

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2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 秋葉 道宏

令和3（2021）年 3月



目 次	1
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 秋葉道宏	3
II. 分担研究報告	
1. 閉鎖性水域における藻類異常発生予測モデルの構築 秋葉道宏, 西村修, 今本博臣, 佐野大輔	13
2. 海外におけるアオコ等の水質汚濁対策の検証等 柳橋泰生	21
3. カビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定法の構築 秋葉道宏, 藤本尚志, 浅田安廣, 松本恭太	27
4. 生物障害ポテンシャル評価手法の確立 秋葉道宏, 藤本尚志, 浅田安廣, 松本恭太	35
5. 粉末活性炭による2-MIBの効率的除去に関する検討 秋葉道宏, 浅田安廣, 三好太郎, 早坂俊一	45
6. 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 秋葉道宏, 越後信哉	55
7. 高分解能質量分析計を用いた水道水生ぐさ臭原因物質の探索 と簡易分析手法の提案 秋葉道宏, 高梨啓和, 藤原俊一郎, 北村壽朗	65
8. 流域モニタリングネットワークのための 簡便な生物障害検出方法の構築 秋葉道宏, 清水和哉, 藤本尚志, 高梨啓和	73
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	101



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2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3(2021)年 3月



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。

事前に藻類の異常発生を予測することを目指し、機械学習手法のひとつであるサポートベクターマシン (Support Vector Machine : SVM) を用いて、ダム湖での藍藻類の発生を事前に予測するための統計モデルを構築した。予測モデルの入力データとして水質データ、気象データ、及び水理学的データを使用し、予測日から 1 週間後に藍藻類が発生するか否かを予測することを試みた。その結果、*Microcystis* 属及び *Anabaena* 属に関し高い予測性能を示すモデルの構築に成功した。

中国での 2020 年以降に報告された導水事業による水質の改善等に関する研究の状況についてとりまとめた。近年で研究対象水域が拡大し、手法も多様なものとなっており、導水事業に関連して、ウォーターフットプリントの算定、太陽光発電システムの導入、マイクロプラスチックによる汚染等の研究も実施されていた。

PCR によるカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出に基づくカビ臭産生藍藻類の簡易同定を検討した。その結果、カビ臭が発生した全国水源から単藻培養した藍藻株から得られたカビ臭物質合成遺伝子の配列情報に基づき、日本でカビ臭産生藍藻類として代表的な 5 属 (*Microcoleus* 属, *Pseudanabaena* 属, *Planktothricoides* 属, *Dolichospermum* 属, *Aphanizomenon* 属) について簡易同定可能な PCR 系を構築し、その有用性を示した。

単藻培養した一部の藍藻株を用いて培養実験を行い、培養温度と各増殖過程でのカビ臭原因物質産生能の変化について評価した。その結果、*Pseudanabaena limnetica*, *Microcoleus autumnalis* 共に 2-メチルイソボルネオール(2-MIB)産生に及ぼす温度の影響が大きいことが明らかとなった。

粉末活性炭処理による 2-MIB 除去への効率性を向上させるために、2-MIB 吸着競合影響評価指標の探索ならびに複数種の粉末活性炭混合注入による 2-MIB 除去効果への影響評価を行った。3 つの浄水場原水を用いて、粉末活性炭による 2-MIB 除去率と水質指標との関係性についてモニタリング試験を行った結果、原水ごとに 2-MIB 除去率と水質指標との関係性について傾向が異なることを示した。そして、カビ臭が発生する時期を踏まえた上で、適切な指標を水源ごとに選択する必要があることが示された。また、粉末活性炭の中で 2-MIB の除去性が高い種を混合して使用することで、2-MIB 除去率の向上と総使用量を低減することが可能であることを示した。

溶存有機物(DOM)の精密質量スペクトルの差異解析により、地点間・季節間での比較が可能か琵琶湖・淀川水系の水試料を用いて評価した。その結果、地点間の差は固相抽出であっても乾燥濃縮であっても類似した差を見出すことができ、また各地点の特性と矛盾のないものであった。比較的濃縮操作の自動化が簡単な固相抽出であっても倍率を上げれば十分乾燥濃縮と同等の傾向が得られることを示した。

機器分析による水質管理を可能とするために、原因物質の構造や分析条件を明らかにすることを目的とした。水道水生ぐさ臭原因物質の構造を推定した結果、末端ケトン、シクロヘキセノン、メトキシ基を有すること、プロピル基またはブチル基を有することが示唆され、原因物質の構造を 4 つの異性体まで絞り込むことに成功した。また、GC-MS を用いて分析する際の条件を検討し、無極性カラムに対する原因物質の保持指標と電子イオン化法を用いた際のマススペクトルを得て、汎用的・標準的な分析条件を確立した。

カビ臭原因物質合成酵素遺伝子の異なる環境因子 (栄養塩, 温度,  $Mg^{2+}$ 濃度) における発現

量変化, カビ臭原因物質産生量, 開発したカビ臭原因物質産生藍藻類の whole-cell qPCR 法を用いた半定量技術・定量技術, そして細胞密度との比較を実施した。環境因子の中で窒素濃度, 水温による影響が大きいことが示された。whole-cell qPCR 法によるジェオスミン産生 *Dolichospermum* 属と 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* 属 (*Phormidium* 属) の半定量・定量法を開発し, その有用性を示した。

#### 研究分担者

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

#### A. 研究目的

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

- ① 流域での障害生物の発生状況やそのメカニズムを把握
- ② 流域スケールでの生物障害発生 of 広域モニタリングシステムを開発
- ③ 浄水プロセスの適応性を高めながら, ①, ②と連携して, 流域連携による水供給システムの生物障害適応性の強化方策を例示

#### B. 研究方法

4つのダム(室生ダム, 阿木川ダム, 寺内ダム, 一庫ダム)を対象とし, 機械学習手法のひとつであるサポートベクターマシン (Support Vector

Machine: SVM) を用いて藻類異常発生予測を行った。予測モデルの入力データとして水質データ, 気象データ, 及び水理学的データ (2005年から2017年) を使用した。モデルに用いる変数選択においては, 正則化回帰手法である Lasso 回帰及び Elastic Net 回帰を用いた。そして, 予測日から1週間後に藍藻類が発生するかどうかを予測することを試みた。

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, 遺伝子解析を行い, 得られた配列情報から, カビ臭原因藍藻類として代表的な 5 属 (ジェオスミン: *Dolichospermum* 属, *Aphanizomenon* 属 2-メチルイソボルネオール (2-MIB): *Pseudanabaena* 属, *Planktothricoides* 属, *Microcoleus* 属) を簡易同定可能な PCR 系の実験条件を検討した。さらに水源試料から抽出した DNA 試料に対して, 構築した遺 PCR 系を用いて, カビ臭原因物質産生藍藻類の同定を試みた。

カビ臭原因物質が確認された水源から単離された *Pseudanabaena limnetica* および *Microcoleus autumnalis* について培養実験を行い, 培養温度 (20, 25, 30°C) と増殖過程におけるカビ臭原因物質の生成について検討を行った。

粉末活性炭による 2-MIB 除去に関するモニタリング試験では, 3つの浄水場 (A, B, C 浄水場) 原水について 2020年6月から2021年3月までの期間で計 18 回の粉末活性炭による 2-MIB 除去実験を行った。代表的な測定項目は, 2-MIB 濃度, 全有機炭素 (TOC) 濃度, UV254, 3次元蛍光分析 (Excitation-Emission Matrix, EEM) である。また粉末活性炭混合注入試験では, 国内浄水場の原水を用いて 3種類の粉末活性炭を組み合わせる 2-MIB 除去実験を行った。

琵琶湖淀川流域内の琵琶湖水 (大津港), 淀川水 (枚方大橋左岸), 桂川水 (下水処理施設放流口直下) の3ヶ所を対象とし, 夏季と秋季に採水を行い, 地点間と採水時期の違いについて差異解析を行



った。あわせて、藻類増殖時と非増殖時の琵琶湖水（琵琶湖疏水）の溶存有機物(DOM)の精密質量スペクトルの比較を行った。

黄色鞭毛藻のウログレナ (*Uroglena americana*) による生ぐさ臭の被害が発生している際に採取された水道原水を固相抽出により濃縮・精製し、高分解能 GC-MS を用いて分析し、原因物質の構造や分析条件について検討した。

ジェオスミン産生藍藻類として *Dolichospermum smithii* NIES-824 (*Anabaena smithii* NIES-824), 2-MIB 産生藍藻類として *Pseudanabaena foetida* NIES-512 を用いて、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子の発現量とカビ臭物質産生量に対する異なる環境因子（栄養塩、温度、 $Mg^{2+}$ 濃度）による影響を評価した。また同株を用いて新たに開発した簡便迅速な半定量技術 whole-cell qPCR 法の適用性について評価した。

### C. 研究結果および D. 考察

室生ダムにおける *Microcystis* 属の発生予測モデルの最良モデルでは、AUC(Area Under the Curve) : 0.89, FPR(False Positive Rate) : 20.0%, 正解率 : 84.0%, 適合率 : 55.6%と高い予測性能を示した。*Anabaena* 属の最良モデルでは、AUC : 0.83, FPR : 35.0%, 正解率 : 72.0%, 適合率 : 41.7%と高い予測性能を示した。また阿木川ダム、寺内ダム、一庫ダムを対象に追加検証を行った結果、*Microcystis* 属についてはすべてのダムにおいて非常に高い予測性能が得られた。一方で、*Anabaena* 属の予測では寺内ダムを除く3つのダムにおいては高い予測性能が得られた。

富栄養化した水環境の改善に関する 2020 年以降に報告された研究論文について整理を行った。近年の研究の傾向としては、南水北調に関する研究が多くみられ、全国的に研究対象水域が拡大していた。その取り組みとしては富栄養化、重金属汚染、硫酸塩汚染、再生水利用との比較、住血吸虫、ウォーターフットプリント、生態系、総合評価等であり、研究内容や手法が多様なものとなっていた。

カビ臭原因物質合成酵素遺伝子を対象とした PCR によるカビ臭産生藍藻類の簡易同定法を検討したところ、*Microcoleus* 属を除く4属については非特異的な検出がなく、*Microcoleus* 属については 2-MIB 合成遺伝子と相同性が高い *Phormidium* sp.のみ非特異的な検出が確認された。続いて、46 水源試料で構築した PCR 系を適用したところ、*Phormidium* sp.を単離した水源を除き、単離した産生株と同じ属の遺伝子のみが検出する結果となった。本研究で構築した手法は培養よりも早く産生種を属レベルで判定できることから、顕微鏡での産生種同定のサポート情報として有用であることが示された。

カビ臭発生水源より単離した株を用いて、培養温度と増殖量、カビ臭原因物質産生量を比較した結果、*P. limnetica* は培養温度による最大増殖量の違いは見られなかった一方で、2-MIB 総濃度の変化は温度の影響が大きいことが明らかとなった。*M. autumnalis* については増殖に及ぼす温度の影響が大きく 25°C で最も増殖速度が大きかった。一方 2-MIB 産生については 25°C で低くなる傾向がみられた。

粉末活性炭処理による 2-MIB 除去に対する水質の影響評価指標を探索したところ、本調査で用いた3つの原水では競合影響を評価可能な共通指標は存在しないことが明らかとなった。また、年間を通して競合影響を評価する水質指標も確認できなかった一方、時期を水温により区切ることによって相関性を示す水質指標が一部確認された。粉末活性炭混合注入試験では、2-MIB 除去性の高い粉末活性炭を混合利用することで、2-MIB 除去率を向上でき、さらに同等の 2-MIB 除去率の達成に必要な活性炭総使用量を低減できることが示された。

DOM の精密質量スペクトル解析について、地点間の差は濃縮方法（固相抽出、乾燥濃縮）に間で類似した差を見出すことができ、また各地点の特性と矛盾のないものであった。一方で、同一地点での季節間の変化は、地点間の差よりも総じて小さく、濃縮方法によって異なる傾向が得られる場合があった。濃縮方法による差が何を意味するかは、今後もモニタリングを続け、他の水質指標との関連性を評価する必要があると考えられる。

生ぐさ臭原因物質の構造解析について、得られたマススペクトルを解析して原因物質のカルボニル基の構造を推定した。その結果、生ぐさ臭原因物質はアルデヒド基を有しておらず、2個のカルボニル基はいずれもケトンであること、そのうち1個は末端ケトン構造であることが示唆された。続いて、原因物質の全体構造を推定した結果、4個の異性体に限定することができた。そして、装置コストが安価、かつ操作が容易であり広く普及している GC/MS を用いた簡便な化学分析方法を示した。

カビ臭産生藍藻類の同原因物質の産生量、同原因物質合成酵素遺伝子の発現量に対する環境因子の影響について評価し、通常の観測項目における環境因子（窒素、水温）から、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖とカビ臭物質産生の特性を推量する知見を得た。また、カビ臭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。さらに、水源におけるカビ臭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同藍藻類の識別と定量に有効と期待できる whole-cell qPCR 法を開発し、現場でサンプリング後にカビ臭産生藍藻類を定量できる知見が得られた。

## E. 結論

SVMを用いることで、ダム湖における1週間後の藻類異常発生を予測するモデルを開発した。そして開発した予測モデルを適用することで、*Microcystis* 属、*Anabaena* 属に関しては高い予測性能が得られた。

中国での導水事業等による水環境改善に関する報告内容を取りまとめた。ここ1年余の間で30件を超える研究報告が行われており、それらの研究は、様々な水域について各種手法を用いて実施されていた。

新たに構築したPCR系を用いたカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定法を適用することで、水源試料でのカビ臭産生藍藻類を簡易同定可能であり、顕微鏡観察と組み合わせることで早期にカビ臭産生藍藻類の同定が可能となることが示唆された。

カビ臭発生水源より単離した2-MIB産生株である*P. limnetica*, *M. autumnalis* は共に、2-MIB産生に及ぼす温度の影響が大きいことが明らかとなった。今後は、株間、培養条件の違いによるカビ臭原因物質産生の違い等、さらなる検討が必要と考えられた。

粉末活性炭処理における2-MIB除去率の低下に関与する競合物質は、原水ごと、そして時期により異なり、カビ臭が発生する時期を踏まえた上で、競合物質による2-MIB除去率への影響を把握可能な指標を水源ごとに選択する必要があることが示された。複数種の粉末活性炭の混合注入による2-MIBの除去効果について、2-MIB除去性の高い粉炭を少量だけ混合使用することで2-MIB除去率を向上でき、活性炭総使用量を低減できることが示された。

DOMの精密質量スペクトルの差異解析による地点間の差について濃縮方法で比較したところ、比較的濃縮操作の自動化が簡単な固相抽出であっても倍率を上げれば十分乾燥濃縮と同等の傾向が得られることが明らかとなった。一方で同一地点での季節間の変化は、濃縮方法により差異解析の結果に明瞭な違いが現れ得ることが示された。この差の意味も含め、更に長期的なモニタリングを継続して、年間を通じたバックグラウンドスペクトルを得た上で差異解析を行うことが望ましいと考えられた。

水道水生ぐさ臭原因物質の構造について、4個の異性体に限定することができた。また、浄水場への導入が進んでいる汎用型GC-MSを用いて、簡便な分析方法を提案した。本提案に基づいて分析すれば、推定された物質の相対的な濃度を実測可能であると考えられた。

環境因子(窒素、水温)がカビ臭物質産生藍藻類の増殖と同物質の産生量に与える影響について明らかとなった。また、新たに開発した whole-

cell qPCR法の有用性が示され、本手法を用いたカビ臭物質藍藻類の定期的なモニタリングにより、カビ臭発生の予測に貢献できると考えられた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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粉末活性炭への非平衡吸着. 水道協会雑誌. 89(6), 2-10, 2020.

江崎敦, 浅田安廣, 藤本尚志, 早坂泰彦, 鈴木孝俊, 山田晃平, 秋葉道宏. 形態学的特徴と遺伝子解析に基づく全国水道水源でのカビ臭原因物質産生藍藻類の存在調査. 水道協会雑誌. 90(5), 2-12, 2021.

Shinfuku Y, Takanashi H, 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*, 257, 127174, 2020.

Shinfuku Y, Nakamura T, Takanashi H, Nakajima, Ueda T, Akiba M. A Method to Purify a DNPH-derivatized Sample Using Solid Phase Extraction. *Environmental Science*, 33(5), 70-78, 2020.

Shen Q, Shimizu K, Miao H, Tsukino S, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M. Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of *Dolichospermum smithii*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 177-184, 2021.

### 2. 学会発表

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, LC-HRMS, GC-O, GC-HRMS, 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68回質量分析総合討論会, 2020.5, オンライン.

柳橋泰生, 周張弛, 白亦, 楊露. 中国における導水による水環境保全対策, 第42回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム, 2020.7, オンライン.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, ガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計を用いた水道水中の生ぐさ臭原因物質

- の構造推定, 環境科学会 2020 年会, 2020.9, ,  
オンライン.
- 松本恭太, 浅田安廣, 江崎敦, 藤本尚志, 秋葉道宏. PCR 法によるカビ臭原因物質産生 *Phormidium autumnale* の遺伝子検出に関する検討. 令和 2 年度水道研究発表会, 2020.11, 誌上発表.
- 江崎敦, 浅田安廣, 藤本尚志, 秋葉道宏. 遺伝子解析に基づくカビ臭原因物質藍藻類の同定. 令和 2 年度水道研究発表会, 2020.11, 誌上発表.
- 高篠鮎人, 浅田安廣, 神里良太, 茂田裕充, 浦上正, 秋葉道宏. 粉末活性炭処理における 2-メチルイソボルネオールとの競合吸着物質の推定. 令和 2 年度水道研究発表会, 2020.11, 誌上発表.
- 柳橋泰生, 白亦, 周張弛. 環境試料の臭気指数測定方法におけるベルヌーイ試行明白率の試算, 第 33 回におい・かおり環境学会, 2020.12, オンライン.
- 八島将太, 門屋俊祐, 西村修, 今本博臣, 三浦尚之, 秋葉道宏, 佐野大輔. 浄水障害を引き起こす藻類の水源域における異常発生予測モデルの開発, 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.
- 柳橋泰生, 周張弛. 中国における導水事業による水環境改善に関する研究の状況, 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.
- 松本恭太, 浅田安廣, 江崎敦, 藤本尚志, 秋葉道宏. カビ臭原因藍藻類の簡易同定に向けた合成酵素遺伝子検出の有用性評価. 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.
- 早坂俊一, 浅田安廣, 三好太郎, 秋葉道宏. カビ臭除去対応時における複数種の粉末活性炭混合注入を通じた使用量低減効果. 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.
- 山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, 生ぐさ臭を呈する水道原水から発見されたカルボニル化合物の構造推定, 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.
- 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, ガスクロマトグラフ高分解能質量分析計による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.
- Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, An Exploration of the Causative Substance of Fishy Smell in Raw Water for Taps by Combining High Resolution Mass Spectrometry and Multivariate Analysis, The 23rd Symposium of Japan Society on Water Environment Online, 2020.9, online.
- Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, An Exploration of the Causative Substance of Fishy Smell in Raw Water for Taps by Combining High Resolution Mass Spectrometry with Multivariate Analysis, Water and Environment Technology Conference 2020 Online, 2020.11, online.
- Qingyue Shen, Kazuya Shimizu, Hanchen Miao, Shinya Tsukino, Motoo Utsumi, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Osamu Nishimura, Yasuhiro Asada, Naoshi Fujimoto, Hirokazu Takanashi, Michihiro Akiba, 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), 2021.3, Tsukuba, Japan.
- Hanchen Miao, Qingyue Shen, Satoshi Ichise, Marie Shimada, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Hirokazu Takanashi, 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), 2021.3, Tsukuba, Japan.
- Ji Zhang, Qingyue Shen, Satoshi Ichise, Marie Shimada, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Hirokazu Takanashi, Michihiro Akiba, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Rapid detection for 2-MIB-producing cyanobacteria, The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), 2021.3, Tsukuba, Japan.
- 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. 実用新登録  
該当なし
  3. その他
- I. その他 (受賞等)
    - 新福優太, 公益社団法人日本水環境学会博士研究奨励賞 (オルガノ賞), An Exploration of the Causative Substance of Fishy Smell in Raw Water for Taps by Combining High Resolution Mass Spectrometry and Multivariate Analysis, 2020.9, 公益社団法人日本水環境学会.
    - 山下優輝, 2020 年会優秀発表賞 (富士電機賞), ガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計を用いた水道水中の生ぐさ臭原因物質の構造推定, 2020.9, 公益社団法人環境科学会.
    - 山下優輝, 第 55 回日本水環境学会年会学生ポスター発表特別賞 (ライオン特別賞), 生ぐさ臭を呈する水道原水から発見されたカルボ

ニル化合物の構造推定, 2021.3, 公益社団法人日本水環境学会.

Shen Q ら, ポスタープレゼンテーション賞, 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, 2021.3.

Miao H ら, ポスタープレゼンテーション賞, 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, 2021.3.

Zhang J ら, ポスタープレゼンテーション賞, Rapid detection for 2-MIB-producing cyanobacteria, The 4th International Conference on Recent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment, 2021.3.

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2年度 分担研究報告書

令和3（2021）年 3月



閉鎖性水域における  
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





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：閉鎖性水域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 シニアアドバイザー  
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

研究要旨

日本の水道水源の約 50%はダム湖から供給されている一方で、主に夏に発生する藻類により、景観障害や悪臭、水生生物の大量死、カビ臭など、さまざまな悪影響が及ぼされている。もし事前に藻類の異常発生を予測することができれば、取水位置の変更準備や凝集剤の補充等、被害を最小限に抑えるための工学的対応を取ることが可能となる。そこで本研究では、機械学習手法のひとつであるサポートベクターマシン (Support Vector Machine : SVM) を用いて、ダム湖での藍藻類の発生を事前に予測するための統計モデルを構築した。予測モデルの入力データとして水質データ、気象データ、及び水理学的データを使用し、予測日から 1 週間後に藍藻類が発生するか否かを予測することを試みた。その結果、*Microcystis* 属及び *Anabaena* 属に関し高い予測性能を示すモデルの構築に成功した。*Microcystis* 属の最良モデルでは、全窒素濃度、流入量、最高気温、風速の変数が採用されていたことから、これらの変数が *Microcystis* 属の発生予測において重要な予測因子であると考えられた。*Anabaena* 属に関しては、最良モデルにおいて全窒素濃度、最高気温、風速の変数が採用されており、これらの変数が *Anabaena* 属の発生予測において重要な予測因子であると考えられた。

A. 研究目的

日本においてダム湖は水道水源全体の約 5 割を占める重要な取水源となっている。一方で、夏季を中心にダム湖の表層付近で藍藻類が異常発生することで、水面に藻類群体が集積するアオコ等の水の華が見られるようになる。アオコの発生によってダム湖における景観障害や異臭、水生生物や魚類の大量死など様々な悪影響を及ぼすだけでなく、上水道システムにおいてもカビ臭等の異臭味障害や処理設備の故障による処理効率の低下などをもたらす。加えて、*Microcystis* 属が産生するミクロキスチン等の毒性物質による健康被害も懸念される。もし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の工学的な対策を前もって施すことが可能となる。

以上の背景のもと、本研究では、機械学習手法の一つであるサポートベクターマシン (Support Vector Machine : SVM) を用いて、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。

B. 研究方法

水資源機構が管理する 4 つのダムを対象とし、それらのダムにおける藻類異常発生予測を行っ

た。使用した藻類細胞数及び放流量等のデータは水資源機構による定期水質調査の結果を用いた。気象データについては対象ダム近傍の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 2005 年から 2017 年の期間のデータを収集した。モデルに用いる変数選択においては、正則化回帰手法である Lasso 回帰及び Elastic Net 回帰を用いた。表 1 に示した変数候補は、既往研究及び現場管理者による経験を基に決定した。本研究では 1 週間後の藻類異常発生を予測の目的としたことから、気象データ及び水理学的データについては予測日の過去 7 日間のデータを用いた。

構築する予測モデルは 2 クラス分類を扱うため、各データに対し陽性と陰性の正解ラベルを与える必要がある。本研究では「1 週間後に藻類異常発生する」を陽性、「発生しない」を陰性とした。この際、現場管理者の経験を基に藻類種ごとに藻類異常発生の定義を決定した。*Microcystis* 属については 1ml あたりの藻類細胞数が 10000 個以上の場合を陽性、それ未満を陰性と定義した。*Anabaena* 属については 1mL あたりの藻類細胞数が 100 個以上の場合を陽性、それ未満を陰性とした。

整理されたデータセットは、予測モデル構築用の学習データと、モデルの予測性能検証用の検証データに分割した。データは陽性データ及び陰性データの割合に偏りのある不均衡データであるため、データの偏りを補正する学習データのサンプリング方法としてアンダーサンプリングと Synthetic Minority Over-Sampling Technique (SMOTE) を採用した。

本研究で構築するモデルは、入力データを基にそれぞれのデータに対し藻類異常発生が起きる確率を算出し、発生確率により1週間後に藻類異常発生が起きるかどうかを判定するものである。実際に藻類異常発生が起きた場合に予測に失敗すると藻類による被害が拡大してしまう可能性があることから、実際に藻類異常発生が起きる場合を確実に陽性と予測可能な状況にする必要がある。同時に、実際には藻類異常発生が起きない場合に陽性と予測してしまうことをできるだけ避ける必要がある。そこで、陽性と陰性を分ける閾値を再現率（実際のクラスが陽性であるデータを正しく陽性であるとモデルが予測できた割合）が100%となるように調整し、偽陽性率（False Positive Rate : FPR, 陰性を陽性であるとモデルが予測した割合）が最小となるモデルを最良モデルとした。併せて、各モデルの Area Under ROC Curve (AUC), 正解率, 適合率及びF値も算出した。

## C. 研究結果およびD. 考察

### (1) 変数選択

Lasso 回帰および Elastic Net 回帰を用いた変数選択の結果、室生ダムにおいては風が強いほど *Microcystis* 属が発生しにくいと考えられた。また、リンや窒素といった栄養塩濃度については濃度が高いほど藻類が発生しやすと考えられ、既往研究で得られた知見と一致した。*Anabaena* 属に関しては、リン濃度の回帰係数が0と推定され、室生ダムにおいてリン濃度は *Anabaena* 属の発生に与える影響は弱いという推定結果であった。実際にデータを確認したところ、室生ダムにおける *Anabaena* 属の発生と過去1年間の平均リン濃度の間には明確な関係性が見られなかった。

### (2) 室生ダムにおける藍藻類発生予測結果

室生ダムにおける *Microcystis* 属の発生予測モデルにおける変数選択の結果を表2に、予測結果を表3に示した。最良モデル#5では、AUC : 0.89, FPR : 20.0%, 正解率 : 84.0%, 適合率 : 55.6%と高い予測性能を示した。なお、最良モデル#5はカーネル関数としてガウスカーネル、サンプリング方法に SMOTE を採用して得られたものであった。

室生ダムにおける *Anabaena* 属の予測結果を表4に、予測結果を表5に示した。最良モデル#1では、AUC : 0.83, FPR : 35.0%, 正解率 : 72.0%, 適

合率 : 41.7%と高い予測性能を示した。なお最良モデル#1はカーネル関数としてガウスカーネル、サンプリング方法にアンダーサンプリングを採用して得られたものであった。

### (3) 追加検証

室生ダムにおける予測では高い予測性能が示されたが、本研究で提案する予測モデル構築方法の汎用性を確認するために追加検証を行った。水資源機構の管理するダムの中から阿木川ダム（岐阜県恵那市）、寺内ダム（福岡県朝倉市）、一庫ダム（兵庫県川西市）を追加検証の対象ダム湖として選択し、室生ダムと同様の予測モデル構築方法を適用した。また、室生ダムおよび追加3ダムを全て合わせた合同データによる予測モデル構築も行った。なお、阿木川ダム及び寺内ダムの *Microcystis* 属データについては陽性データがモデル構築を行う上で非常に少なかったため、4ダム合同データを用いた予測においてのみ用いた。

各ダムの最良モデル及びその予測結果を表6、表7、表8に示す。*Microcystis* 属についてはすべてのダムにおいて非常に高い予測性能が得られた。一方で、*Anabaena* 属の予測では寺内ダムを除く3つのダムにおいては高い予測性能が得られた。

寺内ダムにおいて予測性能が低く留まった原因を考察するために、各ダム間でのそれぞれの予測因子についてデータの特徴を確認した。各ダムにおけるデータの平均N/P比を比較すると、寺内ダムは平均51.4と他のダムと比較して高かった。藤本ら<sup>1)</sup>によれば、*Anabaena* 属を含む藍藻類はN/P比が30以上となる場合には優占化しにくい。またSmith<sup>2)</sup>らによる世界各地の17湖沼のデータ解析の結果でも、N/P比が29未満となる場合には優占化しやすくと結論づけられている。これらの知見から、N/P比が30程度を上回ると藍藻類は発生しにくくなると考えられる。しかしながら、寺内ダムでは年に3回程度の *Anabaena* 属の陽性データが確認されていることから、寺内ダムにおいてはN/P比の他に *Anabaena* 属の発生に強い影響を与える因子が存在すると考えられた。

## E. 結論

本研究では、SVMを用いることで、ダム湖における1週間後の藻類異常発生を予測するモデルの開発を行った。*Microcystis* 属に関しては解析した全てのダムにおいて高い予測性能が得られた。各最良モデルにおいては共通して、全窒素濃度、流入量、最高気温、及び風速の変数が用いられ、これらが *Microcystis* 属の予測において重要な予測因子であると考えられた。*Anabaena* 属については、寺内ダムを除いた各ダムにおいて高い予測性能が得られた。各最良モデルにおいては共通して、全窒素濃度、最高気温、及び風速の変数が用いら

れ、これらが *Anabaena* 属の予測において重要な予測因子であると考えられた。寺内ダムにおける *Anabaena* 属の予測結果より、年平均 N/P 比が 30 を大きく超える場合には、本研究では考慮しなかった変数の影響が *Anabaena* 属の発生に関し大きいと考えられた。

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

八島将太, 門屋俊祐, 西村修, 今本博臣, 三浦尚之, 秋葉道宏, 佐野大輔. 浄水障害を引き起こす藻類の水源域における異常発生予測モデルの開発, 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン

Sirapat Khodseewong, Gissela Pascual, Munehiro Nomura, Takashi Sakamaki, Osamu Nishimura, Michihiro Akiba. The Mechanism of Aluminium Flocs Formation in Coagulation Process. 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

1) 藤本尚志, 福島武彦, 稲森悠平, 須藤隆一. 全国湖沼データの解析による藍藻類の優占化と環境因子との関係. 水環境学会誌, Vol. 18, No. 11, pp. 901-908, 1995.

2) V. H. Smith. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue- green algae in lake phytoplankton. Science, Vol. 221, No. 4611, pp. 669-671, 1983.

