮遊性	geosmin
ダムD	<i>Dolichospermum</i>	<i>smithii</i>	直線	球・樽	球	球	有(粘質)	浮遊性	geosmin
ダムE	<i>Dolichospermum</i>	<i>crassum</i>	規則らせん	球・樽	なし	長楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
貯水池J	<i>Dolichospermum</i>	<i>planctonicum</i>	直線	球・樽	球	楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
貯水池J	<i>Dolichospermum</i>	<i>circinale</i>	規則らせん	球・樽	球	楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
湖沼N	<i>Dolichospermum</i>	<i>circinale</i>	不規則らせん	球・樽	なし	楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
貯水池K	<i>Dolichospermum</i>	<i>crassum</i>	規則らせん	球・樽	球	楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
貯水池K	<i>Dolichospermum</i>	<i>planctonicum</i>	直線	球・樽	球	楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
湖沼B	<i>Pseudanabaena</i>	<i>limnetica</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	浮遊性/付着性	2-MIB
湖沼C	<i>Pseudanabaena</i>	<i>sp.</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	付着性	2-MIB
貯水池I	<i>Phormidium</i>	<i>sp.</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	有(堅い)	付着性	2-MIB
湖沼L	<i>Pseudanabaena</i>	<i>foetida</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	有(粘質)	付着性	2-MIB
湖沼O	<i>Planktothricoides</i>	<i>raciborskii</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	浮遊性	2-MIB
ダムP	<i>Pseudanabaena</i>	<i>yagii</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	付着性	2-MIB
河川Q	<i>Microcoleus</i>	<i>autumnalis</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	付着性	2-MIB
河川R	<i>Microcoleus</i>	<i>autumnalis</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	付着性	2-MIB

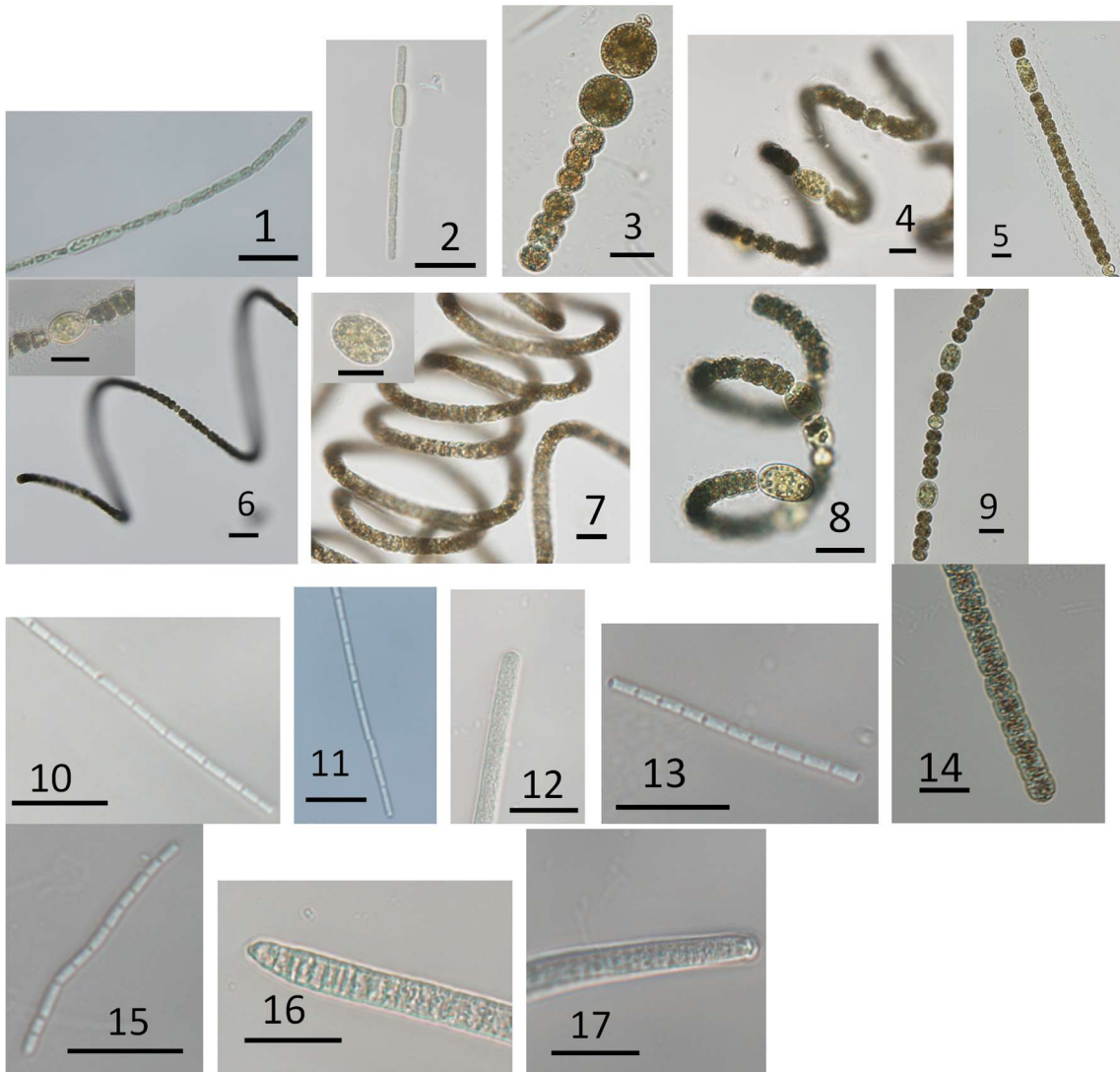


図1 湖沼 A *Aphanizomenon gracile*, 図2 湖沼 B *A. gracile*, 図3 ダム D *Dolichospermum smithii*, 図4 ダム E *D. crassum*, 図5 貯水池 J *D. planctonicum*, 図6 貯水池 J *D. circinale*,
 図7 湖沼 N *D. circinale*, 図8 貯水池 K *D. crassum*, 図9 貯水池 K *D. planctonicum*,
 図10 湖沼 B *Pseudanabaena limnetica*, 図11 湖沼 C *Pseudanabaena* sp.,
 図12 貯水池 I *Phorumidium* sp., 図13 湖沼 L *Ps. foetida*, 図14 湖沼 O *Planktothricoides raciborskii*,
 図15 ダム P *Ps. yagii*, 図16 河川 Q *Miclocoleus autumnalis*,
 図17 河川 R *M. autumnalis*

注：バーは図7（アキネート拡大写真は20 μm）のみ50 μmでそれ以外は20 μm

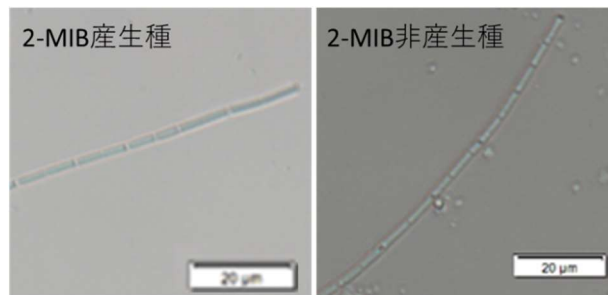
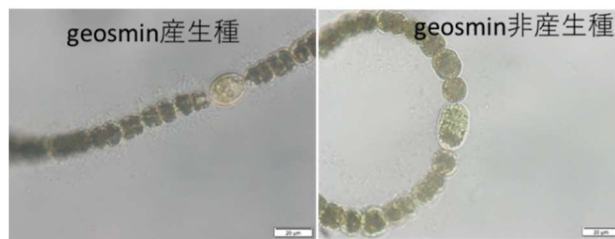
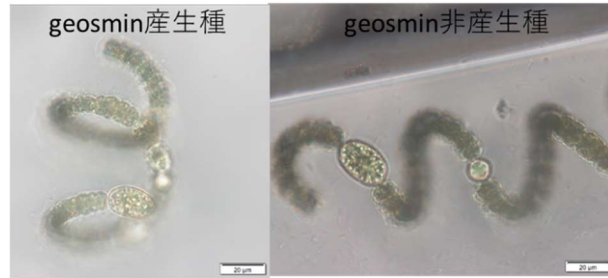


