

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

気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価
とその適応性の強化に向けた研究

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 秋葉 道宏

令和4（2022）年 3月

目 次	
研究班の構成	1
I. 総括研究報告	
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価 とその適応性の強化に向けた研究 秋葉道宏	3
II. 分担研究報告	
1. 水道水源で発生したカビ臭原因物質藍藻類 の簡易同定・定量法の構築 秋葉道宏, 藤本尚志, 浅田安廣, 松本恭太	13
2. 気候変動条件下における障害生物発生ポテンシャル評価 秋葉道宏, 藤本尚志, 浅田安廣, 松本恭太	19
3. 障害生物およびその代謝産物の発生メカニズムの解明 秋葉道宏, 清水和哉, 西村修, 藤本尚志, 浅田安廣	37
4. ダム湖の藻類異常発生予測モデルの構築における 衛星データ等の活用可能性の検討 西村修, 佐野大輔, 今本博臣, 三浦耀平	51
5. 障害生物発生時における分析方法の開発 秋葉道宏, 高梨啓和, 小倉明生, 北村壽朗	57
6. 精密分析による水道水原水中溶存有機物の特性解析 秋葉道宏, 越後信哉	69
7. 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, 清水和哉, 藤本尚志, 高梨啓和	79
8. 気候変動により生じる生物障害等リスク に対する対応策の検討 柳橋泰生	87
9. 気候変動への適応を考慮した水安全計画の改善 小坂浩司	95
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	99

研究班の構成

(令和3年度)

研究代表者

国立保健医療科学院生活環境研究部主任研究官 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
京都大学大学院地球環境学堂教授	越後信哉
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
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教授	佐野大輔
叡啓大学ソーシャルシステムデザイン学部教授	下ヶ橋雅樹
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主任研究官
国立保健医療科学院生活環境研究部主任研究官
国立保健医療科学院研究生
国立保健医療科学院研究生
東北大学大学院工学研究科大学院生

三 浦 尚 之
三 好 太 郎
松 本 恭 太
仲 門 拓 磨
三 浦 耀 平

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

気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価と
その適応性の強化に向けた研究

令和3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4(2022)年 3月

気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究

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 主任研究官

研究要旨

本研究では「気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究」に資する成果を得ることを目指し、①気候変動条件下における障害生物発生ポテンシャル評価と将来発生予測モデルの構築、②障害生物発生時における分析方法の開発と効率的な浄水処理システムの提案、③気候変動により生じる生物障害等リスクに対する対応策の検討に関連する研究を実施した。

①気候変動条件下における障害生物発生ポテンシャル評価と将来発生予測モデルの構築

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・定量法の開発を目的とし、定量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・定量を試みた結果、カビ臭原因物質産生藍藻類の監視に対して構築したPCR系の有用性が示された。

水源流域における障害生物の発生ポテンシャルを評価することを目的として、複数のカビ臭原因物質産生藻類株を用いてカビ臭合成酵素遺伝子による系統の違いとカビ臭産生能、増殖、カビ臭産生に及ぼす窒素制限および温度の影響等について検討を行い、カビ臭原因物質産生藻類の増殖およびカビ臭産生に及ぼす気候変動により生じる環境条件の影響について検討を行った。その結果、分子系統によってカビ臭物質の産生能が異なったり、株間で窒素源に対する応答が異なったり、温度によって増殖やカビ臭産生特性が大きく異なることから、単離株の増殖やカビ臭産生特性に関するデータの蓄積は極めて重要であり、そういった特性を踏まえて、発生予測モデルの構築を行っていく必要性が示唆された。

気候変動により生じる環境条件下（温度、光条件、共存微生物）でのカビ臭産生藍藻類の増殖ポテンシャルとカビ臭物質産生能の変化やカビ臭発生メカニズムの解明を目的として、温度、光強度、共存微生物群の変化によるカビ臭物質産生藍藻類のカビ臭物質産生のメカニズムの解明を試みた。その結果、カビ臭物質産生藍藻類の同属・同種で、異なる株の場合、環境因子への応答は異なるものとなり、増殖に対しては、水温条件は異なる結果を与えやすいことを明らかにした。また、微生物群集がカビ臭原因物質産生藍藻類の一部の増殖に好影響を与えていることを明らかにした。

藻類発生予測モデルの構築に向けて、日本国内の4つのダム湖において、再解析データ(ERA5、DSJRA55)、レーダー・アメダス解析雨量(RAP)データの活用可能性を、アメダスの気象データと比較することで検討した。その結果、アメダスの気象データに比べERA5データ及びRAPデータがより藻類の濃度に関連のある要因として特定された。

②障害生物発生時における分析方法の開発と効率的な浄水処理システムの提案

生ぐさ臭の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。原因物質の分子式は $C_{13}H_{20}O_3$ であり、14種類から4種類まで絞り込める可能性が示された。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で取得したマススペクトルから、原因物質を自動検出するための条件を確立した。

精密質量分析による溶存有機物(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、下水処理水の混入を想定した模擬汚染水を用いて検討した。その結果、バックグラウンドの季節変動は観測されるが、異常が起こった際にそれらの変動の影響は、特異的なシグナルに注目することで、十分に回避可能と考えられた。

粉末活性炭による2-MIBの効率的除去に向けて、前段処理による粉末活性炭処理への吸着競合影響の低減について検討を行った結果、吸着競合影響の低減には低分子有機物の除去が重要であり、それらを対象とした吸着剤や凝集剤の開発が必要であることが指摘された。

③気候変動により生じる生物障害等リスクに対する対応策

豪雨等による水道原水の濁度上昇が発生した水道事業体における対応策等について調査した結果、経験的に水源河川の水位を観察し原水濁度の管理に役立てているとの情報を得た。続いて、データに基づき相関解析を行った上で、河川水位の長期間の変化の状況と気候変動の関係について考察した結果、水道の原水濁度と水源の水位に比較的高い相関があることが示され、豪雨時に水道において原水濁度の監視とともに、水源河川の水位を注視することが有効であることが示された。また、降雨強度および河川水位の長期的変化を解析したところ、降雨強度は増加傾向にあり気候変動との関係が考えられたが、河川水位については河川により傾向が異なる

り河川施設等種々の要因の関与が示唆された。

World Health Organization、International Water Associationによる水安全計画の見直し、改善に関連した手引き「A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans」を翻訳し、「水安全計画の監査に関する実践ガイド」を出版した。

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	鹿児島大学大学院 理工学研究科 准教授
越後信哉	京都大学大学院地球環境学 教授
小坂浩司	国立保健医療科学院 上席主任研究官
清水和哉	筑波大学生命環境系 准教授
浅田安廣	国立保健医療科学院 主任研究官

A. 研究目的

近年、地球温暖化の影響と考えられる生物障害や水道原水水質悪化の報告例が目立つ。さらに気候変動による集中豪雨の頻度・規模の増加が確認されており、それら水害による水道事業への影響が生じている。将来的にも気候変動に伴う生物障害事例、集中豪雨・台風による水害頻度の増加等が予想されることから、その生じるリスクに対して適応可能な水道システムを考え、将来にわたって安全で安心な水供給を実現する必要がある。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、気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスクへの適応性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 障害生物の発生メカニズムの把握や藻類発生育予測システムを構築すること
- ② 障害生物発生時の分析方法の開発や効率的な浄水処理プロセスを構築すること
- ③ 気候変動に伴う水道事業の課題を抽出し、①、②と連携して、気候変動に伴う生物障害等リスクに適応した新たな水道システムを例示すること