表 1. モデル構築における変数候補

データ	単位	説明
cellnumber	cell/mL	モデルの目的変数として、藻類細胞数を用いた。
TP1yp	mg/L	測定日より過去1年間の全リン濃度(各月1回程度の測定)の平均値を用いた。
TN1yp	mg/L	測定日より過去1年間の全窒素濃度(各月1回程度の測定)の平均値を用いた。
Inflow7	m <sup>2</sup> /s	測定日より過去7日間の流入量の平均値を用いた。
Discharge7	m <sup>2</sup> /s	測定日より過去7日間の放流量の平均値を用いた。
AveMaxTemp7	°C	測定日より過去7日間の最高気温の平均値を用いた。
AveWind7	m/s	測定日より過去7日間の風速の平均値を用いた。
Sun7	時間	測定日より過去7日間の日照時間の合計を用いた。
Rain7	mm	測定日より過去7日間の降水量の合計を用いた。

表 2. 室生ダムにおける *Microcystis* 属予測モデル

モデル	入力データ
#1	TP1yp, TN1yp, Inflow, Discharge7, AveMaxTemp7, AveWind7, Sun7, Rain7
#2	TP1yp, TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7, AveWind7, Sun7, Rain7
#3	TP1yp, TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7, AveWind7, Sun7
#4	TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7, AveWind7, Sun7
#5	TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7, AveWind7

表3. 室生ダムにおける *Microcystis* 属の発生予測結果

	gaussian						linear						polynomial					
	Under Sampling			SMOTE			Under Sampling			SMOTE			Under Sampling			SMOTE		
	AUC	FPR	OC	AUC	FPR	OC	AUC	FPR	OC	AUC	FPR	OC	AUC	FPR	OC	AUC	FPR	OC
#1	0.76	60.0%	47.8%	0.85	45.0%	20.1%	0.66	80.0%	29.8%	0.76	70.0%	7.0%	0.67	80.0%	46.2%	0.77	60.0%	4.8%
#2	0.72	55.0%	42.9%	0.84	40.0%	13.4%	0.72	75.0%	24.2%	0.74	70.0%	4.8%	0.66	80.0%	40.9%	0.78	60.0%	2.8%
#3	0.72	55.0%	46.8%	0.86	40.0%	6.6%	0.67	85.0%	36.4%	0.71	70.0%	7.5%	0.63	90.0%	36.7%	0.74	90.0%	0.0%
#4	0.75	50.0%	34.9%	0.82	20.0%	21.3%	0.65	90.0%	32.4%	0.71	70.0%	9.1%	0.78	75.0%	37.9%	0.75	55.0%	14.9%
#5	0.64	100.0%	0.0%	0.89	20.0%	7.4%	0.63	85.0%	39.1%	0.67	75.0%	9.1%	0.76	70.0%	35.0%	0.70	50.0%	3.9%

表4. 室生ダムにおける *Anabaena* 属予測モデル

モデル	入力データ
#1	TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7, AveWind7, Rain7
#2	TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7, Rain7
#3	TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7

表5. 室生ダムにおける *Anabaena* 属の発生予測結果

	gaussian						linear						polynomial					
	Under Sampling			SMOTE			Under Sampling			SMOTE			Under Sampling			SMOTE		
	AUC	FPR	OC	AUC	FPR	OC	AUC	FPR	OC	AUC	FPR	OC	AUC	FPR	OC	AUC	FPR	OC
#1	0.83	35.0%	24.5%	0.59	75.0%	4.2%	0.54	85.0%	12.6%	0.53	85.0%	2.8%	0.78	80.0%	28.6%	0.79	75.0%	0.0%
#2	0.76	40.0%	33.5%	0.46	100.0%	0.0%	0.55	85.0%	10.5%	0.52	85.0%	2.7%	0.73	80.0%	10.4%	0.66	80.0%	0.0%
#3	0.70	40.0%	31.3%	0.56	80.0%	4.2%	0.51	85.0%	8.1%	0.51	85.0%	1.7%	0.63	80.0%	5.7%	0.64	80.0%	0.1%

表6. 4ダムにおける最良モデル

最良モデルの入力データ		
室生ダム	<i>Microcystis</i>	TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7, AveWind7
	<i>Anabaena</i>	TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7, AveWind7, Rain7
寺内ダム	<i>Microcystis</i>	-
	<i>Anabaena</i>	TN1yp, AveMaxTemp7, Sun7
一庫ダム	<i>Microcystis</i>	TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7, AveWind7
	<i>Anabaena</i>	TN1yp, AveMaxTemp7, AveWind7, Rain7
4ダム合同	<i>Microcystis</i>	TP1yp, TN1yp, Inflow, AveMaxTemp7, Sun7, AveWind7
	<i>Anabaena</i>	TP1yp, TN1yp, Discharge7, Inflow7, AveMaxTemp7, Sun7, AveWind7

表 7. 4 ダムにおける *Microcystis* 属の発生予測結果

	室生ダム	寺内ダム	一庫ダム	4ダム合同
AUC	0.89	-	0.95	0.93
FPR	20.0%	-	10.0%	15.0%
正解率	84.0%	-	92.0%	88.0%
適合率	55.6%	-	71.4	62.5
再現率	100.0%	-	100.0%	100.0%
F値	0.71	-	0.83	0.77

表 8. 4 ダムにおける *Anabaena* 属の発生予測結果

	室生ダム	寺内ダム	一庫ダム	4ダム合同
AUC	0.83	0.60	0.81	0.82
FPR	35.0%	60.0%	25.0%	25.0%
正解率	72.0%	52.0%	80.0%	80.0%
適合率	41.7%	29.4%	50.0%	50.0%
再現率	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
F値	0.59	0.45	0.67	0.67



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等に関する研究の状況について、昨年度に引き続きとりまとめた。中国では、南水北調にみられるように流域を跨ぐ導水事業が多く実施されており、水質の改善を目的とする場合もある。導水事業による水環境の改善効果、影響等を調べた研究は、以前は、太湖、滇池等の重点対策湖沼を対象としたものが多かったが、研究対象水域、手法も多様なものとなっており、ウォーターフットプリントの算定、太陽光発電システムの導入、マイクロプラスチックによる汚染等の研究も実施されている。中国では、導水路が河川、湖沼と並ぶ研究対象分野として大きな位置付けをもってきていると推察される。

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<sup>1)</sup>。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年以来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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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、2020年以降発表された文献について内容をまとめた。

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. 研究結果およびD. 考察

2020年以降に報告された30件を超す研究論文を入手した。研究対象水域別に導水事業による水環境の改善等に関する研究報告の概要を表-1に示

す。研究対象水域は、重点対策湖沼(太湖、滇池等)、南水北調東ルート・中央ルート、北西部オアシス、都市内、その他に分類した。

研究の傾向としては、10年程前は、2007年にアオコの大発生がみられ水道に大きな影響を与えた太湖等重点対策湖沼の研究が多かったが、最近では、南水北調に関する研究が多くみられ、全国的に研究対象水域が拡大していた。

太湖および滇池では、以前はモデル計算による導水事業の効果に関する研究が主流であったが、最近では、導水事業前後の実測による導水事業の評価が行われるようになってきている。以前は研究報告には原データの掲載はなかったが、今回、導水事業の評価を行うため、長期間の測定データが掲載されていたのは画期的である。

今回の調査では、南水北調に関する研究が多くなっており、富栄養化、重金属汚染、硫酸塩汚染、再生水利用との比較、住血吸虫、ウォーターフットプリント、生態系、総合評価等研究内容や手法が多様なものとなっていた。

北西部オアシスへの導水に関する研究については継続的に報告が行われている。また、雲南省、浙江省などの地方の導水事業に関する報告が見られた。

英文の論文を検索したところ、導水事業に関するものは中国を対象としたものが圧倒的に多く、他の国での研究についてはほとんど報告がなかった。中国では、導水路が河川、湖沼と並ぶ研究対象分野として大きな位置付けをもってきていると推察される。

## E. 結論

中国では導水事業による水環境改善に関する研究が盛んであり、1年余の間に30件を超す研究報告が行われていた。研究は、様々な水域について各種手法を用いて実施されていた。日本の水環境改善政策の検討に参考になると考えられた。

## 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

柳橋泰生, 周張弛, 白亦, 楊露「中国における導水による水環境保全対策」第42回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム, 2020年7月, オンライン.

柳橋泰生, 白亦, 周張弛「環境試料の臭気指数測定方法におけるベルヌーイ試行明白率の試算」第33回におい・かおり環境学会, 2020年12月, オンライン.

柳橋泰生, 周張弛「中国における導水事業による水環境改善に関する研究の状況」第55回日本水環境学会年会, 2021年3月, オンライン.

## 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) Y. Xiong et al, Evolution of China's water issues as framed in Chinese mainstream newspaper, *Ambio*, 2016, 45:241-253.
- 2) X. Zhang 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年3月.
- 4) J. Dai et al, Impacts of a large river-to-lake water diversion project on lacustrine phytoplankton communities, *Journal of hydrology*, 87(2020)124938.
- 5) X. Mao et al, Analysis of influencing factors and entry efficiency of the Yangtze-Taihu Water Diversion Project, *Journal of China hydrology*, 40(2020)4:22-25(Chinese)
- 6) F. Peng et al, Shallow lake water exchange process before and after water diversion projects as affected by wind field, *Journal of hydrology*, 592(2021)125785.
- 7) W. Gao et al, identifying spatiotemporal alteration of nitrogen to phosphorus ratio of Lake Dianchi and driving forces during 1988-2018, *L. lake sci*, 33(2021)64-73(Chinese).
- 8) C. Guo et al, Patterns of fish communities and water

quality in impounded lakes of China's south-to-north water diversion project, *Science of the total environment*, 713(2020)136515.

9) C. Guo et al, Eutrophication and heavy metal pollution patterns in the water supplying lakes of China's south-to-north water diversion project, *Science of the total environment*, 711(2020)134543.

10) X. Qu et al, A holistic assessment of quality condition and spatiotemporal patterns in impounded lakes along the eastern route of China's South-to-North water diversion project, *Water research*, 185(2020)116275.

11) Z. Yu et al, Long-term monitoring of community succession in impoundment lake: Responses of macroinvertebrate to South-to-North Water Diversion Project, *Ecological indicators*, 118(2020)106734.

12) W. Xie, The source apportionment of sulfate associated with the Eastern Route of the South-to-North Water Diversion Project in Shandong Province during diversion water period, *South-to-north water transfers and water science & technology*, (2020) (Chinese).

13) Y. Liu et al, Alternative water supply solutions: China's South-to-North-water-diversion in Jinan, *Journal of environmental management*, 276(2020)111337.

14) Y. Huang, The South-to-North Water Diversion Project and schistosomiasis: an overview, *Chin J schisto control*, (2020) (Chinese).

15) Z. He et al, Remote sensing inversion of water quality parameters and its influencing factors in the lake of South-to-North Water Diversion Project, *Water resources protection*, 2021-1-277(Chinese).

16) P. Zhao et al, Does water diversion project deteriorate the water quality of reservoir and downstream? A case-study in Danjiangkou reservoir, *Global ecology and conservation*, 24(2020)e01235.

17) X. Nong et al, Evaluation of water quality in the South-to-North Water Diversion Project of China using the water quality index (WQI) method, *Water research* 178(2020)115781.

18) J. Liu et al, Influences of the south-to-north water diversion project and virtual water flows on regional water resources considering both water quantity and quality, *Journal of Cleaner Production* 244(2020)118920.

19) D. Feng et al, Footprint assessments on organic farming to improve ecological safety in the water source areas of the South-to-North Water Diversion project, *Journal of cleaner production*, 254(2020)120130.

20) L. Zhu et al, Effects of Water Diversion Project on groundwater system and land subsidence in Beijing, China, *Engineering geology*, 276(2020)105763.

21) B. Ye et al, Feasibility of coupling PV system with long-distance water transfer. A case study of China's "South-to-North water diversion", *Resources, conservation & recycling*, 164(2021)105194.

- 22) Q. Shao et al, Study on evaluation of water resources value from South-to-North Water Transfer Project in Beijing, *Water resources and hydropower engineering*, 51(2020)S2:220-225(Chinese).
- 23) J. Tang et al, Ecosystem structure and function of the main channel of the middle route of south-north water diversion project, *China environmental science*, 40(2020)12:5391-5402(Chinese).
- 24) J. Li et al, Study on ecological compensation standards of water receiving area for trans-basin water transfer project, *Water power*, 47(2021)1:1-6,33(Chinese).
- 25) Q. Shen et al, Did water diversion projects lead to sustainable ecological restoration in arid endorheic basins?, *Science of the total environment*, 701(2020)134785.
- 26) F. Huang et al, An entropy-based investigation into the impact of ecological water diversion on land cover complexity of restored oasis in arid inland river basins, *Ecological engineering*, 151(2020)105865.
- 27) F. Huang et al, Modeling oasis dynamics driven by ecological water diversion and implications for oasis restoration in arid endorheic basins, *Journal of hydrology*, 2020.11.12.
- 28) C. Qian et al, Water quantity optimization method for improving water quality of Xuanwu Lake by water diversion, *Water resources protection*, 2021-01-29(Chinese).
- 29) H. Yang et al, Residues, bioaccumulation, and trophic transfer of pharmaceuticals and personal care products in highly urbanized river affected by water diversion, *Journal of hazardous materials*, 391(2020)122245.
- 30) C. Zhang et al, An ensemble Kalman Filter approach to assess the effects of hydrological variability, water diversion, and meteorological forcing on the total phosphorus concentration in a shallow reservoir, *Science of the total environment*, 724(2020)138215.
- 31) C. li, Impact of microplastics on microbial community in sediments of the Huangjinxia Reservoir-water source of a water diversion project in western China, *Chemosphere*, 253(2020)126740.
- 32) L. Jinhua, Water age distribution characteristics of Lake Star (Zhaoqing, Guangdong) influenced by the Water Diversion Project and wind field, *J.lake.sci*, 33(2021)2:449-461(Chinese).
- 33) L. Luo et al, Analysis of the impact of Water Diversion Project on the ecological environment of storage lakes, *Water power*, (2021)(Chinese).
- 34) S. Wu et al. Study on influence of water temperature on long distance water diversion –taking Dongfeng Reservoir as an example, *Sichuan environment*, 39(2020)6:96-101 (Chinese).
- 35) Z. Song et al, Ecological benefit calculation of inter-basin water diversion projects based on energy analysis, *Journal of water resources & water engineering*, 31(2020)5:56-61(Chinese).
- 36) X. Chen, Studies on pricing mechanism for ecological water diversion project based on supply and demand game equilibrium, *China water resources*, 21(2020)38-40(Chinese).

表1 導水事業による水環境改善等に関する研究の概要

対象水域	概要
太湖	導水は太湖の藻類の多様性を増加させ構造を変化させたが、水源河川の栄養塩が多くプラスの効果は短期的であった <sup>4)</sup> 。太湖の水質改善に大きな役割を果たしている長江からの導水について、2002-2017年のデータを基に、取水量と実際に太湖に流入する水量の比率を解析し、導水のスケジュールや支流の影響が大きいこと示した <sup>5)</sup> 。
滇池（テンチ）	24年間蓄積された水位データを基に水循環の計算を行ったところ、湖心付近で水が滞留しており、導水により水の滞留時間を38～52%減少させることができることがわかった <sup>6)</sup> 。2013年から導水が実施されている滇池における全窒素、全リン濃度について1988年から2018年の変化を解析した結果、内湾部の草海では2008年、その他の大部分を占める外海では2004年をピークに減少に転じていることがわかった <sup>7)</sup> 。
南水北調東ルート	上下流の5湖沼で生物的均質化が促進された <sup>8)</sup> 。水源湖の西部・南西部は富栄養化しており、重金属汚染があった <sup>9)</sup> 。上流から下流まで湖沼の水質を調べたところ、全体的に良好であった <sup>10)</sup> 。南四湖の底生動物は初期に減少したが、その後回復した <sup>11)</sup> 。南四湖の硫酸塩汚染の原因について同位体分析を活用して調査したところ、湖の北部で濃度が高く、地質の影響が大きく、導水の影響は5%程度であった <sup>12)</sup> 。主要受水都市の済南市の再生水利用と雨水貯留の有効性を示した <sup>13)</sup> 。南水北調の計画が立案された頃から住血吸虫の拡散が懸念されていたが、中央ルートも含め調査した結果、安全が確認された <sup>14)</sup> 。東平湖の水質について南水北調の実施に伴う1985年と2015年の変化を衛星データ等により解析したところ、大きな変化があり、濁度とChl-aに逆相関がみられた <sup>15)</sup> 。
南水北調中央ルート	漢江（取水地点）と下流の貯水池の水質が同様の季節変化を示した <sup>16)</sup> 。新しい水質指標を考案し、水質が優れた水準にあることを示した <sup>17)</sup> 。ウォーターフットプリントの概念に基づき水ストレス指標を提案し、地域毎に算出した <sup>18)</sup> 。有機農業が奨励されている丹江口貯水池周辺地域でエコロジカルフットプリントを算出した <sup>19)</sup> 。北京の地盤沈下の減少を確認した <sup>20)</sup> 。太陽光発電システムを活用した導水事業を構想し、CO <sub>2</sub> 排出量削減率が98.45%に達することを示した <sup>21)</sup> 。南水北調による北京市にとっての価値を生態、環境、社会、経済、政治の5分野の合計19の指標で評価したところ、経済的価値が大きく気候調節やレクリエーションの価値は小さかった <sup>22)</sup> 。主要水路の生態系の構造について2015-2019年の観測データによって、生産者から消費者まで18のグループで構成されることを解明した <sup>23)</sup> 。生態補償を計算したところ、経済的利益の3%を超えないことがわかった <sup>24)</sup> 。
北西部オアシス	内陸の乾燥地の導水事業によるオアシスの生態系回復を示した <sup>25)</sup> 。北西部のオアシスへの導水量が累積2億5千万m <sup>3</sup> に達し、地下水位の1.2m上昇に貢献したが、衛星・航空画像の解析により土地被覆の改善に寄与したことがわかった <sup>26)</sup> 。地下水収支、蒸発散等を組み込んだモデルにより最適導水量を計算したところ、4,500万m <sup>3</sup> という結果が導かれた <sup>27)</sup> 。
都市内	南京市内の玄武湖（面積5.5m <sup>2</sup> ）を浄化するための導水量、汚水流入削減量をモデル計算により定量的に明らかにした <sup>28)</sup> 。南京市の導水が行われている都市内河川水中の医薬品およびパーソナルケア製品の濃度を測定したところ30物質が検出された <sup>29)</sup> 。天津市の浅いYuqiao貯水池において全リン濃度に与える要因を回帰モデルで解析したところ、導水が40%、水文学的変動が37%、気象が23%であった <sup>30)</sup> 。
その他	導水事業の水源となっている西部の黄神夏貯水池のマイクロプラスチックと微生物を調査し、マイクロプラスチックが588片/kgあり、微生物多様性と関係があることを示した <sup>31)</sup> 。複雑な形状でデッドスペースが多い広東省の星湖を対象として、モデル計算により湖内各地点の水の滞留時間を計算し、滞留を最小とする導水方法を提案した <sup>32)</sup> 。雲南省の金沙江から導水しているLashihai湖において導水による水生生物、沿岸植生、越冬鳥類等への影響を調査した結果をまとめた <sup>33)</sup> 。金沙江から661kmの長距離の導水を行う滇中導水による灌漑用水の水温への影響を調査したところ、導水によって0.4～2.0℃水温が低下することがわかった <sup>34)</sup> 。浙江省の流域間を跨ぐ導水事業を対象として、生態面の利益を過去の事例と比べ正確に定量的に計算した <sup>35)</sup> 。生態保全のための導水事業の補償において市場メカニズムを導入するため、政府と市場の関係強化や水の価格付けの提案を行った <sup>36)</sup> 。

## カビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定法の構築

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	松本	恭太



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：カビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定法の構築

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 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 松本 恭太 国立保健医療科学院 生活環境研究部 研究生

#### 研究要旨

遺伝子検出を用いたカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定法の開発を目的とし、PCRによるカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出に基づくカビ臭産生藍藻類の簡易同定を試みた。

本研究では単藻株 55 株、NIES 株 39 株、分譲株 20 株から抽出した DNA 試料を用いてジェオスミン産生株である *Dolichospermum* 属、*Aphanizomenon* 属、2-MIB 産生株である *Pseudanabaena* 属、*Planktothricoides* 属、*Microcoleus* 属に特異的な PCR 系を検討した。結果としては、*Microcoleus* 属を除く 4 属については非特異的な検出がなく、*Microcoleus* 属については 2-MIB 合成遺伝子と相溶性が高い *Phormidium* sp.のみ検出が確認された。

続いて、46 水源試料で構築した PCR 系を適用した結果、*Phormidium* sp.を単離した水源を除き、単離した産生株と同じ属の遺伝子のみが検出した。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 *Phormidium* sp.を単離した水源については *Microcoleus* 属に特異的な 16S rRNA 遺伝子の検出を組み合わせることで、カビ臭産生株が *Microcoleus* 属ではないことを示す結果となった。そのため、本研究で構築した PCR 系の有用性が示され、顕微鏡観察と組み合わせることで早期にカビ臭原因物質産生種の同定が可能となる。

#### 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するとともに、形態での種判断を補助するツールが必要となる。

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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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。PCR の検出においては *Dolichospermum* 属、*Aphanizomenon* 属の検証は進んでいるものの、2-MIB 合成遺伝子については属レベルで判定可能な PCR 系の構築に関する検討が進んでいない<sup>3)</sup>のが現状である。

以上の背景を踏まえ、本研究では遺伝子検出を用いたカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定法の開発を目的とし、PCRによるカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出に基づくカビ臭産生藍藻類の簡易同定を試みた。

#### B. 研究方法

##### 1. 対象試料

本研究は、平成 31 年 4 月～令和 3 年 3 月でカビ臭が発生した地域で採取した 46 水源試料を用いた。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、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. PCRによるカビ臭産生種の同定方法の確立

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、遺伝子解析に供した。

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、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子解析(*geoA*遺伝子、2-MIB合成遺伝子)<sup>4)</sup>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配列情報を取得した。

取得した配列情報をMEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)を用いて比較し、カビ臭原因藍藻類として代表的な5属(ジェオスミン:*Dlichospermum*属,*Apanizomenon*属 2-MIB:*Pseudanabaena*属,*Planktothricoides*属,*Microcoleus*属)について判定可能なプライマー対を設計した(表1)。そして、各DNA抽出試料を用いてPCRによるカビ臭原因藍藻類の属レベルでの簡易同定を試みた。

## 3. カビ臭発生水源でのカビ臭産生藍藻類の同定の試み

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。また、付着性藻類を対象とした場合、岩に付着している藻類をはがし、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、電気泳動にて検出結果を確認し、水源試料に存在するカビ臭産生種の同定を試みた。

## C. 研究結果およびD. 考察

単藻株55株、NIES株39株、分譲株20株から

抽出したDNA試料を用いて、表1に示すプライマーを用いて、PCRを実施した。*Dlichospermum*属、*Apanizomenon*属、*Pseudanabaena*属、*Planktothricoides*属については、カビ臭原因物質産生株であり、かつ形態観察ならびに16S rRNA遺伝子解析で既に同定された属種と同じ属のプライマーを使用した場合のみ増幅産物が検出する結果(図1, 2)となった。*Microcoleus*属については、*Microcoleus autumnalis*と形態的に類似しているが16SrRNA遺伝子配列が異なる*Phormidium* sp.からPCR増幅産物の検出が確認された。得られた2-MIB合成遺伝子の一部の配列情報を比較した場合、97.8%一致していることが確認され、さらに塩基配列が異なる連続部分は確認されなかった。そのため、本研究で得られた2-MIB合成遺伝子の配列情報の範囲では、特異的に*Microcoleus*属のみを検出できない可能性がある。しかし、*Phormidium* sp.は一部地域でのみ単離された株であり、日本の多く地域で問題となっているカビ臭原因藻類は*Microcoleus*属である。さらにPCRの検出結果と顕微鏡観察を加えることでより正確に*Microcoleus*属の産生株の存在を判断することが可能であるといえる。

以上、本研究で提案したプライマーを用いることでカビ臭産生藍藻類を属レベルで同定可能であることが示された。

続いて、46水源試料で構築したPCR系を適用したところ、*Phormidium* sp.を単離した水源を除き、単離した産生株と同じ属の遺伝子のみが検出する結果となった(図3)。また、*Phormidium* sp.を単離した水源については、*Microcoleus*属の16S rRNA遺伝子はPCRで検出されず、*Microcoleus*属のカビ臭産生株は存在しないことが明らかとなった。以上、本研究で構築した手法は培養よりも早く産生種を属レベルで判定できることから、顕微鏡での産生種同定のサポート情報として有用であるといえる。

## E. 結論

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、日本で代表的なカビ臭産生藍藻類の5属について、属レベルでの同定可能なPCR系を構築することに成功した。また同反応系を水源試料に適用したところ、非特異的な検出はほとんどなく、産生種を属レベルで同定可能であることが明らかとなり、本研究で構築した手法の有用性が示された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

1. 論文発表



江崎敦, 浅田安廣, 藤本尚志, 早坂泰彦, 鈴木孝俊, 山田晃平, 秋葉道宏. 形態学的特徴と遺伝子解析に基づく全国水道水源でのカビ臭原因物質産生藍藻類の存在調査. 水道協会雑誌; 90(5), 2-12, 2021.

2. 学会発表

松本恭太, 浅田安廣, 江崎敦, 藤本尚志, 秋葉道宏. PCR 法によるカビ臭原因物質産生 *Phormidium autumnale* の遺伝子検出に関する検討. 令和2年度水道研究発表会, 2020.11, 誌上発表.

江崎敦, 浅田安廣, 藤本尚志, 秋葉道宏. 遺伝子解析に基づくカビ臭原因物質藍藻類の同定. 令和2年度水道研究発表会, 2020.11, 誌上発表.

松本恭太, 浅田安廣, 江崎敦, 藤本尚志, 秋葉道宏. カビ臭原因藍藻類の簡易同定に向けた合成酵素遺伝子検出の有用性評価. 第55回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.

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) Devi A, Chiu YT, Hsueh HT, Lin TF (2021) Quantitative PCR based detection system for cyanobacterial geosmin/2-methylisoborneol (2-MIB) events in drinking water sources: Current status and challenges, Water Res., 116478.

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.

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。

表 1 本研究で使用したプライマー一覧

対象領域	属	フォワード (F) リバース (R)	配列 (5' → 3')	PCR 産物の サイズ (bp)
2-MIB 合成 遺伝子	<i>Microcoleus</i> 属	F	CAGCGGATCTTTTCTTCGAG	210
		R	TGAACCAGGTCGTTGTGAAA	
	<i>Pseudanabaena</i> 属	F	CACCAGATATTTTCTTCGAT	210
		R	TGAACCAAGTCGTTATGAAA	
	<i>Planktothricoides</i> 属	F	CAGGGGATCTTTTCTTCGAG	210
		R	TGAACCAGGTCGTTGTGGAG	
<i>geoA</i> 遺伝子	<i>Dolichospermum</i> 属	F	ACATTGAAATGCGGCGGAAA	153
		R	TCATTGCGGAGATGTACACC	
	<i>Aphanizomenon</i> 属	F	GTACATCTCCGCAACGACCT	133
		R	CCGCCTCTTGGGTACTTACA	

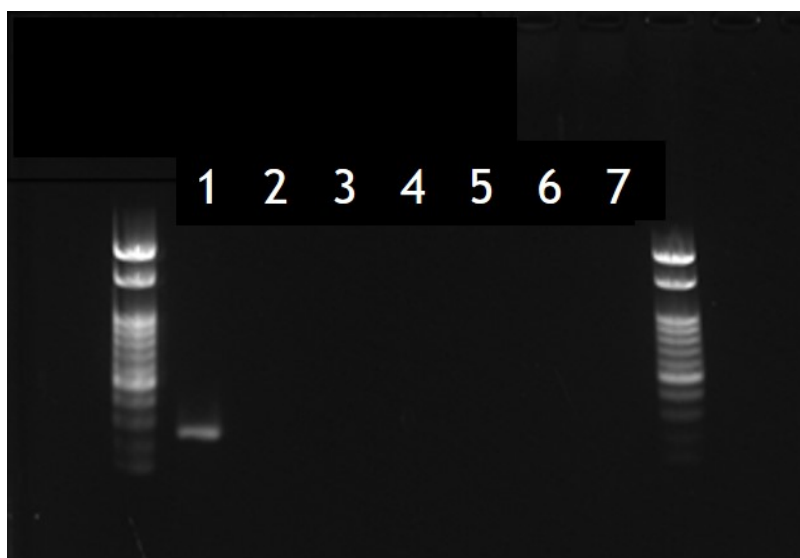


図 1 PCR (*Microcoleus* 属判定) による検出結果 (一部)

1. *Microcoleus autumnalis*, 2. *Microcoleus autumnalis*(非産生株), 3. *Pseudanabaena cinerea*
4. *Planktothricoides raciborskii*, 5. *Dolichospermum smithii*, 6. *Aphanizomenon gracile*,
7. Negative control

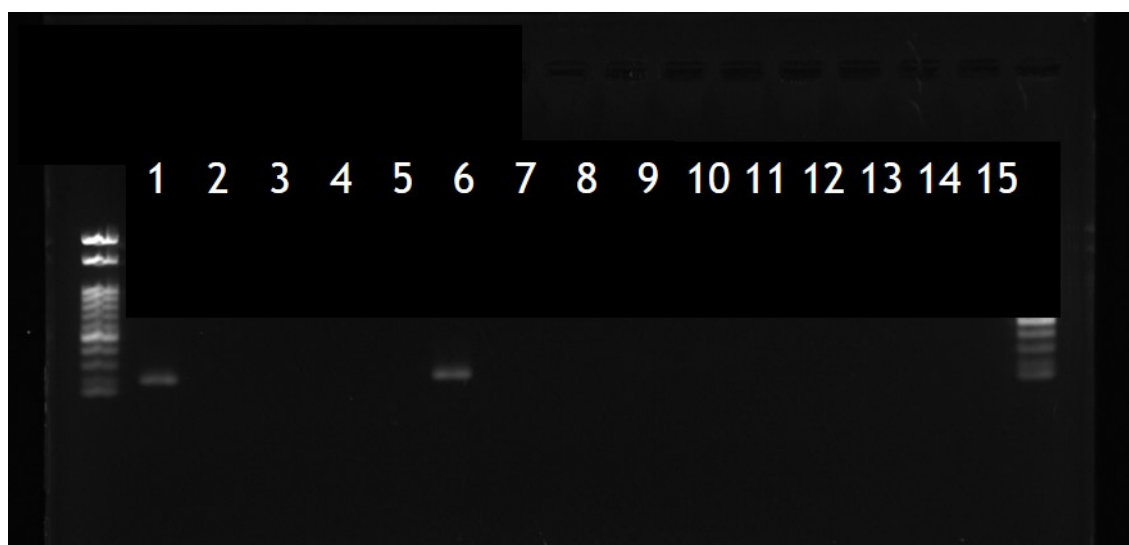


図 2 PCR (*Dolichospermum* 属判定) による検出結果 (一部)

1. *Dolichospermum smithii*, 2. *Pseudanabaena sp.*, 3. *Pseudanabaena yagii*(非産生株), 4. *Pseudanabaena yagii*,
5. *Planktothricoides raciborskii*, 6. *Dolichospermum planctonicum*, 7. *Limnothrix sp.* (非産生株), 8. *Limnothrix sp.* (非産生株),
9. *Pseudanabaena foetida*(非産生株), 10. *Pseudanabaena subfoetida*(非産生株),
11. *Oscillatoria sp.* (非産生株), 12. *Pseudanabaena sp.*, 13. *Dolichospermum affine*(非産生株),
14. *Dolichospermum lemmermannii* (非産生株), 15. Negative control