図 18 同水源におけるカビ臭産生種，非産生種比較

775塩基に基づいて作成

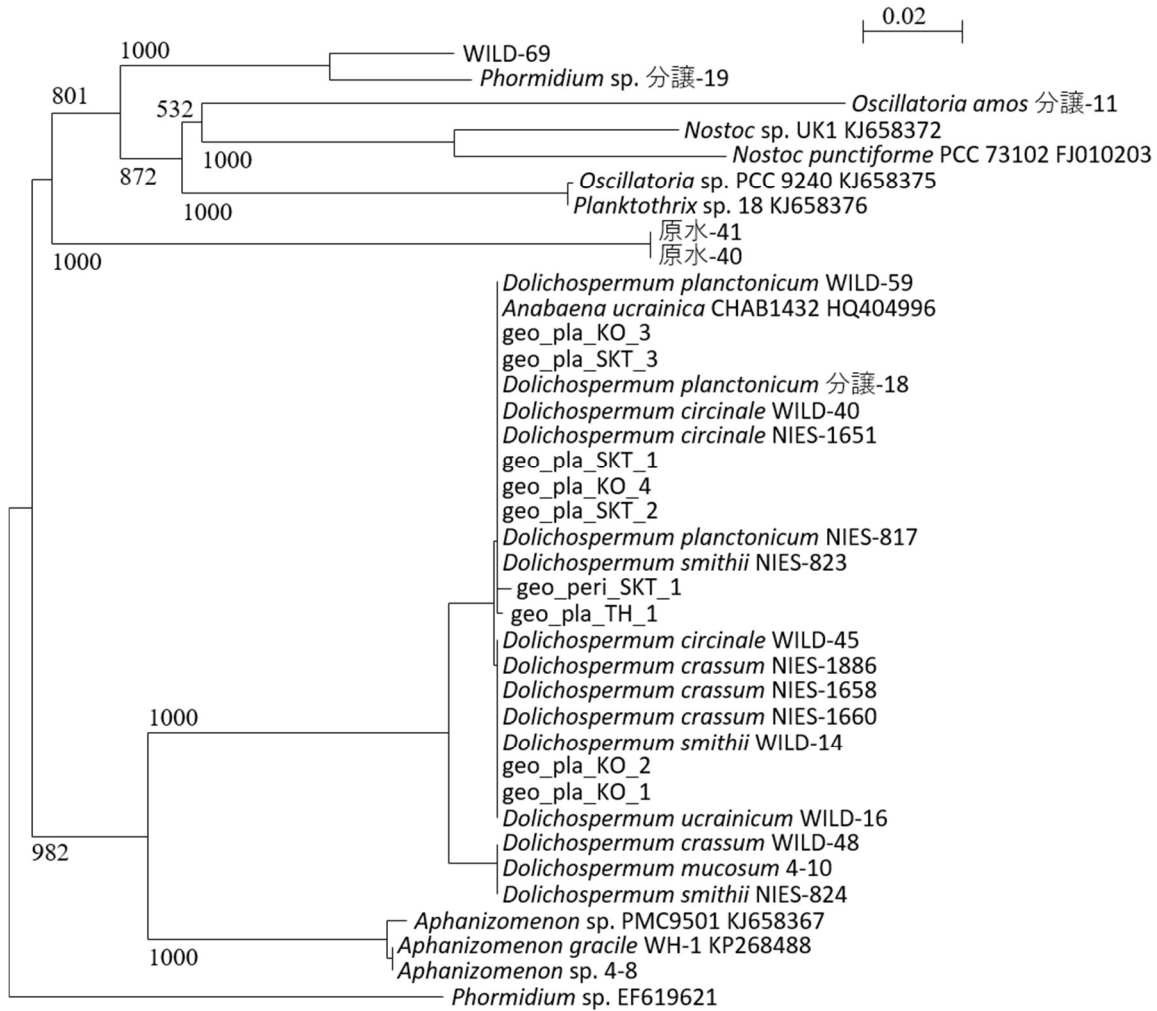


図 19 *geoA* 遺伝子に基づく系統樹

649塩基に基づいて作成

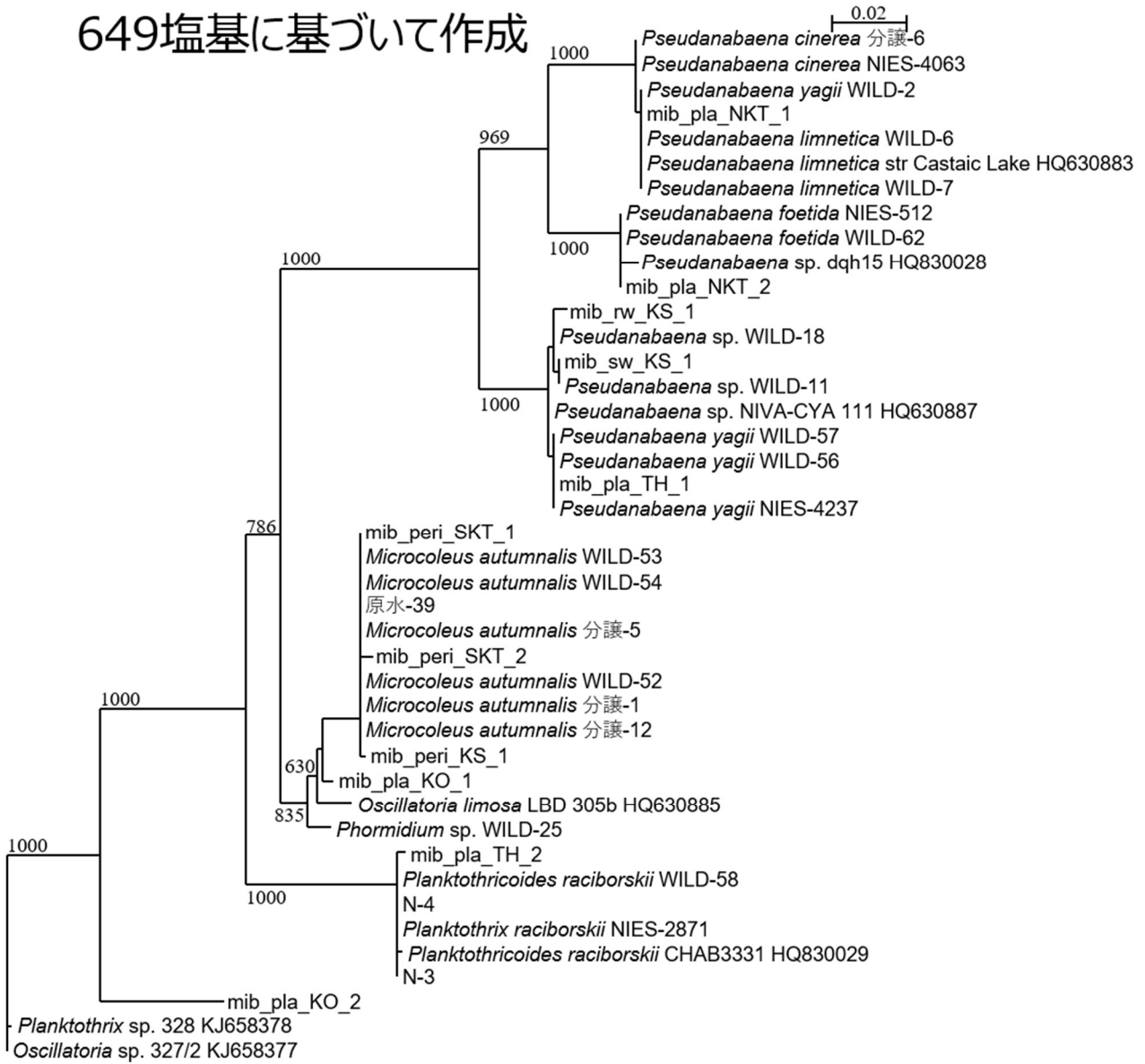


図 20 2-MIB 合成酵素遺伝子に基づく系統樹

表 2 各水源試料でのカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の検出結果

採水 地点	遺伝子検査		単離培養株	
	<i>geoA</i>	2-MIB	名称	保有遺伝子
湖沼C	—	+	<i>Pseudanabaena sp.</i>	2-MIB
ダムD	+	—	<i>Dolichospermum smithii</i>	<i>geoA</i>
ダムE	+	—	<i>D.crassum</i>	<i>geoA</i>
ダムF	—	+	単離培養株無し	
河川G	+	—	<i>D.pseudocompuctum</i>	非検出
河川H	—	+	<i>Phormidium sp.</i>	2-MIB
貯水池I	—	+	<i>Phormidium sp.</i>	2-MIB
貯水池J	+	—	<i>D.planctonicum</i>	<i>geoA</i>
			<i>D.circinale</i>	<i>geoA</i>
貯水池K	+	+	<i>D.crassum</i>	<i>geoA</i>
			<i>D.planctonicum</i>	<i>geoA</i>
湖沼L	—	+	<i>Pseudanabaena foetida</i>	2-MIB
河川M	—	+	<i>Pseudanabaena subfoetida</i>	非検出
湖沼N	+	+	<i>D.circinale</i>	<i>geoA</i>
湖沼O	+	+	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	2-MIB
ダムP	—	+	<i>Pseudanabaena yagii</i>	2-MIB
河川Q	—	+	<i>Microcoleus autumnalis</i>	2-MIB
河川R	—	+	<i>Microcoleus autumnalis</i>	2-MIB
貯水池S	—	+	<i>D.affine</i>	非検出
			<i>D.lemmermannii</i>	非検出
河川T	—	+	単離培養株無し	
湖沼U	—	—	<i>Aphanizomenon gracile</i>	非検出

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 京都大学大学院 工学研究科 准教授

研究要旨

水中の DOM の組成やその変化を Orbitrap 質量分析計を用いて精密質量分析する場合に、感度（シグナル強度）と平等性（親水性と考えられる物質回収状況）の観点からは固相抽出よりも乾燥濃縮が優れていることを示した。また、炭素量の回収率もこの結果を支持するものであった。ただし、固相抽出による場合も、疎水性化合物のみが回収される等の極端なバイアスが存在することはなく、検体数が多い場合、塩分濃度が高い場合、あるいは高い濃縮倍率が要求される場合においては固相抽出法も選択肢となりうると考えられた。

A. 研究目的

溶存有機物 (Dissolved Organic Matter, DOM) は水中に含まれる有機物群のうち溶存態のものの総称で、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も期待できる。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。一方で、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。このような状況を踏まえ、昨年度は精密質量分析を各種の水道原水に適用し、溶存有機物のパタンから水源のタイプが判別できること等を示した。

本年度は、DOM の精密質量分析において必要な前処理プロセスである濃縮操作について、濃縮方法の中でも特に用いられることの多い固相抽出と窒素吹付けによる乾燥濃縮について、全有機炭素 (Total organic carbon; TOC) の回収率、組成の変化 (濃縮の平等性) の 2 点の観点から比較を行った。

B. 研究方法

1. 試料及実験の構成

試料は実際の浄水場の急速ろ過水を用いた。まず、十分な感度が得られる試料の濃縮倍率について、TOC 回収率と Orbitrap 精密質量分析計を用いた精密質量スペクトルの 2 点に基づき検討を行った。次に、乾燥濃縮を行った試料と固相抽出を用いた濃縮を行った試料について比較を行った。この比較においても、TOC 回収率と Orbitrap 精密質量分析計を用いた検出結果の 2 つの観点から検討を行った。

2. 固相抽出

本研究では、近年溶存有機物の濃縮のための固相抽出のカートリッジとして一般的に用いられている逆相系のカートリッジである Bond Elut PPL カートリッジ (500 mg, 3 mL; アジレント・テクノロジー) を用いた。具体的な固相抽出の手順は以下通りである。まず 10 mL のメタノールを約 1 mL/min で通液し、その後 1M HCl 20 mL を約 1 mL/min で通液することでコンディショニングを行った。次に塩酸を用いてサンプルの pH を 2 に調整した。そして、コンセントレーター (CHRATEC SPC10 シリーズ, Waters) を用いてこのサンプル (0.1 L, 0.2 L, または 1.0 L) を 20 mL/min で通水した。その後、カートリッジの内部を洗浄するために 20 mL の 1M HCl を約 1 mL/min で通液し、この後カートリッジに保持された DOM を脱離するために、10 mL のメタノールを約 1 mL/min で通液した。DOM はこの 10 mL のメタノール中に回収されている。これの TOC を測定する場合は窒素吹き付け式試験管濃縮装置 (Dry Thermo Bath MG-2000; EYELA) を用いて蒸発・乾固を行った後に MQW に再溶解した。精密質量分析を行う場合

は濃縮後の試料（脱離後のメタノール溶液）を直接分析した。

3. 乾燥濃縮

窒素吹き付け式試験管濃縮装置(Dry Thermo Bath MG-2000; EYELA)を用いて試料に窒素を吹き付けながら温度を 40 °C 前後に保ち濃縮を行った。窒素は窒素ガス発生装置 (Model24F; システム・シンスツルメンツ)を用いて生成した。100 倍濃縮においては 10 mL の 5 つの試料を用意し、それぞれ 2 mL まで濃縮した後混合し、合計 10 mL の試料をさらに 0.5 mL まで濃縮した。20 倍の濃縮については、10 mL の試料を 0.5 mL まで濃縮した。10 倍濃縮においては 10 mL の試料を 1 mL まで濃縮した。

乾燥濃縮をおこなったそれぞれのサンプルを TOC 測定に用いる場合は、希釈後の倍率が 1 倍となるように希釈を行った。また精密質量分析に用いる場合は濃縮したサンプルをそのまま用いて分析を行った。

4. 精密質量分析

精密質量分析には Orbitrap 質量分析計(Q Exactive Focus, Thermo Fisher Scientific)を使用した。イオン化法は ESI のネガティブモードを用いて行った。サンプルの注入には付属の HPLC のポンプとオートサンプラーを用い、水とメタノールがそれぞれ 50%となるように 200 μ L/min にて送液している状態で、20 μ L 注入した。ただし、カラムによる分離は行わず、ランタイム（一回の分析時間は 10 分とした）。また、分解能は 70,000 で、スキャン範囲を $m/z=100-1500$ に設定して測定を行った。

イオン化条件の最適化最適化にあたっては、PPL カートリッジにより 100 倍濃縮したろ過水試料を用いて、スプレー電圧とキャピラリー温度の 2 点について検討した。スプレー電圧は 2.5, 3.5, 4.5kV の三段階で検討し、キャピラリー温度については 250 および 400 °C の二段階で検討を行った。最適化後の分析条件を表 1 に示す。

C. および D. 研究結果及び考察

1. 精密質量分析における DOM 分析に適した濃縮倍率の検討

PPL カートリッジを用いて、10 倍、20 倍、100 倍に濃縮をした対象試料（ろ過水）を TOC 測定、精密質量分析の二つの結果から、分析に適した濃縮倍率を検討した。

PPL カートリッジを用いて濃縮をした対象試料の TOC 測定結果を以下の表 2 に示す。また対象試料の濃縮を行わない場合の TOC は 0.97 mg/L であった。濃縮倍率が高くなるにつれて、TOC 回収率にはやや低下が見られるが、回収率は 60%前後と考えることができる。また、MQW でも 0.2 mg/L

程度のブランク値があることに注意が必要である。

次に上記試料の精密質量分析の結果を図 1 および 2 に示す。またここでは前述の通りキャピラリー温度、スプレー電圧についてはそれぞれ 400 °C, 4.5 kV とした。また、解析の段階ではピークエリアが 500000 以上のものを対象とした。

10 倍濃縮を行った対象試料と、100 倍濃縮を行った対象試料との比較において、10 倍濃縮の方がピークエリアの大きい物質も多々見受けられる。しかし、そのほとんどは有意水準が 10%以下のものである（図 1 において有意水準 10%のラインに線を引いてある）。それとは対照的に、100 倍濃縮では 10 倍濃縮と比較してピークエリアの大きくかつ有意水準も高い物質が多く検出されていることがわかる（左上の領域にプロットが多いことに対応）。このことから、10 倍濃縮よりも 100 倍濃縮の方が、より多くの物質を検出でき、濃縮倍率が高いほうが望ましいと考えることができる。

次に、20 倍濃縮を行った試料と 100 倍濃縮を行った試料を比較した。有意水準 10%に線を引き、これを基準に考えると、100 倍濃縮と 20 倍濃縮で検出できる物質の数に差が見られることがわかる。また有意水準 10%以上について考えると、20 倍濃縮において 100 倍濃縮よりもピークエリアが 2 倍以上となる物質が 5 つであるのに比べ、100 倍濃縮において 20 倍濃縮よりもピークエリアが 2 倍以上となる物質は 17 個検出された。このように低倍率では検出することのできない物質が数多く見られたため、本研究では濃縮倍率を 100 倍に設定した。また、これ以上の通水量の増大は必要とする試料量が大きくなり作業時間を要することとなる。このことから、これ以上の濃縮倍率についての検討は行わず、100 倍を基本的な濃縮倍率とし以降の検討を行った。

2. 濃縮方法の比較

まず、回収率を比較するために 100 倍濃縮時の TOC の値（注：濃縮倍率で割り戻した値）を比較する。PPL カートリッジを用いた濃縮における回収率の平均が 53.5%であるのに対し、乾燥濃縮を行った場合の回収率の平均は 99%であり、回収率は乾燥濃縮を用いた場合の方が高いことがわかる。