B. 研究方法

①気候変動条件下における障害生物発生ポテンシャル評価と将来発生育予測モデルの構築

保有している培養株(カビ臭が発生した水源からの単離培養株 27 株、水道事業体保有株 19 株、国立環境研究所微生物系統保存施設保有株 39 株)及び水源試料(53 試料)の DNA 試料に対し、本研

究で構築した定量 PCR 系(カビ臭原因物質産生藍藻類として代表的な 5 属(*Microcoleus* 属、*Pseudanabaena* 属、*Planktothricoides* 属、*Dolichospermum* 属、*Aphanizomenon* 属)を簡易同定・定量)を適用した。また、2021年 6月から11月までの半年間において、3 水源で毎週モニタリングを実施し、構築した定量 PCR 系の有用性を評価した。

水道水源から単離された藍藻類株を用いて、培地条件の変化(CT 培地もしくは改変 CT 培地(窒素濃度を 0 もしくは 1 mg/L に制限))あるいは温度条件の変化に対して、カビ臭原因物質産生濃度の変化を確認した。また、2-MIB 産生能が株間で異なる要因を解明することを目的として 2-MIB 合成酵素遺伝子の発現解析を行った。

供試藍藻類に対して、温度影響および光強度影響を解析するために、1) 光強度を 30.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ に固定して、培養温度を、10°C、20°C、30°C とした実験系と 2) 培養温度を 20°C に固定して、光強度を 10.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、30.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、60.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とした実験系を構築した。また、霞ヶ浦の環境水試料を用いて、共存微生物群集の供試藍藻類の増殖とカビ臭物質産生への影響を解析した。

日本国内の 4 つのダム湖を対象として、栄養塩データ、水文データ、アメダスの気象データ、再解析データ、アメダス解析雨量(RAP)のデータを説明変数、対象藻類の濃度を目的変数とし、関連度自動決定(automatic relevance determination: ARD)により対象藻類の濃度に関連のある要因の特定を行った。

②障害生物発生時における分析方法の開発と効率的な浄水処理システムの提案

生ぐさ臭原因物質の 14 種類の候補構造について量子化学計算に基づいた絞り込みを試みた。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検討した。

下水処理水後の放流水により溶存有機物(DOM)の構成の変化を模擬し、環境水における季節変動が精密質量分析を用いた異常検知に与える影響についての確認を行った。

粉末活性炭による 2-MIB の効率的除去に向けて、オゾン-活性炭処理を導入している浄水場の原水並びに各処理工程水を用いて、前段処理による粉末活性炭処理への吸着競合影響の低減について検討を行った。

③気候変動により生じる生物障害等リスクに対する対応策

豪雨等による水道原水の濁度上昇が発生した

水道事業体における対応策等について情報収集を行い、水源河川と水道原水の濁度の関係について相関を解析した上で、河川水位の長期間の変化の状況と気候変動の関係について考察した。

水安全計画の運用に関連する WHO のガイド「A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans」について翻訳した。

C. 研究結果および D. 考察

①気候変動条件下における障害生物発生ポテンシャル評価と将来発生予測モデルの構築

単離株ならびに水源試料に対して定量 PCR を適用した結果、非特異的増幅はなく、構築した定量 PCR を適用することで、カビ臭原因物質産生藍藻類として代表的な 5 属を簡易同定及びその遺伝子量を定量できることが示された。続いて、開発した定量 PCR 系を用いて 3 水源において定期モニタリングを行い、カビ臭原因物質濃度と本研究で対象とした 5 属のカビ臭原因物質産生藍藻類の遺伝子量を評価した。その結果、数 ng/L からカビ臭原因物質産生藻類に関連する合成酵素遺伝子を定量可能であり、優占種が変遷した場合や同時に異なるカビ臭原因物質が発生した場合においても原因種の同定ならびに遺伝子量の把握が可能であった。

分子系統によってカビ臭原因物質の産生能、株間での窒素源に対する応答が異なり、さらに温度によって増殖やカビ臭原因物質産生特性が大きく異なることが示された。2-MIB 合成酵素遺伝子の発現量解析において経時的な変化について検討を行い、株間での 2-MIB 産生量の違いを発現量によって説明できる可能性が示唆された。

カビ臭物質産生藍藻類の同属・同種で、異なる株の場合、環境因子への応答は異なるものとなり、増殖に対しては、水温影響の方が異なる結果を与えやすいことを明らかにした。また、微生物群集がカビ臭物質産生藍藻類の一部の増殖に好影響を与えていることを明らかになった。

欧州中期予報センターが提供する ERA5 (The fifth generation of European reanalysis) 及び RAP データがアメダスの気象データの最高気温及び降水量データより藻類の濃度に関連のある変数として特定された。

②障害生物発生時における分析方法の開発と効率的な浄水処理システムの提案

量子化学計算を用いて生ぐさ臭原因物質の構造を検討した結果、候補構造を 14 種類から 4 種類まで絞り込める可能性が示された。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で取得したマススペクトルから、原因物質を自動検出するための条件を確立した。

精密質量分析を用いた水道原水における分析は、環境水の季節変動による差異を検出するが、水道原水に異常が発生した場合にその季節変動に関わらず異常の検知に有用であることが示された。そして、精密質量分析を用いた DOM の動向の異常検知手法を検討する際に、異常発生時の検知手

法のみにも努めるのではなく、平常時にそれらの物質がどの程度の濃度で存在するかについての知見を蓄積することが重要であると考えられる。

粉末活性炭処理による 2-MIB 除去に対する水中有機物の吸着競合について、高分子有機物を除去可能な凝集沈澱、急速ろ過処理では粉末活性炭処理による 2-MIB 除去率は改善できない一方で、有機物を分解、親水化可能なオゾン処理は、2-MIB 除去改善に有効であったが、前段に高分子有機物を除去可能な処理と組み合わせる必要があることを指摘した。また活性炭処理では、2-MIB 除去の改善効果は活性炭自体が持つ吸着効果であると考えられた。

③気候変動により生じる生物障害等リスクに対する対応策

豪雨等による水道原水の濁度上昇が発生した水道事業体における対応策等について聴取したところ、経験的に水源河川の水位を観察し原水濁度の管理に役立っているとの情報を得た。最近頻発している豪雨時のデータを解析したところ、時期に関係なく水位により原水濁度が予測できるとは言えないものの、各豪雨時には水位および濁度は連続的に変化することから、豪雨・出水時に濁度とともに水位を連続監視することは濁度管理を行う上で有効と考えられた。また、降雨強度および河川水位の長期的変化を解析したところ、水位については、影響を与える要因として、ダム等の建設・運用状況等も考えられ、それらの施設の気候変動適応策としての可能性も示唆された。

「A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans」を分担で翻訳を行い、「水安全計画の監査に関する実践ガイド」として出版した。同ガイドは国立保健医療科学院のサイト上で公表し、また、WHO の原本のサイト上でも公表された。

E. 結論

①気候変動条件下における障害生物発生ポテンシャル評価と将来発生予測モデルの構築

水道水源におけるカビ臭産生藍藻類として代表的な 5 属について、構築した定量 PCR 系で同定・定量可能であること示した。また、モニタリング試験に適用した結果、カビ臭産生藍藻類の監視に対して本手法が有用であることを示した。