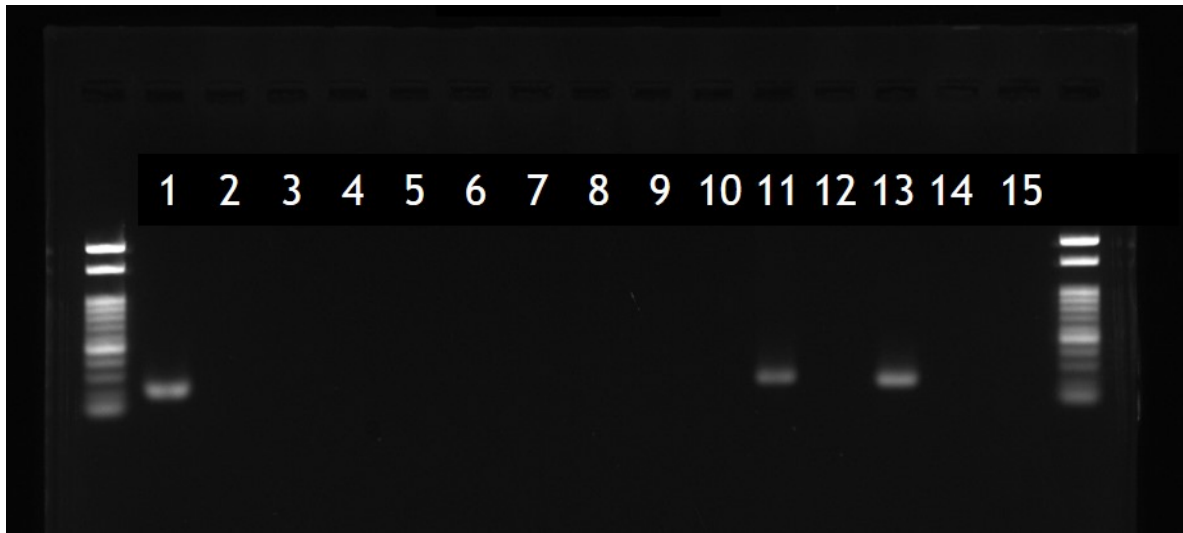


図3 水源試料に対する PCR (*Planktothricoides* 属判定) による検出結果 (一部)  
 1. *Planktothricoides raciborskii* (Positive control), 2-14. 水源試料, 15. Negative control

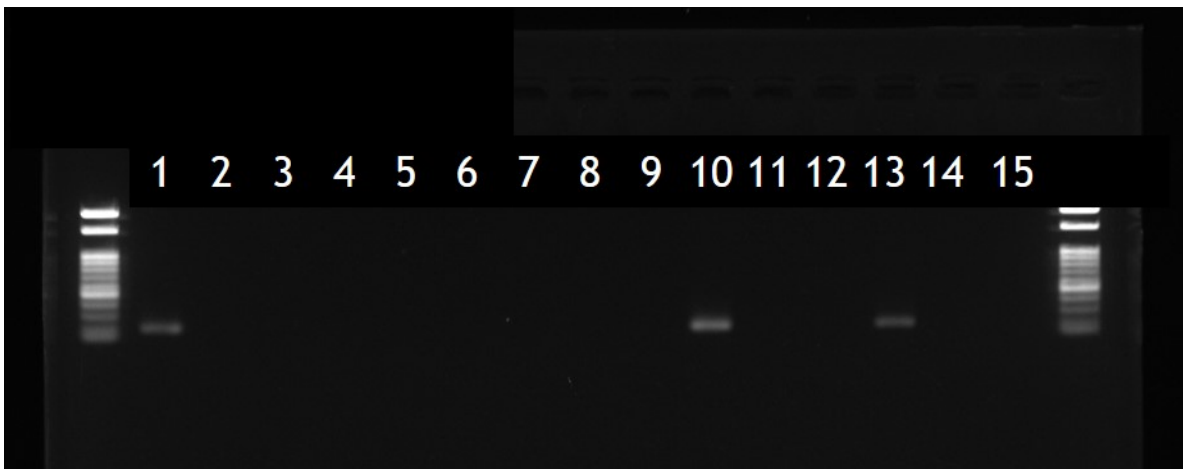


図4 水源試料に対する PCR (*Dolichospermum* 属判定) による検出結果 (一部)  
 1. *Dolichospermum smithii* (Positive control), 2-14. 水源試料, 15. Negative control



## 生物障害ポテンシャル評価手法の確立

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	松本	恭太



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：生物障害ポテンシャル評価手法の確立

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 松本 恭太 国立保健医療科学院 生活環境研究部 研究生

#### 研究要旨

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

本研究ではカビ臭原因物質が確認された水源から単離された *Pseudanabaena limnetica* および *Microcoleus autumnalis* について培養実験を行い、増殖過程におけるカビ臭の生成について検討を行った。*P. limnetica* の 2-MIB 産生に及ぼす温度の影響が大きいことが明らかとなった。*M. autumnalis* については増殖に及ぼす温度の影響が大きく 25°C で最も増殖速度が大きかった。一方 2-MIB 産生については 25°C で低くなる傾向がみられた。再現性も含めて株間におけるカビ臭産生特性の違い、培養条件の違いによるカビ臭産生の違い等についてさらなる検討が必要であると考えられた。

#### A. 研究目的

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

カビ臭の原因物質はジェオスミンと 2-MIB(2-メチルイソボルネオール)であり、それらを産生する主な原因生物として藍藻類があげられる。しかし、その中にはカビ臭産生種/非産生種が混在しているため、カビ臭を産生する種について、形態、16S rRNA 遺伝子の塩基配列、カビ臭物質合成酵素遺伝子の塩基配列に関するデータ収集を行うと同時に、その特徴について整理を行っていく必要がある。

そこで本研究課題ではカビ臭原因物質が確認された水源から単離された藻類株について培養実験を行い、増殖過程におけるカビ臭の生成について検討を行った。特に、温度条件に着目し、カビ臭生成に及ぼす温度の影響について検討を行った。

#### B. 研究方法

##### 1) 供試藻類および培養方法

供試藍藻類として、A 沼から単離された *Pseudanabaena limnetica* WILD-6 株、河川 B で単

離された *Microcoleus autumnalis* WILD-52 株を用いた。*P. limnetica* は、200ml 容三角フラスコを用いて培養を行った。CT 培地 100ml を入れて、オートクレーブ滅菌後、初期糸状体数が 500 糸状体/ml となるように接種した。100 μm を 1 糸状体とした。20, 25, 30°C で培養を行った。照度は 2000 lx (12 時間明/12 時間暗) とした。各条件につき 3 本ずつ試験を行った。5 日に 1 回程度糸状体数を Fuchs Rosenthal 血球計数盤を使用し光学顕微鏡により計測した。

*M. autumnalis* はねじ蓋付き試験管に CT 培地を 10ml 分注し、オートクレーブ滅菌後、糸状体が 10mm/ml となるように接種した。照度は 2000 lx (12 時間明/12 時間暗) とした。温度条件は 15°C, 20°C, 25°C, 30°C とした。*M. autumnalis* は付着性があり、顕微鏡観察による正確な菌数のカウントが困難であるため、増殖量を Chl.a 量により評価した。

1 週間おきに Chl.a の測定を行った。3 本の試験管を用いて行った。Chl.a の測定において、試験管内の試料(液部)を 25mm の GF/C で吸引ろ過し、そのろ紙を *M. autumnalis* が付着した状態の試験管内に戻し、0.2% MgCl<sub>2</sub> 含有 90% メタノールを 10ml 加えた。遮光した状態で 65°C の湯浴で 30 分加熱することにより Chl.a を抽出した。抽出液を遠心チューブに移し、2000rpm で 15 分間遠心分離した後、上澄み液を吸光度計で計測した。Chl.a 量の測

定は Shen らによったり。

## 2) カビ臭物質の測定

糸状体数のカウント, Chl. a の定量と同時にカビ臭物質の測定を行った。*P. limnetica* については培養液 0.3ml と CT 培地 1.4ml を 1.5ml 容エッペンに入れたもの, 培養液を孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過したろ液を 1.5ml 容エッペンに入れ満水にしたものについて測定を行った。

*M. autumnalis* については試験管 3 本について測定を行った。培養を行ったねじ蓋付き試験管内の液部をファルコンチューブに移し 3000rpm で 15 分間遠心分離を行った。上澄みを別のファルコンチューブに移し, それを CT 培地で満水にした (溶存態 2-MIB 測定用試料)。上澄みを取り除いたファルコンチューブに少量の CT 培地を加えボルテックスし, 底に沈殿した菌体をねじ蓋付き試験管内に移した。そして試験管を CT 培地で満水にした (菌体内 2-MIB 測定用試料)。このようにして菌体部と液体部に分離した状態でそれぞれ SPME-GC/MS 法に供した。

SPME-GC/MS システム (Agilent 5977B GC/MSD, Agilent 及び Multiple Sampler MPS Robotec Pro, Gerstel) を用いて, ジェオスミン・2-MIB 濃度を測定した。

## C. 研究結果および D. 考察

### 1) *P. limnetica*

各温度において 0 日目から 9 日目までが対数増殖期であった (図 1)。30°C よりも, 20°C, 25°C のほうが比増殖速度がやや大きいことが明らかとなった。9 日目以降は定常期となり, 培養温度による最大増殖量の違いは見られなかった。2-MIB 総濃度は 25°C において最も高く推移した (図 2)。20°C よりも 30°C のほうが 2-MIB 総濃度が高く推移した。これらの結果から温度による影響が大きいことが明らかとなった。

溶存態濃度について, 温度条件による大小関係は総濃度と同様であった (図 3)。培養後期のほうが高まる傾向がみられた。総濃度に占める溶存態濃度の割合は, 20°C と 30°C において培養後期に高まる傾向がみられ, 最大で 50% を超えていた (図 4)。一方 25°C では培養期間を通じて大きな変化は見られず, 20~40% の間を推移した。一糸状体あたりの 2-MIB 含有量は 30°C の 9 日目に特異的に高まり 0.0034ng/糸状体であった (図 5)。25°C では培養後期に他の温度に比べて明らかに高まり, 最大 0.0017ng/糸状体であった。20°C, 30°C を比較すると, 30°C のほうが増殖初期から高く推移したが, 培養後期では同程度となった。

### 2) *M. autumnalis*

初期の増殖速度は 25°C が最も速く, 次いで 30°C, 20°C, 15°C であった (図 6)。20~30°C では 3 週目で定常期になったのに対し, 15°C では 4 週目で定

常期になった。定常期の増殖量には違いが見られなかった。

2-MIB の総量は 20°C の一回目の実験では 14 日目に最大となり, その後減少がみられたが, その他の条件では, 培養日数とともに高まっていく傾向がみられた (図 7)。増殖が良好であった 25°C では 2-MIB 総量は低く推移した。溶存態 2-MIB 量は培養日数の経過とともに高まり, 25°C および 30°C において最も高まった (図 8)。2-MIB 総量に占める, 溶存態 2-MIB 量の割合は, 各温度で 14 日以降 20% 程度以下で推移したが 25°C において, 28 日目に 30% を超えた (図 9)。20°C において再現性が得られず, さらなる検討が必要と考えられた。

### 3) 二種間の比較

*P. limnetica* のほうが速やかに増殖し, 定常期に達するまでの時間が短いことが明らかとなった。培養方法の違いも影響している可能性が考えられた。*P. limnetica* は 25°C において, 2-MIB 濃度が最も高まったが, *M. autumnalis* は 25°C において 2-MIB 総量は低く推移し, 種類の違いにより 2-MIB 産生の温度特性が異なることが示唆された。*P. limnetica*, *M. autumnalis* とともに, 溶存態の 2-MIB は培養日数の経過とともに高まり, 各温度における溶存態 2-MIB の最大濃度はそれぞれ, 30000~80000ng/L, 20000~120000ng/L であった。両藻類ともに温度による違いはみられるが, 藻類間で溶存態 2-MIB の産生ポテンシャルに大きな差異はないと考えられた。これについては今後藻体量あたりの溶存態 2-MIB 放出量の評価が必要と考えられる。定常期における 2-MIB 総濃度 (総量) に占める溶存態濃度 (溶存態量) の割合は, *P. limnetica* のほうが高い傾向がみられた。

## E. 結論

*P. limnetica* の増殖曲線より, 増殖に及ぼす温度の影響は小さいが, 2-MIB 産生に及ぼす温度の影響は大きいことが明らかとなった。*M. autumnalis* については増殖に及ぼす温度の影響が大きく 25°C で最も増殖速度が大きかった。一方 2-MIB 産生については 25°C で低くなる傾向がみられた。再現性も含めて株間におけるカビ臭産生特性の違い, 培養条件の違いによるカビ臭産生の違い等, さらなる検討が必要と考えられた。温度や培養時期によって 2-MIB 産生が異なることから, それらの現象を理解するために, 2-MIB 合成酵素遺伝子の発現量の評価等の必要性が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし



G. 研究発表

- 1. 論文発表  
該当なし
- 2. 学会発表  
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

- 1. 特許取得  
該当なし
- 2. 実用新案登録  
該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

1) Shen Q, Shimizu K, Miao H, Tsukino S, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M: Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of *Dolichospermum smithii*, Environ. Sci. Pollut. Res., Vol. 28, pp.177–184, 2021.

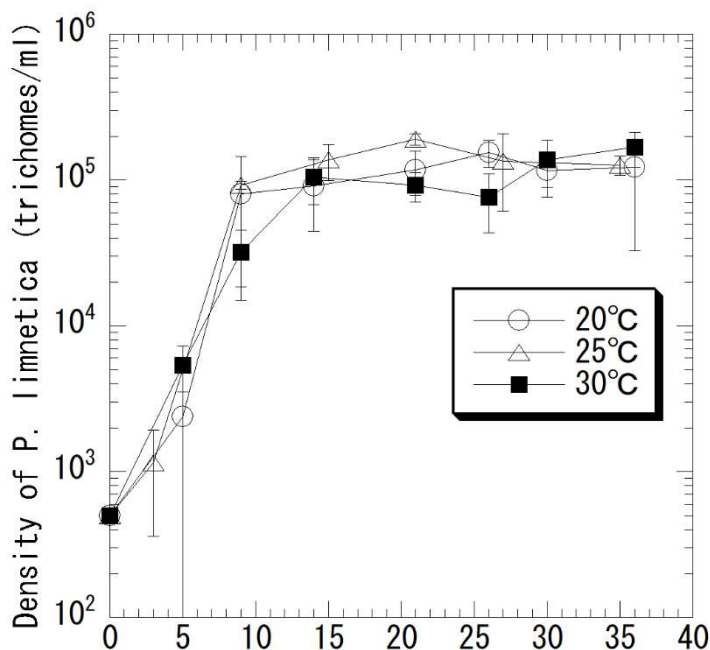


図1 *P. limnetica* の各温度における増殖曲線

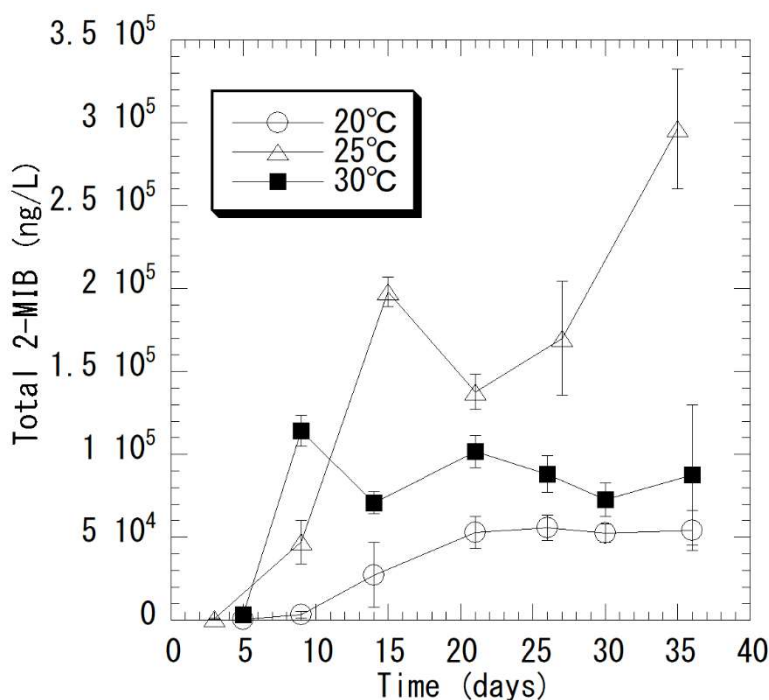


図2 各温度における2-MIB総濃度の推移(*P. limnetica*)

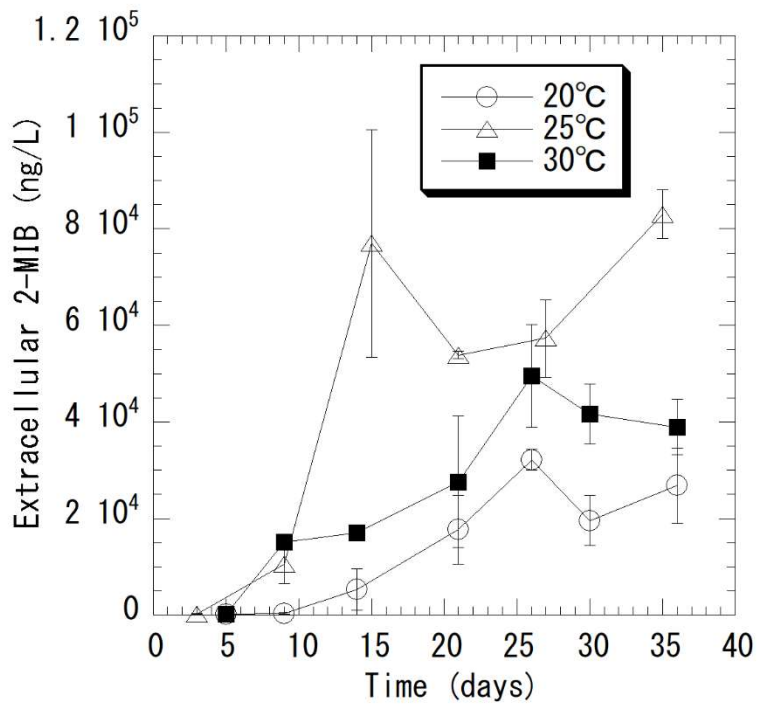


図3 各温度における2-MIB溶存態濃度の推移 (*P. limnetica*)

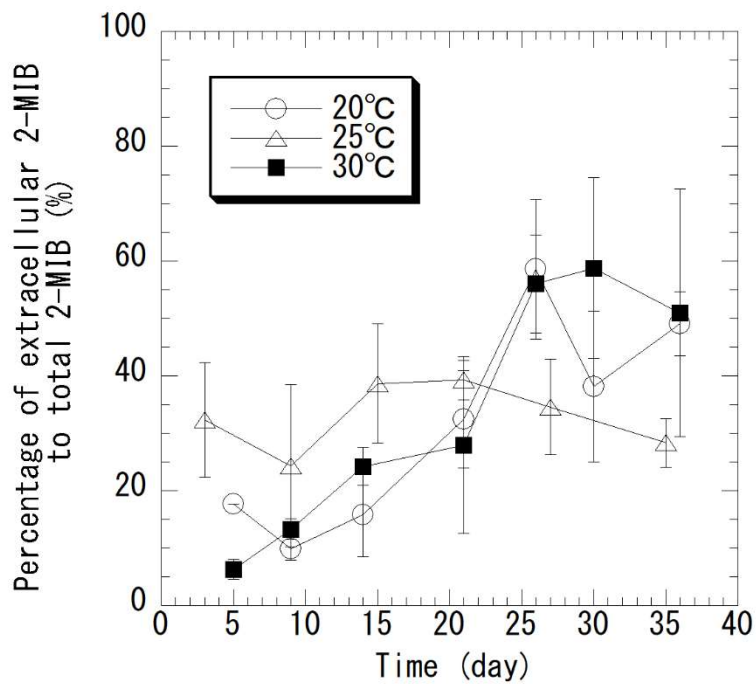


図4 各温度における2-MIB溶存態濃度の総濃度に占める割合の推移 (*P. limnetica*)

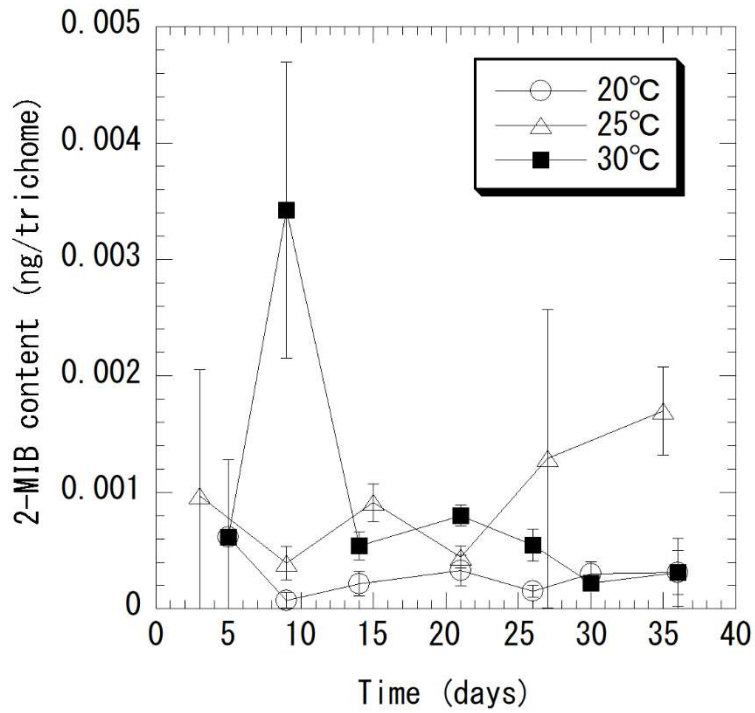


図5 各温度における2-MIB含有量の推移 (*P. limnetica*)

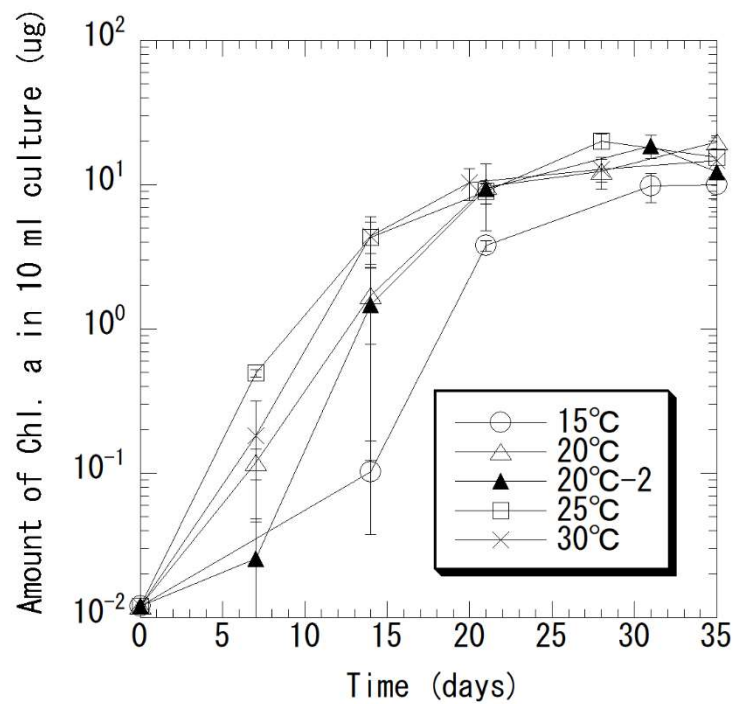


図6 各温度における10ml培養液中のChl. a量の推移 (*M. autumnalis*)

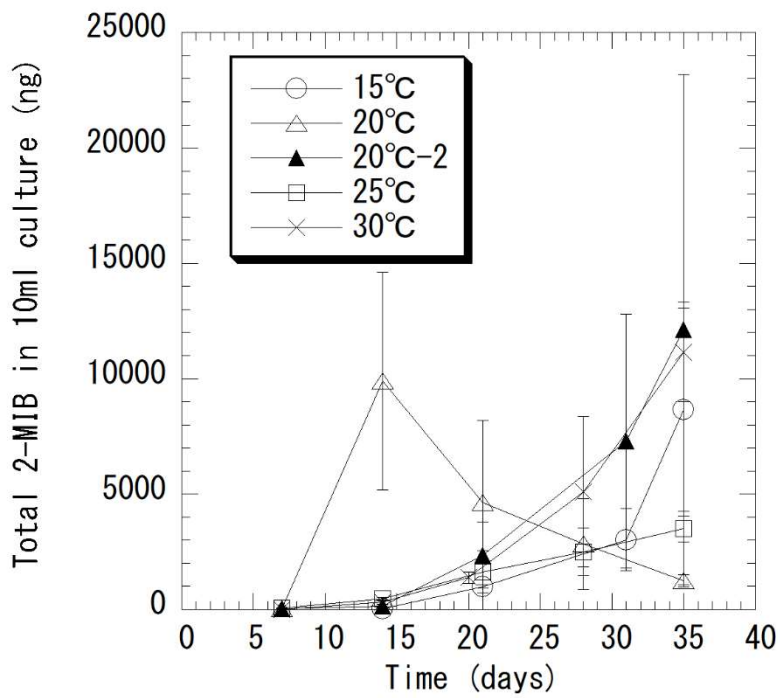


図7 各温度における 10ml 培養液中の総 2-MIB 量の推移 (*M. autumnalis*)

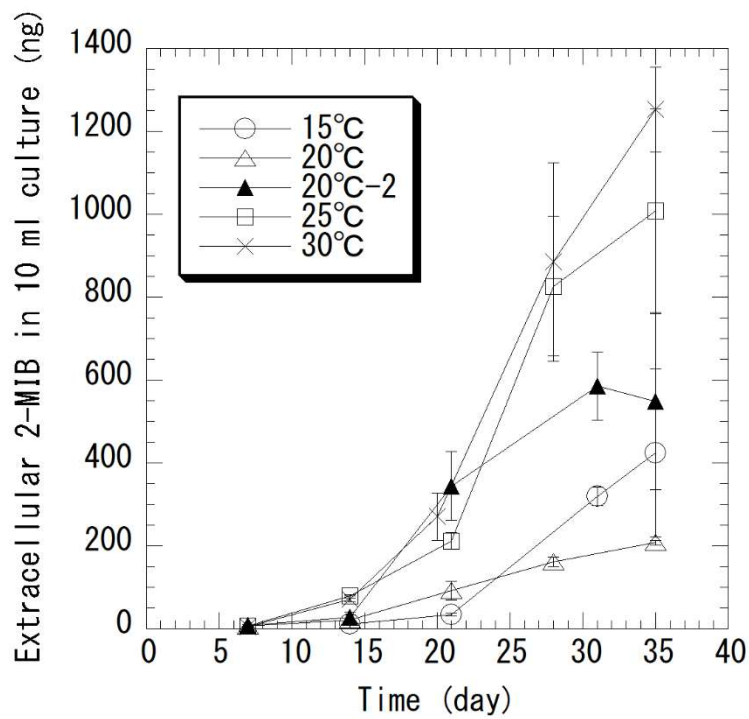


図8 各温度における 10ml 培養液中の溶存態 2-MIB 量の推移 (*M. autumnalis*)

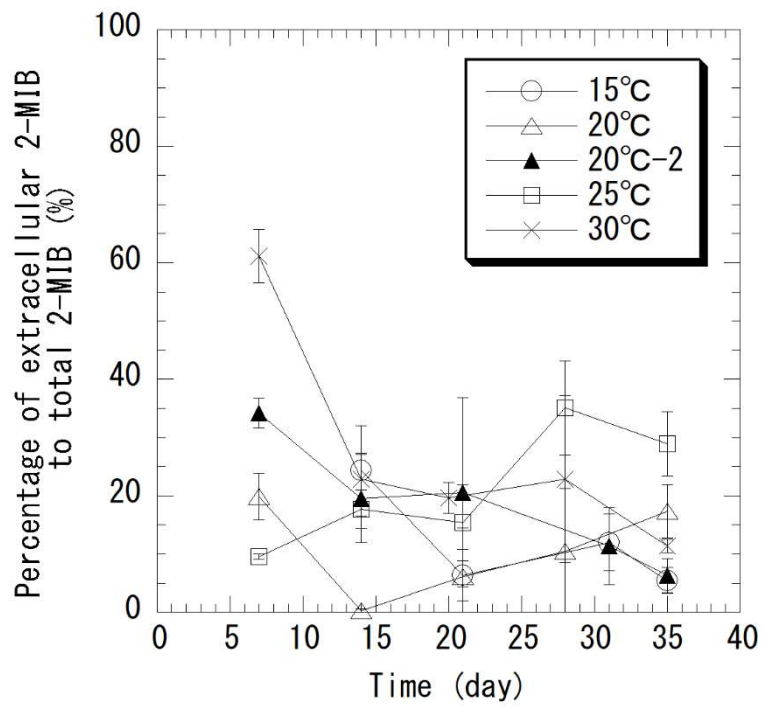


図9 各温度における溶存態 2-MIB 量の総量に占める割合の推移 (*M. autumnalis*)



## 粉末活性炭による 2-MIB の効率的除去に関する検討

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	浅田	安廣
研究協力者	三好	太郎
研究協力者	早坂	俊一





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 の効率的除去に関する検討

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 三好 太郎 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 早坂 俊一 国立保健医療科学院 生活環境研究部 研究生

研究要旨

粉末活性炭処理による 2-MIB 除去への効率性を向上させるために、2-MIB 吸着競合影響評価指標の探索ならびに複数種の粉末活性炭混合注入による 2-MIB 除去効果への影響評価を実施した。

3 つの浄水場の原水を用いてモニタリング試験を実施した結果、2-MIB 除去率の変動を評価可能な水質指標は明らかにできず、粉末活性炭処理における 2-MIB 除去率の低下に関与する競合物質は、原水ごと、そして時期により異なることが明らかとなった。一方、原水ごとに特定の期間においては 2-MIB 除去率の変動を評価可能な水質指標が示され、カビ臭が発生する時期を踏まえた上で、適切な指標を水源ごとに選択する必要があることが示された。

また複数種の粉末活性炭の混合注入による 2-MIB の除去効果について検討した結果、2-MIB 除去性の高い粉末活性炭を少量、混合使用することで 2-MIB 除去率を向上でき、水質基準値達成に対する 2-MIB 除去に必要な活性炭総使用量を低減できることが示された。

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、Matsui らにより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 未満の物質群が取り上げられている<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>ならびに非平衡吸着<sup>3)</sup>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。さらに、3 次元蛍光分析(Excitation-Emission Matrix, 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<sup>2,3)</sup>。

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。そのため、粉末活性炭を用いて効率よくカビ臭原因物質を除去するためには、これら競合物質の影響を受けない、あるいは効果的に除去可能な粉末活性炭の組み合わせ等を含めて