次に、乾燥濃縮後のサンプル内の組成について精密質量分析で分析した。図 3 が乾燥濃縮と PPL カートリッジを用いた 100 倍での濃縮を差異解析により比較したものである。乾燥濃縮後のサンプルは PPL カートリッジを用いた濃縮後のサンプルよりも多くの物質が検出されていることがわかる（左上に検出される分子が多いことに対応）。

さらに、乾燥濃縮および PPL カートリッジを用いて 100 倍濃縮したサンプルのマスペクトルを

比較した(図4および5)。強度自体は乾燥濃縮後のサンプル方が数倍強いものの、 m/z が数百の位置に最大値をとる溶存有機物に特徴的なスペクトルの概形は両者でおおよそ一致している。このことから、乾燥濃縮で無機物同時に濃縮されてもイオン化の阻害はそれほど強くないことわかる。あわせて m/z が500以上の範囲について拡大した精密質量スペクトルを図6および7にまとめた。乾燥濃縮を行ったサンプルのみ、 m/z が900-1500の範囲でピークが観察された。このことから、乾燥濃縮において物質の変性や汚染発生し可能性が考えられる。もしくはPPLカートリッジを用いた濃縮において高分子の物質が保持されなかった可能性や、保持はされたが離脱されなかった可能性が考えられる。ここでブランク試験としてそれぞれの濃縮法を、淀川急速ろ過水を濃縮した手順と同じ方法でMQWを用いて行った。その結果、いくつかのシグナルはブランク試料に含まれることがわかったが、対象試料を乾燥濃縮した場合に検出されたピークのうち多くが、ブランク試験では検出されなかった。したがって対象試料について乾燥濃縮を行ったサンプルについて検出されたマススペクトルは実際に対象試料に由来するものであるといえる。逆にPPLカートリッジを用いた濃縮で特に m/z が900-1500の範囲でピークが検出できなかったのは、その範囲のDOMをPPLカートリッジでは濃縮できないためと解釈できる。

次に検出された分子組成について考察を行った。上述の条件で乾燥濃縮とPPLカートリッジを用いて100倍濃縮を行った試料の精密質量分析結果をMQWの精密質量分析結果と比較し、有意水準5%以下で2倍以上増加している物質の組成について探索した。その結果乾燥濃縮を行った後の試料では82個、PPLカートリッジを用いた濃縮では26個が条件を満たした。条件を満たした分子の組成比を図8および9に示す。親水性化合物はアミノ基やカルボキシル基といった官能基を有すると考えられるため、疎水性の物質と比較してN/CやO/C比が大きくなる。また一方で疎水性化合物はH/C比が大きくなることが考えられる。図11より、乾燥濃縮の方が多くのO/C比が高い物質、つまり親水性物質を検出していることがわかる。ただし、PPLによる濃縮であっても、同等

のO/C比の物質を検出しており、PPLが疎水性の物質のみを多く回収するといった極端なバイアスは認められなかった。以上のことから、乾燥濃縮はPPLカートリッジを用いた濃縮よりも有機物の回収率が高く、共存する塩分による阻害も少なく、平等かつ高感度で濃縮できる方法であることが明らかになった。今後の課題としては、塩分等の共存物質による解析の妨害(例えばアダクトの生成など)の評価が挙げられる。

E. 結論

水中のDOMの挙動をOrbitrap質量分析計を用いて精密質量分析する場合に、感度と平等性の観点からは乾燥濃縮が優れていることを示した。ただし、乾燥濃縮は作業時間を要するため、高感度分析や親水性が高い物質に注目する場合は、乾燥濃縮が良いが、PPLでも一定程度親水性物質も回収できており、試料量が必要な解析や実験を併用する場合にはPPLを用いることが適切な場合もあると考えられた。

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

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

表 1 分精密質量分析の条件

LC部		MS部	
機種	UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific)	機種	Q Exactive Focus
移動相	A液：MQW B液：メタノール	スキャンタイプ	Full MS
溶離条件	アイソクラティック (A,B液 50%)	ランタイム (分)	5
注入量 (μL)	20	イオン化法	HESI-
流量 (μL/分)	200	スキャン範囲	100-1500
分離カラム	なし	解像度	70000
		スプレー電圧 (kV)	4.5
		キャピラリー 温度 (°C)	400

表 2 PPL カートリッジによる回収率

濃縮倍率	MQW (mg/L)	ろ過水 (mg/L)	回収率 (%)
10 倍	0.248	0.857	63%
20 倍	0.274	0.853	60%
100 倍	0.215	0.751	55%

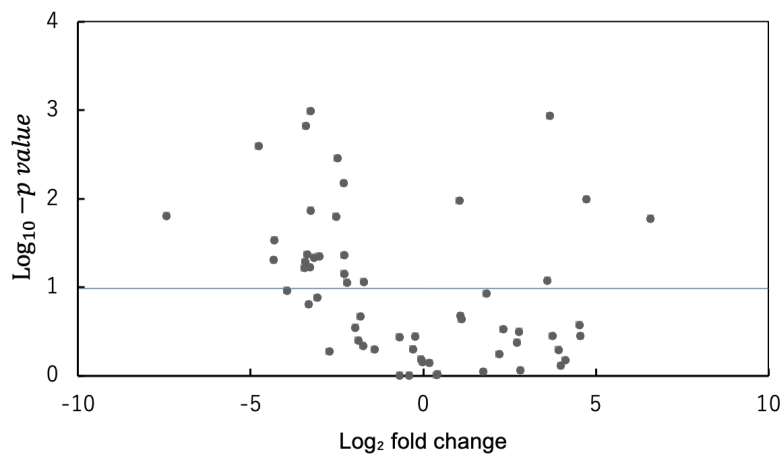


図 1 10 倍濃縮と 100 倍濃縮の比較（左側（横軸が負）のプロットは 100 倍の方が大きく、右側（横軸が正）のプロットは 10 倍の方が大きく検出されたシグナルを意味する。横線は有意水準 10% に対応）

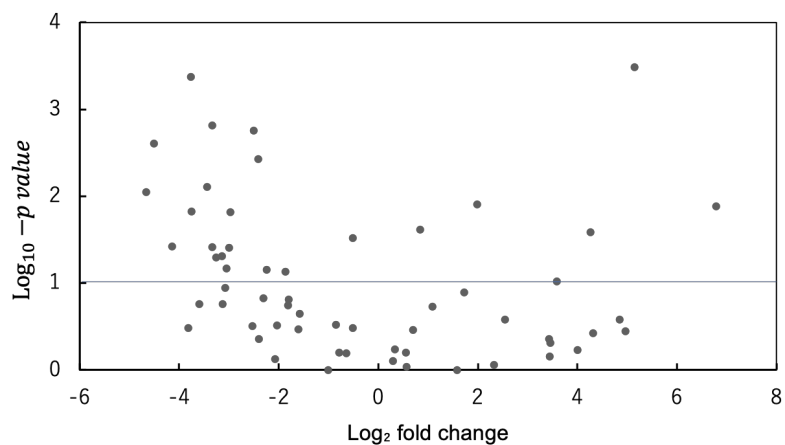


図2 20倍濃縮と100倍濃縮の比較（左側（横軸が負）のプロットは100倍の方が大きく、右側（横軸が正）のプロットは20倍の方が大きく検出されたシグナルを意味する。横線は有意水準10%に対応）

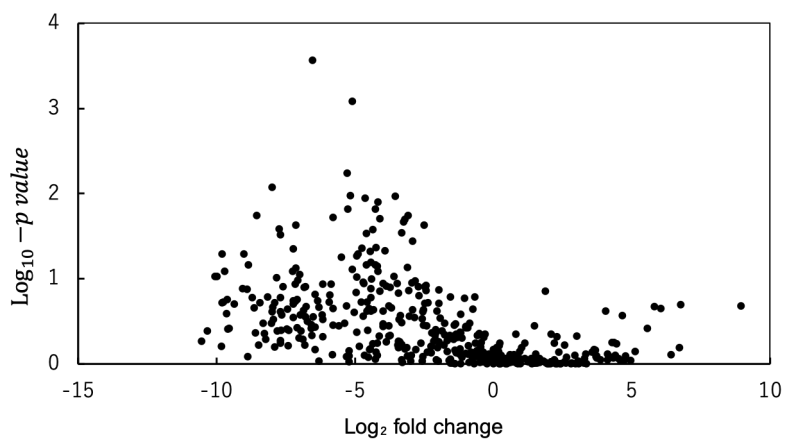


図3 PPLカートリッジを用いて100倍濃縮した試料と乾燥濃縮により100倍濃縮した試料の検出状況の比較（左側（横軸が負）のプロットは乾燥濃縮の方が大きく、右側（横軸が正）のプロットは固相抽出の方が大きく検出されたシグナルを意味する）

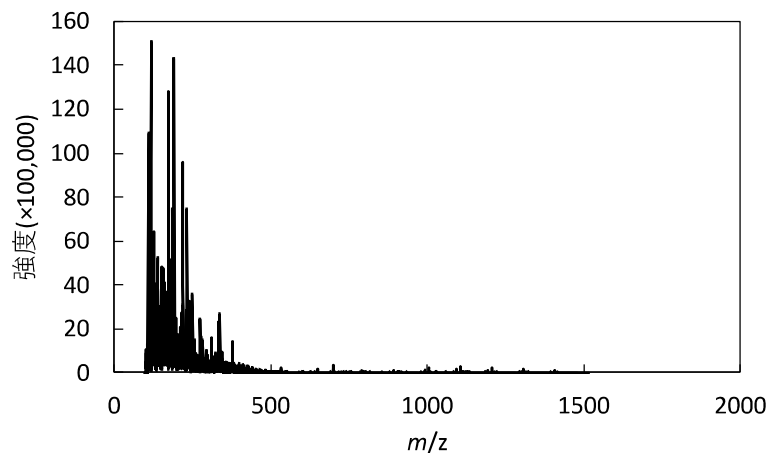


図4 PPLカートリッジによる濃縮後試料の精密質量スペクトル

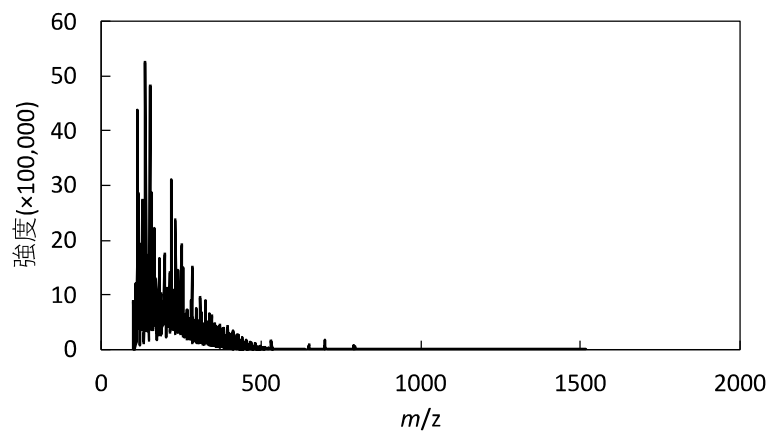


図5 乾燥濃縮による濃縮後試料の精密質量スペクトル

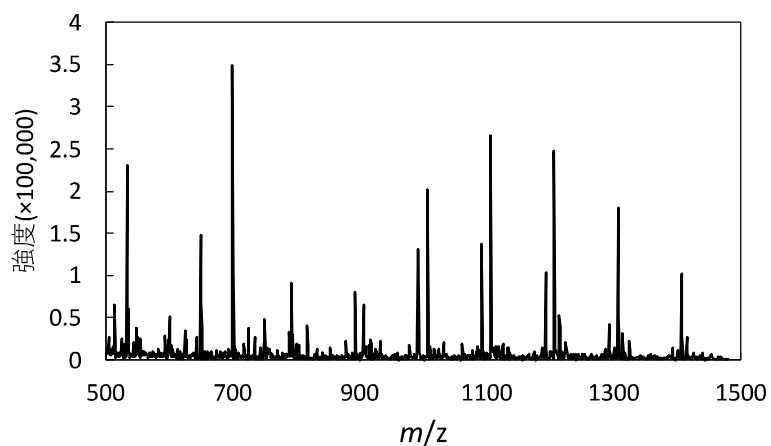


図6 乾燥濃縮による濃縮後試料の精密質量スペクトル(m/z > 500)