分子系統によってカビ臭物質の産生能が異なったり、株間で窒素源に対する応答が異なったり、温度によってカビ臭産生量が大きく異なることから、単離株の増殖やカビ臭産生特性に関するデータの蓄積は極めて重要であり、そういった特性を踏まえて、発生予測モデルの構築を行っていく必要性が示唆された。

カビ臭物質産生藍藻類の同属・同種で、異なる株の場合、環境因子への応答は異なるものとなることから、水源では、同属・同種でも多くの異なる株によって微生物群集を形成していることが考えられるため、既往研究における分離株を用いた知見を加えることが、カビ臭発生予測法へとつなげる上で重要であると考えられた。また、微生物群集がカビ臭物質産生藍藻類

の一部の増殖に好影響を与えていることを明らかになったことで、藍藻類の増殖に好影響を与える微生物群集構造や指標微生物の特定により、カビ臭発生を予測できる環境マーカーの創出につながることを期待できると考えられた。

日本国内の4つのダム湖を対象とし、再解析データ(ERA5、DSJRA55)、レーダー・アメダス解析雨量(RAP)データの活用可能性をARDにより検討した結果、ERA5及びRAPデータが藻類の濃度に関連のある変数として特定された。今後は地表面温度等の衛星データの活用可能性の探索及び藻類異常発生予測モデルの構築を行う予定である。

②障害生物発生時における分析方法の開発と効率的な浄水処理システムの提案

量子化学計算を用いて生ぐさ臭原因物質の構造を検討した結果、候補構造を14種類から4種類まで絞り込める可能性が示された。ただし、最終的な結論を得るためには、高い計算レベルでの全経路探索計算の終了を待つ必要があるといえる。また、GC-MSを用いて生ぐさ臭原因物質を自動検出するための条件を確立した。

DOMの精密質量スペクトルの差異解析より、季節変動は精密質量分析を用いることで観測されるが、異常が起こった際にそれらの変動の影響は、特異的なシグナルに注目することで、十分に回避可能と考えられた。

粉末活性炭による2-MIB除去を改善するためには、前処理として低分子有機物を除去可能な吸着処理あるいは、低分子有機物を高分子化する処理が有効であると考えられた。将来的に2-MIB除去を改善するためには、上述した対策については、活性炭処理の併用や低分子有機物に対応する吸着剤、凝集剤の開発などの技術開発が重要となると考えられた。

③気候変動により生じる生物障害等リスクに対する対応策

豪雨等による水道原水の濁度上昇が発生した水道事業者における対応策等について、経験的に水源河川の水位を観察し原水濁度の管理に役立っているとの情報を得た。データに基づき相関解析を行った上で、河川水位の長期間の変化の状況と気候変動の関係について考察した結果、水道の原水濁度と水源の水位に比較的高い相関があることが示され、豪雨時に水道において原水濁度の監視とともに、水源河川の水位を注視することが有効であることが示された。また、降雨強度および河川水位の長期的変化を解析したところ、降雨強度は増加傾向にあり気候変動との関係が考えられたが、河川水位については河川により傾向が異なり河川施設等種々の要因の関与が示唆された。

WHO/IWAによる水安全計画の見直し、改善に関連した手引き「A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans」を翻訳し、「水安全計画の監査に関する実践ガイド」を出版した。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shen Q, Wang Q, Miao H, Shimada M, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M, Shimizu K. Temperature affects growth, geosmin/2-methylisoborneol production, and gene expression in two cyanobacterial species. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021. (Published Online)

矢野留実子, 平健司, 浅田安廣, 藤本尚志, 秋葉道宏. かび臭産生糸状藍藻類の遺伝子学的試験法の検討. *水道協会雑誌*; 91(3), 2-12, 2022.

2. 学会発表

新福優太, 山下優輝, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏. LC/HRMS および GC/HRMS の組み合わせによる水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定. 第69回質量分析総合討論会; 2021年5月; オンライン開催.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏. 水道水生ぐさ臭原因物質を自動検出するためのマススペクトルと保持指標の取得. 環境科学会2021年会; 2021年9月; オンライン開催.

藤本尚志, 倉持綾希子, 浅田安廣, 秋葉道宏. 水道水源等から単離した *Pseudanabaena* 属の分子系統およびカビ臭産生能. 日本水処理生物学会第57回(神奈川)大会; 2021年10月; 神奈川(オンライン開催).

Miao H, Shen Q, Zhang J, Asada Y, Utsumi M, Lei Z, Takanashi H, Fujimoto N, Akiba M, Tian Y, Zhang Z, Shimizu K. A rapid method for the monitor of geosmin-producing *Dolichospermum* sp. based on whole-cell PCR. 日本水処理生物学会第57回大会; 2021年10月; 神奈川(オンライン開催).

Zhang J, Shen Q, Miao H, Asada Y, Utsumi M, Lei Z, Takanashi H, Shimada M, Fujimoto N, Akiba M, Tian Y, Zhang Z, Shimizu K. Elucidation of 2-MIB production mechanism under different temperature. 日本水処理生物学会第57回大会; 2021年10月; 神奈川(オンライン開催).

Kazuya Shimizu. Production of musty odor by Cyanobacteria and Actinomycetes. The International of Workshop of "Three Water Overall Planning as a whole, comprehensively protect and restore the aquatic ecological environment"; Nanjin China; December 2021; Oral presentation (Online).

三好太郎, 早坂俊一, 浅田安廣, 秋葉道宏. 2-メチルイソボルネオール除去への粉末活性炭混合注入方式の適用性評価. 令和3年度日本水道協会全国会議; 2022年2月; オンライン(配信). 令和3年度全国会議(水道研究発表会). 仲門拓磨, 浅田安廣, 三好太郎, 秋葉道宏, 増田貴則. 粉末活性炭処理による2-MIB除去に対

する藻類由来有機物が及ぼす影響. 第 56 回日本水環境学会年会; 2022 年 3 月; 富山 (オンライン開催).

松本恭太, 浅田安廣, 藤本尚志, 江崎敦, 秋葉道宏. 定量 PCR 法によるカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定及び定量解析. 第 56 回日本水環境学会年会; 2022 年 3 月; 富山 (オンライン開催).

武内祐, 藤本尚志, 大西章博, 清水和哉, 浅田安廣, 秋葉道宏. 付着性藍藻類 *Microcoleus* 属の 2-MIB 産生能および合成酵素遺伝子の発現解析. 第 56 回日本水環境学会年会; 2022 年 3 月; 富山 (オンライン開催).

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏. 量子化学計算による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定. ; 2022 年 3 月; 富山 (オンライン開催).

3. 図書

小坂浩司, 越後信哉, 島崎大 (訳). 水安全計画の監査に関する実践ガイド (A Practical

Guide to Auditing Water Safety Plans). 国立保健医療科学院, 2021.

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

新福優太, ベストプレゼンテーション賞-ポスター発表部門, LC/HRMS および GC/HRMS の組み合わせによる水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 一般社団法人日本質量分析学会, 2021 年 5 月.

山下優輝, 第 56 回日本水環境学会年会優秀発表賞 (クリタ賞), 量子化学計算による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 公益社団法人日本水環境学会, 2022 年 3 月.