使用する必要がある。

一方、実際の浄水場で行われる水質試験では、ここまで詳細な物質群について定期的に測定していないのが現状である。そのため、粉末活性炭処理への競合影響を事前に把握するためには、競合影響を推測可能な指標が必要となる。

以上の背景を踏まえ、本研究では粉末活性炭による 2-MIB の効率的除去の検討に向けて、以下の 2 項目について実施した。

- ・モニタリング試験に基づいた粉末活性炭処理による 2-MIB 吸着競合影響評価指標の探索
- ・複数種の粉末活性炭混合注入による 2-MIB 除去効果への影響

B. 研究方法

1. 対象試料

モニタリング試験では、3 つの浄水場 (A, B, C 浄水場)原水について 2020 年 6 月から 2021 年 3 月までの期間で計 18 回採水を依頼した。各原水の水質情報を表 1 にまとめる。また、粉末活性炭混合注入試験では、国内浄水場の原水を用いて試験を行った。

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 2)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。なお、粉末活性炭試験へのメタノールの影響はないことが事前に確認されている。

モニタリング試験では原水試料に 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 A 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, 東京理科器械) 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 0.45 µm のメンブランフィルター (Membrane Solutions) 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。

粉末活性炭混合注入試験では、水道原水に 2-MIB 標準溶液を添加し初期濃度が 100 ng/L となるように調整した。粉炭懸濁液は粉炭 A と粉炭 B, C をそれぞれ混合し作製した。このとき、試料水へ注入した際の注入率として粉炭 A 注入率を 20ppm に固定したうえで、粉炭 B, C の注入率が 5,10,15,20ppm となるように粉炭懸濁液を調整した。また、粉炭 A, C については粉炭懸濁液の注入率を 20ppm で一定とし、混合割合を変化させた粉炭懸濁液を作製した。対照系として、混合する活性炭を粉炭 A とした粉炭懸濁液も同様に作製した。作製した粉炭懸濁液を試料水へ注入後、速やかに往復振とう機に取り付け、150rpm の振とう回数で 30 分間水平振とうした後、孔径 0.45 µm のメンブランフィルター (Membrane Solutions) で濾過することで試料水から粉炭を除去した。

全ての試験において 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、粉炭処理による水質指標と 2-MIB 除去率との関係性を評価した。測定項目は全有機炭素(TOC)濃度, 254 nm 吸光度 (UV254), 電気伝導率及び EEM を測定した。

## C. 研究結果および D. 考察

### 1. モニタリング試験に基づいた粉末活性炭処理による 2-MIB 吸着競合影響評価指標の探索

測定期間中で、各原水での 2-MIB 除去率は A 浄水場で 29.0-59.1%, B 浄水場で 20.9-46.0%, C 浄水場で 8.8-37.6%となった (図 1)。A 浄水場では、雨の影響で濁度が 45.6 度まで上昇したケースがあったが、2-MIB 除去率の低下への影響は確認されなかった。

続いて、各原水試料について取得した EEM データを用いて PARAFAC 解析を行った結果、Core Consistency が 90 以上となる component 数は全ての原水で 2 つとなった (表 3)。3 つの原水を比較すると、A 浄水場原水の PARAFAC 解析の結果が最も異なる傾向を示しており、トリプトファン様蛍光物質といった生物由来のピークが確認できず、フルボ酸様蛍光物質とフミン酸様蛍光物質といった腐植物質に関連するピークのみが確認された。この点からも各原水の水質は異なっており、2-MIB 除去率への影響が異なることが推察された。

測定期間中の 2-MIB 除去率と TOC 濃度, UV254, 電気伝導率, PARAFAC Score, そして TOC 1mgC/L 当たりの UV254, PARAFAC Score に関する相関関係を確認した (表 4)。結果として、相関関係が見られる水質パラメータは確認できなかった。ここで、井上らは全国 21 水道原水を用いて、高水温期と低水温期での 2-MIB 除去率と水質パラメータの相関関係を確認しており、高水温期と低水温期で傾向が異なることが確認されている<sup>3)</sup>。そこで、本調査でも高水温期 (中央値より高い時期)、低水温期 (中央値よりも低い時期) に区分して、各水質パラメータと 2-MIB 除去率の関係性について再評価した。

A 浄水場では、高水温期では電気伝導率、低水温期では TOC と負の相関が確認された。低水温期では UV254, PARAFAC Score とともに負の相関が確認され、フミン質濃度が影響している可能性が考えられた。一方、高水温期では電気伝導率が高いと 2-MIB 除去率が下がる傾向にあることから、フミン質ではなく汚染物質の流入が影響している可能性が示唆された。

B 浄水場では、高水温期、低水温期ともに TOC 濃度と 2-MIB 除去率で負の相関が確認された。しかし、年間を通じたデータを使用した場合、相関関係が確認されなかったことから、高水温期と低水温期で競合物質の特性が変化している可能性がある。高水温期では、TOC 濃度の他に UV254, PARAFAC Score(Component 1,2), TOC 1mgC/L 当たりの PARAFAC Score(Component 1)で負の相関が確認され、低水温期では PARAFAC Score(Component 1)と負の相関が、TOC 1mgC/L 当たりの UV254, PARAFAC Score(Component 1,2)で正の相関が確認された。高水温期では、アオコが

発生しており、PARAFAC Score(Component 2:トリプトファン様蛍光物質)とは強い負の相関を示していることから、生物由来物質が影響していると考えられる。一方、低水温期では TOC 1mgC/L 当たりの UV254, PARAFAC Score(Component 1,2)で正の相関が確認されていることから生物由来物質による 2-MIB 除去率への影響は少なく、それ以外のフミン物質による影響が示唆された。これより、時期によって起源を異にする有機物が主要な吸着競合成分となっていると推察される。

C 浄水場では、高水温期で TOC 1mgC/L 当たりの UV254, PARAFAC Score(Component 1,2)と負の相関、TOC 濃度と正の相関が確認された。一方、低水温期では相関性がある水質パラメータは確認されなかった。高水温期では、TOC 濃度と 2-MIB 除去率に正の相関が確認されたことから、競合影響が低い物質の変化が TOC 濃度変化に影響していると考えられる。そして、UV254, PARAFAC Score(Component 1,2)自体で相関性はなく、TOC 1mgC/L 当たりの UV254, PARAFAC Score(Component 1,2)で負の相関を示していることから、UV254, PARAFAC Score(Component 1,2)を示す物質群の一部が競合影響の強い物質であると考えられる。また低水温期は相関性がある水質パラメータは確認されなかったことから、採水時期ごとに競合影響を示す物質群が変化している可能性が考えられる。

以上より、本調査で用いた原水では競合影響を評価可能な共通指標は存在しないことが明らかとなった。また、本調査で用いた原水については、年間を通して競合影響を評価する水質指標も確認できなかった一方、時期を水温により区切ることで相関性を示す水質指標が一部確認された。そのため、各水源でカビ臭が発生する時期を考慮した上で、適切な指標を水源ごとに選択する必要があるといえる。

## 2. 複数種の粉末活性炭混合注入による 2-MIB 除去効果への影響

各粉末活性炭の 2-MIB 除去率 (図 2) ならびに有機物除去率 (図 3: PARAFAC Score (フルボ酸様蛍光物質) 除去率のみ掲載) を比較したところ、粉炭 A に対して粉炭 B は 2-MIB 除去率が大幅に向上、粉炭 C は 2-MIB 除去率と有機物除去率が大幅に向上しており、粉炭ごとに除去特性が異なることが示された。

続いて、粉炭 A 注入率を 20ppm に固定した混合注入の場合、2-MIB 除去性の高い 2 つの粉炭 (B, C) を添加することで、2-MIB 除去率は最大約 10% 向上した (図 4)。一方、フルボ酸様・フミン酸様蛍光物質の吸着性については粉炭 C との混合注入が優れていることが示された。また、90% 除去 (水質基準:10 ng/L) を達成可能な活性炭総使

用量は、2-MIB 除去性の高い粉炭 B, C を個温豪注入することで低減できることが示された。

次に粉炭懸濁液の注入率を 20ppm で一定にし、混合割合をさせた場合、2-MIB 除去性の高い粉炭 C を少量添加した場合でも 2-MIB 除去率向上の効果が確認された。

これらの結果より、2-MIB 除去性の高い粉炭を混合利用することで、2-MIB 除去率を向上でき、さらに同等の 2-MIB 除去率の達成に必要な活性炭総使用量を低減できることが示された。

## 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) 粉末活性炭処理における 2-MIB 除去率の低下に関与する競合物質は、原水ごと、そして時期により異なることが明らかとなった。そのため、カビ臭が発生する時期を踏まえた上で、適切な指標を水源ごとに選択する必要があることを指摘した。
- (2) 複数種の粉末活性炭の混合注入による 2-MIB の除去効果について検討した結果、2-MIB 除去性の高い粉炭を少量、混合使用することで 2-MIB 除去率を向上でき、基準値に対する 2-MIB 除去達成に必要な活性炭総使用量を低減できることが示された。

## 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, 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 の粉末活性炭への非平衡吸着. 水道協会雑誌. 89(6), 2-10, 2020.

### 2. 学会発表

高篠鮎人, 浅田安廣, 神里良太, 茂田裕充, 浦上正, 秋葉道宏. 粉末活性炭処理における 2-メチルイソボルネオールとの競合吸着物質の推定. 令和 2 年度水道研究発表会, 2020.11, 誌上発表.

早坂俊一, 浅田安廣, 三好太郎, 秋葉道宏. カビ臭除去対応時における複数種の粉末活性炭混合注入を通じた使用量低減効果. 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.

## 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) 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.
- 2) 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.

- 3) 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, (2020) 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, 89(6), 2–10.

J. 謝辞

水道事業者から水道原水のご提供をいただきました。記して謝意を表します。

表 1 各浄水場原水の水質測定結果

	A浄水場				B浄水場				C浄水場			
	最大値	最小値	平均値	中央値	最大値	最小値	平均値	中央値	最大値	最小値	平均値	中央値
水温 (°C)	23.3	2.3	12.5	14.6	30.5	4.5	17.7	17.2	31.7	6.2	17.7	16.5
濁度 (度)	45.6	2.4	5.8	3.3	3.8	0.8	2.4	2.6	13.8	2.9	6.7	6.6
色度 (度)	7.5	1.6	3.7	3.7	3.0	0.8	1.8	1.6	6.7	2.5	3.9	3.9
pH	7.5	7.0	7.3	7.4	9.2	7.5	7.9	7.7	8.0	7.6	7.8	7.8
電気伝導率(mS/m)	14.8	8.2	11.1	11.0	32.6	10.8	14.5	13.4	32.6	16.0	25.4	25.9
TOC (mgC/L)	1.43	0.50	0.95	0.93	2.16	0.97	1.43	1.37	2.25	1.06	1.57	1.54
UV254	0.274	0.035	0.062	0.051	0.050	0.025	0.035	0.035	0.104	0.032	0.070	0.067

表 2 粉末活性炭の種類

粉炭種	材質	d <sub>50</sub> [μm]	Micropore (0.3~2nm) [cm <sup>3</sup> ・g <sup>-1</sup> ]	Mesopore (2~50nm) [cm <sup>3</sup> ・g <sup>-1</sup> ]	Macropore (50nm~) [cm <sup>3</sup> ・g <sup>-1</sup> ]	BET 表面積 [m <sup>2</sup> ・g <sup>-1</sup> ]
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

表 3 各浄水場原水の PARAFAC 解析結果

		励起波長/蛍光波長	ピークの特徴
A浄水場	Component 1	260 nm/ 475nm	フミン酸様ピーク
	Component 2	<255 nm/ 380nm	フルボ酸様ピーク
B浄水場	Component 1	<255 nm/ 435nm	フミン酸様ピーク
	Component 2	280 nm/ 330 nm	トリプトファン様ピーク
C浄水場	Component 1	<255 nm/ 440nm	フミン酸様ピーク
	Component 2	280 nm/ 355 nm	トリプトファン様ピーク

表 4 2-MIB 除去率と各種水質指標との関係性(相関係数)

	TOC	UV254	電気伝導率	PARAFAC Score		PARAFAC Score/ TOC		UV254/TOC
				Component1	Component2	Component1	Component2	
A浄水場	0.22	0.32	-0.24	0.29	0.28	0.21	0.28	0.33
B浄水場	-0.46	-0.30	-0.11	-0.45	-0.15	-0.18	0.37	0.11
C浄水場	0.15	-0.24	-0.05	-0.05	-0.13	-0.31	-0.19	-0.38

表 5 高水温期と低水温期における 2-MIB 除去率と各種水質指標との関係性(相関係数)

		TOC	UV254	電気伝導度	PARAFAC Score		PARAFAC Score/ TOC		UV254/TOC
					Component1	Component2	Component1	Component2	
A浄水場	高水温期	-0.15	0.23	-0.45	-0.15	-0.03	0.01	-0.23	0.29
	低水温期	-0.65	-0.57	0.53	-0.53	-0.48	0.33	0.01	0.22
B浄水場	高水温期	-0.79	-0.70	-0.34	-0.55	-0.79	-0.68	0.28	-0.10
	低水温期	-0.72	0.30	0.32	-0.40	0.11	0.60	0.55	0.70
C浄水場	高水温期	0.55	-0.26	0.00	-0.10	0.15	-0.43	-0.67	-0.55
	低水温期	-0.31	-0.25	-0.23	-0.01	-0.30	-0.26	0.33	-0.19

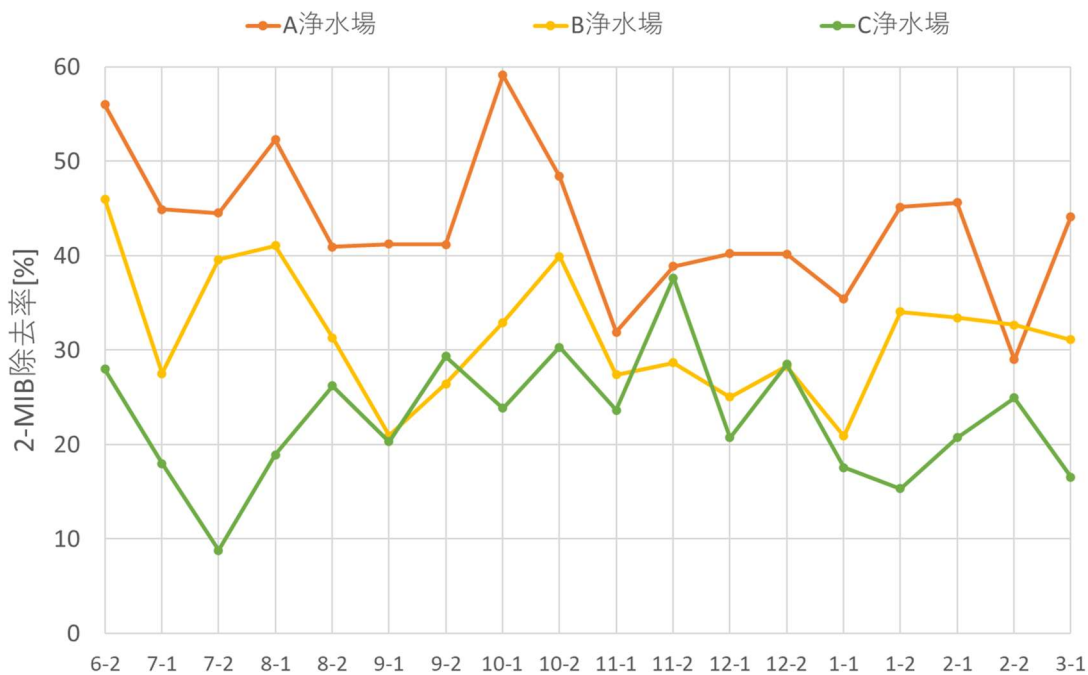


図 1 各浄水場原水を用いた粉末活性炭処理による 2-MIB 除去率の変動

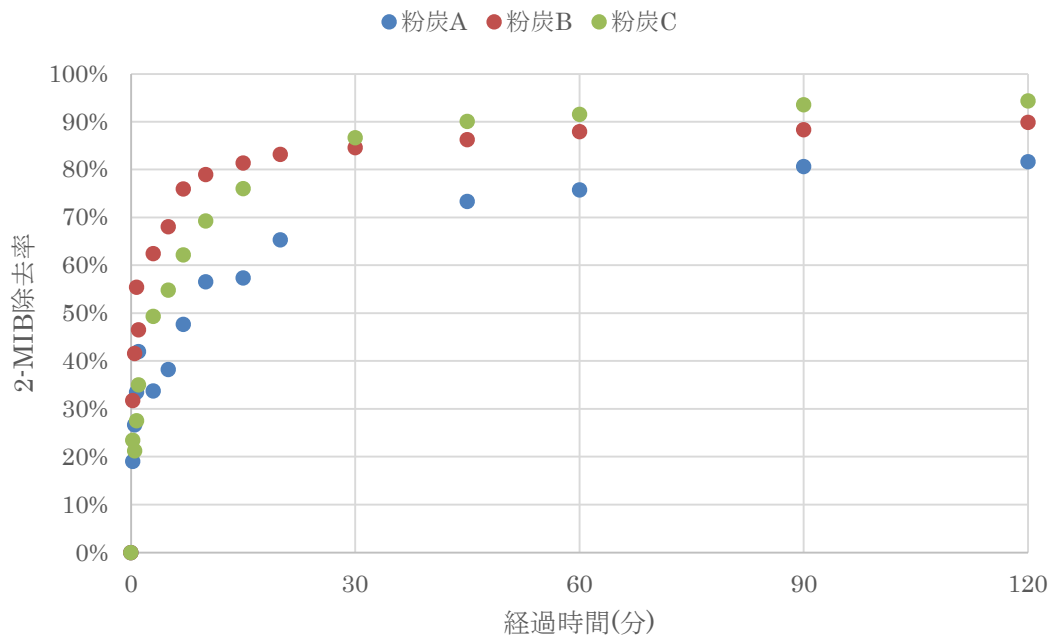


図2 各粉末活性炭の2-MIB除去率の経時変化

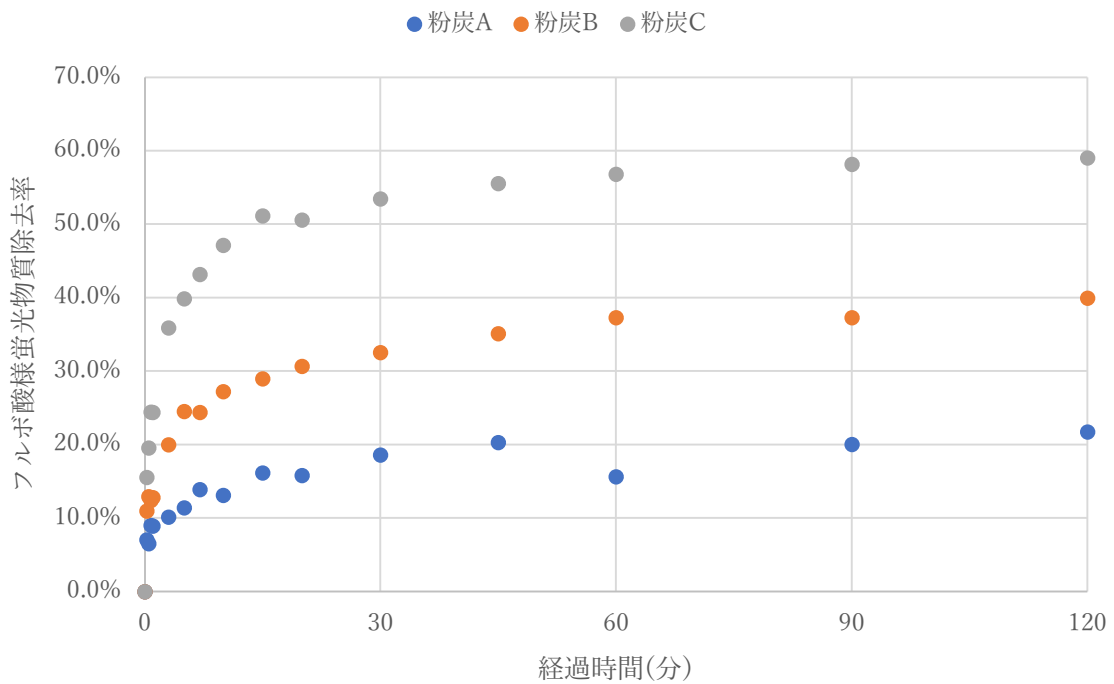


図3 各粉末活性炭のフルボ酸様蛍光物質除去率の経時変化

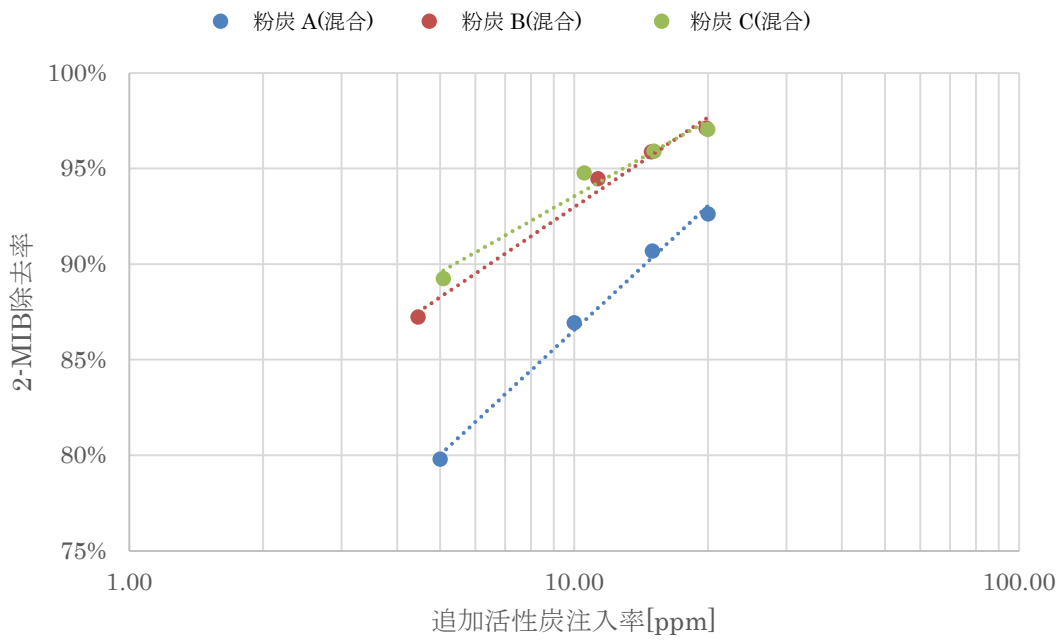


図 4 粉末活性炭混合注入による 2-MIB 除去率の変化 (粉炭 A 20 ppm に対する追加効果)

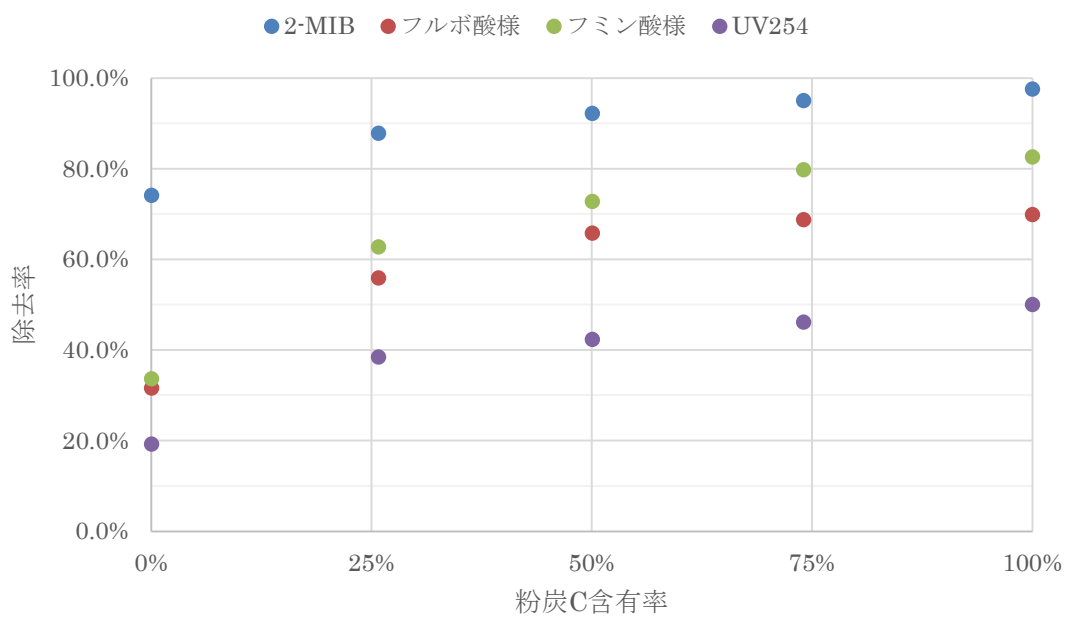


図 5 粉末活性炭混合注入による 2-MIB 除去率の変化 (粉炭総量を 20 ppm に設定)





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

DOMの精密質量スペクトルの差異解析により、地点間・季節間での比較が可能か琵琶湖・淀川水系の水試料を用いて評価した。その結果、地点間の差は固相抽出であっても乾燥濃縮であっても類似した差を見出すことができ、また各地点の特性と矛盾のないものであった。比較的濃縮操作の自動化が簡単な固相抽出であっても倍率を上げれば十分乾燥濃縮と同等の傾向が得られることを示した。一方で、同一地点での季節間の変化は、地点間の差よりも総じて小さく、濃縮方法によって異なる傾向が得られる場合があり、更に長期的なモニタリングを継続して年間を通じたバックグラウンドスペクトルを得た上で差異解析を行うことが望ましいことを指摘した。

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。水道原水中の 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ともに、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、一昨年度は精密質量分析を各種の水道原水に適用し、溶存有機物のパターンから水源のタイプが判別できること等を示した。また昨年度は、試料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い、場合によっては乾燥濃縮のほうが良いとの結果を得た。本年度は、昨年度確立した方法を、同一水系内の複数の地点や、同一地点でも採水時期が異なる試料に適用し、有機物組成の差や変動を捉えることができるか、また、乾燥濃縮と固相

抽出でその結果に差が見られるか検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料及実験の構成

採水地点としては、琵琶湖淀川流域内の琵琶湖水 (大津港)、淀川水 (枚方大橋左岸)、桂川水 (下水処理施設放流口直下) の 3ヶ所を対象とした。また、これらの地点について夏季と秋季に採水を行い、地点間と採水時期の違いについて差異解析を行った。あわせて、藻類増殖時と非増殖時の琵琶湖水 (琵琶湖疏水) の DOM の精密質量スペクトルの比較を行った。

2. 固相抽出

昨年度同様、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を 20 mL/min で通水した (通水量は濃縮倍率によって適宜変更した)。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・乾固を行った後に超純水(以下 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。原則として濃縮倍率は 100 倍とした。試験管の容量が限られるため、10 mL の試料を 5 本用意し、それぞれ 2 mL まで濃縮した後混合し、再度合計 10 mL の試料とし、これを 0.5 mL となるように濃縮した。

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 MQW で再希釈を行った。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。測定条件は原則昨年度確立した方法と同様で、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  $\mu$ L/min にて送液している状態で、20  $\mu$ 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。用いた分析条件を表 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再検討

PPL カートリッジを用いて 100 倍と 1000 倍に濃縮をした琵琶湖水(夏季)の精密質量スペクトルを差異解析で比較した(図 1 (左))。琵琶湖水の場合は、1000 倍の方がシグナルが大きいピークが多く見られ(図の第 1 象限にプロットが多いことに対応する)、1000 倍の方が強いシグナル強度または多種のピークが得られることが確認できる。TOC の回収率をみても(表 2 の右側の列)、100 倍と 1000 倍の回収率にはそれほど大きな差は見られず、琵琶湖淀川水系あるいは我が国の多くの水道水源(TOC がそれほど高くない状況を想定)について固相抽出を行う場合は、通水に要する時間も 100 分程度であることから、1000 倍程度

の濃縮倍率が適していると考えられる。

乾燥濃縮と固相抽出の TOC の回収率を比較すると、乾燥濃縮で 100 倍に濃縮した試料が 80%前後であるのに対し、固相抽出(表 1 中の PPL の列) 100 倍では、60%前後、1000 倍では 40-50%であった。このことから、乾燥濃縮の方が、平等な濃縮法といえるが、濃縮の手間(作業ステップ数や時間)、さらには共存無機イオンの影響が解釈を難しくする可能性を考慮すると、この程度のロスがあるとしても固相抽出に依存せざるを得ない場合もある。実際、固相抽出と乾燥濃縮を濃縮倍率 100 倍同士で比較すると(図 1 (右))、若干乾燥濃縮の方が有意に大きいピークがあるが、その数は限定的であり、少なくともイオン化する物質についてはそこまで濃縮方法バイアスが存在するとはいえない。上記のことを踏まえ、以下ではより実的な試料について、できる限り固相抽出による 1000 倍濃縮試料と乾燥濃縮による 100 倍濃縮試料を用いた分析結果を並列して表示し、比較することとした。

### 2. 異なる地点間の差異解析

図 2 に琵琶湖水試料と桂川水試料を比較した結果を示す。左側が乾燥濃縮、右側が固相抽出の結果である。いずれの濃縮方法でも差のあったピークの分布傾向は類似しており、桂川水試料の方が濃度が高い物質が多数含まれていること、また少数ではあるが琵琶湖水にしか含まれていない、あるいは琵琶湖水の方が濃度が高い物質があることが示されている。この傾向は桂川水試料は有機物濃度が高く、下水処理水の影響を受けており琵琶湖水とは組成が大きく異なると推定されることを考えると妥当と判断できる。なお、固相抽出では TOC としてのロスがあることを先に指摘したが、差異解析の結果、同等の結果が得られることが確認できた。

次に同時期の琵琶湖水試料と淀川水試料の比較結果を図 3 に示す。図 2 同様、左側が乾燥濃縮、右側が固相抽出の結果である。まず、明瞭な傾向として図 2 と比べると有意差のあるピーク(物質)が少ない(つまり p 値を示す y 軸の数値が 2 を超えるものが少ない)。これは、淀川水の大部分が琵琶湖水に由来し、その組成に関してある程度の類似性があることを反映したものと考えられる。図 2,3 の結果から質量スペクトルの差は琵琶湖淀川水系の各地点あるいは水の流れを反映した妥当なものといえることができる。また、乾燥濃縮と固相抽出を比較すると、淀川の方が濃度の高い物質が多い(かつ有意差が明瞭)という傾向では一致しており、同等の結果が得られた。

図 4 は淀川水を基準に桂川水と差異解析を行ったものである。先述のように琵琶湖水と淀川水の類似性が高いため、当然ではあるが、図 2 同様桂

川水に特有の物質が多数検出されその傾向は、乾燥濃縮と固相抽出で同様であった。以上の3つの比較から、精密質量スペクトルの差異解析により同一水系内であってもその差を捉えることが可能であり、またこのことは固相抽出法によっても可能であることがわかった。