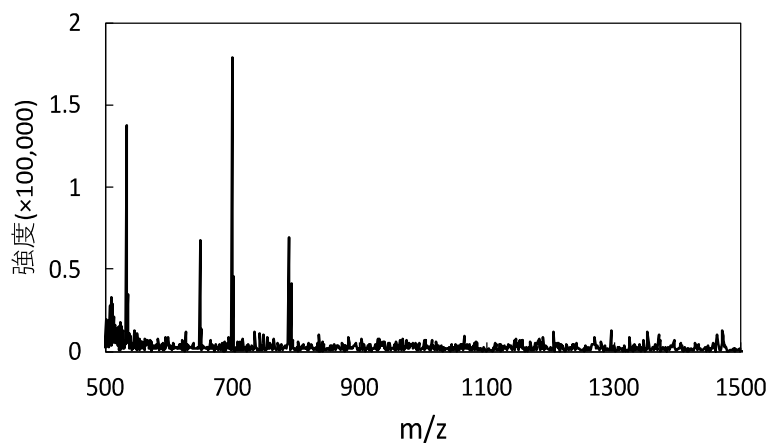


図7 PPL カートリッジによる濃縮後試料の精密質量スペクトル(m/z > 500)

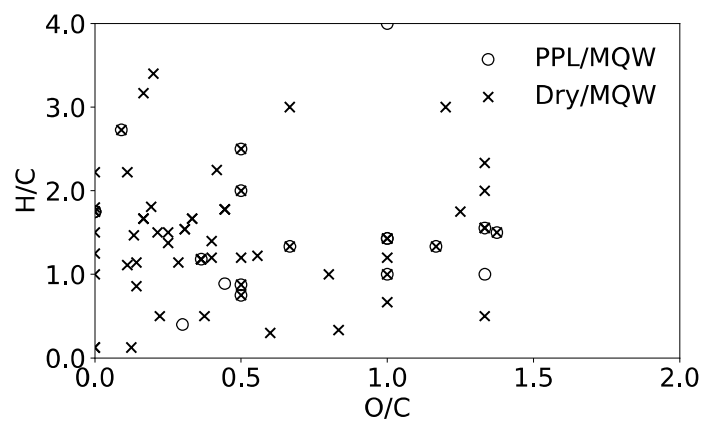


図8 検出された各 m/z の O/C 比と H/C 比 (PPL/MQW: 固相抽出による試料と超純水ブランクを比較して検出された m/z, Dry/MQW: 乾燥濃縮による試料と超純水ブランクを比較して検出された m/z)

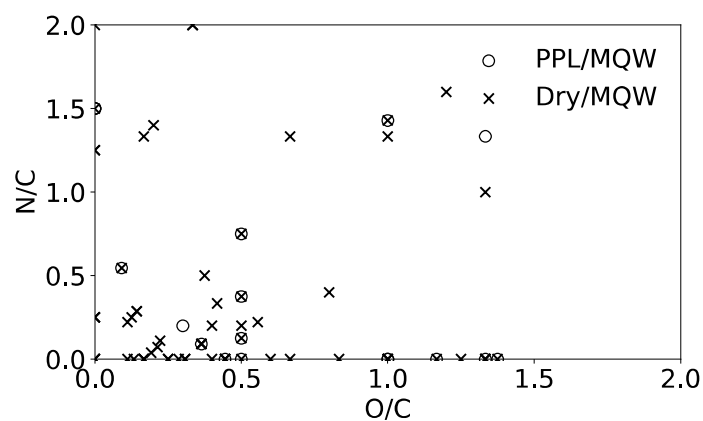


図9 検出された各 m/z の N/C 比と H/C 比 (PPL/MQW: 固相抽出による試料と超純水ブランクを比較して検出された m/z, Dry/MQW: 乾燥濃縮による試料と超純水ブランクを比較して検出された m/z)

粉末活性炭による 2-MIB 吸着に対する競合有機物成分の推定

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	浅田	安廣
研究協力者	神里	良太

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：粉末活性炭による 2-MIB 吸着に対する競合有機物成分の推定

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 浅田 安廣 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 神里 良太 国立保健医療科学院 生活環境研究部 研究生

研究要旨

粉炭処理による 2-MIB 非平衡吸着に対する競合有機物成分を推定することを目標とし、本研究では標準試料を用いて粉炭処理による 2-MIB 非平衡吸着に競合吸着する物質群候補を明らかにすることを目的とした。

腐植物質（フミン酸、フルボ酸）、アミノ酸、糖類の標準試料を用いて粉炭処理による 2-MIB 非平衡吸着試験を行ったところ、2-MIB 除去率の低下について同程度の DOC 濃度ではフルボ酸の影響が大きいことから、2-MIB 吸着においてフルボ酸が競合吸着物質の 1 つであることが確認できた。特に分画したフルボ酸の 1 kDa 未満の低分子物質は強い競合吸着作用を示すことが示された。

また水道原水より分画した腐植画分試料、非腐植画分試料での 2-MIB 除去率を評価した結果、各画分共に同程度の競合吸着影響があることが確認された。そして、いずれの画分においてもフミン酸様蛍光物質とフルボ酸様蛍光物質が 2-MIB 吸着競合に影響を及ぼしていることが示された。

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に関連する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。しかし、水道原水中の様々な天然有機物（NOM）との競合吸着を考慮する必要がある。

活性炭による有機物の競合吸着に関する取り組みとして、活性炭処理に対してフミン質が競合吸着により微量有害有機物の除去を著しく低下させることが確認されている¹⁾。また Matsui によると微粉炭処理において 2-メチルイソボルネオール(2-MIB)との競合吸着する物質群として、天然有機物(NOM)は紫外線吸収部分がある分子量 230 Da 未満の物質群を指摘している²⁾。そして 2-MIB 吸着に対する水道原水中の競合中着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³⁾ならびに非平衡吸着⁴⁾に対する原水中溶存有機物の影響を一斉調査し、2-MIB 吸着量の低下を確認した。そして、3次元蛍光分析 (EEM) の結果、競合吸着に寄与する溶存有機物群としてフルボ酸様蛍光物質が指摘された^{3,4)}。

これらの情報より、粉炭処理による 2-MIB 除去を低下させる有機物群の特徴として、分子量、紫外線吸収部分の存在、フルボ酸様蛍光物質が取り上げられる。平衡吸着においては、このような

特徴ある物質群を踏まえた競合吸着に関する研究²⁾は確認されているものの、非平衡吸着に関する検討は非常に限られているのが現状である。水道原水を対象として平衡吸着と非平衡吸着で 2-MIB 除去率の低下割合が変化することも確認されており³⁾、さらに実用的な観点をもふまえると、浄水工程で想定される接触時間 1 時間程度⁵⁾での傾向を明らかとすることが望まれる。

以上の背景を踏まえ、本研究では粉炭処理による 2-MIB 非平衡吸着に対する競合有機物成分を推定することを目的とし、以下の二項目について検討を行った。

- ・標準試料を用いた粉炭処理による 2-MIB 非平衡吸着に競合吸着する物質群候補の推定
- ・抽出した物質群に対する実試料を用いた 2-MIB 非平衡吸着に競合吸着影響評価

B. 研究方法

1. 対象試料

腐植物質等の標準試料として国際腐植物質学会 (International Humic Substances Society, IHSS)、日本腐植物質学会 (Japanese Humic Substances Society, JHSS) の標準試料および参照試料を用いた(表 1)。フミン酸やフルボ酸との比較のため NOM の参照試料を実験に用いた。またアミノ酸およびタンパク質 (和光純薬)、糖類 (関

表 1 腐植物質等の標準試料

試料	種類	略称
Suwannee River Humic Acid Standard	IHSS標準試料	SHA
Suwannee River Fulvic Acid Standard	IHSS標準試料	SFA
Nordic Aquatic Fulvic Acid Reference	IHSS参照試料	NFA
Pony Lake Fulvic Acid Reference	IHSS参照試料	PFA
Biwako Fulvic Acid	JHSS参照試料	BFA
Suwannee River NOM	IHSS参照試料	SN
Nordic Reservoir NOM	IHSS参照試料	NN

表 2 アミノ酸・糖類等の標準試料

試料	製品コード	略称
L-Tryptophan	204-03382	Trp
L-Tyrosine	202-03562	Tyr
L(-)-Phenylalanine	161-01302	Phe
Albumin Solution	015-25613	Alb
D(+)-Glucose	10017-00	Glu

東化学)の標準試料を用いた(表 2)。アミノ酸の標準試料としては疎水性で分子量が 2-MIB と同程度であり、代表的な紫外線吸収部分であるベンゼン環を有する芳香族アミノ酸 3 種類を選定した。

さらに国内 5 箇所の水道原水を樹脂分画⁶⁾して得た腐植画分および非腐植画分を用いた。腐植画分試料の比較対象として分画前の水道原水を用いた。

2. 粉末活性炭による 2-MIB 除去試験

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あるいは植物系粉炭(表 3)で、前処理として、110 °Cにて3時間処理し、使用時までデシケータにて保管したものを使用した。なお、実験全般に使用しているのは粉炭 A である。

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(以降、超純水と記載)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 µg/L となるように超純水で希釈し 2-MIB 保存溶液とした。

続いて 2-MIB の吸着競合影響を容易に比較するために各試料を調製した。水道原水と分画試料は原水ごとに DOC 濃度、電気伝導率(EC)を同一にし、標準試料は全て DOC 濃度 1 mg/L、EC を全国 21 浄水場原水の平均である 17.5±2.5 mS/m に調製した上で吸着実験を行った。pH は中性域である 7.0~7.5 に調整した。pH 及び EC は pH/EC メーター(LAQUAF-74, 堀場製作所)、DOC 濃度は全有機炭素計(TOC-L, 島津製作所)を用いて

表 3 粉末活性炭の種類

粉炭種	材質	d ₅₀ [µm]	Micropore (0.3~2nm) [cm ³ ・g ⁻¹]	Mesopore (2~50nm) [cm ³ ・g ⁻¹]	Macropore (50nm~) [cm ³ ・g ⁻¹]	BET 表面積 [m ² ・g ⁻¹]
粉炭A	木質	15	0.47 (83%)	0.08 (14%)	0.02 (3%)	1,163
粉炭B	植物系	12	0.46 (88%)	0.05 (10%)	0.01 (2%)	1,136
粉炭C	木質	9	0.4 (35%)	0.6 (53%)	0.14 (12%)	955

測定した。また、対照系として超純水を用いた。また吸着競合影響の大きい腐植物質等の標準試料については、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(MAP001C37, PALL)を用いて、遠心分離機(テーブルトップ遠心機 4200, 久保田商事株式会社)により 2,000×g の遠心加速度で 40 分間遠心分離を行い、1 kDa 未満の低分子試料に分画した。この低分子試料を用いて 2-MIB 吸着実験を行った。

調製した試料に 2-MIB 保存溶液を添加した試料水(最終濃度: 1 µg/L)を 20°C の恒温槽にて温度調整した。これを、容量 50 mL の茶透明摺合せ遠沈管(IWAKI)に 50 mL 取分けた。次に、粉炭懸濁液(0.51mg/mL)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 mg/L とした。粉炭注入後、20 °C の恒温槽内に置いている往復振とう機(MMS-120 型, 東京理科機械)に速やかに取り付け、150 rpm の振とう速度で 30 分間水平振とうした。その後、孔径 0.2 µm 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固相マイクロ抽出-ガスクロマトグラフィー質量分析(SPME-GCMS)システム(Agilent Technologies)を用いて残留 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 1 mL を加え、上記と同様の操作を行った。対照ろ過水の 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 °C に設定し実施した。

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 NOM 指標の変化量と 2-MIB 除去率との関係性を評価した。変化前の試料は吸着実験で粉炭懸濁液の代わりに超純水を 1 mL 加えた対照ろ過水を測定し、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 濃度、254 nm 吸光度(UV254)及び 3 次元蛍光スペクトル(Excitation-Emission Matrix, EEM)を測定した。

C. 研究結果および D. 考察

1. 標準試料を用いた粉炭処理による 2-MIB 非平衡吸着に競合吸着する物質群候補の推定

腐植物質等の標準試料の 2-MIB 吸着実験結果(図 1)より、SHA が除去率 81% と最も高く、BFA が除去率 49% で最も低い結果となった。同じ水源の試料で比較した場合、フミン酸 SHA に対してフルボ酸 SFA は除去率 69% と低く、他の試料についてもフルボ酸は総じて除去率が低い結果となっている。これらの結果から、同程度の DOC 濃度ではフルボ酸の影響が大きいことから、フルボ酸自体が 2-MIB 吸着競合物質として大きく寄与

していることが示唆された。また、NOMが同じ水源から分画されたフルボ酸より除去率が低く、競合影響を示したことは、腐植画分と非腐植画分の両方に吸着競合物質が含まれており、その両方が影響することを示している。