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価と
その適応性の強化に向けた研究

令和3年度 分担研究報告書

令和4（2022）年 3月

水道水源で発生したカビ臭原因物質藍藻類の
簡易同定・定量法の構築

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)
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
分担研究報告書

研究課題：水道水源で発生したカビ臭原因物質藍藻類の簡易同定・定量法の構築

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 主任研究官
研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学 応用生物学部 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・定量法の開発を目的とし、定量 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・定量を試みた。

本研究では単藻株 27 株、NIES 株 39 株、分譲株 19 株、水源 53 試料から抽出した DNA 試料を用いてジェオスミン産生株である *Dlichospermum* 属、*Aphanizomenon* 属、2-MIB 産生株である *Pseudanabaena* 属、*Planktothricoides* 属、*Microcoleus* 属に特異的な定量 PCR 系を検討した。結果としては、5 属については非特異的な検出がなく、構築した定量 PCR を適用することで、カビ臭原因物質産生藍藻類として代表的な 5 属を簡易同定及びその遺伝子量を定量できることが示された。

続いて、2021 年 6 月から 11 月までの半年間において、3 水源にて毎週モニタリングを実施した。数 ng/L からカビ臭原因物質産生藻類に関連する合成酵素遺伝子を定量することが可能であり、優占種が変遷した場合や同時に異なるカビ臭原因物質が発生した場合においても原因種の同定ならびに遺伝子量の把握が可能であった。そのため、本研究で構築した PCR 系の有用性が示され、増殖特性や採水頻度等を考慮することで早期にカビ臭原因物質産生種の同定・定量できる可能性が示された。

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ており、その監視・制御が求められている。

カビ臭原因物質であるジェオスミンと 2-MIB (2-メチルイソボルネオール) 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株と非産生株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、産生株の判断を補助するツールが必要となる。

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

よる検出において、水源でジェオスミンが上昇する際にターゲット遺伝子が検出する結果を示している²⁾。このように形態学的判定が困難な場合においても遺伝子検出を応用することにより、カビ臭原因物質産生種の発生状況を早期に捉えることができる可能性がある。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³⁾のが現状である。さらに、定量可能な PCR 系を構築できた場合、増殖予測等に利用できる可能性も考えられる。

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・定量法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. カビ臭原因物質合成酵素遺伝子配列情報の取得

藍藻類を単離培養した試料 5 mL 及び水源試料 100 mL を、それぞれ孔径 0.8 μm 及び 0.22 μm のメンブレンフィルターで吸引ろ過し、藻体を捕

捉し、-20°Cにて冷凍保存した。それぞれ DNeasy Power Soil Kit、DNeasy Power Water Kit(QIAGEN 株式会社)を用いて DNA 抽出を行った。DNA 抽出試料を PCR にて対象領域(2-MIB 合成酵素遺伝子及び *geoA* 遺伝子)⁴⁾の増幅を行い、得られた PCR 精製試料についてユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼して DNA 配列情報を取得した。

2. 定量 PCR 系の構築

取得した配列情報とアメリカ国立生物工学情報センター(NCBI)に登録された配列情報について MEGAX(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)を用いて比較し、カビ臭原因藍藻類として下記に示す代表的な 5 属について同定・定量可能なプライマー対を設計した。その後、属ごとにアニーリング温度やプライマー濃度を調整することで、適切な反応系を決定した。なお、検量線用試料は対象領域の PCR 増幅産物より作製した。

ア 2-MIB 合成酵素遺伝子

① *Microcoleus* 属(旧:*Phormidium* 属)、② *Pseudanabaena* 属(旧:*Oscillatoria* 属、*Phormidium* 属)、③ *Planktothricoides* 属(旧:*Oscillatoria* 属)

イ *geoA* 遺伝子

④ *Dolichospermum* 属(旧:*Anabaena* 属)、⑤ *Aphanizomenon* 属

3. 開発した定量 PCR の有用性評価

保有している培養株(カビ臭が発生した水源からの単離培養株 27 株、水道事業体保有株 19 株、国立環境研究所微生物系統保存施設保有株 39 株)及び水源試料(53 試料)の DNA 試料に対し、本研究で構築した定量 PCR を適用した。

続いて、2021 年 6 月から 11 月までの半年間において、毎週モニタリングを実施した。対象水源は①A 湖、②B ダム、③C 湖とした。測定項目は定量 PCR による遺伝子量、固相マイクロ抽出(SPME)-GC/MS によるカビ臭原因物質濃度、顕微鏡観察による生物数、pH、電気伝導率、色度、濁度とした。DNA 試料は水源試料 100 mL を孔径 0.22 µm メンブレンフィルターで吸引ろ過し、藻体を捕捉し、-20°Cにて冷凍保存した後、DNeasy PowerWater Kit(QIAGEN) (6 月まで)、DNeasy PowerSoil Pro Kit(QIAGEN) (7 月以降)により抽出した。なお、DNA 抽出キットの変更は、濁質による抽出効率への影響を考慮し実施した。

C. 研究結果および D. 考察

単離株に対して定量 PCR を適用した結果、非特異的増幅はなく、各プライマー対で判定可能な属と同じ種であるカビ臭原因藍藻類のみを選択的に検出することができた(図 1)。よって、本研究で

構築した定量 PCR を適用することで、カビ臭原因物質産生藍藻類として代表的な 5 属を簡易同定及びその遺伝子量を定量できることが示された。

さらに原水から抽出した DNA 試料に対して本手法を適用した結果、カビ臭が発生した原水試料とそこから単離培養した株と遺伝子の増幅結果が一致したことから、原水試料から直接 DNA 試料を抽出して本研究で構築した定量 PCR 系を適用することで迅速な同定・定量が同時に可能となったといえる。

続いて、開発した定量 PCR 系を用いて 3 水源において定期モニタリングを行い、カビ臭原因物質濃度と本研究で対象とした 5 属のカビ臭原因物質産生藍藻類の遺伝子量を評価した。A 湖では *Dolichospermum* 属に関連する *geoA* 遺伝子のみが特異的に検出され、ジェオスミン濃度の変動と傾向が一致したことから原因種と同定した(図 2)。また、ジェオスミン濃度 2 ng/L 程度で遺伝子が検出されており、増殖期にはカビ臭原因物質濃度の上昇より先行して遺伝子量が増加する傾向が確認された。C 湖では 6 月と 8 月に 2-MIB 濃度が増加した期間があり、6 月は *Pseudanabaena* 属、8 月は *Planktothricoides* 属に関連する 2-MIB 合成酵素遺伝子が検出されたことから、本手法により 2-MIB 産生藍藻類の優占種の変遷が把握可能であることを示した(図 2)。B ダムにおいても 5 ng/L 程度から遺伝子が検出できた。また、ジェオスミンと 2-MIB が同時に発生した時期にはジェオスミンは *Dolichospermum* 属、2-MIB は *Planktothricoides* 属に関連する合成酵素遺伝子量の変化を同時に確認できた。

E. 結論

水道水源におけるカビ臭産生藍藻類として代表的な 2-MIB 産生株(*Microcoleus* 属、*Pseudanabaena* 属、*Planktothricoides* 属)及びジェオスミン産生株(*Dolichospermum* 属、*Aphanizomenon* 属)の同定・定量手法を開発した。さらに実用化に向けて 3 水源の原水に適用した結果、数 ng/L からカビ臭原因物質産生藻類に関連する合成酵素遺伝子を定量可能であり、優占種が変遷した場合や同時に異なるカビ臭原因物質が発生した場合においても原因種の同定ならびに遺伝子量の把握が可能であった。また遺伝子量がカビ臭原因物質濃度の上昇前に増加が確認できた期間もあることから、増殖特性や採水頻度等を考慮することで本手法によりカビ臭原因藍藻類の増殖予測ができる可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

矢野留実子, 平健司, 浅田安廣, 藤本尚志, 秋葉道宏. かび臭発生糸状藍藻類の遺伝子学的試験法の検討. 水道協会雑誌; 91(3), 2-12, 2022.