### 3. 季節間の比較

図5に琵琶湖水について夏季と秋季を比較したものを示す。第1象限にプロットがあれば、夏季が、第2象限にプロットがあれば秋季の方が大きいピークの存在を意味する。乾燥濃縮、固相抽出いずれの場合も夏季の方が濃度が高い物質が多い傾向にあったが、固相抽出の方が傾向がより明瞭であった。有機物の回収率は固相抽出の方が低いが、濃縮倍率が高いため明確な差が検出しやすくこのような結果になったものと考えられる。

淀川水の比較についても固相抽出では、夏季の方が高い物質が多いという琵琶湖水と同様の結果が得られたが、乾燥濃縮については、有意差のある物質がほとんど検出されなかった（逆に秋季の方が濃度が高い物質が少数存在した）（図6）。このように、試料によっては濃縮方法に依存して差異解析の結果が異なることがあるので注意が必要であることがわかった。

図7は桂川水について夏季と秋季で差異解析を行ったものである。固相抽出（右側）については、明瞭に夏季の方が多数の有機物が検出されているが、乾燥濃縮による場合は、夏季の方が高い物質も検出されたが、濃度の倍率は高くないものの秋季の方が高い物質が多数検出された。この2つの濃縮方法による差が何を意味するかは、今後もモニタリングを続け、他の水質指標との関連性を評価する必要があるが、濃縮方法により差異解析の結果に明瞭な違いが現れ得ることが示された。

### 4. 藻類増殖時と非増殖時の差異解析

琵琶湖水について、藻類の増殖が見られた場合（カビ臭物質の存在により確認）とそうでない場合（平常時）の間で、差異解析をした結果を、図8に示す。藻類増殖がない（少ない）場合の方が検出される物質数が多いという結果になった（注：試料量の関係で固相抽出により濃縮した場合の比較に限定している）。この結果は、藻類増殖時と非増殖時のDOM組成の変化を検知している

といえる。一方で、増殖時になぜ検出される物質が減少するのか、現段階では原因は不明であり、今後も長期的にモニタリングを続ける必要がある。

### E. 結論

DOMの精密質量スペクトルの差異解析から、地点間・季節間での比較が可能か、琵琶湖淀川水系において調査を行った。その結果、地点間の差は固相抽出であっても乾燥濃縮であっても類似した差を見出すことができ、また各地点の特性と矛盾のないものであった。比較的濃縮操作の自動化が簡単な固相抽出であっても倍率を上げれば十分乾燥濃縮と同等の傾向が得られることがわかったのは重要な成果といえる。一方で、同一地点での季節間の変化は、地点間の差よりも総じて小さく、濃縮方法によって異なる傾向が得られる場合があり、更に長期的なモニタリングを継続して年間を通じたバックグラウンドスペクトルを得た上で差異解析を行うことが望ましいと考えられた。

### 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 夏季採水時の試料の TOC と各濃縮法による回収率  
(%で表示されている数字が回収率を示す)

濃縮法	MQW (mg/L)	淀川 (mg/L)	桂川 (mg/L)	琵琶湖 (mg/L)
乾燥濃縮 (100倍)	0.06 <	1.4 (84.7%)	2.3 (79.2%)	1.1 (74.6%)
PPL (100倍)	0.107	1.0 (64.3%)	1.7 (58.6%)	0.8 (56.0%)
1000倍濃縮	0.102	0.6 (38.9%)	1.49 (46.9%)	0.7 (48.4%)
濃縮前	0.06 <	1.6	3.0	1.5

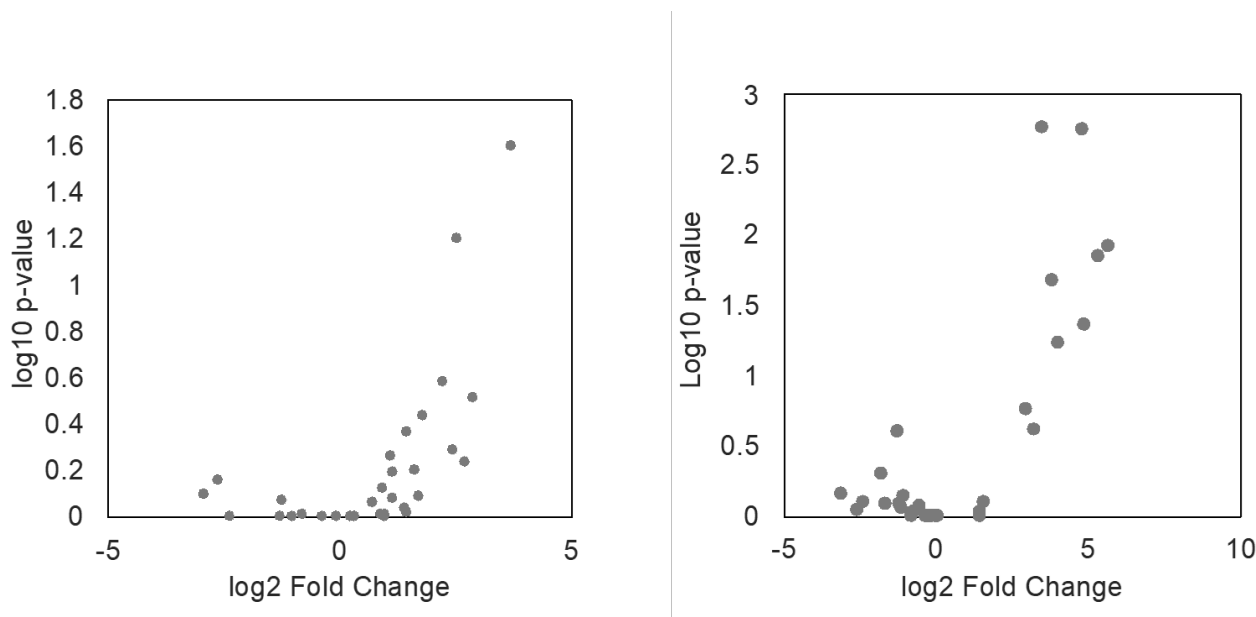


図 1 固相抽出による濃縮倍率の比較（左側，1000 倍と 100 倍）と乾燥濃縮と固相抽出の比較（右側，ともに 100 倍濃縮）。左側では 1000 倍の方がシグナルが大きい質量数について，右側では乾燥濃縮の方がシグナルが大きい質量数について右側（第 1 象限）にプロットが現れる。夏季における琵琶湖水の結果を示している。

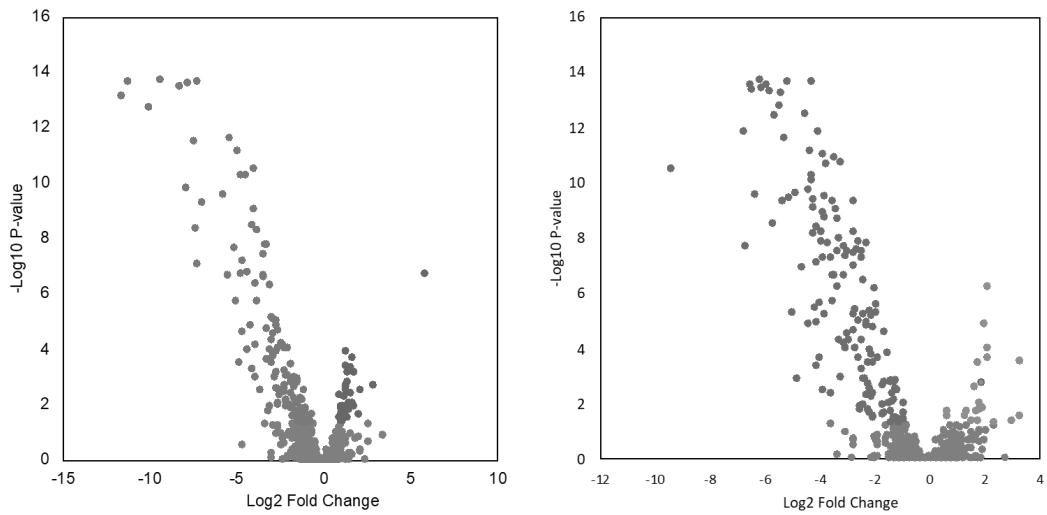


図2 琵琶湖水と桂川水（夏季）の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）. 琵琶湖水の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，桂川水の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる.

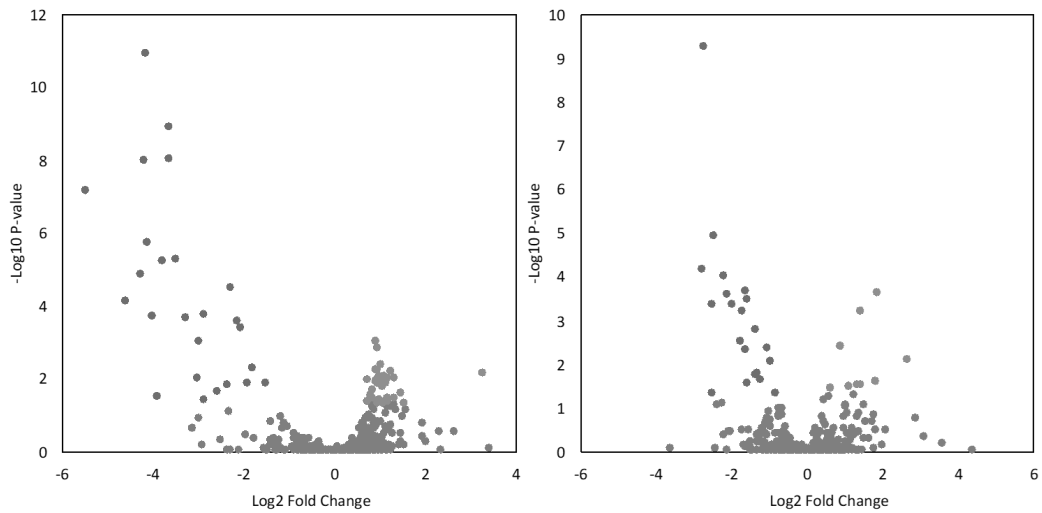


図3 琵琶湖水と淀川水（夏季）の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）. 琵琶湖水の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，淀川水の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる.

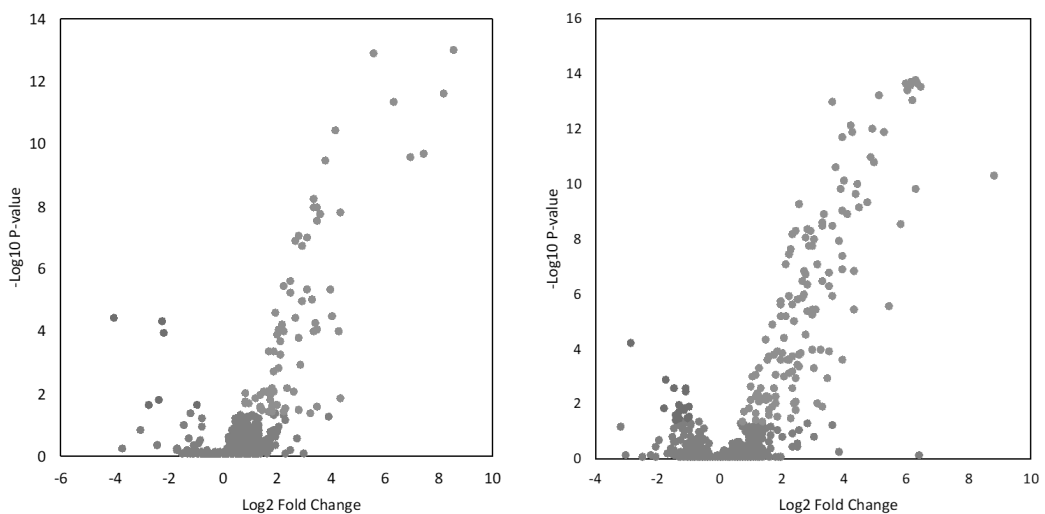


図4 淀川水と桂川水（夏季）の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）. 淀川水の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，桂川水の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる.

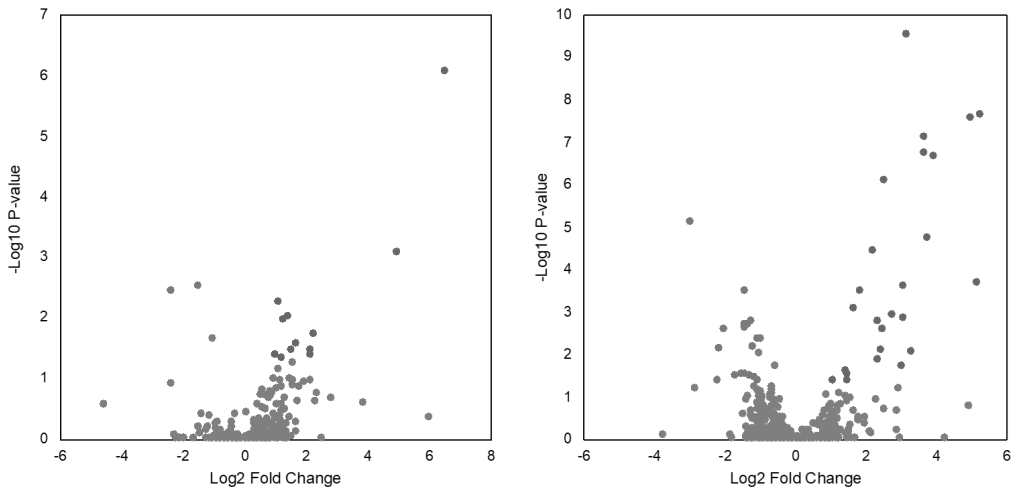


図5 琵琶湖水についての夏季と秋季の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）。夏季の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，秋季の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる。

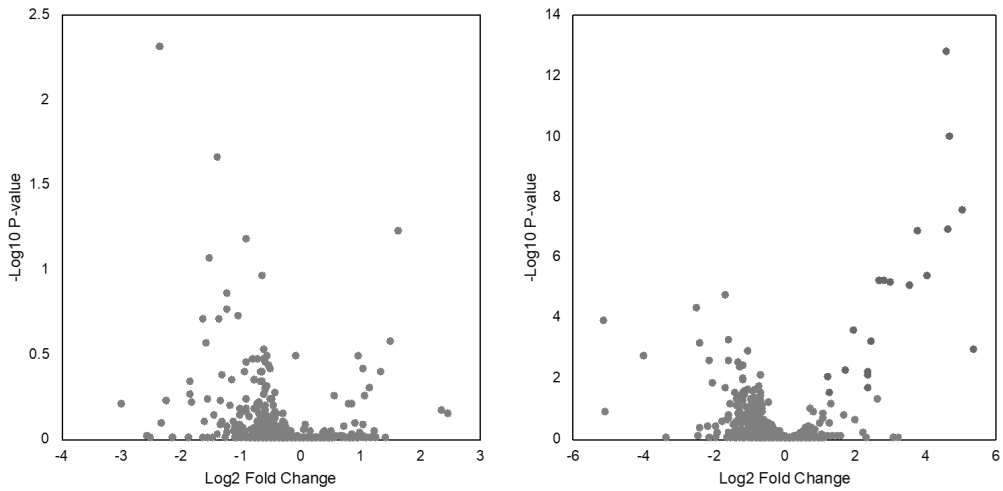


図6 淀川水についての夏季と秋季の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）。夏季の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，秋季の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる。

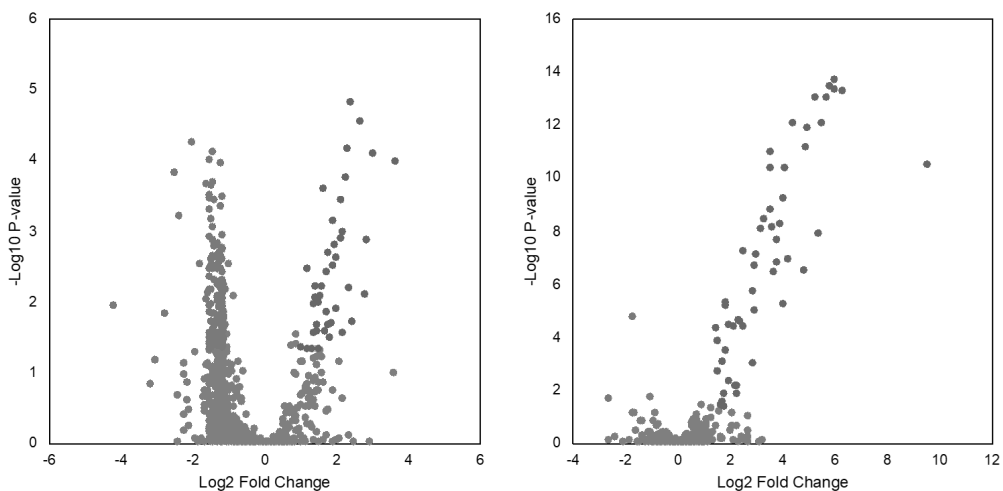


図7 桂川水についての夏季と秋季の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）。夏季の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，秋季の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる。



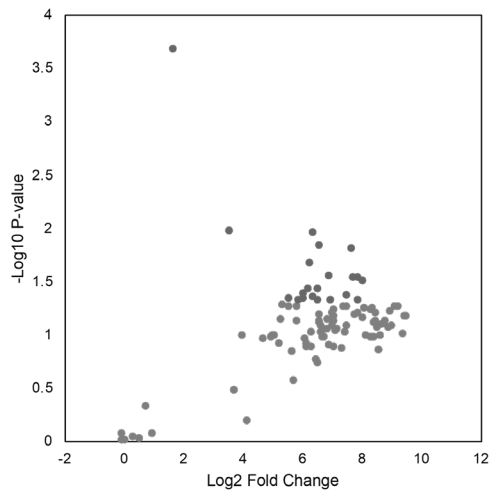


図8 藻類非発生時と発生時の比較（左側，乾燥濃縮；右側，固相抽出）. 非発生時の方がシグナルが大きい質量数について右側（第1象限）にプロットが現れ，発生時の方がシグナルが大きい質量数については左側（第2象限）にプロットが現れる.



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と簡易分析手法の提案

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	高梨	啓和
研究協力者	藤原	俊一郎
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と簡易分析手法の提案

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	藤原 俊一郎	京都市上下水道局 水質管理センター 担当係長
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

水道水の生ぐさ臭は、被害件数が2番目に多い異臭味障害であるが、その原因物質は十分に明らかにされているとは言い難い。このため、機器分析による水質管理は行われておらず、官能試験による水質管理が行われている。そこで本研究では、機器分析による水質管理を可能とするために、原因物質の構造や分析条件を明らかにすることを目的とした。

以前の研究により、原因物質の分子式は $C_{13}H_{20}O_3$ であること、構造内に2個のカルボニル基、シクロヘキセン環を含むことが示唆されている。本研究により、2個のカルボニル基の一方は末端ケトンであること、もう一方はシクロヘキセン環に酸素原子が直接付加したシクロヘキセノンであることが示唆された。さらに、メトキシ基を有すること、プロピル基またはブチル基を有することが示唆された。これらの情報に基づき、原因物質の構造を4つの異性体まで絞り込むことに成功した。また、GC-MSを用いて分析する際の条件を検討し、無極性カラムに対する原因物質の保持指標と電子イオン化法を用いた際のマススペクトルを得て、汎用的・標準的な分析条件を確立した。

#### A. 研究目的

水道水の異臭味被害の中で2番目に被害件数が多い生ぐさ臭<sup>1)</sup>は、原因物質として1-ヘプタナール、(2E,4E)-ヘプタジエナール、(2E,4Z)-ヘプタジエナール、(2E,4Z)-デカジエナール、(2E,4E,7Z)-ジエナール<sup>2)</sup>が指摘されている。しかし、浄水場では、これらの物質から生ぐさ臭を感知することができないという意見があり、原因物質が他に存在することが示唆されている。このように、生ぐさ臭については十分な知見が集積されておらず、現在、日本の水道法において、物質の濃度ではなく臭気強度 (TON) を基にした官能試験による管理に留まっている。生ぐさ臭の臭気原因物質が明らかになれば、発生機構の詳細検討や発生予測、物性に基づいた除去技術の開発、水質検査の簡易化・高精度化・迅速化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質の同定には困難を伴う。未知物質の同定には、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 (NMR) 装置による構造解析、質量分析計 (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  $\mu\text{g}$ ～数  $\text{mg}$  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  $\mu\text{g}$  程度得ることは相当な労力が必要で困難と予想されるため、検討の初期段階からこれらの手法を用いることは得策ではない。

これに対して MS 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ので、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。このため、検討の初期段階から用いることができる。一方、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イオン源を備えた質量分析計が適している。分子量情報を得た後に、ハードなイオン化法などを用いて、分析種 (原因物質) の開裂反応を観察して構造情報を取得する必要がある。

そこで本研究では、昨年度までの LC-MS を用いたソフトなイオン化で得た分子量情報、および開裂反応を観察して得た構造情報に基づき、ハードなイオン化法を用いた構造推定結果の検証、および詳細な構造推定をおこなうことを目的とした。さらに、構造が確定しない状況でも、広く普及している GC-MS を用いて原因物質を分析する

ための条件を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 試料水

黄色鞭毛藻のウログレナ (*Uroglena americana*) による生ぐさ臭の被害が発生している際に採取された水道原水を、既報<sup>3)</sup>に準じて固相抽出により濃縮・精製し、高分解能 GC-MS を用いて分析した。

### 2. 分析

濃縮・精製した試料を、高分解能 GC-MS (JMS-T200GC AccuTOF GCx-Plus, JEOL) を用いて分析した。イオン源には電子イオン化 (EI) および電界イオン化法 (FI) を、分離カラムには DB-5MS (膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ , 内径 0.25 mm, 長さ 60 m, Agilent Technologies) を用いた。分離カラムの昇温プログラムは、50  $^{\circ}\text{C}$  (0-1.5 min), 200  $^{\circ}\text{C}$  (1.5-31.5 min), 200  $^{\circ}\text{C}$  (31.5-41.5 min) とした。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速は 1 mL/min (線速度 33.95 mm/sec) とした。

### 3. 標準的な分析条件の検討

イオン化法は、普及が進んでおり、条件が標準化されている EI を採用した。保持指標を求めるときに用いる分離カラムは、保持指標のデータベースで収録例が多い無極性カラムである DB-5MS を採用することにした。保持指標の算出に必要な  $n$ -アルカン<sup>4)</sup>は、ジーエルサイエン社の炭化水素混合試料ヘキサン溶液を用いた。

## C. 結果および D. 考察

### 1. 水道水生ぐさ臭原因物質の EI マススペクトルの取得

昨年度までの LC-MS とは異なり、本研究では GC-MS を用いるため、原因物質のカラム保持時間が不明である。そこで、FI 法を用いたイオン化を行い、原因物質の分子イオン ( $m/z$  224) を得てカラム保持時間を求めた。

イオン化法を FI 法から EI 法に変えて、同一のガスクロマトグラフを用いて分離条件を変えずに再度分析を行った。FI 法で求めたカラム保持時間における EI マススペクトルを取得したところ、図 1 に示す原因物質のマススペクトルが再現性よく得られた。

### 2. 水道水生ぐさ臭原因物質のカルボニル基の構造推定

得られたマススペクトルを解析して原因物質のカルボニル基の構造を推定した。推定は、カルボニル化合物の典型的なフラグメンテーション機構である  $\alpha$  開裂に着目して行った。 $\alpha$  開裂は、図 2 に示すカルボニル基の  $\alpha$  位の結合が開裂する

反応である。 $\alpha$  開裂に伴い観察されるプロダクトイオンは、カルボニル化合物がアルデヒドである場合は  $m/z$  29 のホルミルカチオンが観察され、ケトンであれば炭素鎖長に応じた  $m/z$  のプロダクトイオンが観察される。原因物質の分子イオンとホルミルカチオンについてそれぞれ抽出イオンクロマトグラムを描写したところ、図 3 に示すようにホルミルカチオンのピークは観察されなかった。このため、原因物質のカルボニル基は 2 個ともアルデヒドではなくケトンと予想された。

そこで、ケトン由来のプロダクトイオンが検出されるか確認したところ、FI 法で検出した原因物質の分子イオン ( $m/z$  224) と同一のカラム保持時間に、 $m/z$  43 のイオン (アセチルカチオン) が原因物質の分子イオンと同様のピーク形状で検出された。このため、原因物質はアルキル鎖の末端にケトンを有する (末端ケトン構造を有する) ことが示唆された。一方、アセチルカチオン以外の炭素鎖長の異なるケトン由来のプロダクトイオンは発見されなかった。

したがって、生ぐさ臭原因物質はアルデヒド基を有しておらず、2 個のカルボニル基はいずれもケトンであること、そのうち 1 個は末端ケトン構造であることが示唆された。

### 3. 水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定結果の検証と全体構造の推定

原因物質のマススペクトルを解析して、原因物質の全体構造を推定した。解析に際し、3 種のプロダクトイオン ( $m/z$  57.0362, 85.0685, 193.1281) に着目した。図 4 に示すように、プロダクトイオン  $m/z$  57.0362 および  $m/z$  85.0685 は、シクロヘキセン環の  $\pi$  電子に生じたラジカルカチオンによるアルキルケトン部位の脱離生じて  $m/z$  85.0685 が生成し、次いでこのイオンが単純誘起開裂を起こして  $m/z$  57.0362 が生成したと推定した。すなわち、これらのイオンの検出により C5 (ペンタノン) 以上のアルキルケトンの存在が示唆された。

また、プロダクトイオン  $m/z$  193.1281 の生成を説明可能なフラグメンテーション反応として、単純誘起開裂に伴うメトキシ基の脱離が推定された。

原因物質の分子式が  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$  であること、および昨年度に示唆されたシクロヘキセンを鑑みて、含まれている酸素系官能基は C5 (ペンタノン) 以上のアルキルケトンが 1 個、メトキシ基が 1 個、シクロヘキセン環に直接酸素原子が結合してシクロヘキセノン環であることが示唆された。これらは、これまでの構造推定結果と矛盾しない。

得られた部分構造を組み合わせると、図 5 に示す 4 個の異性体に限定することができた。

### 4. 生ぐさ臭原因物質の簡便な化学分析方法の提

## 案

簡便な化学分析方法として、装置コストが安価、かつ操作が容易であり広く普及している GC/MS を用いた分析法に着目した。イオン化法および質量分離部も、同様に装置コストが安価、かつ操作が容易な EI 法、四重極型質量分離部に着目した。さらに、分離カラムも、安価で広く普及している無極性カラムを用いた方法を検討した。

得られたマススペクトルを解析する手段として、米国 National Institute of Standards and Technology (NIST) が開発して無償公開している GC-EI-MS 用の自動同定ソフトである AMDIS を用いることを検討した。AMDIS を用いて原因物質の検出の有無を自動的に判定するのに必要な情報は、原因物質のマススペクトルと分離カラムへの保持指標である。マススペクトルは、図 1 に示したものを登録できるようにした。保持指標を求めるために *n*-アルカン混合標準液を原因物質と同条件で測定した結果から、原因物質のカラム保持時間を保持係数に換算した結果、原因物質の保持係数 (RI) は 1,694 であった。

## E. 結論

令和元年度に推定された水道水生ぐさ臭原因物質の構造について、電子イオン化で得られたフラグメントイオンを解析して検証した。検証の結果、4 個の異性体に限定することができた。また、浄水場への導入が進んでいる汎用型 GC-MS を用いて、簡便な分析方法を提案した。本提案に基づいて分析すれば、推定された物質の相対的な濃度を実測可能である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Shinfuku Y, Takanashi H, 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*, 257, 127174, 2020.

Shinfuku Y, Nakamura T, Takanashi H, Nakajima, Ueda T, Akiba M. A Method to Purify a DNPH-derivatized Sample Using Solid Phase Extraction. *Environmental Science*, 33(5), 70-78, 2020.

### 2. 学会発表

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, LC-HRMS, GC-O, GC-HRMS, 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 68 回質量分析総合討論会, 2020.5, オンライン.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, ガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計を用いた水道水中の生ぐさ臭原因物質の構造推定, 環境科学会 2020 年会, 2020.9, , オンライン.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, 生ぐさ臭を呈する水道原水から発見されたカルボニル化合物の構造推定, 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, , オンライン.

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, ガスクロマトグラフ高分解能質量分析計による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 第 55 回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, An Exploration of the Causative Substance of Fishy Smell in Raw Water for Taps by Combining High Resolution Mass Spectrometry and Multivariate Analysis, The 23rd Symposium of Japan Society on Water Environment Online, 2020.9, online.

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, An Exploration of the Causative Substance of Fishy Smell in Raw Water for Taps by Combining High Resolution Mass Spectrometry with Multivariate Analysis, Water and Environment Technology Conference 2020 Online, 2020.11, online.

## 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. 実用新登録  
該当なし

3. その他  
該当なし

## I. その他 (受賞等)

新福優太, 公益社団法人日本水環境学会博士研究奨励賞 (オルガノ賞), An Exploration of the Causative Substance of Fishy Smell in Raw Water for Taps by Combining High Resolution Mass Spectrometry and Multivariate Analysis, 2020.9, 公益社団法人日本水環境学会.

山下優輝, 2020 年会優秀発表賞 (富士電機賞), ガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計を用いた水道水中の生ぐさ臭原因物質の構造推定, 2020.9, 公益社団法人環境科学会.

山下優輝, 第 55 回日本水環境学会年会学生ポスター発表特別賞 (ライオン特別賞), 生ぐさ臭を呈する水道原水から発見されたカルボニル化合物の構造推定, 2021.3, 公益社団法人日本水環境学会.