吸着競合影響が大きい標準試料の2検体(PFA, BFA)について、分子量分画し、吸着実験を行った結果(図2)、2検体共に分画前試料の除去率に対して低分子試料(1 kDa未満)の除去率が大幅に低下した。このことから、フルボ酸の低分子物質は強い吸着競合作用を示すことが推測される。

続けて、アミノ酸・糖類等の標準試料の結果(図1)より、アミノ酸においてはL-Tryptophanが2-MIB除去率70%で吸着競合影響が確認できるが、総じてその影響は限定的である。また、特に分子量の大きいタンパク質標準試料のAlbumin Solutionの除去率は89%、親水性である糖類標準試料のD(+)-Glucoseの除去率は92%とその影響が小さいことを確認できた。

腐植物質等の標準試料の中から吸着競合影響の最も小さいSHAと最も大きいBFAを用いて複数の粉炭による2-MIB吸着実験の結果を比較した(図3)。水道原水は調製せずに2-MIB吸着実験を行った結果を示している。全ての試料において粉炭Bが最も2-MIBの除去性に優れており、続けて粉炭C、粉炭Aの順となった。吸着競合影響の比較として全ての粉炭でSHAの2-MIB除去率は80%以上であるのに対し、BFAの2-MIB除去率は12%~30%低下した結果となっている。このことから、粉炭によらずフルボ酸の影響が大きいことが確認できた。

2. 抽出した物質群に対する実試料を用いた2-MIB非平衡吸着に競合吸着影響評価

試料特性と吸着競合における関連性を把握するため、各試料の2-MIB除去率を対照系と比較した(図4)。その結果、全ての試料で除去率が対照系よりも低く、試料の特性に関係なく吸着競合が観察された。また腐植画分と非腐植画分とで2-MIB除去率に大きな差異が見られなかったことから、その両方に吸着競合物質が含まれており、同程度の競合影響があると推察された。

次にEEMにより得られたデータについてPARAFAC解析により主要ピーク成分を分離した。それぞれの成分ピーク位置は成分1が励起波長[nm]/蛍光波長[nm](以下、EX/EM):260/480、成分2がEX/EM:250/400であり、成分1をフミン酸様蛍光物質、成分2をフルボ酸様蛍光物質と推定した。得られた2つの主要ピーク成分の吸着前蛍光強度と2-MIB除去率の関係を確認した結果(図5)、腐植画分、非腐植画分共にフミン酸様ピーク強度、フルボ酸様ピーク強度と2-MIB除去率の間に負の相関が確認できた。このことから、いずれの画分においてもフミン酸様蛍光物質とフル

ボ酸様蛍光物質が2-MIB吸着競合に影響を及ぼしていることが示唆された。

E. 結論

本研究にて得られた知見は以下のようにまとめられる。

- (1) 腐植物質標準試料において同程度のDOC濃度ではフルボ酸の影響が大きいことから、2-MIB吸着においてフルボ酸が吸着競合物質の1つであることが確認できた。特に分画したフルボ酸の1 kDa未満の低分子物質は強い吸着競合作用を示すことが示された。
- (2) 除去性能の異なる複数の粉炭を用いた評価においてもフミン酸と比較してフルボ酸の競合影響が大きいことが確認できた。
- (3) 腐植画分、非腐植画分での2-MIB除去率を評価した結果、対照系よりも低く、試料の特性に関係なく吸着競合が観察され、各画分共に同程度の競合影響があることが確認できた。そして、いずれの画分においてもフミン酸様蛍光物質とフルボ酸様蛍光物質が2-MIB吸着競合に影響を及ぼしていることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

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

学会発表

井上拓也, 浅田安廣, 田代新, 船橋康史, 岡本朗, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏. 2-メチルイソボルネオール(2-MIB)の粉末活性炭への非平衡吸着における水道原水中有機物の影響- 全国の水道原水を用いた検討-. 2019.11.6-8日; 函館. 令和元年度全国会議(水道研究発表会)講演集. 410-411.

神里良太, 浅田安廣, 高篠鮎人, 浦上正, 茂田裕充, 小松一弘, 秋葉道宏: 粉末活性炭処理での吸着競合影響-2-MIB除去低下要因の推定-. 第54回日本水環境学会年会; 2020年3月; 盛岡. 同講演集. p.137.

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) 海老江邦雄, 李富生, 湯浅晶 (1995) 活性炭によるフミン質及び微量有害有機成分の吸着特性, 水道協会雑誌, 64(9), 38-48.
- 2) Matsui Y., Yoshida T., Nakao S., Knappe D. R. U. and Matsushita T. (2012) Characteristics of competitive adsorption between 2-methylisoborneol and natural organic matter on superfine and conventionally sized powdered activated carbons, *Water Res*, 46, 4741-4749.
- 3) 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 (2018) 水道原水中での 2-メチルイソボルネオールの粉末活性炭吸着 ～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.
- 4) 井上拓也, 浅田安廣, 田代新, 船橋康史, 岡本朗, 秋葉道宏 (2019) 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講演集,

- 218.
- 5) 日本水道協会編 (2012) 5 浄水施設-13 粉末活性炭吸着設備, 水道施設設計指針 2012, 294-297.
- 6) Imai A., Matsushige K. and Nagai T. (2003) Trihalomethane formation potential of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, *Water Res.*, 37, 4284-4294.

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。腐植物質試料の作製には、国立環境研究所小松一弘氏に協力を得ました。また、本研究の一部は国立保健医療科学令和元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埼玉県企業局高篠鮎人氏、大阪市水道局浦上正氏、神奈川県内広域水道企業団茂田裕充氏に全面的な協力を得ました。記して謝意を表します。

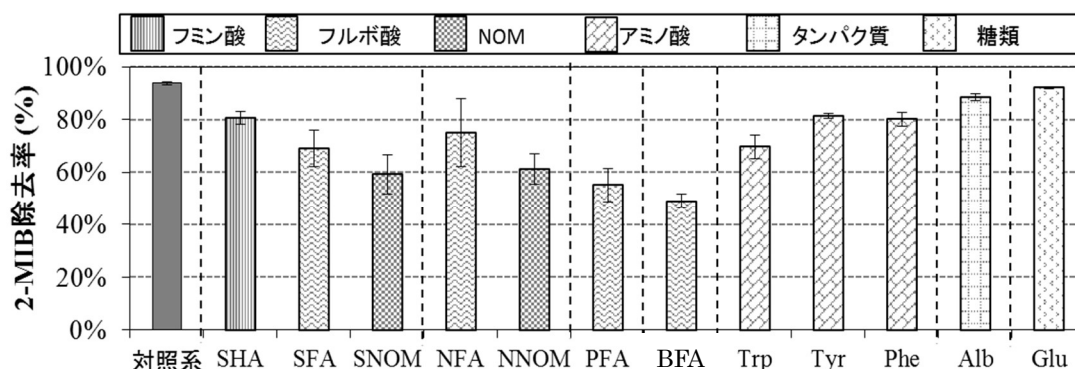


図1 標準試料を用いた粉炭処理による 2-MIB 除去率

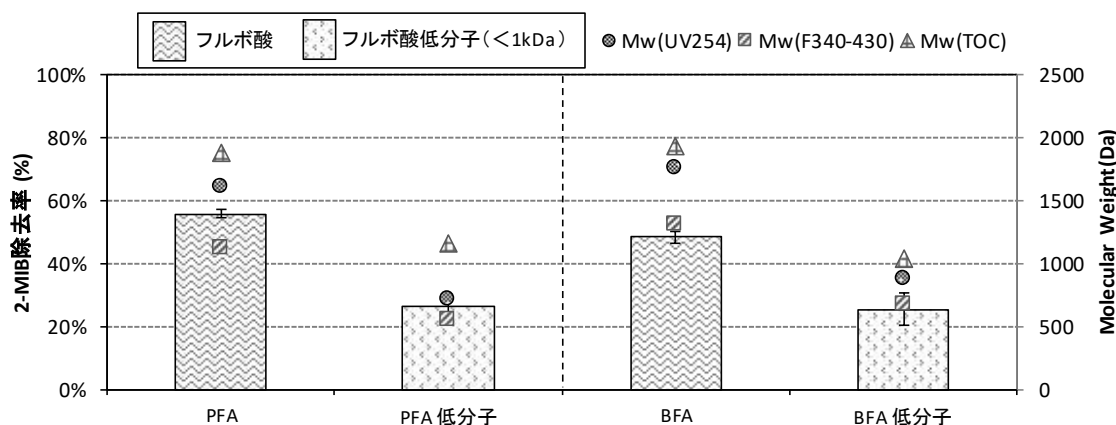


図2 低分子試料を用いた粉炭処理による 2-MIB 除去率

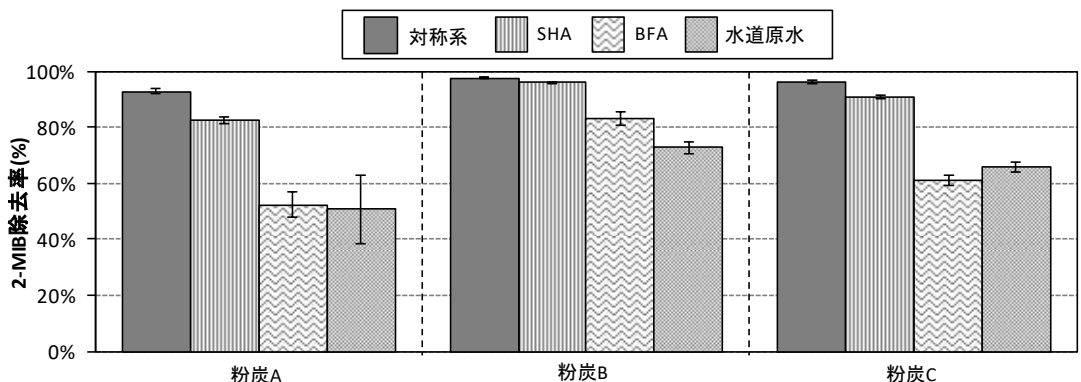


図3 粉炭種ごとの粉炭処理による2-MIB除去率

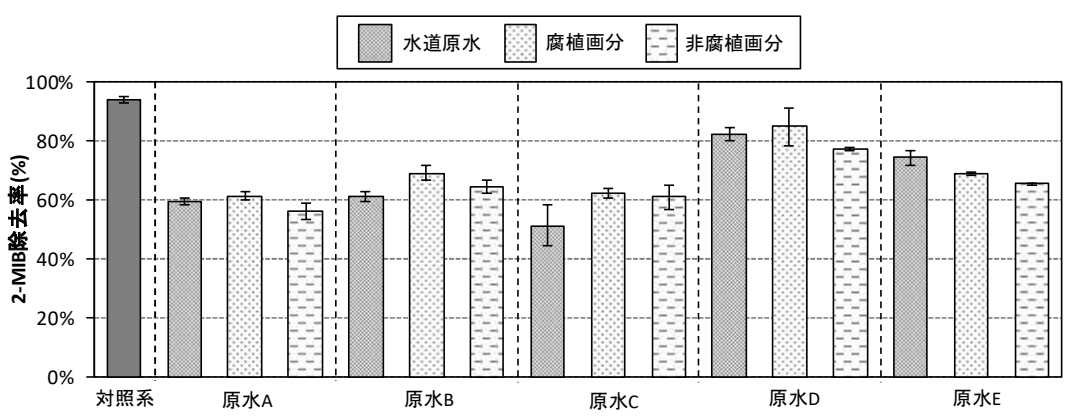


図4 各画分試料の粉炭処理による2-MIB除去率

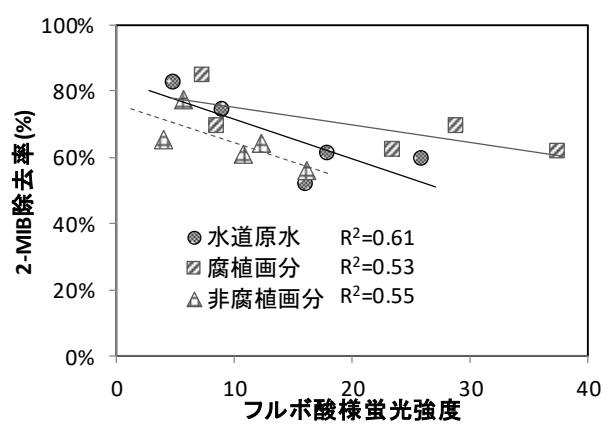
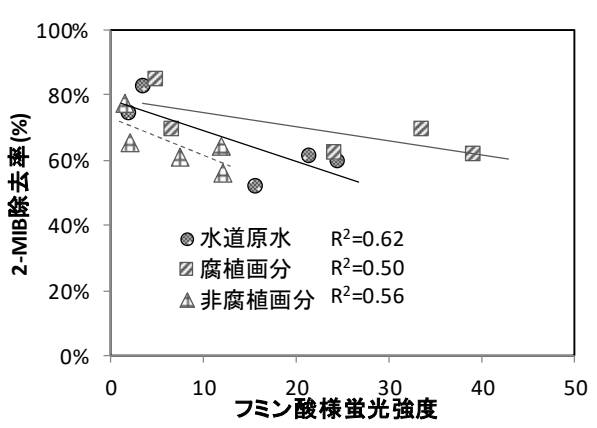