2. 学会発表

松本恭太, 浅田安廣, 藤本尚志, 江崎敦, 秋葉道宏. 定量PCR法によるカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定及び定量解析. 第56回日本水環境学会年会; 2022年3月; 富山(オンライン開催).

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発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。

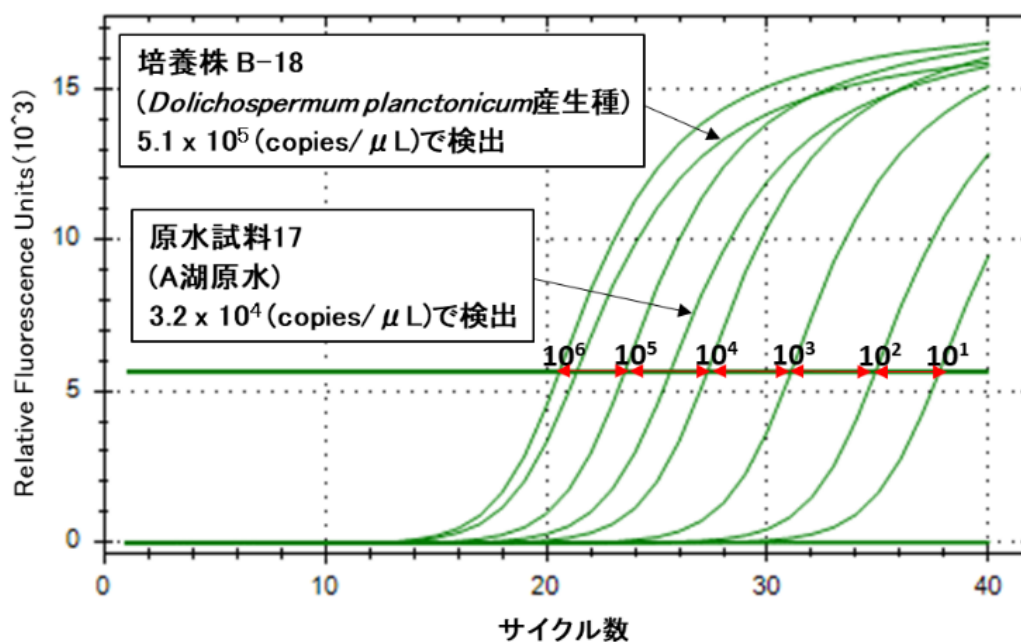


図1 定量PCR結果(例: *Dolichospermum* 属)

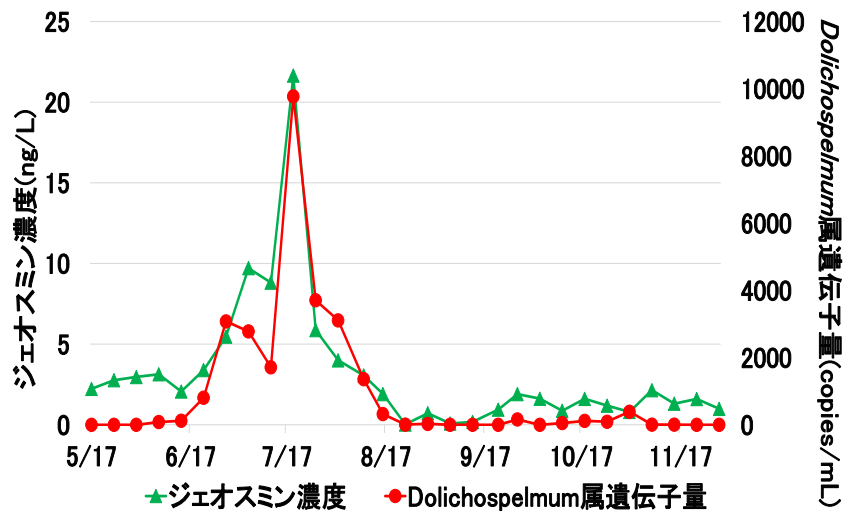


図 2 *geoA* 遺伝子 (*Dolichospermum* 属) のモニタリング結果 (相模湖)

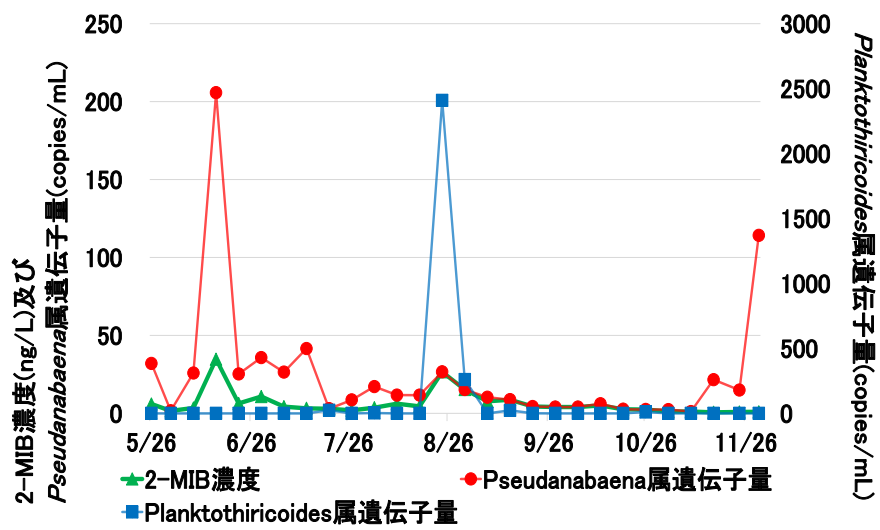


図 3 2-MIB 合成酵素遺伝子 (*Pseudanabaena* 属、*Planktothricoides* 属) のモニタリング結果 (C 湖)

気候変動条件下における障害生物発生ポテンシャル評価

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)
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
分担研究報告書

研究課題：気候変動条件下における障害生物発生ポテンシャル評価

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 主任研究官
研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学 応用生物科学部 教授
研究分担者 浅田 安廣 国立保健医療科学院 主任研究官
研究協力者 松本 恭太 国立保健医療科学院 研究生