J. 謝辞

本研究を実施するにあたり、京都市上下水道局水質管理センター水質第1課の職員より、試料水採取などで協力を受けた。ここに記して謝意を表す。

K. 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) 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

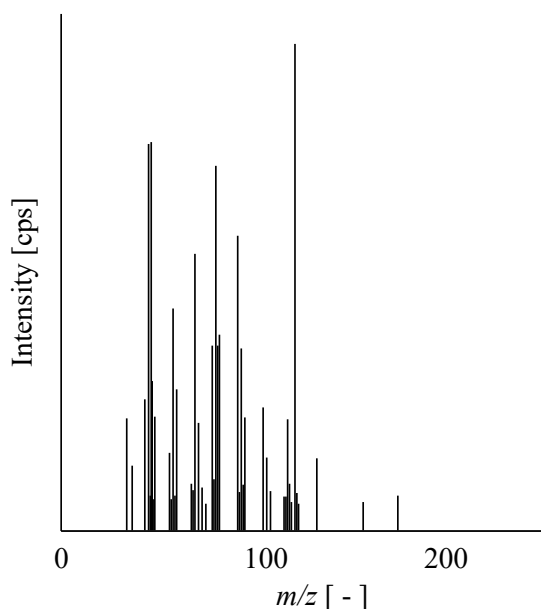


図1 水道水生ぐさ臭原因物質のEI マスペクトル

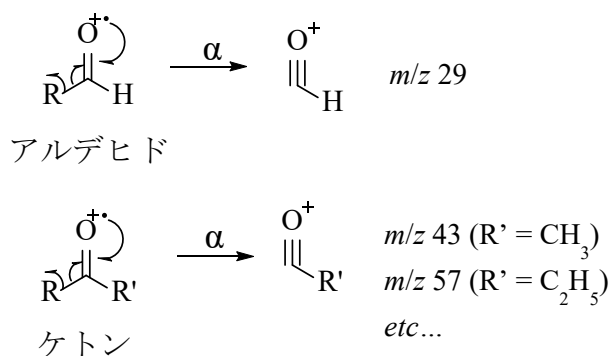


図2 アルデヒドおよびケトンのα開裂機構



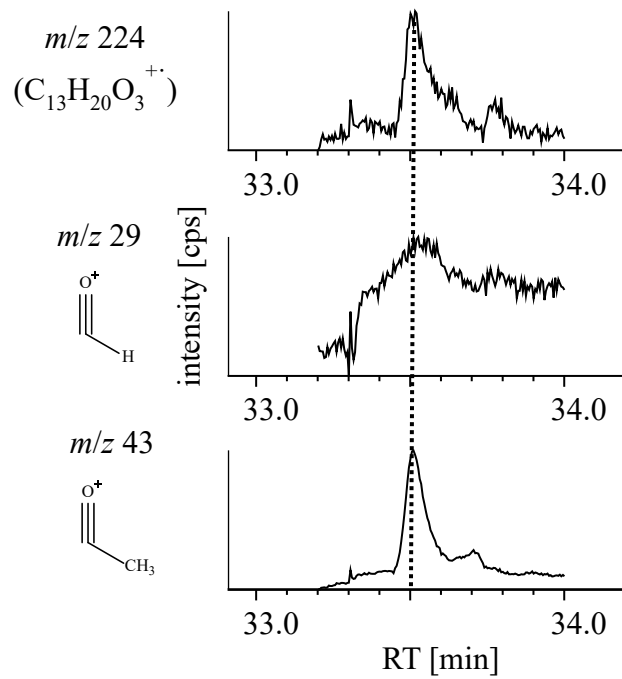


図3 水道水生ぐさ臭原因物質のカルボニル基の構造推定  
 (上段：原因物質の分子イオンの抽出イオンクロマトグラム,  
 中段：ホルミルカチオンの抽出イオンクロマトグラム,  
 下段：アセチルカチオンの抽出イオンクロマトグラム)

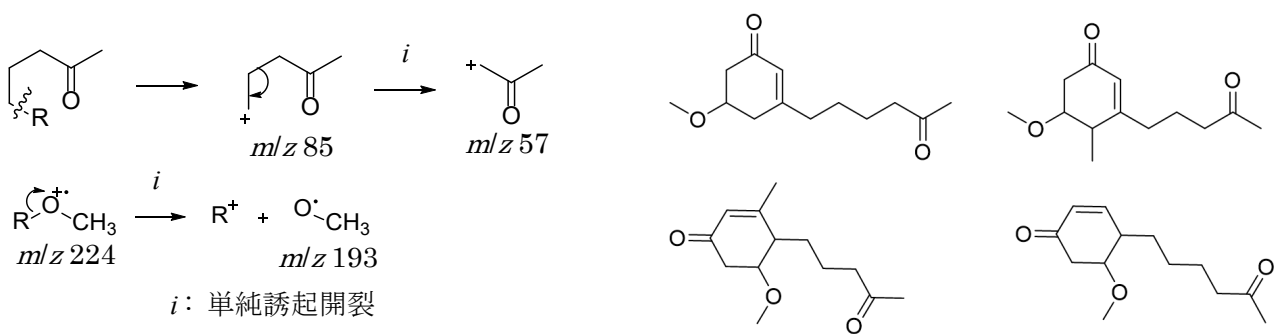


図4 着目したプロダクトイオンの生成機構の推定 図5 水道水生ぐさ臭原因物質の全体構造の推定



流域モニタリングネットワークのための  
簡便な生物障害検出方法の構築

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



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

研究課題：流域モニタリングネットワークのための簡便な生物障害検出方法の構築

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長  
研究分担者 清水 和哉 筑波大学 生命環境系 准教授  
研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学 応用生物科学部 教授  
研究分担者 高梨 宏和 鹿児島大学学術研究院 理工学域工学系 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および環境因子が及ぼすカビ臭物質合成酵素遺伝子の発現量への影響とカビ臭物質産生量の挙動把握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、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、個体群数定量に必要なカビ臭物質合成遺伝子を用いた迅速かつ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、環境因子が及ぼすカビ臭物質合成酵素遺伝子の発現量への影響とカビ臭物質産生量の挙動を明らかにすることとした。この結果、Whole Cell qPCR 法によるカビ臭物質産生藍藻類の個体群数の定量法を確立し、モバイル型装置や自動装置に応用できる知見を得た。また、高 NO<sub>3</sub>-N 濃度において 2-MIB 産生能が高くなることを明らかにした。異なる温度では、増殖に適さない温度（低温）の際に、カビ臭物質合成酵素遺伝子群の発現量が高くなることを見いだした。加えて、温度がカビ臭物質の局在（細胞内もしくは細胞外）の制御の一端を担っていることが推量された。カビ臭発生予測手法に寄与する重要な知見を提供した。

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<sup>1)</sup>や藍藻類<sup>2)</sup>の定量手法（早期検出技術に応用可能）が構築できると考えられる状況となってきた。水源池におけるカビ臭発生予測手法及びカビ臭発生抑制手法の確立は、持続的な水質管理に極めて重要であると広く認識されている。各種環境因子の状況におけるカビ臭物質産生藍藻類の個体

群数の挙動およびカビ臭物質産生への影響についての知見もカビ臭発生予測手法の構築に求められている。カビ臭物質産生藍藻類の定量手法で用いられている実験機器は、近年、安価になりつつあるが、未だ数百万円台であるため、全ての水道事業体に導入することは困難である。一方、水道流域が連携してモニタリングを行う場合、従来の形態観察法に加えた統一した方法によってモニタリングを実施することが望ましい。我々の研究成果により、ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログや 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 合成に関与する遺伝子メチルトランスフェラーゼ遺伝子とシクラーゼ遺伝子は放線菌と藍藻類間の各遺伝子の相同性は低く、放線菌と藍藻類を分けた分子生物学的解析が可能であると推測された。藍藻類では *geoA* 遺伝子ホモログを用いて各「属」を区別でき、「属」毎の個体群数定量を可能とすることがわかった。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。昨年度までに、従来の遺伝子定量手法で用いられている実験装置（定量 PCR (qPCR) 装置）よりも安価な一般的な PCR 装置（数十万円）を用いた定量法を開発した。ここ数年で、モバイル型の PCR 装置や qPCR 装置が販売され、かつ、自動 qPCR 装置も普及してきている状況となっている。このため、qPCR 装置を用いた Whole Cell PCR 法の開発も有意義である情勢が形成されている。

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迅速かつ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、環境因子が及ぼすカビ臭物質合成酵素遺伝子の発現量への影響とカビ臭物質産生量の挙動を明らかにすることとした。

## B. 研究方法

1) 異なる環境因子におけるカビ臭物質合成酵素遺伝子の発現量の変動

### 1-1) 2-MIB 産生に及ぼす NO<sub>3</sub>-N 濃度影響

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 μmol/m<sup>2</sup>/s、明暗周期を 12 h として培養した。全てのサンプル (n=5) は、植菌後 4 日経過する毎に採取し、細胞密度をあらわすクロロフィル a (Chl.a) の定量および遺伝子発現量の定量、ジェオスミンの定量を実施した。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 qRT-PCR 法により実施した。使用したプライマーは、表 1 に示した。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。

### 1-2) カビ臭物質産生に及ぼす温度影響

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)、2-MIB 産生藍藻類として *Pseudanabaena foetida* NIES-512 を用いた。両藍藻類ともに標準培地とされている CT 培地にて培養を行った。培養温度は、15°C、25°C、35°C とした。光強度は、30.0 μmol/m<sup>2</sup>/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) や 2-MIB 合成酵素遺伝子群 (*mtf* 遺伝子と *mtc* 遺伝子) の発現解析を qRT-PCR 法により実施した。使用したプライマーは、表 1 に示した。遺伝子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

供試藍藻類は、*D. smithii* NIES-824 (ジェオスミン産生) とし、2-MIB 産生藍藻類は茨城県から分譲いただいた、*Pseudanabaena* sp. の 1705 株と 1803 株、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 *Phormidium tenue* を用いた。

*D. smithii* NIES-824 は、CT 培地、培養温度 28°C、光強度 60.3 μmol/m<sup>2</sup>/s、明暗周期を 12 h として培養した。*Pseudanabaena* sp.1705 株と 1803 株は、CT 培地、培養温度 25°C、光強度 30.0 μmol/m<sup>2</sup>/s、明暗周期を 12 h として培養した。*P. tenue* は、MA 培地、培養温度 25°C、光強度 30.0 μmol/m<sup>2</sup>/s、明暗周期を 12 h として培養した。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。

ジェオスミン産生藍藻類は *geoA* ホモログを標的とした Whole Cell qPCR 法をインターカレート法で行った。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) とした Whole Cell qPCR 法をインターカレート法およびプローブ法で行った。使用したプライマーおよびプローブは表 1 に示した。インターカレート法による Whole Cell qPCR 法の DNA ポリメラーは TB Green Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc, Shiga, Japan) とし、Probe 法の Whole Cell qPCR 法 (Takara Bio

Inc, Shiga, Japan)とした。PCR 反応液は、本ポリメラーゼの説明書通りに作成した。*geoA* 遺伝子のサーマルサイクル条件は、初期変性 95°C, 30 秒, 40 回のサーマルサイクル反応; 変性 95°C, 5 秒, アニーリング 60°C, 34 秒とした。

2-MIB 産生藍藻類 *Pseudanabaena* 属 1705 株, 1803 株と *P. tenue* の *mtc* 遺伝子を標的とした Whole Cell qPCR 法は、インターカレート法と Probe 法の両方を行った。インターカレート法による Whole Cell qPCR 法は、上述と同様である。Probe 法による Whole Cell qPCR 法の DNA ポリメラーゼは、Premix Ex Taq (Probe qPCR) (Takara Bio Inc, Shiga, Japan)とした。PCR 反応液は、本ポリメラーゼの説明書通りに作成した。*mtc* 遺伝子のサーマルサイクル条件は、初期変性 95°C, 30 秒, 40 回のサーマルサイクル反応; 変性 95°C, 5 秒, アニーリング 60°C, 34 秒とした。

Whole Cell PCR 法の評価は、得られた遺伝子のコピー数と藍藻類の細胞密度を比較した。

## C. 研究結果および D. 考察

### 1) 異なる環境因子におけるカビ臭物質合成酵素遺伝子の発現量の変動

#### 1-1) 2-MIB 産生に及ぼす NO<sub>3</sub>-N 濃度影響

NO<sub>3</sub>-N 濃度が 2-MIB 合成に対する影響については、遺伝子発現レベルではほとんど知られていない。このため、2-MIB 産生藍藻類バイオマス (Chl-a), 2-MIB 産生量の解析とともに異なる NO<sub>3</sub>-N 濃度下での *mtf* および *mtc* 遺伝子の発現を qPCR で解析し、2 つの標的遺伝子間の相関解析を行った。

細胞バイオマス (Chl-a として) は 16 日目に最大となった (対照群および高濃度 NO<sub>3</sub>-N 処理でそれぞれ 0.95 mg/L および 0.72 mg/L)。 *P. foetida* の Chl-a 含有量は、高濃度 NO<sub>3</sub>-N 処理では低く、8 日目以降は 2 つの NO<sub>3</sub>-N 濃度間で有意な差が見られた ( $p < 0.05$ , 図 1A)。

両 NO<sub>3</sub>-N 濃度における 2-MIB 濃度 (総量, 細胞外および細胞内の 2-MIB) の変化は、Chl-a 含有量と同様な傾向を示した。つまり *P. foetida* の 2-MIB 濃度は Chl-a 含有量の増加に伴い増加し、16 日目に最大となり、その後減少した。細胞内の 2-MIB 濃度は、NO<sub>3</sub>-N 濃度が高い条件では 12 日目以降に有意に上昇した ( $p < 0.05$ , 図 1D)。細胞内 2-MIB 濃度の最大値は、対照群と高 NO<sub>3</sub>-N 区でそれぞれ 43.00 ng/L と 60.25 ng/L であった。しかし、2 つの NO<sub>3</sub>-N 条件では、総 2-MIB 生成量と細胞外の 2-MIB 生成量の両方に大きな違いは認められなかった

(図 1B および C)。さらに、細胞外の 2-MIB の割合は、2 つの NO<sub>3</sub>-N 条件のいずれにおいても 40%以上であった。

また、図 2 に示すように、Chl-a 濃度は、総 2-MIB 濃度、細胞外 2-MIB 濃度、細胞内 2-MIB 濃度と良好な正の相関関係を示した ( $R^2 = 0.6078, 0.7176, 0.4115$ , いずれも  $p < 0.05$ )。

2-MIB 産生能 (2-MIB/Chl-a) の結果を図 3 に示す。全体として、NO<sub>3</sub>-N 濃度が高いほど 2-MIB 産生能は高くなり、Chl-a 濃度とは逆の効果を示した (図 3)。総 2-MIB 産生量は、対照群と高濃度 NO<sub>3</sub>-N 群でそれぞれ 30.40-292.53 ng/mg Chl-a, 31.99-625.52 ng/mg Chl-a であった (図 3A)。

2-MIB 合成酵素遺伝子群の発現量においては、NO<sub>3</sub>-N 濃度が高い場合、*mtf* および *mtc* 遺伝子の発現レベルは、12 日目を除いて有意に高かった ( $p < 0.05$ , 図 4A および B)。この 2 つの標的遺伝子の発現は、藍藻類 *P. foetida* の死滅期においても安定して転写されていた。また、*mtf* 遺伝子と *mtc* 遺伝子の発現量には、有意な正の相関関係が見られた ( $R^2 = 0.9162, p < 0.01$ , 図 4C)。

### 1-2) カビ臭物質産生に及ぼす温度影響

#### 1-2-1) *D. smithii* のジェオスミン合成における温度影響

本研究では、25°C の温度が *D. smithii* の最適な増殖温度であった (図 5a)。また、15°C では *D. smithii* の増殖が比較的遅かった。増殖速度と Chl-a 濃度は、15°C と 35°C の培養条件に比べて 25°C 条件が明らかに高かった。このように、8 日目以降、3 つの温度処理の間で Chl-a 含有量に有意な差が見られ、25°C でより多くの Chl-a 含有量が得られた (図 5a,  $p < 0.05$ )。低温 (15°C) では *D. smithii* の生育が抑制され、増殖速度と Chl-a 含有量が最も低くなった。24 日間の培養期間中、15°C, 25°C, 35°C における *D. smithii* の Chl-a 濃度の最大値は、それぞれ 0.90 mg/L, 2.22 mg/L, 1.66 mg/L であった。

Chl-a 濃度と比較して、ジェオスミン濃度についても同様の結果と現象が見られた (図 5b-d)。増殖に最適な温度である 25°C でのジェオスミン濃度 (総ジェオスミン, 細胞外ジェオスミン, 細胞内ジェオスミン) は、12 日目以降、15°C および 35°C でのジェオスミン濃度よりも有意に高かったが、15°C ではジェオスミン濃度は最も低かった (図 5b-d,  $p < 0.05$ )。培養開始後 8 日間、細胞外のジェオスミン濃度は 35°C で最も高かったことから、高温が細胞からのジェオスミンの放出を促進することを推察でき

る。今回の結果から、総ジオスミン濃度と Chl-a 含有量の間には、良好な正の相関関係が認められた (Spearman's  $\rho = 0.989, p < 0.01$ )。

温度条件の異なる *D. smithii* のジオスミン産生能 (ジオスミン/Chl-a) は経日的に変動した (図 6)。総ジオスミン産生能は、培養開始から 8 日間は 15°C で最も高かった (図 6a)。また、培養開始から 8 日間の細胞外ジオスミン産生能は、15°C および 35°C で 25°C よりも有意に高かった (図 6b,  $p < 0.05$ )。このことから、藍藻類細胞の増殖初期にジオスミン合成において、低温が引き金となっていると考えられた。さらに、16 日目からは、総ジオスミン産生能と細胞外ジオスミン産生能が上昇し、25°C では 15°C や 35°C に比べて有意に高くなった (図 6a, b)。また、Chl-a 濃度は 16 日目から変化しなかったが、総ジオスミン濃度は大きく上昇した。

遺伝子発現レベルでの解析では、温度条件が異なると、*geoA* 遺伝子の発現量は有意に異なった (図 7)。*geoA* 遺伝子発現量は、25°C と 35°C の培養条件よりも 15°C の方が高く、16 日目を除いて有意に異なっていた ( $p < 0.05$ )。また、35°C では *geoA* 遺伝子の転写が抑制されており、全培養期間において *geoA* の発現量は 25°C および 15°C の条件よりも有意に低かった ( $p < 0.05$ )。低温では藍藻類の増殖は阻害されたが (図 5a)、*geoA* 遺伝子の発現量は有意に増加した (図 7)。このことから、*D. smithii* の *geoA* 遺伝子の発現とその制御には、温度が重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、培養時間の増加に伴って *geoA* 遺伝子の発現量が減少したことから、*geoA* 遺伝子の発現には代謝活動やイソプレノイド産生能と密接な関係があると考えられた。

#### 1-2-2) *P. foetida* の 2-MIB 合成における温度影響

本研究では、25°C と 35°C の温度が *P. foetida* の最適な増殖温度であった (図 8a)。Chl-a 濃度の変化を見ると、*P. foetida* の細胞は、25°C、35°C、15°C の条件下で、それぞれ 8 日目、12 日目、16 日目に死滅期に入った。*P. foetida* 最大 Chl-a 濃度は、15°C、25°C、35°C でそれぞれ 0.48 mg/L、0.47 mg/L、0.31 mg/L であった。25°C で培養した *P. foetida* は、15°C および 35°C の培養条件よりも、培養開始から 8 日間において Chl-a 濃度および増殖量が有意に高かった (図 8a,  $p < 0.05$ )。*P. foetida* の低温 (15°C) での細胞成長は抑制され、増殖速度と Chl-a 含有量が大幅に減少した。

温度が異なると、*P. foetida* の 2-MIB 産生量に有意な差が見られた。35°C では、4 日目から 12 日目にかけて、総 2-MIB 濃度および細胞内 2-MIB 濃度が有意に上昇した (図 8,  $p < 0.05$ )。2-MIB 濃度は、15°C 培養条件で最低となり (図 8b-d)、Chl-a 濃度も最低であった (図 8a)。細胞外 2-MIB 濃度は、35°C では 4 日目と 8 日目に 15°C と 25°C に比べて有意に高かった (図 8b,  $p < 0.05$ )。12 日目には、25°C での細胞外 2-MIB 濃度が大きく上昇し、15°C および 35°C での濃度よりもはるかに高かった。これは、藍藻類の死細胞から放出された 2-MIB が多かったためと推量された。また 35°C の培養条件における 2-MIB の局在が細胞外よりも細胞内の方が多かったことから、温度が局在を制御することが推定された。本研究では、藍藻類のバイオマス (Chl-a 濃度) の増加に伴い、全体的に 2-MIB 濃度が増加した。Chl-a 濃度と 2-MIB 濃度の間には、有意な正の相関関係 (Spearman's  $\rho = 0.850, p < 0.01$ ) が認められた。このことから、高温が *P. foetida* の 2-MIB 生産を促進することが示唆された。各温度における 2-MIB 産生能 (2-MIB/Chl-a) の値は、2-MIB 濃度 (図 8) と比較して同様の結果を示した (図 9)。35°C における 2-MIB 産生能は、15°C および 25°C における 2-MIB 産生能よりも全般的に高かった (図 10)。特に、4 日目の 2-MIB 産生能は、15°C と 35°C の両方で 25°C のそれよりも高かった。これらの結果は、増殖に好ましくない温度が、増殖の初期段階で藍藻類細胞が 2-MIB を合成する可能性を高めることを示している。

異なる培養温度において、2-MIB 合成に関与する遺伝子の *mtf* 遺伝子と *mtc* 遺伝子の発現量は有意に異なっていた (図 10)。*P. foetida* では、25°C と比較して、低温 (15°C) と高温 (35°C) の両方で *mtf* および *mtc* 遺伝子の発現レベルが上昇した。*mtf* および *mtc* 遺伝子の発現レベルは、4 日目および 12 日目において、15°C および 35°C で 25°C の場合よりも有意に高かった ( $p < 0.05$ )。増殖に好ましくない温度が藍藻類細胞の 2-MIB 産生の可能性を遺伝子発現レベルで増加させることが考えられた。また、2 つの 2-MIB 合成酵素遺伝子 (*mtf* および *mtc*) の発現は、温度条件や生育段階が異なる場合において同様であった。これは、GPP メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子と、2-MIB 合成のモノテルペンシクラーゼの遺伝子がオペロンを形成しているためと考えられた<sup>3,4,5</sup>。

藍藻類におけるジオスミン/2-MIB 合成の主要な生合成経路は、メバロン酸経路 (MV) やノンメバロン酸経路 (MEP) などのイソプレ



ノイド経路であると提唱されている<sup>6)</sup>。ジェオスミン、2-MIB、クロロフィル・フィトール、カロテノイドが同様のイソプレノイド経路で生合成されることから、ジェオスミン・2-MIBと藍藻類の光合成色素の合成には密接な関係があると考えられる<sup>6,7,8)</sup>。従って、温度以外に光もジェオスミンと2-MIB合成の遺伝子発現を調節する可能性がある。既往研究から、*Pseudanabaena* sp.において、2-MIB合成に関連する2つの標的遺伝子の発現レベルが、低光量では増加し、高光量では減少することが報告されている<sup>3)</sup>。藍藻類を暗所で24時間以上培養すると、ジェオスミン合成酵素遺伝子の発現が減少し、6時間以内では減少しないことを報告している<sup>9,10)</sup>。

以上から、通常の観測項目における環境因子(窒素、水温)から、カビ臭物質産生藍藻類の増殖とカビ臭物質産生の特性を推量する知見を得た。また、カビ臭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迅速な定量法の開発

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、形態観察では産生株か非産生株の判別や顕微鏡検査カウントでのカビ臭物質産生藍藻類の定量は困難であり、迅速かつ簡便な方法での判別法および定量法が求められている。

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。この証左として、座学・実技講習を行った後、PCR法を実施したことがない方に、実施していただき、良好な結果を得ることができた。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PCR法が優良な方法として開発してき

た。

これまでに、一般的なサーマルサイクラーを用いた迅速かつ簡便な半定量法として Whole-Cell PCR法を開発した。本研究では、定量PCR装置(qPCR法)を用いて迅速かつ簡便な定量法の開発を試みた。

この結果、*geoA* 遺伝子ホモログを標的とした定量法では、Chl.aによる細胞密度と同様に Whole Cell qPCR法もDNAを鋳型としたqPCR法(どちらもインターカレート法)により定量した遺伝子量も増加し(図11)、Chl.aと*geoA* 遺伝子量の高い正の相関関係を構築できた(図12, Whole Cell PCR法  $R^2=0.9268$ )。以上から、Whole Cell qPCR法(インターカレート法)によりDNA抽出せずジェオスミン産生藍藻類の細胞密度を推量する技術を開発した(図11, 図12)。

一方、*mtc* 遺伝子ホモログを標的とした定量法では、*mtc* 遺伝子量もChl.a濃度と同様に増減し(図13,15,17)、正の相関関係を得たが、供試藻類ごとに相関係数が異なっていた(図14,16,18)。インターカレート法がProbe法よりも良好な相関係数を示す傾向にあった。

モバイルqPCR装置も市場に流通しており、現場でサンプリング後にカビ臭物質産生藍藻類を定量できる知見を得られた。加えて、完全自動qPCR装置も市場に流通しており、本研究から、カビ臭産生藍藻類の自動定量化技術に貢献できる知見を得ることができた。各水道事業体の体制に沿って、本研究成果を活用できるものと期待される。

## 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た。環境因子はカビ臭物質産生藍藻類の増殖に影響を与える。高NO<sub>3</sub>-N濃度において2-MIB産生能が高くなることを明らかにした。異なる温度では、増殖に適さない温度(低温)の際に、カビ臭物質合成酵素遺伝子群の発現量が高くなることを見いだした。加えて、温度がカビ臭物質の局在(細胞内もしくは細胞外)の制御の一端を担っていることが推量された。

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と定量に有効と期待できる whole-cell qPCR法を開発した。本手法により、カビ臭物質産生藍藻類を迅速かつ簡便に定量できるため、定期的なモニタリングにより、カビ臭発生の予測に貢献できると期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Shen Q, Shimizu K, Miao H, Tsukino S, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M. Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of *Dolichospermum smithii*, Environmental Science and Pollution Research, 28 177-184, 2021.

### 2. 学会発表

Qingyue Shen, Kazuya Shimizu, Hanchen Miao, Shinya Tsukino, Motoo Utsumi, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Osamu Nishimura, Yasuhiro Asada, Naoshi Fujimoto, Hirokazu Takanashi, Michihiro Akiba, 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), 2021.3, Tsukuba, Japan.

Hanchen Miao, Qingyue Shen, Satoshi Ichise, Marie Shimada, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Hirokazu Takanashi, 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), 2021.3, Tsukuba, Japan.

Ji Zhang, Qingyue Shen, Satoshi Ichise, Marie Shimada, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Hirokazu Takanashi, Michihiro Akiba, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Rapid detection for 2-MIB-producing cyanobacteria, The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), 2021.3, Tsukuba, Japan.

## 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. その他 (受賞等)

Shen Q ら, ポスタープレゼンテーション賞, 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, 2021.3.

Miao H ら, ポスタープレゼンテーション賞, 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, 2021.3.

Zhang J ら, ポスタープレゼンテーション賞, Rapid detection for 2-MIB-producing cyanobacteria, The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment, 2021.3.

### J. 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.
- 3) Wang Z, Xu Y, Shao J, et al (2011) Genes associated with 2-methylisoborneol biosynthesis in cyanobacteria: Isolation, characterization, and expression in response to light. PLoS One **6**:1
- 4) Komatsu M, Tsuda M, Omura S, Oikawa H, and Ikeda H. (2008) Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. Proc Natl Acad Sci **105**, pp.7422-7427
- 5) Giglio S, Chou WKW, Ikeda H, Cane DE, and Monis PT. (2011) Biosynthesis of 2-methylisoborneol in cyanobacteria. Environ Sci Technol **45**, pp.992-998
- 6) Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, Mucha O, Phon TH, and Stephanopoulos G. (2008) Terpenoids: opportunities for biosynthesis of

- natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm* **5**, pp.167–190
- 7) Tholl D. (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol* **9**, pp.297–304
  - 8) Pattanaik B and Lindberg P (2015) Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria. *Life* **5**, pp.269–293
  - 9) Giglio S, Saint CP, and Monis PT. (2011) Expression of the geosmin synthase gene in the cyanobacterium *Anabaena circinalis* AWQC318. *J Phycol* **47**, pp.1338–1343
  - 10) Ludwig F, Medger A, Börnick H, Opitz M, Lang K, Göttfert M, and Röske I. (2007) Identification and expression analyses of putative sesquiterpene synthase genes in *Phormidium* sp. and prevalence of geoA-like genes in a drinking water reservoir. *Appl Environ Microbiol* **73**, pp.6988–6993
  - 11) Shen Q, Shimizu K, Miao H, Tsukino S, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, and Akiba M. (2021) Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of *Dolichospermum smithii*. *Environ Sci Pollut Res* **28**, pp.1177–184

#### K. 謝辞

茨城県企業局水質センターおよび嶋田 麻里恵 氏(茨城県企業局水質センター), 一瀬 諭 博士(滋賀県湖環境科学センター), 北村 壽朗 氏(神奈川県企業庁), 藤瀬 大輝 博士(神奈川県川崎市上下水道局), に感謝いたします。

表 1 本研究で使⽤したプライマーとプローブ

Target genes	Primers/Probe	Sequence (5' to 3')	Reference
<i>geoA</i>	geoA666F	AAAAGACACATTTGCTGATGGTG	Shen et al. (2021)
	geoA774R	ATCACGCGGTCATCAGGCTT	
<i>mtf</i>	Mtf-RTF	CGATTGGTCGGTATTAGAGGCT	Wang et al. (2011)
	Mtf-RTR	ATCACGCGGTCA TCAGGCTT	
<i>mtc</i>	Mtc-RTF	CGCTCGCTTTGTG AGTGAGATAG	
	Mtc-RTR	GGCAGTAGAGTGGTGAGGCAGTT	
16S rRNA	mibcProbe	ACCTAGATTCAGGACTACTCCAGACA	本研究で 新たに設計
	16S-RTF	ACGGAGTTAGCCG ATGCTTATTC	Wang et al. (2011)
	16S-RTR	CGAAAGCCTGACGGAGCAATA	

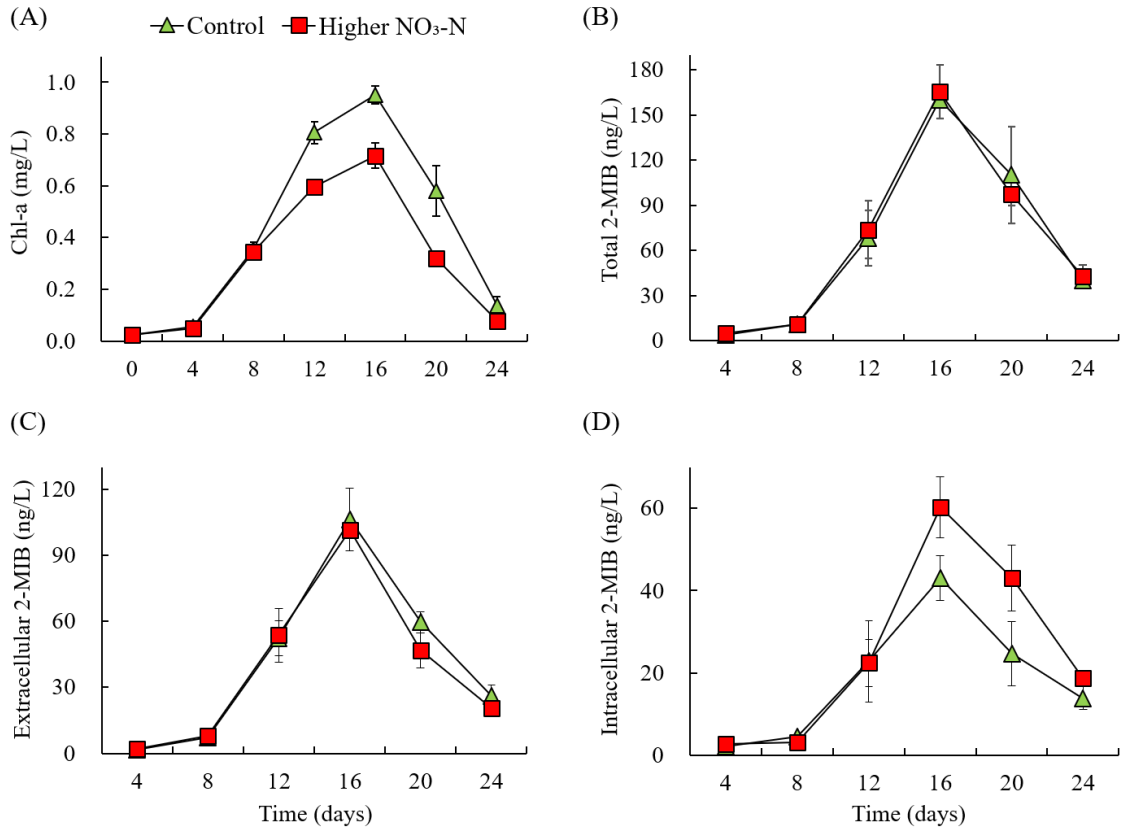


図1 *P. foetida* における異なる  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度での増殖特性と 2-MIB 産生量の経日変化 (A)増殖曲線, (B) 総 2-MIB 濃度, (C) 細胞外 2-MIB 濃度, (D) 細胞内 2-MIB 濃度