図5 2-MIB除去率と主要ピーク成分蛍光強度の関係

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）
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：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
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。昨年度時点では、生ぐさ臭原因物質の候補が1物質発見され、その部分的な構造推定を実施した。一方、生ぐさ臭は同物質以外にも原因物質が存在する混合臭気であることが示唆された。そこで今年度は、同物質のさらなる構造推定、および同物質以外の未特定の原因物質の探索を実施した。その結果、同物質は *2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)* と反応可能なカルボニル部位を2か所有していることが示唆された。また、パネル一数を加増して水道原水試料のにおい嗅ぎ GC (GC-O) 分析を行い、同物質以外の有臭成分のカラム保持時間を特定した。

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)-decatrienal*²⁾ 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いう意見があり、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 (以下 LC-HRMS) 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 以下 (GC-HRMS) 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、主な原因生物が黄金色藻綱 *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。

昨年度は、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、LC-HRMS および GC-O-HRMS を用いて、生ぐさ臭原因物質の探索と構造推定を行った。その結果、推定分子式 $C_{13}H_{20}O_3$ の物質が候補物質として抽出された。一方で、GC-O により検証した同物質の臭気は生ぐさ臭とは異なっており、生ぐさ臭は混合臭気であること(候補物質以外にも原因物質が存在すること)が示唆された。

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

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、2018年4月から2019年4月までに採水した3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。

得られた検体は、既報⁴⁾に準じて固相抽出による濃縮を行い、その後、以下に示す条件で LC-HRMS による多段階精密質量分析、におい嗅ぎ GC (以下、GC-O) 分析、および GC-HRMS 分析に供した。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の培養液⁴⁾についても、同様の分析を実施した。

2. 試料水の分析

2.1 LC-HRMS による試料水の分析

LC-HRMS 分析に供する検体には、分析種のイオン化効率の向上を目的として、2,4-dinitrophenylhydrazine (以下、DNPH) による誘導体化を施した。

上述のように候補物質の推定分子式は $C_{13}H_{20}O_3$ であったことから、同物質は最大で3つの酸素系官能基を含有しており、それら全てがアルデヒドもしくはケトンであれば、最大で3分子の DNPH と反応すると予想される。ただし、昨年度の検討においては、LC-HRMS 分析における Scan Range の上限が 500 であり、候補物質と1分子の DNPH が反応したイオンを検出するに留まった。そこで、候補物質に対して2分子および3分子の DNPH が付加した物質(以下、2分子付加体および3分子付加体)の検出の可否を確認するために、Scan Range の上限を 800 に改めて、再度分析を実施した。

上述の方法により濃縮・誘導体化した試料を、LC-HRMS (UltiMate 3400SD-LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて測定した。使用した分離カラムとその温度、使用した移動相とその流速、イオン化の条件などは、既報に準じた⁴⁾。

また、表1に示す条件を用いて多段階精密質量分析を実施した。これにより得られた第一世代プロダクトイオンスペクトルに基づき、候補物質の構造を推定することを試みた。

表 1: 多段階精密質量分析の分析条件

Items	Value/Type/ Mode
Activation type	CID
Activation time [msec]	30
Collision gas	N ₂
Normalized collision energy [%]	35
Isolation width [Da]	1.5
Resolution (FWHM at <i>m/z</i> 400)	100,000

3. GC-O および GC-HRMS による試料の分析

3.1 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、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、GC-HRMS 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。

3.2 分析条件

固相抽出により得られた脱離液を、GC-O および GC-HRMS による分析に供した。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 DB-5MS (φ 0.25 mm x 30 m, 膜厚 0.25 μm, Agilent Technologies) を用いた。

分離カラムおよびにおい嗅ぎポートの温度は 30°C (0-1.0 min), 300°C (1.0-14.5 min), 300°C (14.5-19.5 min) とした。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速は 2 mL/min (線速度 67.9 mm/sec) とした。GC-O 分析では splitless injection を用いて、インジェクションボリュームは 2 μL とした。また、GC-HRMS 分析では pulsed splitless injection (Head Pressure: 80 psi) を用いて、インジェクションボリュームは 5 μL とした。

イオン化のモードとして、ポジティブイオンモードを用いた。イオン源における corona current は 1 μA, Cone Gas は 240 L/h, Auxiliary Gas は 200 L/h, Source temp. は 150°C とした。

C. 研究結果および D. 考察

1. LC-HRMS による試料水の分析

候補物質の推定分子式 (C₁₃H₂₀O₃), DNPH の分子式 (C₆H₆N₄O₄), DNPH 誘導体化は脱水を伴って進行する反応であることに鑑みて、2 分子付加体の分子式を C₂₅H₂₈N₈O₉ (*m/z* 583.1906), 3 分子付加体の分子式を C₃₁H₃₂N₁₂O₁₂ (*m/z* 763.2190) であると、それぞれ予想した。

予想した *m/z* 値に対して、0.0009 Da の mass tolerance を用いて抽出イオンクロマトグラムを描画したところ、2 分子付加体については図 1 に示すようなピークが、保持時間 20.6 分において観察された。このピークは、ウログレナ培養液および水道原水試料の双方で共通して検出された。一方、3 分子付加体については、ピークを観察することはできなかった。この結果より、候補物質は、DNPH と反応可能なアルデヒド部位またはケトン部位が 2 か所存在することが示唆された。

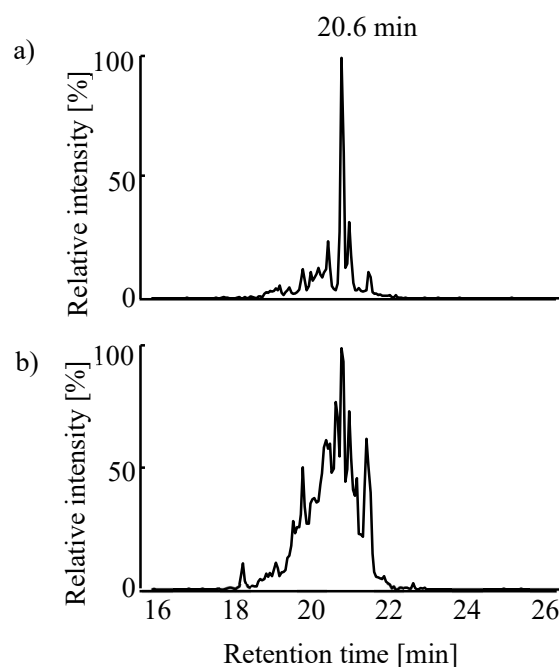


図 1: 2 分子付加体の抽出イオンクロマトグラム (*m/z* 583.1906±0.0009)
a) ウログレナ培養液 b) 水道原水試料

また、候補物質の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 NO, HNO₂, H₂O, C₂H₂O, C₂H₄O, C₃H₆O, H₃NO₃, [CH₃NO₂] が観察された。これらのうち、NO ロスはニトロ基含有化合物において頻繁に観察されるロスであり⁵⁾、同物質が DNPH 誘導体であることを示している。

また、 HNO_2 ロスも DNPH 誘導体の特徴的なロスとして報告されている⁶⁾。その生成機構は、図 2 a) のようなジニトロベンゼン部分の遠隔水素転位反応 (rHa) によって説明可能である。

H_2O , $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ のロスについては、図 2 b)-e) に示した反応機構により、その生成を説明可能である。特に H_2O ロスについては、アルコール性ヒドロキシ基を有する化合物において特徴的に検出されるロスである⁷⁾ ことから、先に述べた結果と併せて考慮すると、候補物質は酸素系官能基を3つ有しており、うち2つは DNPH と反応可能なアルデヒド/ケトン部位、残り1つはアルコール性ヒドロキシ基と予想される。また、 H_2O ロスの生成は、アルコール性ヒドロキシ基における遠隔水素転位反応 (rHa) によって説明可能である。

$\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$, および $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ の生成機構については、ケトン部位とシクロヘキセン環の存在を仮定し、この部位において逆エン反応 (RE), 逆 Diels-Alder 反応 (RDA), Charge Remote Fragmentation (CR) が生じたものと予想した⁷⁾。

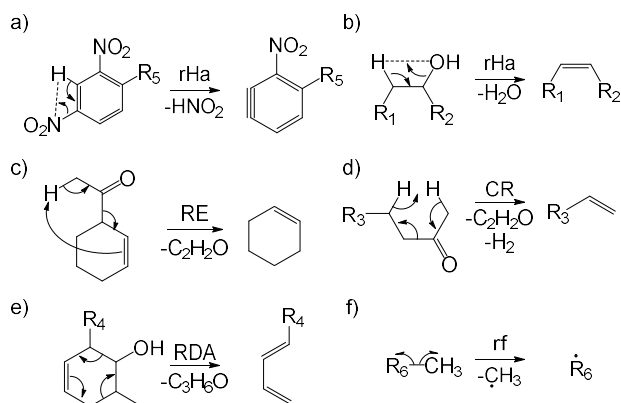
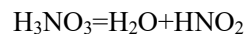


図 2: 予想されるフラグメンテーション経路

a) ジニトロベンゼン部位における遠隔水素転位反応, b) アルコール性ヒドロキシ基における遠隔水素転位反応, c) シクロヘキセンおよびケトン部位における逆エン反応, d) ケトン部位における Charge Remote Fragmentation, e) ヒドロキシシクロヘキセン部位における逆 Diels-Alder 反応, f) メチルラジカル脱離

H_3NO_3 , $[\text{CH}_5\text{NO}_2]\cdot$ は単分子のロスではなく、複数のロスの和であると予想した。すなわち、これらの生成を説明する素反応のひとつとして、図 2 f) のようなメチルラジカル脱離を想定し、以下に示すように予想した。



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 3 g), h) のようなものを予想した。g) は候補物質が DNPH による誘導体化を受けた状態の構造に相当し、誘導体化を受けていない状態での構造を表しているのが h) である。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。

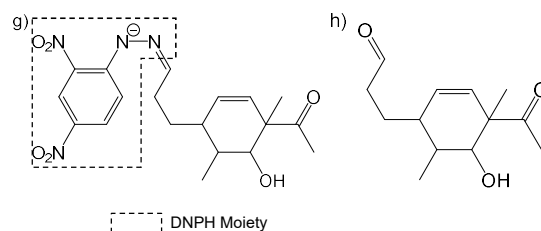


図 3: 推定した全体構造の例

g) DNPH 誘導体としての推定構造

h) DNPH 誘導体化を受ける前の推定構造

2. GC-HRMS および GC-O による試料の分析

2.1 GC-HRMS 分析

水道原水試料およびウログレナ培養液を分析し、候補物質の GC-HRMS における検出の可否を検討した。候補物質の推定分子式が $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ であることと、大気圧化学イオン化 (正イオン化モード) で分析を行ったことに鑑みて、GC-HRMS 分析における同物質のイオン式を $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_3^+$, m/z 値を 225.15 であると予想した。分析の結果, m/z 225 のイオンが検出されたが、このイオンの天然同位体パターンから算出した炭素原子の数は 9 ± 1 個であり、推定分子式 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ とは一致しなかった。

次に、大気圧化学イオン化において頻繁に見られるフラグメンテーション反応のひとつである分析種の脱水⁸⁻⁹⁾に着目し、候補物質のイオン式を $C_{13}H_{18}O_2^+$ 、 m/z 値を 207.14 であると予想した。得られた GC-MS データ上で、 m/z 207.14 に対し 0.05 Da の mass tolerance を用いて EIC を描画したところ、保持時間 10.5 分においてピークが観察された。このイオンは、水道原水試料およびウログレナ培養液の双方で共通して検出された。また、天然同位体パターンから推定した含有炭素原子数は 12 ± 1 であり、推定分子式とよく一致していることが確認された。