研究要旨

水源流域における障害生物の発生ポテンシャルを評価することを目的として、複数のカビ臭原因物質産生藻類株を用いてカビ臭合成酵素遺伝子による系統の違いとカビ臭産生能、増殖、カビ臭産生に及ぼす窒素制限および温度の影響等について検討を行い、カビ臭原因物質産生藻類の増殖およびカビ臭産生に及ぼす気候変動により生じうる環境条件の影響について検討を行った。さらには付着性藍藻 *Microcoleus* 属の株間や増殖時期によるカビ臭産生能の違いのメカニズムを解明するため、カビ臭合成酵素遺伝子の発現解析を行った。その結果、水道水源から単離された *Pseudanabaena* 属は 2-MIB 合成酵素遺伝子で 3 つの系統に分けられ、系統によってカビ臭含有量が異なる傾向が見られた。*Dolichospermum* 属や *Aphanizomenon* 属といったネンジュモ目について窒素を制限した CT 培地、通常の CT 培地で培養し、細胞数とカビ臭濃度を測定したところ、株によって傾向が異なり、*D. minisporum* WILD-76 は窒素制限下のほうが増殖量、カビ臭濃度が高まること明らかとなった。さらに *D. minisporum* WILD-76 の窒素制限下における増殖、カビ臭産生に及ぼす温度の影響について検討したところ、最も温度が低い 20°C でカビ臭濃度、含有量が高まること明らかとなった。付着性藍藻類の *Microcoleus* 属を窒素を 1mg/L に制限した培地を用いて培養したところ、2-MIB 産生量は対数増殖期後期から定常期の最初の段階において最大となることが示唆された。同様に *geosmin* を産生する *Microcoleus* 属の WILD-69 株と B-19 株について窒素を制限した培地を用いて培養したところ、*geosmin* 産生能が異なることが示唆された。2-MIB 合成酵素遺伝子の発現量解析において、株間で経時的な変化について検討を行い、2-MIB 産生能の違いを発現量によって説明できる可能性が示唆された。分子系統によってカビ臭物質の産生能が異なったり、株間で窒素源に対する応答が異なったり、温度によって増殖やカビ臭産生特性が大きく異なることから、単離株の増殖やカビ臭産生特性に関するデータの蓄積は極めて重要であり、そういった特性を踏まえて、発生予測モデルの構築を行っていく必要性が示唆された。

A. 研究目的

近年、地球温暖化の影響と考えられる生物障害や水道原水水質悪化の報告例が目立つ。さらに気候変動による集中豪雨の頻度・規模の増加が確認されており、それら水害による水道事業への影響が生じている。将来的にも気候変動に伴う生物障害事例、集中豪雨・台風による水害頻度の増加等が予想されることから、その生じるリスクに対して適応可能な水道システムを考え、将来にわたって安全で安心な水供給を実現する必要がある。このような水道事業の背景を踏まえながら、気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスクへの適応性の強化に資する成果を得ることを最終的な目標とし、障害生物の発生メカニズムの把握や藻類発生予測システムを構築するための検討を行った。

水源流域における障害生物の発生については各種の気象環境条件が関与する複雑なものであるが、本研究では様々な角度から障害生物の発生ポテンシャルを評価する。具体的な研究内容として、複数のカビ臭原因物質産生藻類の単離株を用い

てカビ臭合成酵素遺伝子による系統の違いとカビ臭産生能、増殖、カビ臭産生に及ぼす窒素制限および温度の影響等について検討を行い、カビ臭原因物質産生藻類の増殖およびカビ臭産生に及ぼす気候変動により生じうる環境条件の影響を評価する上での基礎的な検討を行った。さらには付着性藍藻類の株間や増殖時期によるカビ臭産生能の違いのメカニズムを解明するため、カビ臭合成酵素遺伝子の発現解析を行った。

B. 研究方法

1. カビ臭原因物質産生藻類のカビ臭産生特性の評価

水道水源から単離された *Pseudanabaena subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11、*P. foetida* WILD-62、*P. cinerea* B-6、*Aphanizomenon gracile* WILD-9、*Dolichospermum minisporum* WILD-76、*D. circinale* WILD-45 を用いた。付着性藍藻として河川で単離された *Microcoleus autumnalis* WILD-52、*Microcoleus* sp. WILD-69、*Microcoleus* sp. B-19 を用いた。

Pseudanabaena 属は、200ml 容三角フラスコを用いて培養を行った。CT 培地もしくは窒素濃度を 1mg/L に制限した改変 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 50mm/ml となるように接種した。20°C で培養を行った。照度は 2000 lux (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。

A. gracile WILD-9、*D. minisporum* WILD-76 については 500ml 容三角フラスコに CT 培地もしくは窒素を除いた改変 CT 培地を 200ml 入れて、オートクレーブ滅菌後、初期接種量が *A. gracile* WILD-9 で 10mm/ml、*D. minisporum* WILD-76 および *D. circinale* WILD-45 で 25cells/ml となるように接種した。培養条件は *Pseudanabaena* 属と同様としたが、*D. minisporum* WILD-76 は 25、30°C でも培養を行った。

Microcoleus 属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 lux (12 時間明/12 時間暗) とした。温度条件は 20°C とした。*Microcoleus* 属は付着性があり、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 Shen ら¹⁾に従い Chl.a 量により評価した。

上述の各培養試料について SPME-GC/MS システム (Agilent 5977B GC/MSD, Agilent 及び Multiple Sampler MPS robotic^{pro}, Gerstel) を用いて、ジェオスミン・2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 濃度を測定した。

2. カビ臭合成酵素遺伝子の発現解析

これまで *Microcoleus* 属の単離株の 2-MIB 産生能について検討を行い、株間で 2-MIB 産生能が異なる傾向が見られた。そこで 2-MIB 産生能が異なる要因を解明することを目的として 2-MIB 合成酵素遺伝子の発現解析を行った。*M. autumnalis* WILD-53 および *M. autumnalis* WILD-54 を用いた。

1. と同様に培養を行い、クロロフィル a、2-MIB、発現解析を同時に行い評価した。14 日目、28 日目、42 日目と経時的に試料を採取し測定を行った。PrimerQuestTM Tool および Primer3Plus を用いて、*M. autumnalis* の 16S rRNA 遺伝子、2-MIB 産生に関わる *mtf* 遺伝子 (methyltransferase gene)、*mic* 遺伝子 (2-MIB cyclase gene) を特異的に増幅するプライマーを作成した。NucleoSpin[®] RNA (タカラバイオ) を使用し、培養試料から RNA を抽出した。その後 PrimeScriptTM RT reagent Kit (タカラバイオ) を用いて 10ng RNA/10 μ L のリアクションで RT-PCR を行い cDNA を合成した。その後 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II (タカラバイオ) を用いて説明書に従い qPCR を行った。

C. 研究結果および D. 考察

1) カビ臭原因物質産生藻類のカビ臭産生特性の評価

16S rRNA 遺伝子の系統樹において、*Pseudanabaena subfoetida* WILD-6 と *P. foetida* WILD-62 は同じ系統に位置付けられた。*P.*

limnetica WILD-11 と *P. cinerea* B-6 はそれぞれ異なる系統に位置付けられた。2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹において *P. subfoetida* WILD-6 と *P. cinerea* B-6 は同じ系統に位置付けられた (図 1)。*P. limnetica* WILD-11 と *P. foetida* WILD-62 はそれぞれ異なる系統に位置付けられた。今回用いた *Pseudanabaena* 属は 2-MIB 合成酵素遺伝子で 3 系統に分かれることが明らかとなった。CT 培地において *Pseudanabaena* 属 4 株を培養した結果 13 日以降、定常期となった (図 2)。2-MIB 総濃度は定常期を過ぎても増加傾向であった (図 3)。定常期における糸状体あたりの 2-MIB 含有量は *P. limnetica* WILD-11、*P. foetida* WILD-62 で高く、*P. subfoetida* WILD-6、*P. cinerea* B-6 で低い傾向であった (図 4)。定常期における 2-MIB 含有量について計算したところ、*P. subfoetida* WILD-6 0.0025ng/mm、*P. limnetica* WILD-11 0.0039ng/mm、*P. foetida* WILD-62 0.0043ng/mm、*P. cinerea* B-6 0.0027ng/mm となり、*P. subfoetida* WILD-6、*P. cinerea* B-6 に比べて *P. limnetica* WILD-11、*P. foetida* WILD-62 が約 1.5 倍高いことが明らかとなった。窒素を 1mg/L に制限した条件で検討を行ったところ、*P. subfoetida* WILD-6 は、12 日以降、*P. limnetica* WILD-11 は 8 日以降糸状体数の減少が見られた (図 5)。2-MIB 総濃度は *P. subfoetida* WILD-6 よりも *P. limnetica* WILD-11 のほうが高く推移し、通常の CT 培地と同様の傾向が見られた (図 6)。よって *P. subfoetida* WILD-6 よりも *P. limnetica* WILD-11 のほうが 2-MIB 産生能が高いことが示唆された。しかしながら、通常の CT 培地では総濃度や含有量が低いと判断された *P. cinerea* B-6 が *P. limnetica* WILD-11 と同じくらいに総濃度が高まり、窒素を制限した条件下でこれら 4 株の 2-MIB 産生能の大小関係について明らかにすることはできなかった。