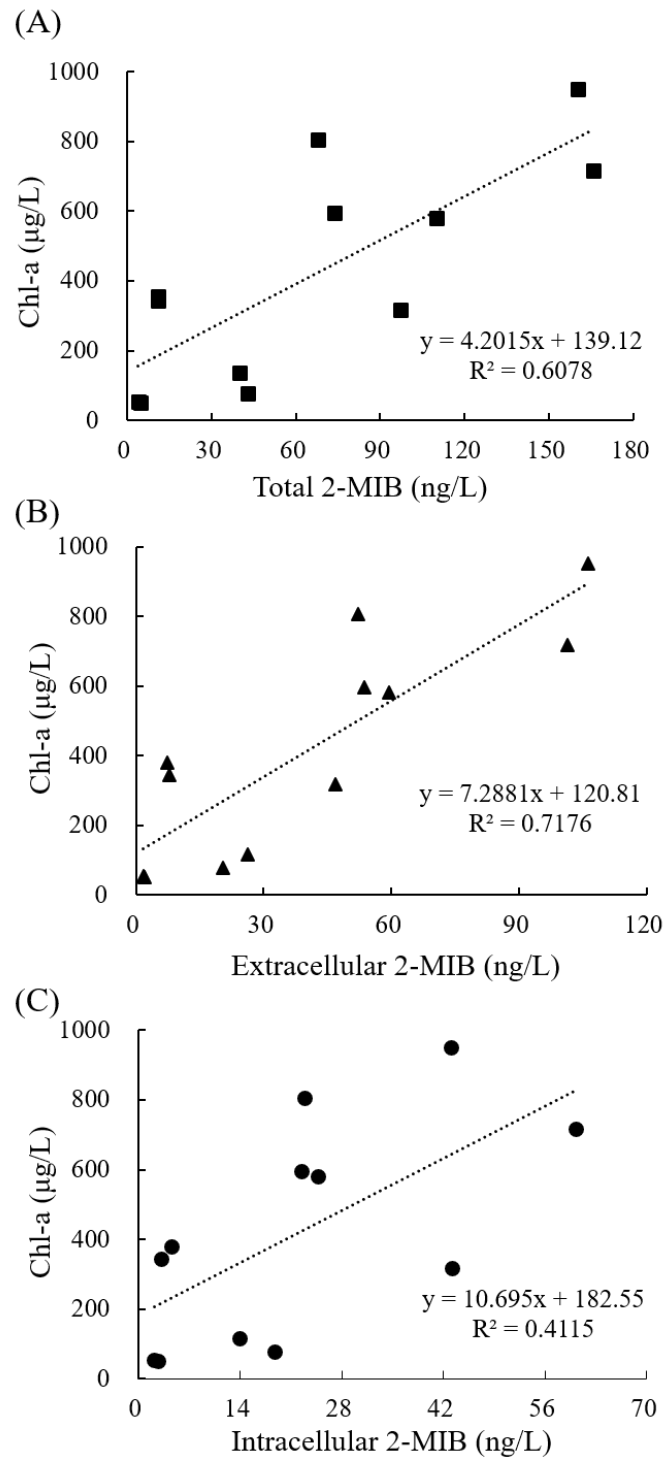


図 2 Chl-a と 2-MIB 濃度の相関分析

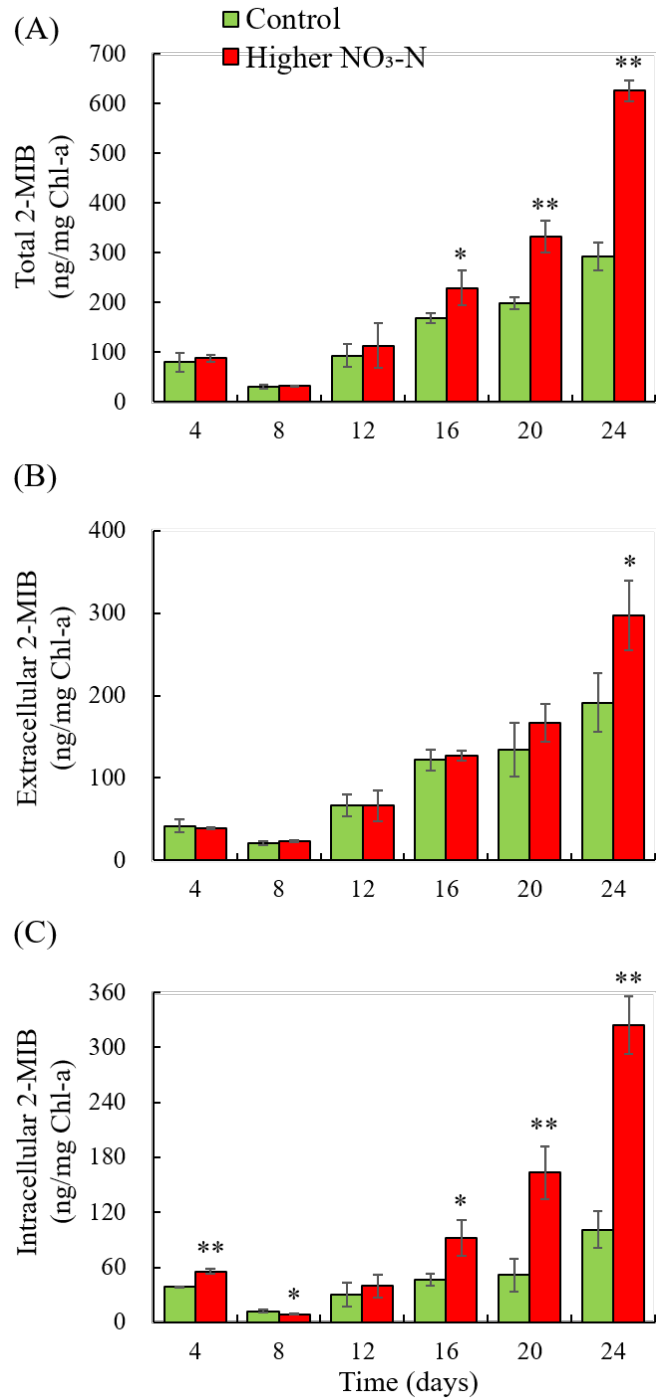


図3 異なる  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度における *P. foetida* の 2-MIB 産生能  
 (A) 総 2-MIB 産生能, (B) 細胞外 2-MIB 産生能, (C) 細胞内 2-MIB 産生能  
 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ )

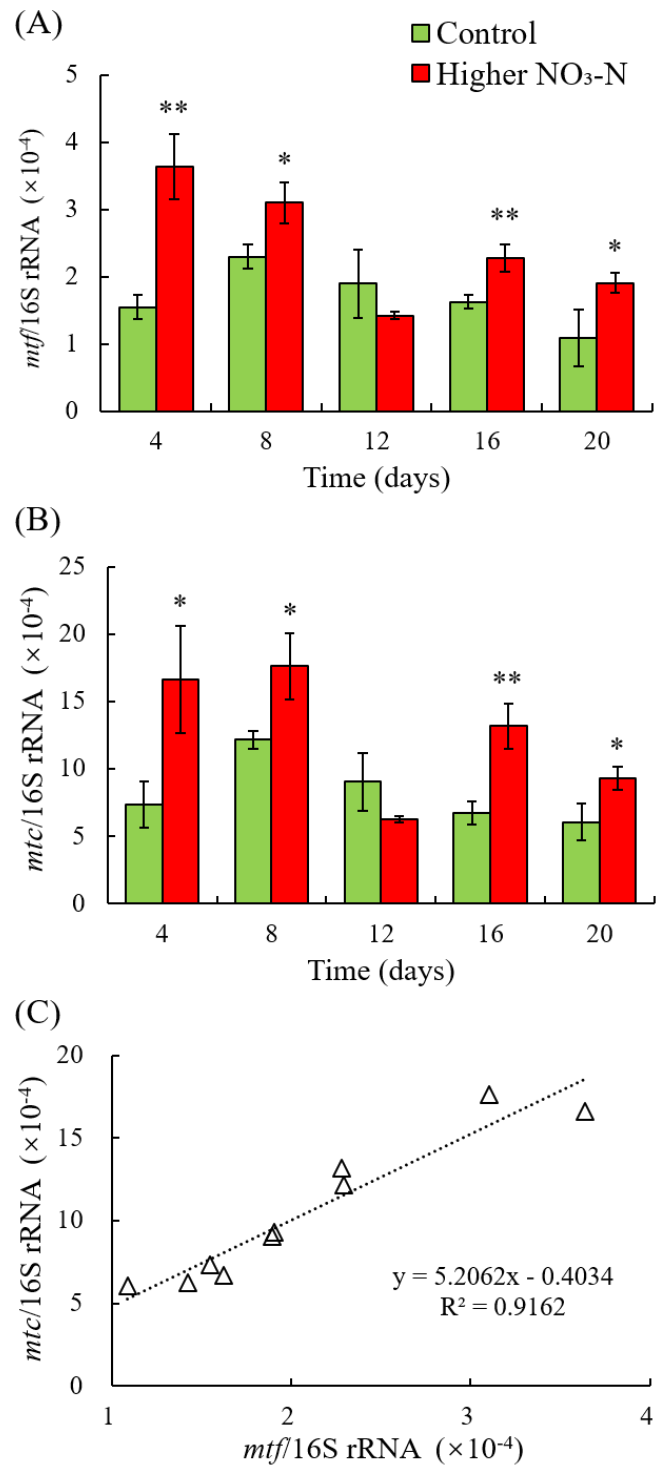


図 4 2-MIB 合成酵素遺伝子群の発現量

(A) *mtf* 遺伝子発現量, (B) *mtc* 遺伝子発現量 gene at different  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentrations and correlation analysis (C) between the two target genes (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).



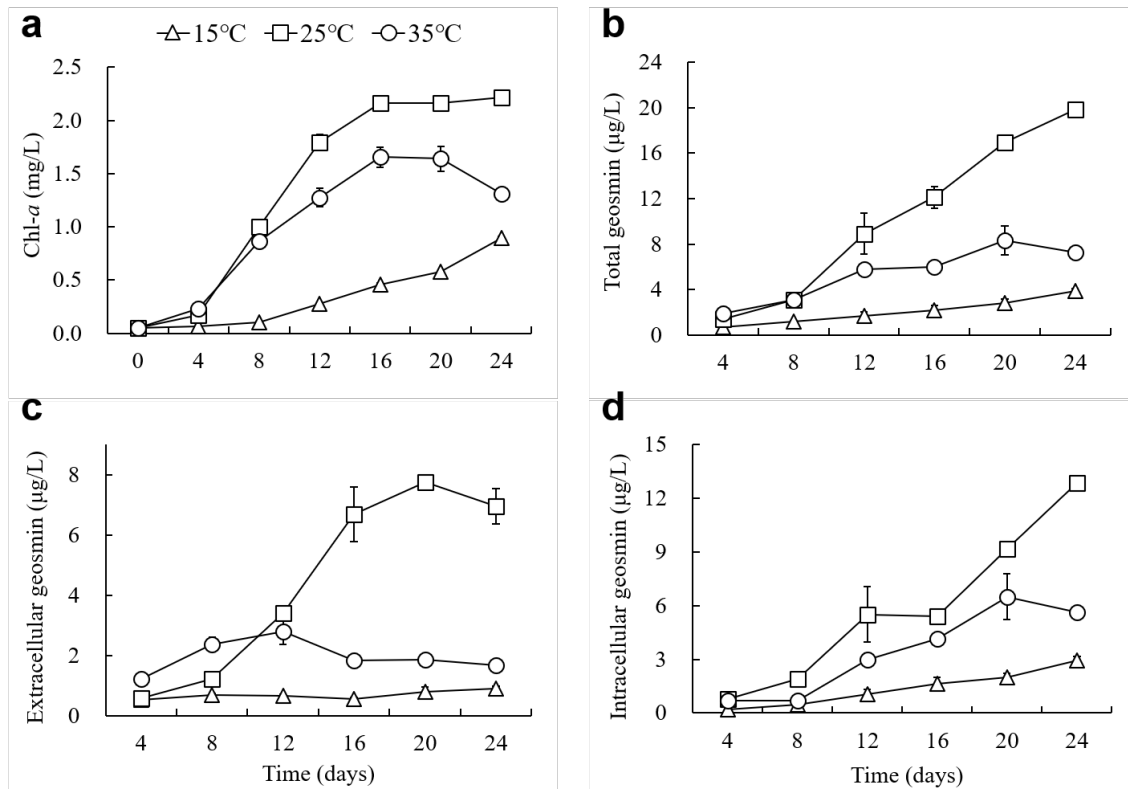


図5 異なる培養温度条件における *D. smithii* の増殖特性とジェオスミン産生量の経日変化  
 (a) *D. smithii* の増殖特性, (b) 総ジェオスミン濃度の経日変化, (c) 細胞外ジェオスミン濃度の経日変化, (d) 細胞内ジェオスミン濃度の経日変化

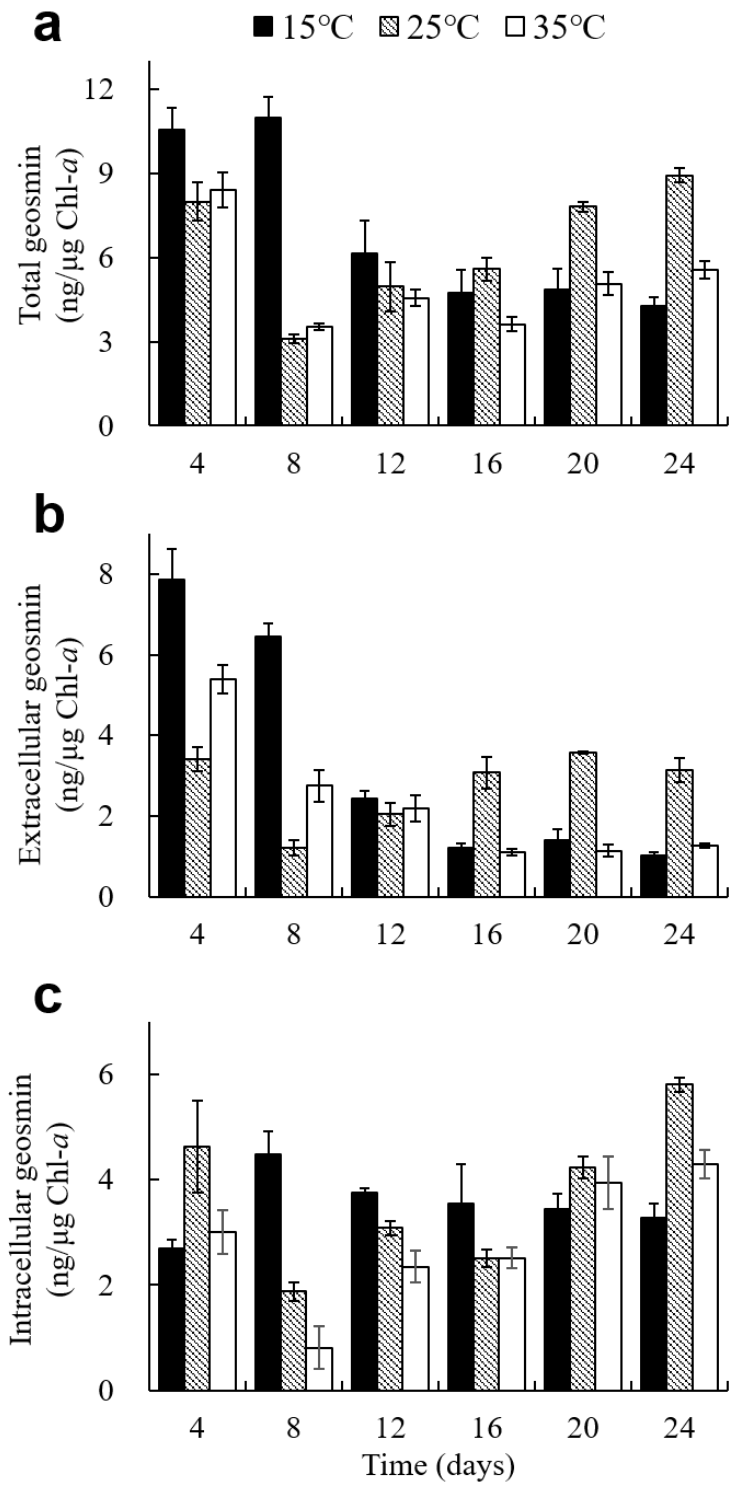


図 6 *D. smithii* のジェオスミン産生能  
 (a) 総ジェオスミン産生能, (b) 細胞外ジェオスミン産生能, (c) 細胞内ジェオスミン産生能

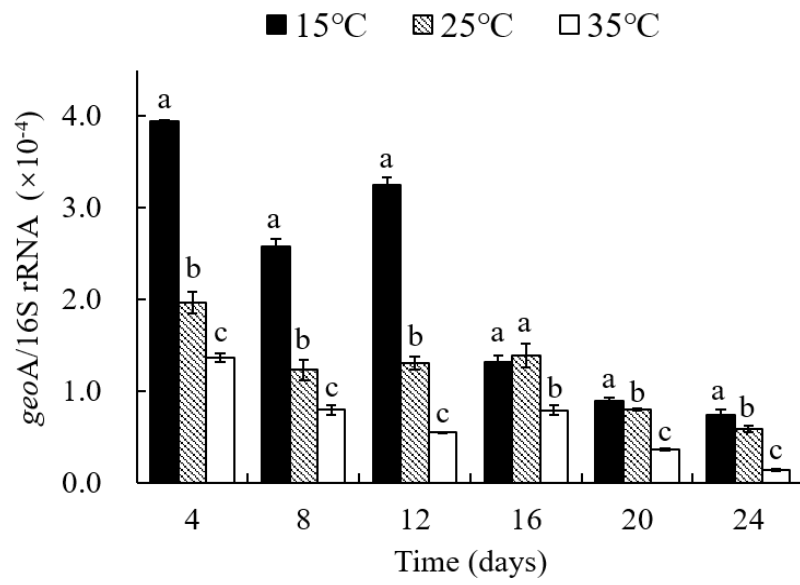


図7 異なる培養温度条件における *D. smithii* の *geoA* 発現量の変化  
異なるアルファベット (a, b, c) は, 有意差を示す( $p < 0.05$ )。

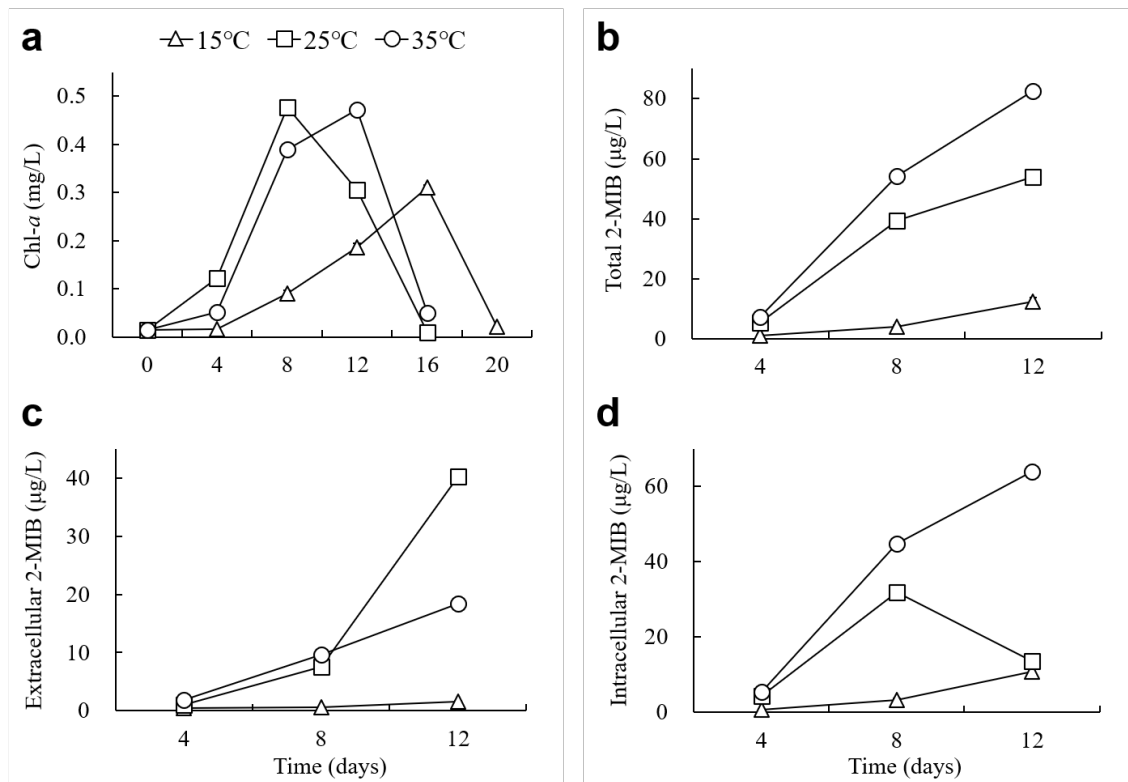


図8 異なる培養温度条件における *P. foetida* の増殖特性と 2-MIB 産生量の経日変化  
 (a) *P. foetida* の増殖特性, (b) 総 2-MIB 濃度の経日変化, (c) 細胞外 2-MIB 濃度の経日変化,  
 (d) 細胞内 2-MIB 濃度の経日変化

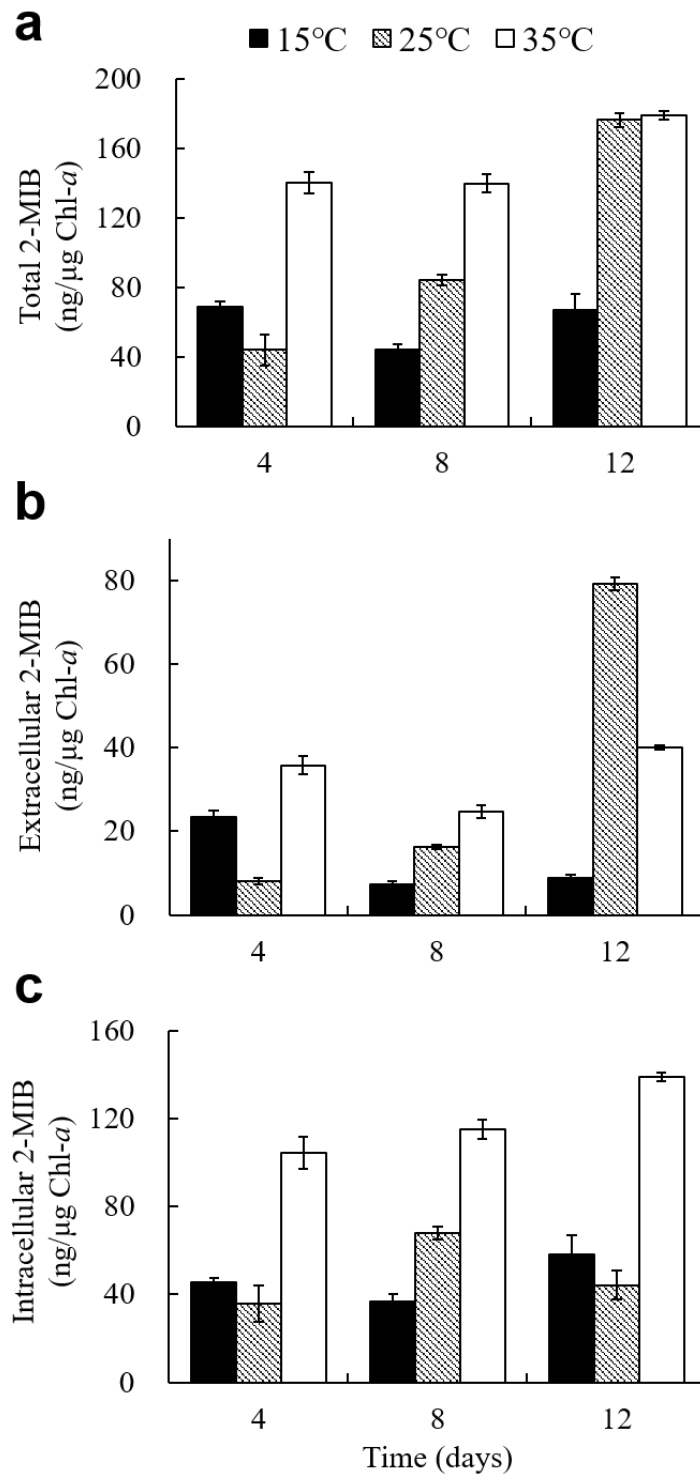


図 9 *P. foetida* の 2-MIB 産生能  
(a) 総 2-MIB 産生能, (b) 細胞外 2-MIB 産生能, (c) 細胞内 2-MIB 産生能

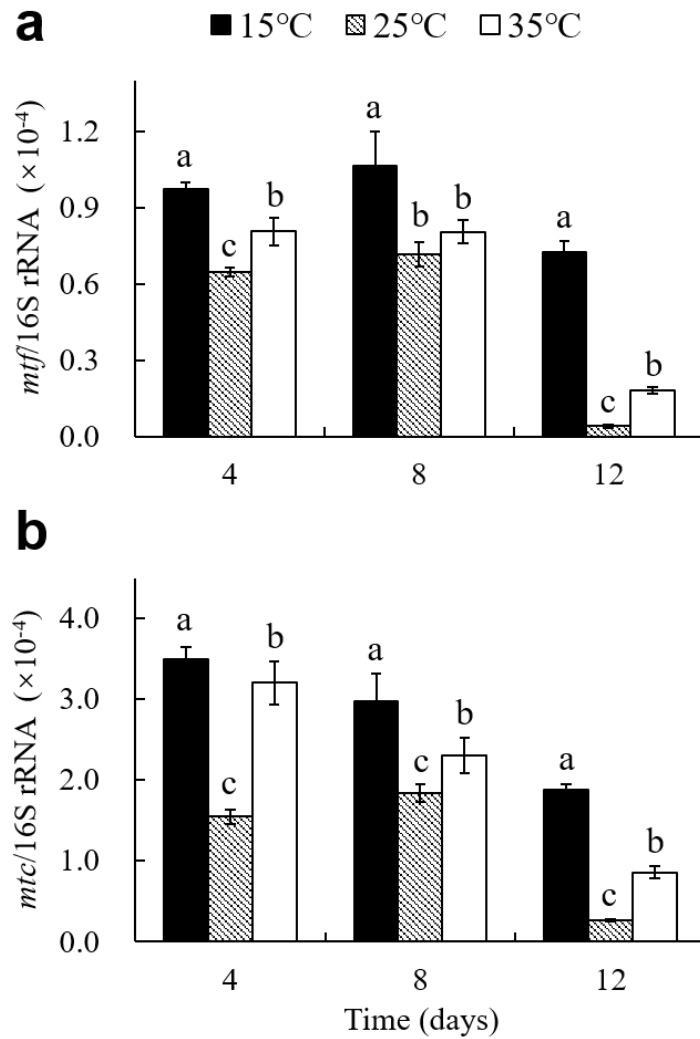


図 10 異なる培養温度条件における 2-MIB 合成酵素遺伝子群の発現量変化  
 (a) *mtf* 遺伝子発現量の変化, (b) *mtc* 遺伝子発現量の変化  
 異なるアルファベット (a, b, c) は, 有意差を示す( $p < 0.05$ )。

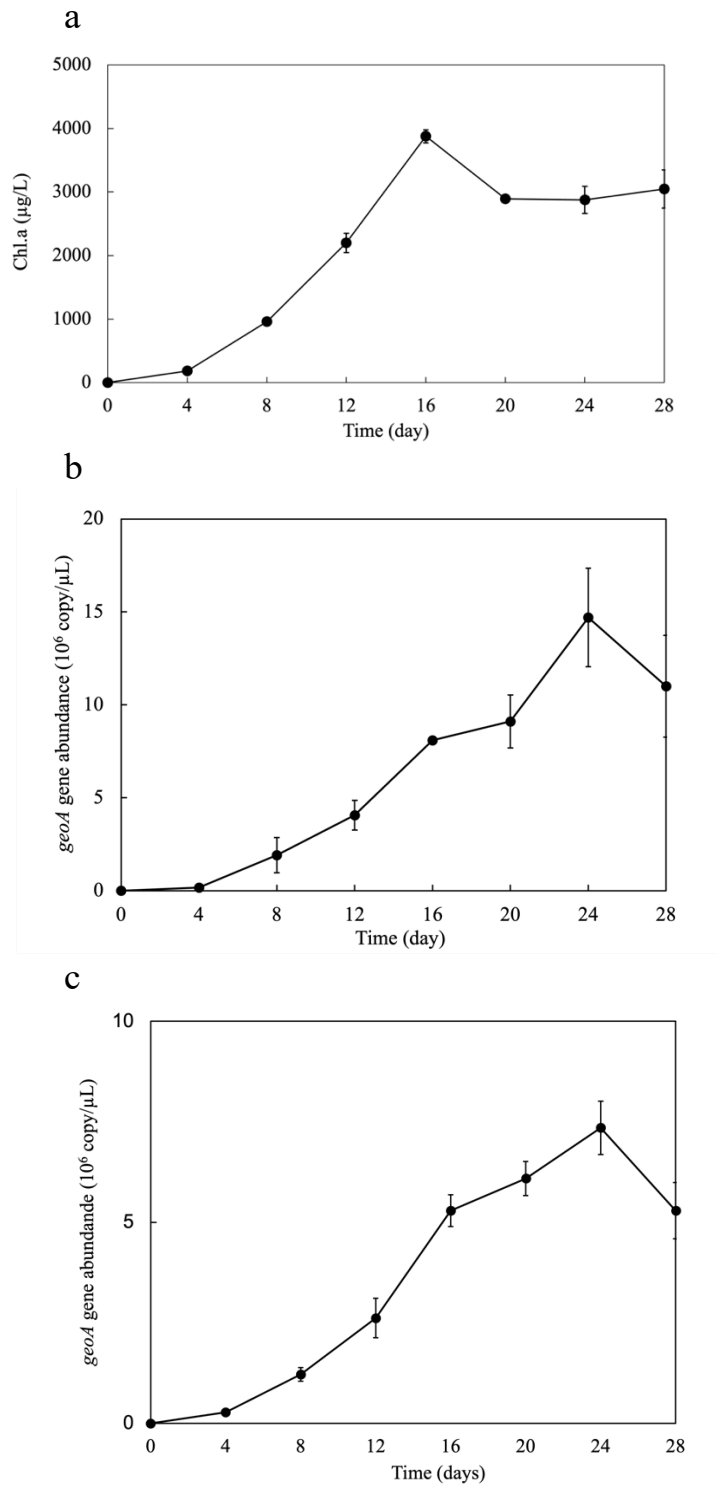


図 11 *D. smithii* の増殖曲線と *geoA* 遺伝子量の経日変化  
 (a) *D. smithii* の増殖曲線, (b) DNA を鋳型とした qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *geoA* 遺伝子量の経日変化, (c) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *geoA* 遺伝子量の経日変化