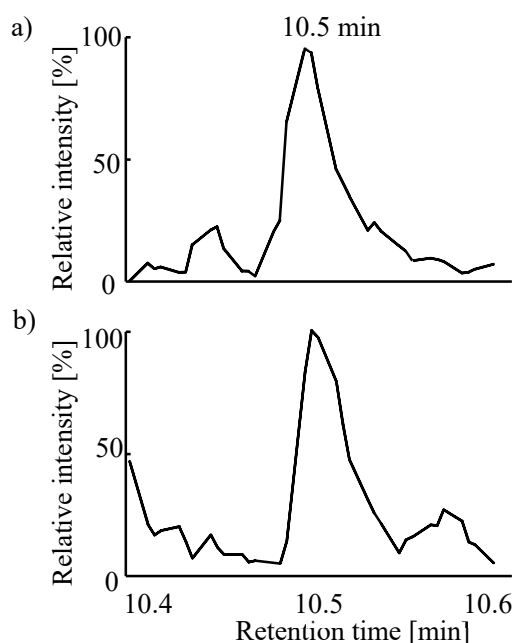


図 4: 候補物質の EIC

(GC-HRMS 分析, m/z 207.14 \pm 0.05)

a) ウログレナ培養液, b) 水道原水試料

2.2 GC-O 分析

3 名のパネラーにより、水道原水 3 検体について、GC-O 分析を実施した。全 9 回の分析において、臭気が検出された保持時間を集計したところ、その総数は 129 であった。しかしこれらの臭気の中には、1 名のパネラーのみが検知したもののように、再現性を確認できない臭気が多数含まれて

いた。そのため、複数のパネラーが共通して検知した再現性の高い臭気のみを絞り込んだ。

絞り込みを行った結果、良好な再現性が確認されたのは保持時間 7.5 分, 9.2-9.5 分, 10.0-10.5 分の 3 つであり、それぞれ黒糖臭, 金属臭, 牛乳臭が検知された。これらのうち、牛乳臭については、前節で確認した候補物質の保持時間とよく一致しており、同物質が有臭成分であることが示唆された。また、黒糖臭および金属臭については、同物質以外の生ぐさ臭原因物質の候補であると考えられる。今後は、電子イオン化および電界イオン化を備えた GC-HRMS 分析を実施することにより、これら 2 成分についてより詳細な検討を実施予定である。

しかし、いずれの保持時間においても、生ぐさ臭は検知されなかった。上述の 3 つの臭気が混合すると生ぐさ臭として感じられるとも予想されるが、今後の検討が必要である。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1) 論文発表

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

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

2) 学会発表

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, LC-HRMS および GC-O-HRMS と多変量解析の組み合わせによる水道水生ぐさ臭原因物質の探索, 第 67 回質量分析総合討論会, 1P-30
Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba,

Exploration of a causative compound of fishy-smell in raw water for taps by combining a LC-HRMS, a GC-O-HRMS, and multivariate analyses, 第 28 回環境化学討論会, 1D-05

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, Exploration of a Causative Substance of Fishy-Smell in Raw Water for Taps by Combining a LC-HRMS, a GC-O-HRMS, and Multivariate Analyses, Water and Environment Technology Conference 2019, 1C-15

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

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, 多変量解析と LC-HRMS および GC-O-HRMS の組み合わせによる水道水中の生ぐさ臭原因物質の探索, 環境科学会 2019 年会, P-26

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

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, 多変量解析, LC-HRMS, GC-O および GC-HRMS による水道水生ぐさ臭原因物質の探索, 第 54 回日本水環境学会年会, 3-I-11-4. (学会中止, 誌上発表)

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。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。

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) Nakahara. M., Takano. R., Ito. H., Yano. H., Hirase. S. and Harimaya. K. (1988) . Volatile Constituents of *Uroglena americana* (Chrysophyceae), *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **62**, 35-37.
- 4) 秋葉道宏, 高梨啓和, 小倉明生, 北村壽朗 (2019) 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける生物障害対策の強化に関する研究 令和元年度分担研究報告書
- 5) Fu, X., Y. Zhang, S. Shi, F. Gao, D. Wen, W. Li, Y. Liao, and H. Liu (2006) Fragmentation study of hexanitrostilbene by ion trap multiple mass spectrometry and analysis by liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20**, 2906-2914.
- 6) Zwiener, C., T. Glauner, and F. Frimmel, 2002. Method optimization for the determination of carbonyl compounds in disinfected water by DNPH derivatization and LC-ESI-MS-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **372**, 615-621.

- 7) Daniel P. Demarque, Antonio E. M. Crotti, Ricardo Vessecchi, Joao L. C. Lopes and Norberto P. Lopes (2016) Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products, *Natural Product Reports*, **33**, 432-455.
- 8) Perraud, V., Li X., J.N. Smith, Barbara J. Finlayson-Pitts (2019) Novel ionization reagent for the measurement of gas-phase ammonia and amines using a stand-alone atmospheric pressure gas chromatography (APGC) source, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, e8561.
- 9) Durán-Peña, M.J., M. E. Flores-Giubi, J. M. Botubol-Ares, L. M. Harwood, I. G. Collado, A. J. Macías-Sánchez and R. Hernández-Galán (2016) Chemoselective and stereoselective lithium carbenoid mediated cyclopropanation of acyclic allylic alcohol, *Organic and Biomolecular Chemistry*, **14**, 2731-2741.

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
研究協力者	藤本	尚志
研究協力者	高梨	啓和

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 啓和 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る。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、カビ臭物質ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* の異なる栄養塩条件下における発現量変化、昨年度に開発した簡易なカビ臭物質産生藍藻類の whole-cell PCR 法を用いた判定量技術と細胞密度との比較を実施した。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ジェオスミン産生 *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) を対象としたジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログの半定量法および 2-メチルイソボルネオール産生 *Phormidium* 属 (*Pseudanabaena* 属) を対象として MIB 合成酵素遺伝子ホモログの半定量法による個体群数の半定量法を確立した。

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（早期検出技術に適用可能）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

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

B. 研究方法

1) 異なる栄養塩濃度におけるカビ臭物質ジェオスミン合成酵素遺伝子の発現量の変動

供試藍藻類は、国立環境研究所微生物系統保存施設より得た、ジェオスミン産生藍藻類として、*Dolichospermum smithii* NIES-824 (*Anabaena smithii* NIES-824) を用いた。本藍藻類とも標準培地が CT 培地とされ、CT 培地の TN/TP が、8.1 であった。また、CT 培地の窒素成分量を 2 倍量と変化させた改変 CT 培地の TN/TP は、13.1 であった。培養温度は、28°C、光強度は、60.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、明暗周期を 12 h として培養した。全 RNA を抽出後、ランダムプライマーで cDNA を作成し、ジェオスミン合成酵素遺伝子 (*geoA* 遺伝子) の発現解析を qPCR 法により実施した。プライマーは、*geoA_Doli_666F* (5'-aaaagacacatttgctgatggtg-3')、*geoA_Doli_774R*

(5'- acgctcaactacaagcacacag) を設計し用いた。全てのサンプル (n=5) は、植菌後 4 日経過する毎に採取した。発現量の定量の際には、細胞密度の変化による影響を除くために、内部標準遺伝子による標準化を行う。本研究では、16S rRNA 遺伝子を内部標準遺伝子として用いた。

2) カビ臭物質産生藍藻類の簡易識別法・定量法の開発

形態観察で判別が困難なジェオスミン産生藍藻類 *Dolichospermum* 属 (*Anabaena* 属) を対象とし、供試藍藻類は、*D. 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 *Dolichospermum macrospora* とした。一方、2-MIB 産生藍藻類 *Pholmidium* 属 (*Pseudanabaena* 属) 1705 株と 1803 株を、茨城県から分譲いただいた。

ジェオスミン産生藍藻類は *geoA* ホモログを標的とし、2-MIB 産生藍藻類は、テルペン環化酵素遺伝子 *mtc* ホモログ (2MIB 合成酵素遺伝子) とし、半定量 Whole Cell PCR 法を行った。*geoA* ホモログは、これまでに我々が設計、作成した PCR プライマー、*geoA_Doli_540F* (5'-CCCCATTGAATACATTGAAATGC-3')、*geoA_Doli_774R* (5'-ACGC TCAACTACAAGCACACAG-3') を用いた。*mtc* ホモログは、*mtc-F* (5'-CGCTCGCTTTGTGAGTGAGATAG-3')、*mtc-R* (5'-GGCAGTAGAGTGGTGAGGCAG-3') 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 反応液は、本ポリメラーゼの説明書通りに作成した。*Dolichospermum* 属を対象とした際のサーマルサイクル条件は、どちらの遺伝子も初期変性 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、20 秒、サイクル数 25 サイクルと設定し、Whole Cell PCR を行った。Whole Cell 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。得られたバンドの輝度をフリーの画像

解析ソフトウェア Image J を用いた。

2-MIB 産生藍藻類 *Phormidium* 属 (*Pseudanabaena* 属) 1705 株と 1803 株については、最適な条件を検討するため、アニーリング温度を 57°C, 60°C, 63°C, サイクル数を 20, 25, 30, 35 サイクルとそれぞれ設定し、サーマルサイクル条件は、*Dolichospermum* 属と同様にして検討を行った。その結果、60°C, 25 サイクルで良好な結果を得たことから、本報告書においてはこの条件にて実施した結果を報告する。

Whole Cell PCR 法の評価は、得られた PCR 産物の輝度と藍藻類の細胞密度を比較し、PCR 産物の輝度から細胞密度を用いて実施した。供試藍藻類は、CT 培地で培養し、培養開始後 4 日経過する毎にサンプルを採取し、細胞密度を表すクロロフィル a (Chl.a) の定量および Whole cell PCR を実施した。

C. 研究結果および D. 考察

1) 異なる栄養塩濃度におけるカビ臭物質ジェオスミン合成酵素遺伝子の発現量の変動

カビ臭物質ジェオスミン合成酵素遺伝子の発現量は、ジェオスミン産生活性と正の相関関係にあると考えられる。このことから、発現量の変動を分析することは重要である。

カビ臭物質ジェオスミン産生合成酵素遺伝子 *geoA* の発現量は、栄養塩が異なる場合、発現量に有意な差が見られた培養日数があったものの、全培養日数において発現が認められる構成的発現をしている遺伝子であることがわかった (図 1)。このことから、カビ臭原因物質産生藍藻類の個体群密度の定量が、カビ臭発生予測の重要な位置付けとなることを強く示しているといえた。顕微鏡観察による形態観察では、カビ臭物質産生藍藻類のみの細胞密度の定量が困難であることから、カビ臭物質産生藍藻類のみ定量する手法が極めて重要である。

2) 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 *Dolichospermum* sp. (*Anabaena* sp.) 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 *Dolichospermum* sp. (*Anabaena* sp.) 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。

カビ臭物質産生に関与する重要な特定遺伝子を検出できる PCR 法は、扱いやすく、産生者のみを推量できる方法であるといえる。このため、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* ホモログ、2-MIB 産生株の指標としては、モノテルペン環化酵素遺伝子 (2-MIB 合成酵素遺伝子) *mtc* ホモログを用いた。

この結果、*geoA* 遺伝子ホモログを標的とした半定量法では、Chl.a による細胞密度と同様に PCR 産物の輝度も上昇しており、細胞密度を推量できることがわかった (図 2)。一方、*mtc* 遺伝子ホモログを標的とした半定量法では、Chl.a による細胞密度が 200 µg/L を越えると安定して PCR 産物を得た (図 3)。これは、*geoA* 遺伝子ホモログを標的とした半定量法と同様であった (図 2, 図 3)。したがって、カビ臭産生藍藻類由来の Chl.a がおよそ 200 µg/L を越えると検出・半定量が可能であると考えられた。

また、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、実施できる強みがあるものの、実務者が作業しなければならない。このため、完全自動化 (サンプルをセットすれば、あとは結果を確認できる) が求められる場合もあることが、水道事業者からのヒアリングからわかった。こちらについては、すでに医療分野をマーケットにした自動核酸抽出・定量 PCR 装置が市場にて販売されているため、応用利用すれば可能であると考えられる。

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ることを明らかにしていた。さらに今年度は、ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* の発現様式は構成的発現であることがわかった。つまり、個体群を定量することで、カビ臭発生予測を可能となるといえる。水源におけるカビ臭物質産生藍藻類のモニタリングのために、形態観察では困難なカビ臭物質産生藍藻類の識別に有効と期待できる whole-cell PCR 法を開発した。本手法は、半定量的な手法へと発展も可能であったことから、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

Hanchen Miao, Ji Zhang, Yasuhiro Asada, Motoo Utsumi, Zhongfang Lei, Hirokazu Takanashi, Naoshi Fujimoto, Michihiro Akiba, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Monitoring of geosmin-producing *Anabaena* by whole cell PCR, 日本水処理生物学会第 56 回大会, 2019 年 11 月 8 日 - 11 月 10 日, 金沢 (口頭発表) .

Ji Zhang, Hanchen Miao, Yasuhiro Asada, Zhongfang Lei, Hirokazu Takanashi, Satoshi Ichise, Naoshi Fujimoto, Michihiro Akiba, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Rapid Detection and Quantification of Musty Odor Production by Cyanobacteria, 第 54 回日本水環境学会年会, 2020 年 3 月 16 日-18 日, 盛岡 (ポスター発表) .