Dolichospermum minisporum WILD-76 を 20°C の条件下、CT 培地、窒素を 0mg/L に制限した CT 培地にて培養したところ、窒素を制限した条件のほうが速やかに増殖することが明らかとなった (図 7)。geosmin 総濃度も窒素を制限した条件のほうが約 2 倍高まることが明らかとなった (図 8)。細胞当りの geosmin 含有量は通常の CT 培地で高い傾向が見られた (図 9)。窒素を制限した CT 培地のほうが良好な増殖を示したことから、この培地を用いて温度の影響について検討を行った。25°C、30°C で初期の増殖速度が大きく、最大増殖量は温度が低いほど高まることが明らかとなった (図 10)。geosmin 総濃度、含有量ともに 20°C において最も高く、温度が高まるにつれて低下することが明らかとなった (図 11、図 12)。*D. circinale* WILD-45 は *D. minisporum* WILD-76 と異なり、窒素を制限した CT 培地より、通常の CT 培地のほうが、増殖量および geosmin 総濃度が高まること明らかとなった (図 13、14)。*A. gracile* WILD-9 は *D. circinale* WILD-45 と同様に、窒素を制限した CT 培地より、通常の CT 培地のほうが、増殖量および geosmin 総濃度が高まること明らかとなった (図 15、16)。以上の結果から、ネンジュモ目の窒素源の有無における挙動は株によって異なることが明らかとなった。2-MIB 産生株であ

る *M. autumnalis* WILD-52 を窒素を 1mg/L に制限した CT 培地で培養したところ、増殖量は 14 日目以降ほぼ横ばいとなり、35 日には低下した(図 17)。その時の 2-MIB 総量は 14 日目に最大となり、その後低下しほぼ一定となった(図 18)。2-MIB 産生量は対数増殖期後期から定常期の最初の段階において最大となることが明らかとなった。これまでの通常の CT 培地を用いた検討では Chl. a 量、2-MIB 濃度が 1 ヶ月の培養期間にわたって増加し続ける傾向にあり、定常期や衰退期における 2-MIB 産生を評価することが困難であったが、窒素を制限することにより増殖過程における 2-MIB 産生特性を評価できると考えられた。geosmin を産生する *Microcoleus* sp. WILD-69 と *Microcoleus* sp. B-19 について窒素を 1mg/L に制限した CT 培地を用いて培養したところ、Chl. a に関しては同様の推移を示したが(図 19)、geosmin 総量は WILD-69 のほうが 14 日目、28 日目において高く(図 20)、単離株によって geosmin 産生能が異なることが示唆された。

2) カビ臭合成酵素遺伝子の発現解析

M. autumnalis WILD-53 および *M. autumnalis* WILD-54 の *mtf* 遺伝子の発現量に培養日数による有意な差はみられなかった(図 21、22)。*M. autumnalis* WILD-53 は *M. autumnalis* WILD-54 と比べて *mtf* 遺伝子の発現量が高いことが明らかとなった。*mic* 遺伝子の発現量についても培養日数による有意な差はみられなかった(図 23、24)。*mic* 遺伝子に関しても *M. autumnalis* WILD-53 のほうが *M. autumnalis* WILD-54 に比べて発現量が高いことが明らかとなった。培養期間を通して Chl. a あたりの 2-MIB 総量は、*M. autumnalis* WILD-53 のほうが大きい傾向が見られ、遺伝子発現量の違いが 2-MIB 産生に影響している可能性が示唆された。*Microcoleus* 属は単離した株間で 2-MIB 産生能が異なる傾向が見られるため、発現解析により説明できるかどうかデータを蓄積し検討するとともに、環境条件の違いが発現量にどのように影響するのか検討することにより、水道水源における付着性藍藻によるカビ臭の発生メカニズムについて明らかにしていく必要がある。

E. 結論

複数のカビ臭原因物質産生藻類の単離株を用いて分子系統の違いとカビ臭産生能、増殖、カビ臭産生に及ぼす窒素制限および温度の影響等について検討を行った。水道水源から単離された *Pseudanabaena* 属は 2-MIB 合成酵素遺伝子で 3 つの系統に分けられ、系統によってカビ臭含有量が異なる傾向が見られた。*Dolichospermum* 属や *Aphanizomenon* 属といったネンジュモ目について窒素源を加えない条件と通常の CT 培地で培養し、増殖とカビ臭濃度を測定したところ、株によって傾向が異なり、*D. minisporum* WILD-76 は窒素制限下のほうが増殖量、カビ臭濃度が高まることが明らかとなった。*D. minisporum* WILD-76 の窒素

制限下における増殖、カビ臭産生に及ぼす温度の影響について検討したところ、最も温度が低い 20°C でカビ臭濃度、含有量が高まることが明らかとなった。付着性藍藻類の *Microcoleus* 属を窒素制限下において培養したところ、2-MIB 産生量は対数増殖期後期から定常期の最初の段階において最大となることが示唆された。同様に geosmin を産生する *Microcoleus* sp. WILD-69 と *Microcoleus* sp. B-19 について窒素を 1mg/L に制限した培地を用いて培養したところ、geosmin 産生能が異なることが示唆された。2-MIB 合成酵素遺伝子の発現量解析において経時的な変化について検討を行い、株間での 2-MIB 産生量の違いを発現量によって説明できる可能性が示唆された。分子系統によってカビ臭物質の産生能が異なったり、株間で窒素源に対する応答が異なったり、温度によってカビ臭産生量が大きく異なることから、単離株の増殖やカビ臭産生特性に関するデータの蓄積は極めて重要であり、そういった特性を踏まえて、発生予測モデルの構築を行っていく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

藤本尚志, 倉持綾希子, 浅田安廣, 秋葉道宏. 水道水源等から単離した *Pseudanabaena* 属の分子系統およびカビ臭産生能. 日本水処理生物学会第 57 回(神奈川)大会; 2021 年 10 月; 神奈川(オンライン開催).

武内祐, 藤本尚志, 大西章博, 清水和哉, 浅田安廣, 秋葉道宏. 付着性藍藻類 *Microcoleus* 属の 2-MIB 産生能および合成酵素遺伝子の発現解析. 第 56 回日本水環境学会年会; 2022 年 3 月; 富山(オンライン開催).

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 (2021) Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of *Dolichospermum smithii*, Environ. Sci. Pollut. Res., 28, 177–184.