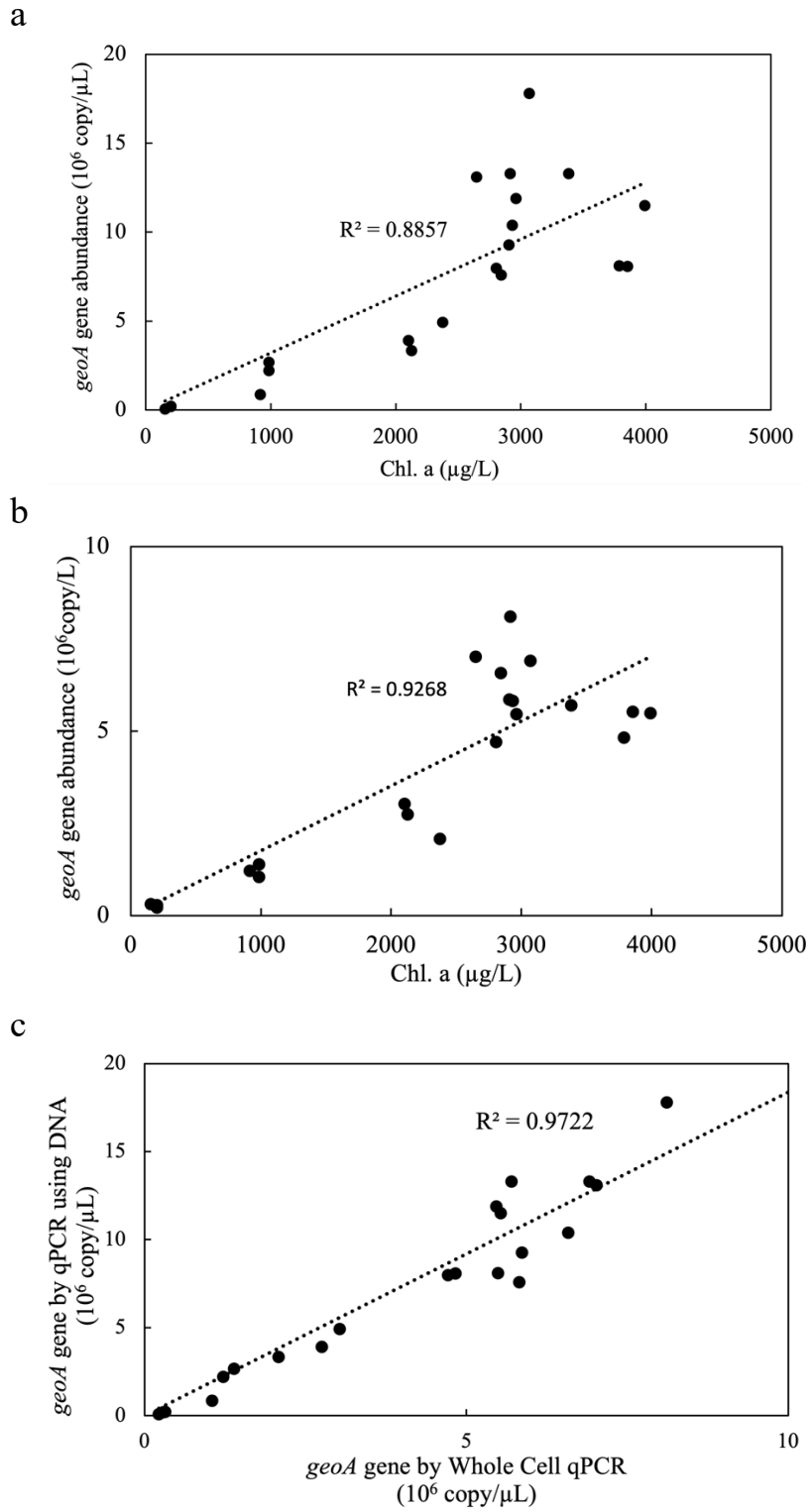


図 12 相関分析

- (a) DNA を鋳型とした qPCR 法を用いた *geoA* 遺伝子量と Chl.a との相関
- (b) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *geoA* 遺伝子量と Chl.a との相関
- (c) DNA 鋳型 qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *geoA* 遺伝子量と Whole Cell qPCR 法を用いた *geoA* 遺伝子量との相関



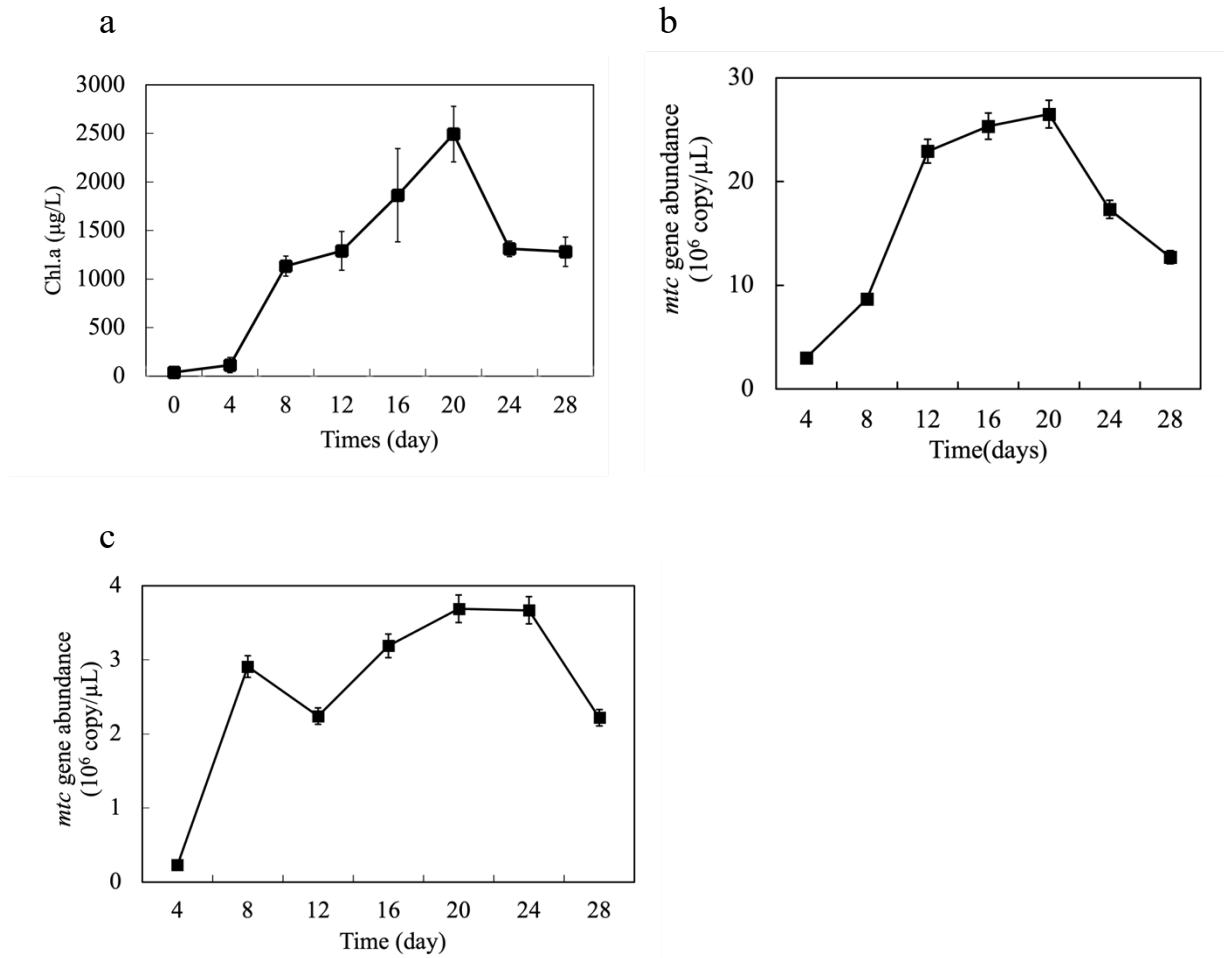


図 13 *Pseudanabaena* sp. 1705 の増殖曲線と *mtc* 遺伝子量の経日変化  
 (a) *Pseudanabaena* sp. 1705 の増殖曲線,  
 (b) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *mtc* 遺伝子量の経日変化,  
 (c) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量の経日変化

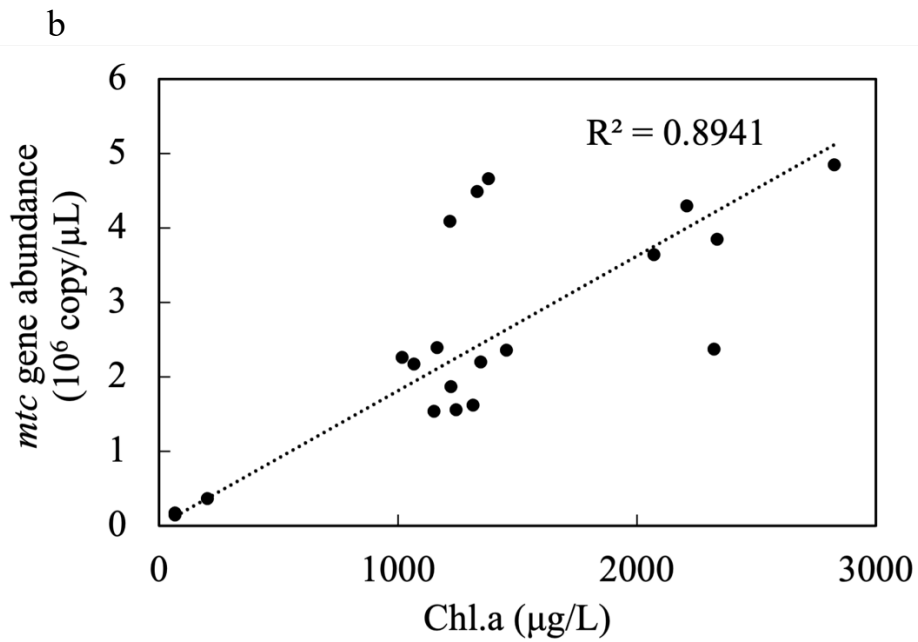
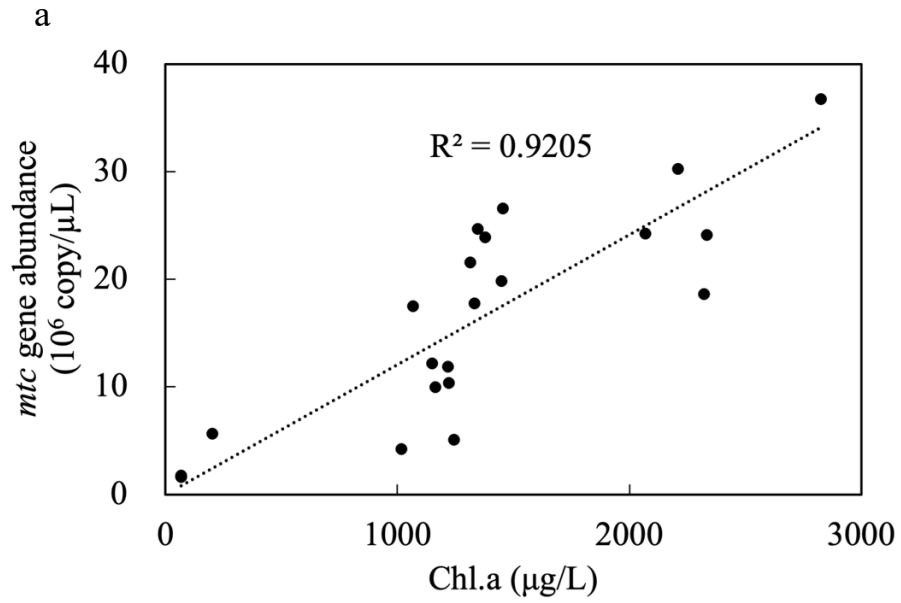


図 14 相関分析 (*Pseudanabaena* sp. 1705)

- (a) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関  
 (b) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関

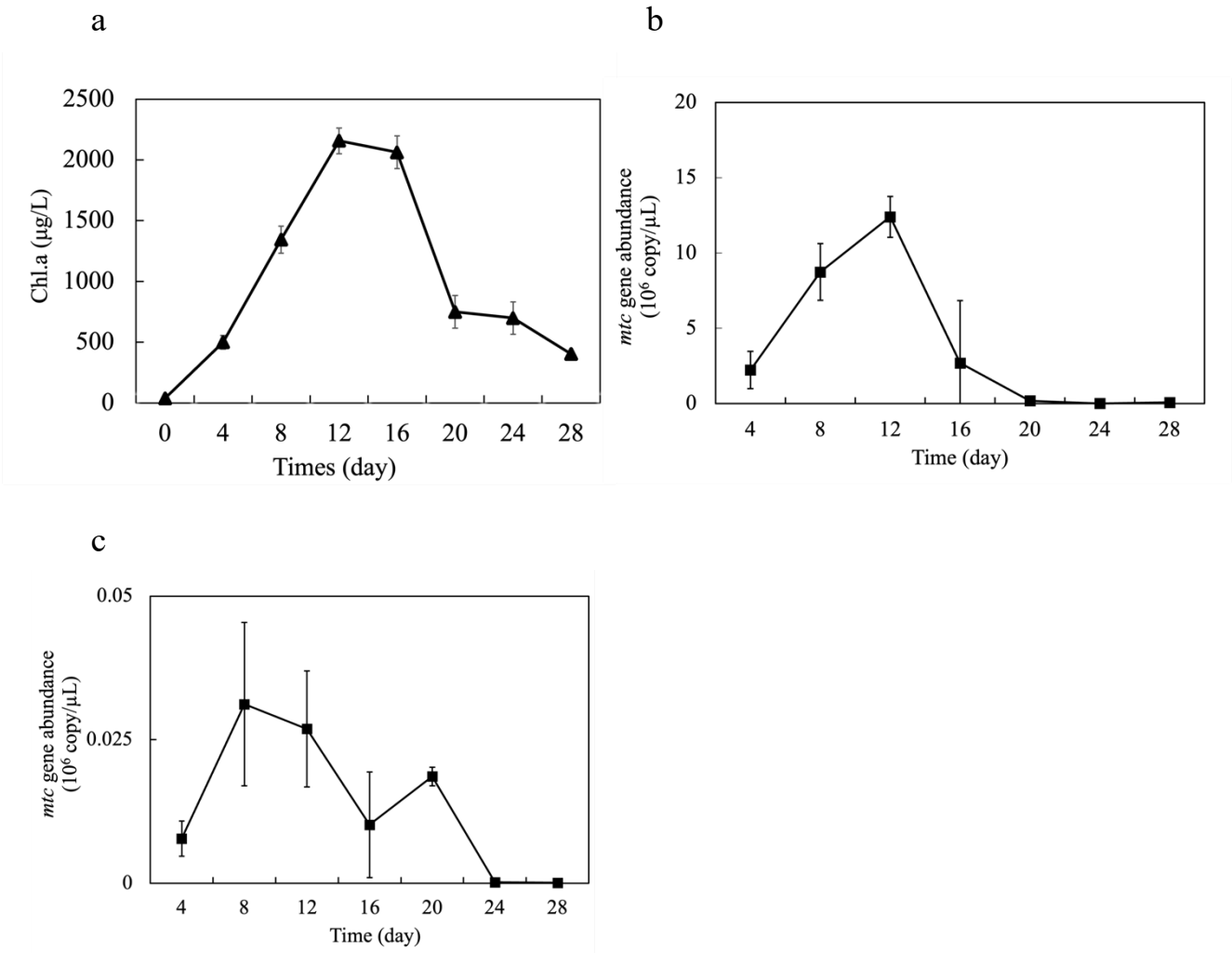
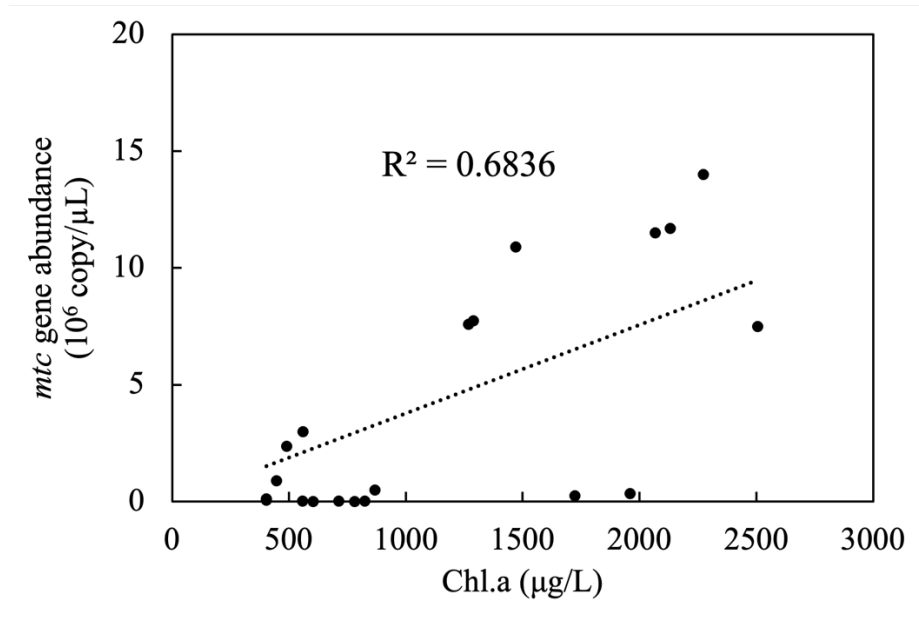


図 15 *Pseudanabaena* sp. 1803 の増殖曲線と *mtc* 遺伝子量の経日変化  
 (a) *Pseudanabaena* sp. 1803 の増殖曲線,  
 (b) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) による *mtc* 遺伝子量の経日変化,  
 (c) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量の経日変化

a



b

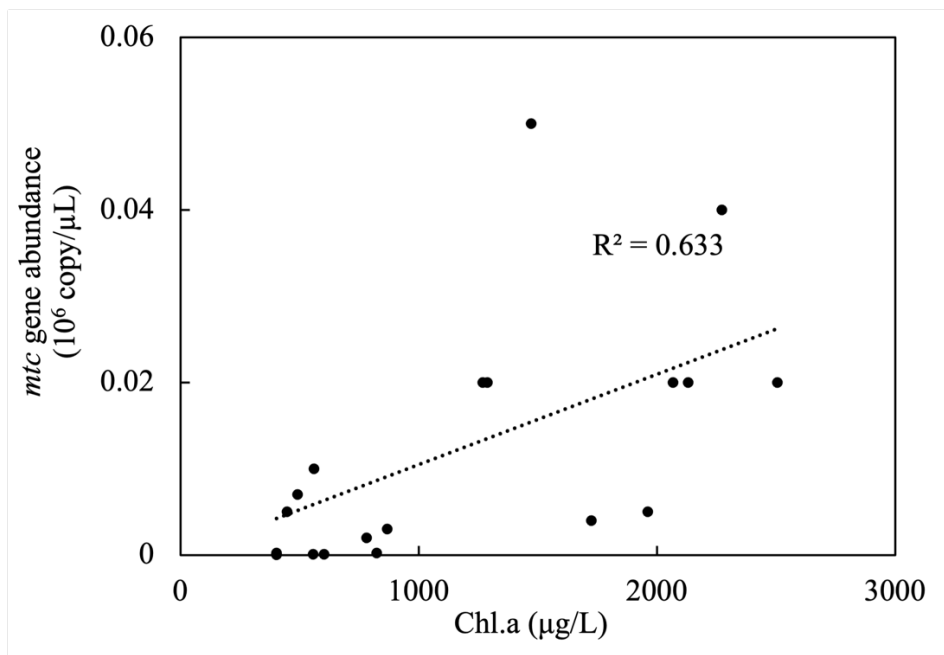


図 16 相関分析 (*Pseudanabaena* sp. 1803)

- (a) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関  
(b) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関

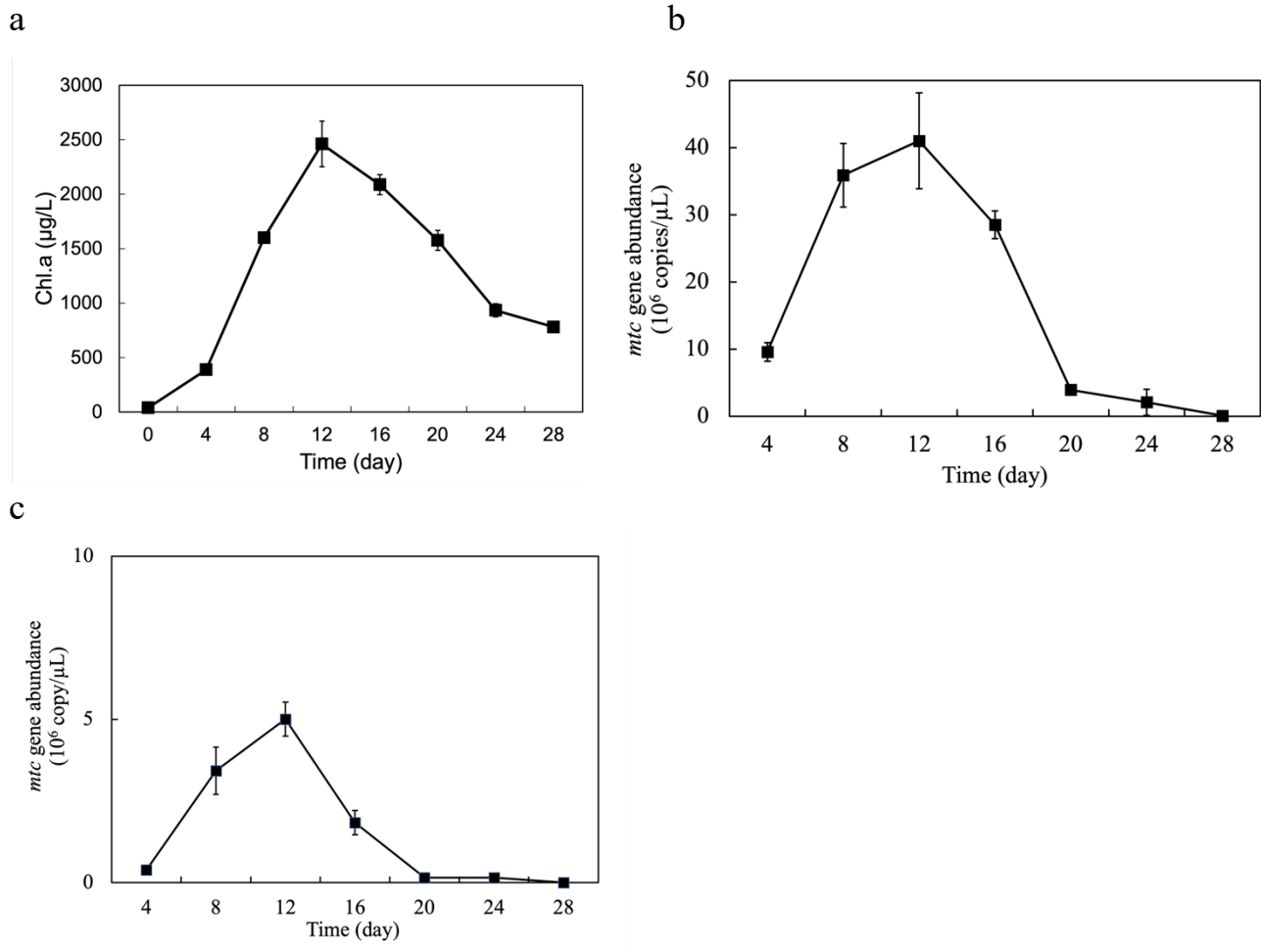


図 17 *Pholmidium tenue* の増殖曲線と *mtc* 遺伝子量の経日変化

(a) *Pholmidium tenue* の増殖曲線,

(b) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) による *mtc* 遺伝子量の経日変化,

(c) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量の経日変化

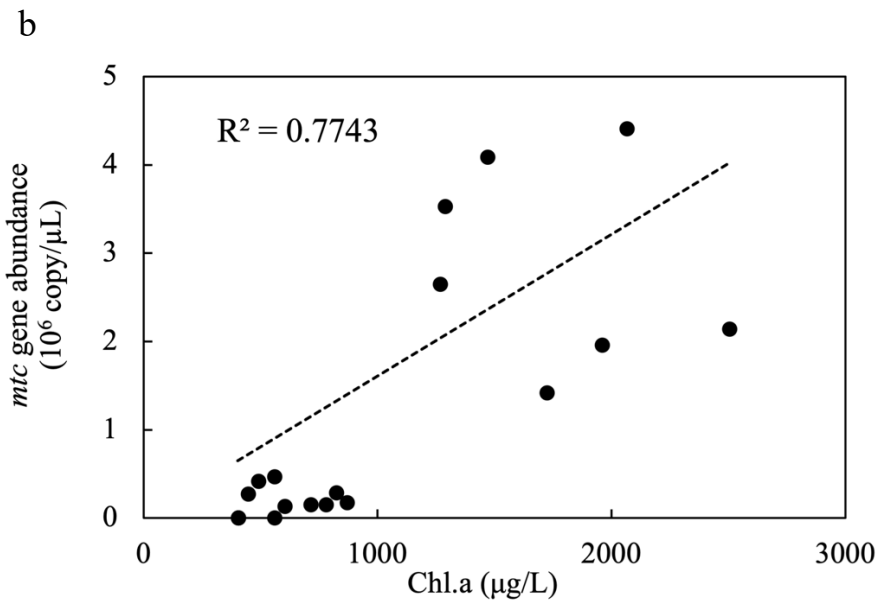
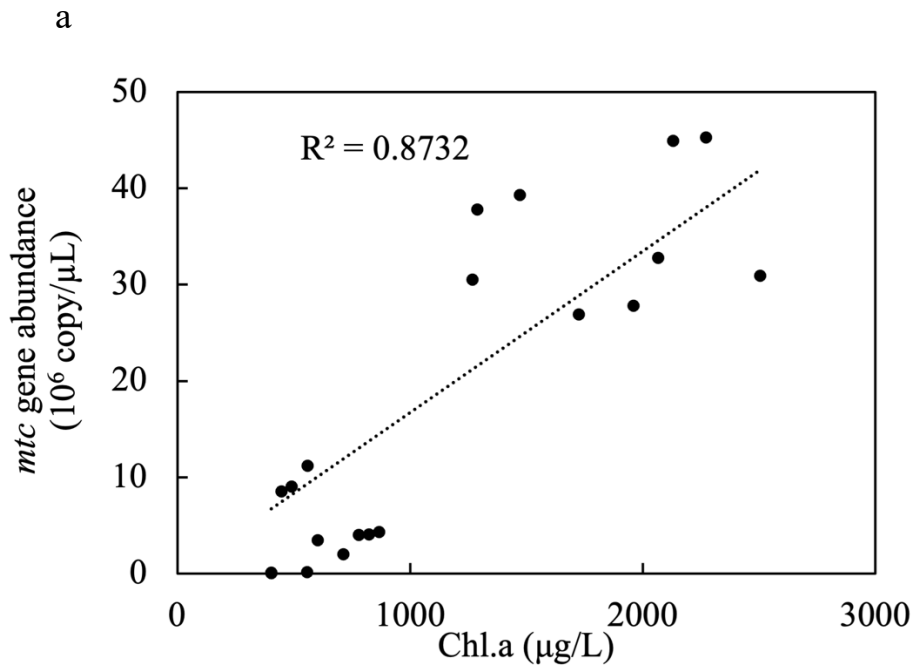


図 18 相関分析 (*Pholmidium tenue*)

- (a) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関  
 (b) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関

研究成果の刊行に関する一覧表

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粉末活性炭への非平衡吸着	水道協会雑誌	89(6)	2-10	2020
江崎敦, 浅田安廣, 藤本尚志, 早坂泰彦, 鈴木孝俊, 山田晃平, 秋葉道宏	形態学的特徴と遺伝子解析に基づく全国水道水源でのカビ臭原因物質産生藍藻類の存在調査	水道協会雑誌	90(5)	2-12	2021
Shinfuku Y, Takanashi H, Nakajima T, Ogura A, Kitamura H, Akiba M	Exploration of an Odorous Aldehydes and Ketones Produced by <i>Urogena americana</i> Using High Resolution Mass Spectrometry, GC-Olfactometry, and Multivariate Analysis	Chemosphere	257	127-174	2020
Shinfuku Y, Nakajima T, Takanashi H, Nakajima, Ueda T, Akiba M	A Method to Purify a DNPH-derivatized Sample Using Solid Phase Extraction	Environmental Science	33(5)	70-78	2020
Shen Q, Shimizu K, Miao H, Tsukino S, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asai Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M	Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of <i>Dolichospermum smithii</i>	Environmental Science and Pollution Research	28	177-184	2021

## 研究班の構成

(令和2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

神奈川県企業庁水道水質センター所長 北 村 壽 朗  
東北大学大学院工学研究科准教授 佐 野 大 輔  
京都市上下水道局水質管理センター水質第1課担当係長 藤 原 俊 一 郎  
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) 渡 辺 崇 一  
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  
千葉県企業局技術部浄水課水質管理班技師 雲 岡 秀 樹  
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 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  
国立保健医療科学院生活環境研究部研究生  
国立保健医療科学院生活環境研究部研究生

三 好 太 郎  
松 本 恭 太  
早 坂 俊 一

令和3年3月29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 宮崎 雅則



次の職員の令和2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・部長  
(氏名・フリガナ) 秋葉 道宏・アキバ ミチヒロ

## 4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

## 6. 利益相反の管理

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

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

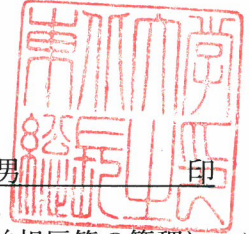
令和 3年 3月 10日

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2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) 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 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 3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 印



次の職員の令和2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3年 5月 11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 江口 文陽



次の職員の令和2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・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。

令和3年5月10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 印



次の職員の令和2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 3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2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。

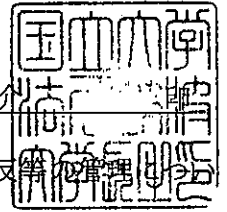
令和 3年 4月30日

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2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。



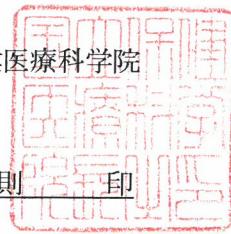
令和3年3月29日

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 宮崎 雅則 印



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
2. 研究課題名 水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける生物障害対策の強化に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 生活環境研究部・主任研究官  
(氏名・フリガナ) 浅田 安廣・アサダ ヤスヒロ

## 4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

## 6. 利益相反の管理

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

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