Qingyue Shen, Hanchen Miao, Saya Akiyama, Shinya Tsukino, Motoo Utsumi, Zhongfang

Lei, Zhenya Zhang, Yasuhiro Asada, Naoshi Fujimoto, Michihiro Akiba, Kazuya Shimizu, Effect of TN/TP ratio on growth and geosmin productive activity in cyanobacteria, The 4th International Conference on Recent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), March 26-30, 2020, Tsukuba (ポスター発表; COVID-19 により延期).

Hanchen Miao, Qingyue Shen, Satoshi Ichise, Marie Shimada, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Michihiro Akiba, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Monitoring of geosmin-producing cyanobacteria by whole-cell PCR, The 4th International Conference on Recent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), March 26-30, 2020, Tsukuba (ポスター発表; COVID-19 により延期).

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

茨城県企業局水質センター, 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, 神奈川県川崎市上下水道局の藤瀬 大輝 博士, に感謝いたします。

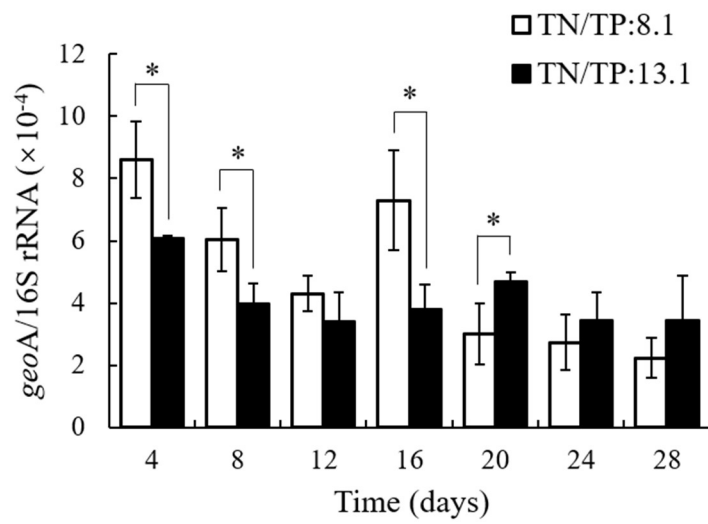


図1 異なる栄養塩濃度における *geoA* 遺伝子の発現量変動

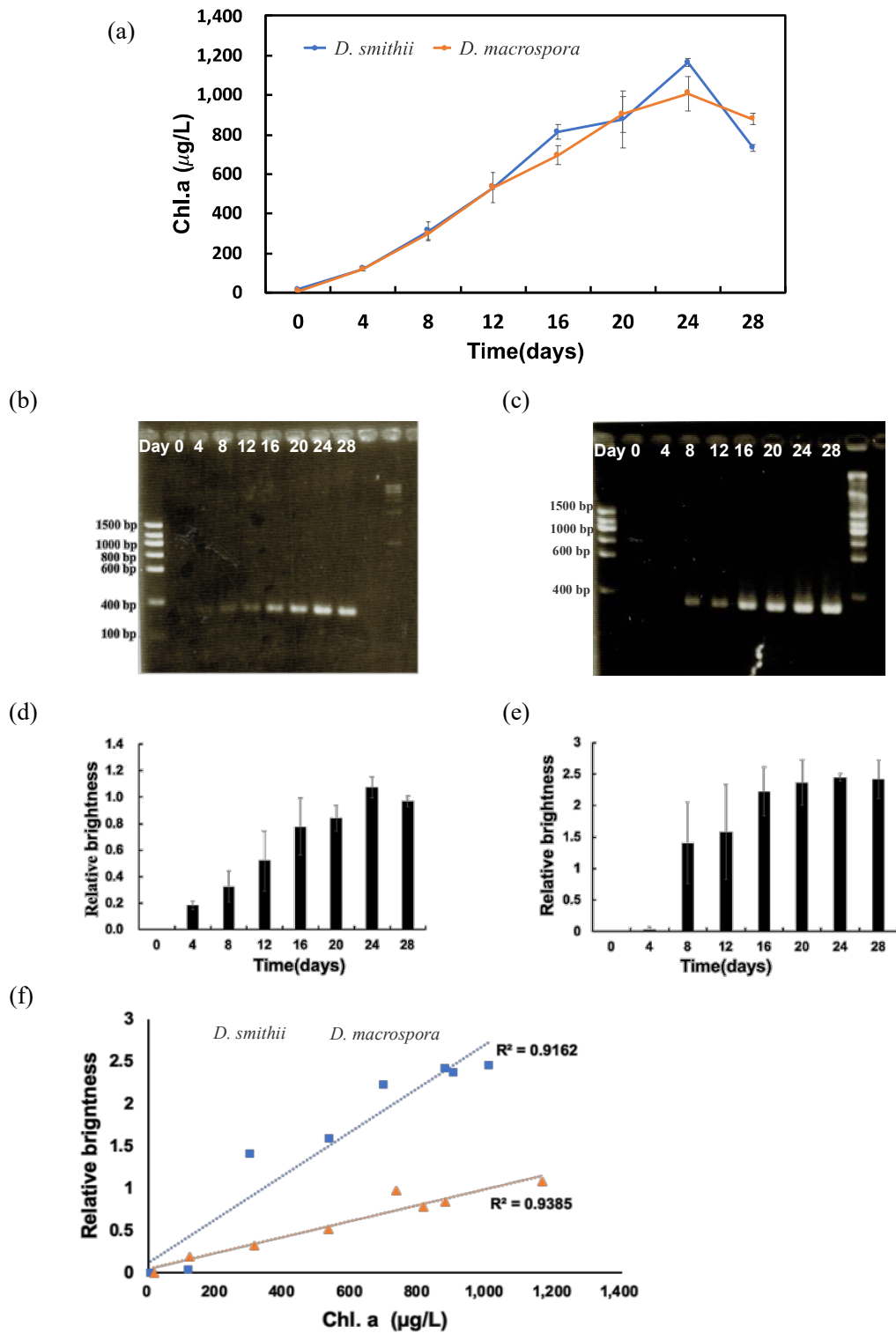
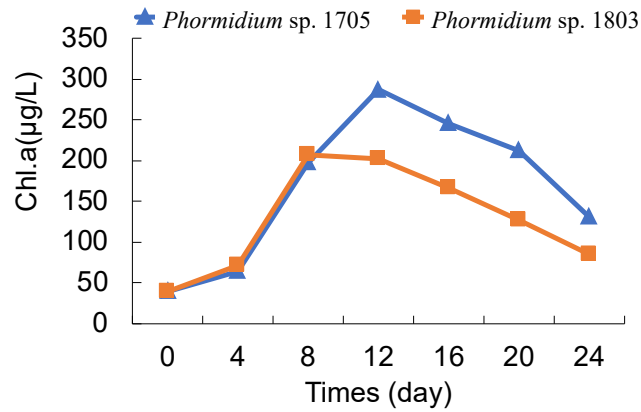
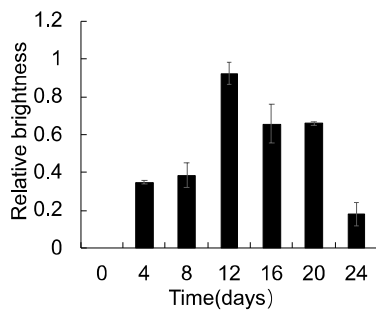


図2 ジェオスミン産生藍藻類の個体密度の変動 (代表的データ)
 (a) Chl.a を用いた個体群密度, (b) *A. smithii* の PCR 産物, (c) *A. macrospora* の PCR 産物, (d) *A. smithii* の PCR 産物の輝度, (e) *A. macrospora* の PCR 産物の輝度, (f) Chl. a と PCR 産物の輝度の相関関係

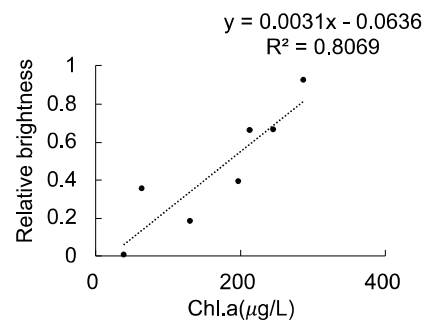
(a)



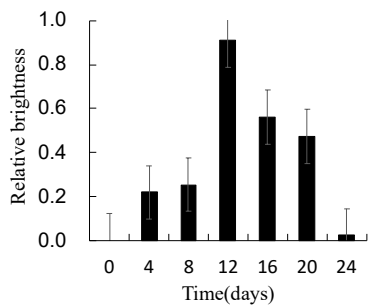
(b)



(c)



(d)



(e)

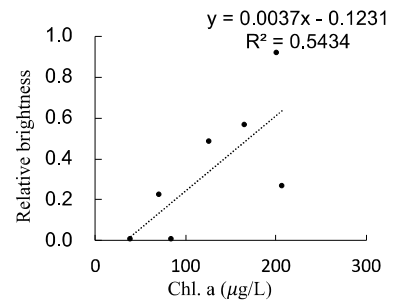


図3 2-MIB 産生藍藻類の個体密度の変動 (代表的データ)

(a) Chl.a を用いた個体群密度, (b) *Phormidium* sp. 1705 の PCR 産物の輝度, (c) *Phormidium* sp. 1705 の PCR 産物の輝度と Chl. a との相関関係, (d) *Phormidium* sp. 1803 の PCR 産物の輝度, (e) *Phormidium* sp. 1803 の PCR 産物の輝度と Chl. a との相関関係

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
井上拓也, 浅田安廣, 田代新, 船橋康史, 岡本朗, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏	全国の水道原水中における2-メチルイソボルネオール ¹ の粉末活性炭への非平衡吸着	水道協会雑誌	印刷中		2020
Takanashi H, Shinfyku Y, Nakajima T, Ogura A, Kitamura H, Akiba M	Exploration of an Odorous Aldehydes and Ketones Produced by <i>Urogenes americana</i> Using High Resolution Mass Spectrometry, GC-Olfactometry, and Multivariate Analysis	Chemosphere	印刷中		2020
Shinfyku Y, Nakajima T, Takanashi H, Nakajima, Ueda T, Akiba M	A Method to Purify a DNPH-derivatized Sample Using Solid Phase Extraction	Environmental Science	印刷中		2020

研 究 班 の 構 成

(令和元年度)

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部教授 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
京都大学大学院工学研究科准教授 越 後 信 哉
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課課長 小 倉 明 生
東京都水道局水質センター検査課課長代理 (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主査 米 村 真 吾
川崎市上下水道局水管理センター水道水質課担当係長 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
シニアアドバイザー 今 本 博 臣
国立保健医療科学院生活環境研究部上席主任研究官 小 坂 浩 司

国立保健医療科学院生活環境研究部主任研究官
国立保健医療科学院研究生
国立保健医療科学院研究生

三 浦 尚 之
神 里 良 太
江 崎 敦

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

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

令和元年度 分担研究報告書

令和2（2020）年 3月

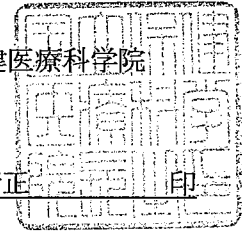
令和2年3月23日

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



次の職員の令和元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) ・該当する口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。

令和 2年 4月 2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



次の職員の令和元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) 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。

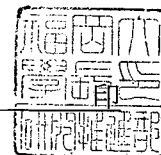
令和2年3月31日

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 朔 啓二郎



次の職員の令和元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) 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) 未審査の場合は、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。

令和2年 5月 7日

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



次の職員の令和元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。

- 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
- 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
- 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) 未審査の場合は、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。

2020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



次の職員の令和元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)

(※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。

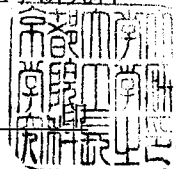
令和 2年 3月 31日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 京都大学大学院工学研究科

所属研究機関長 職名 研究科長

氏名 大嶋 正裕



次の職員の令和元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) 大学院工学研究科 准教授
(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) 未審査の場合は、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。

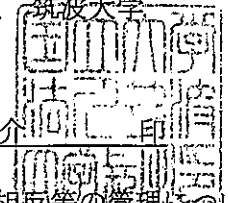
令和 2 年 4 月 17 日

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



次の職員の令和元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) 未審査の場合は、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) ・該当する口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。

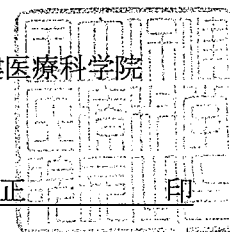
令和2年3月23日

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 印



次の職員の令和元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。

- 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
- 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
- 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。