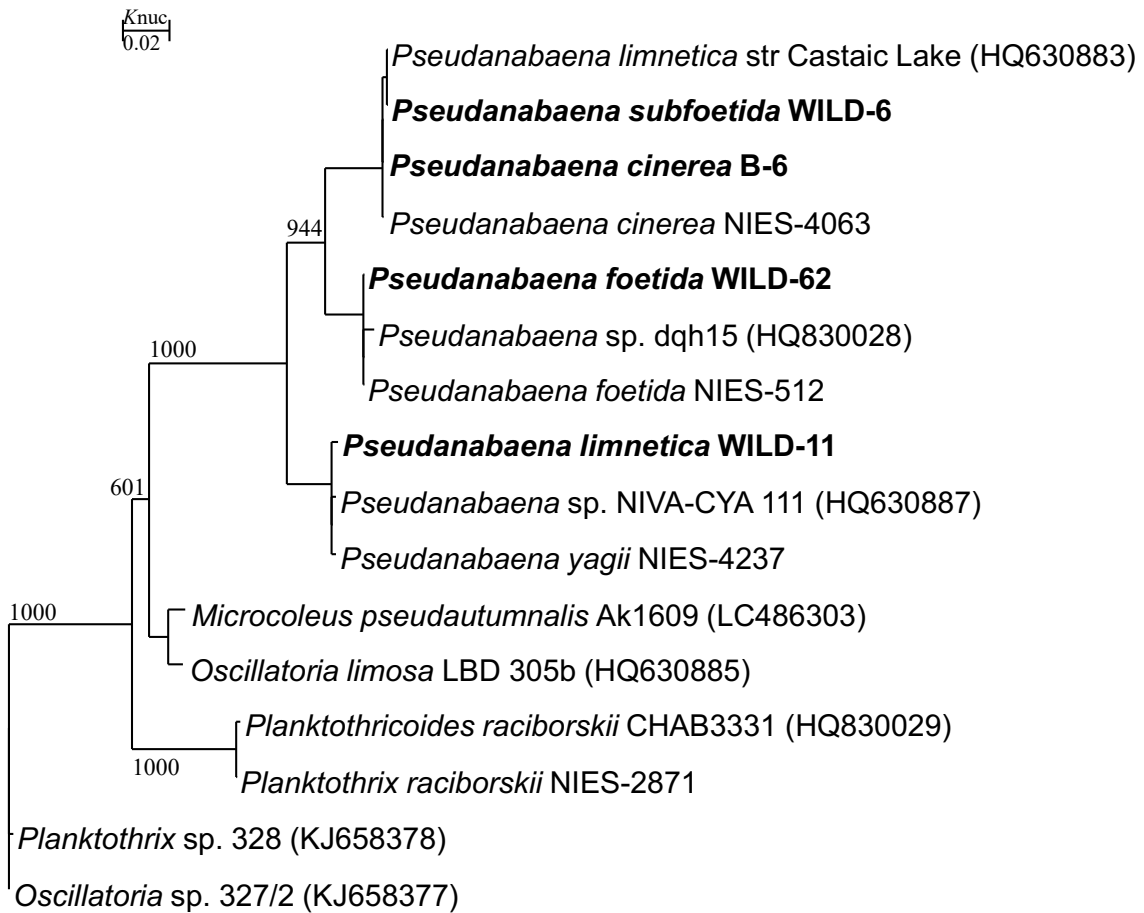


図1 2-MIB 合成酵素遺伝子に基づく系統樹
近隣結合法により 686 塩基に基づいて作成

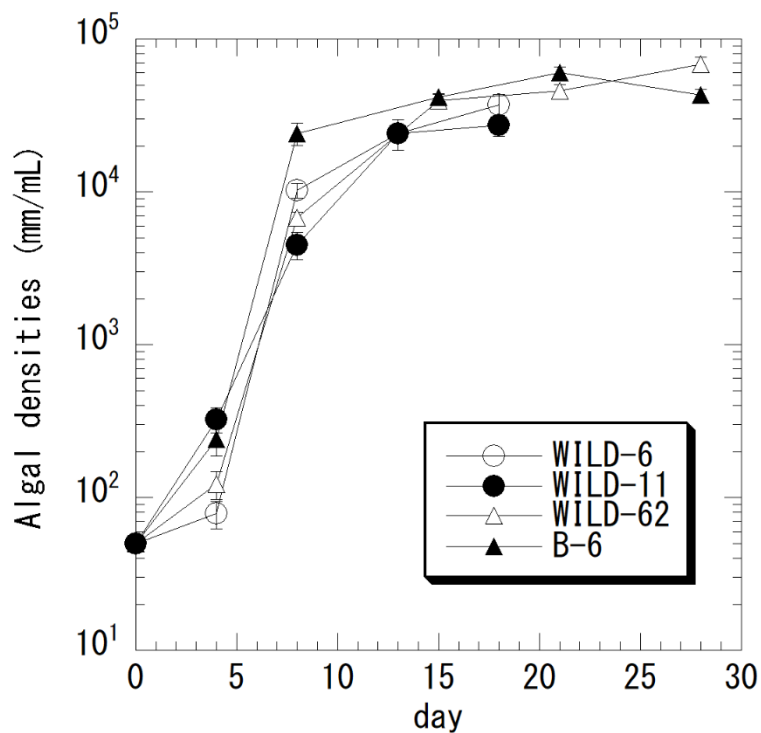


図2 *Pseudanabaena* 属 4 株の増殖曲線 (CT 培地)

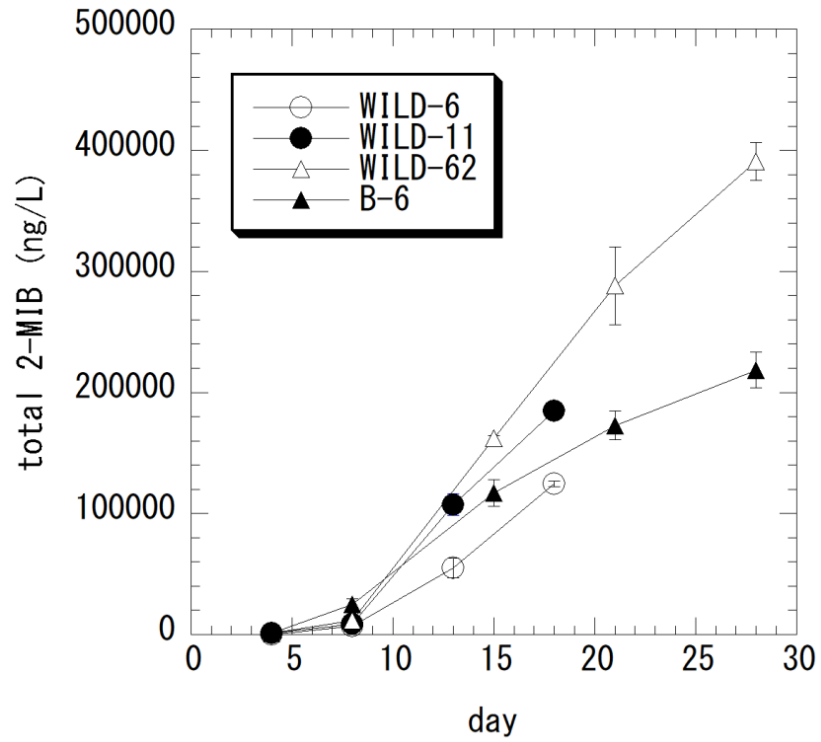


図3 *Pseudanabaena* 属4株の2-MIB総濃度の推移 (CT培地)

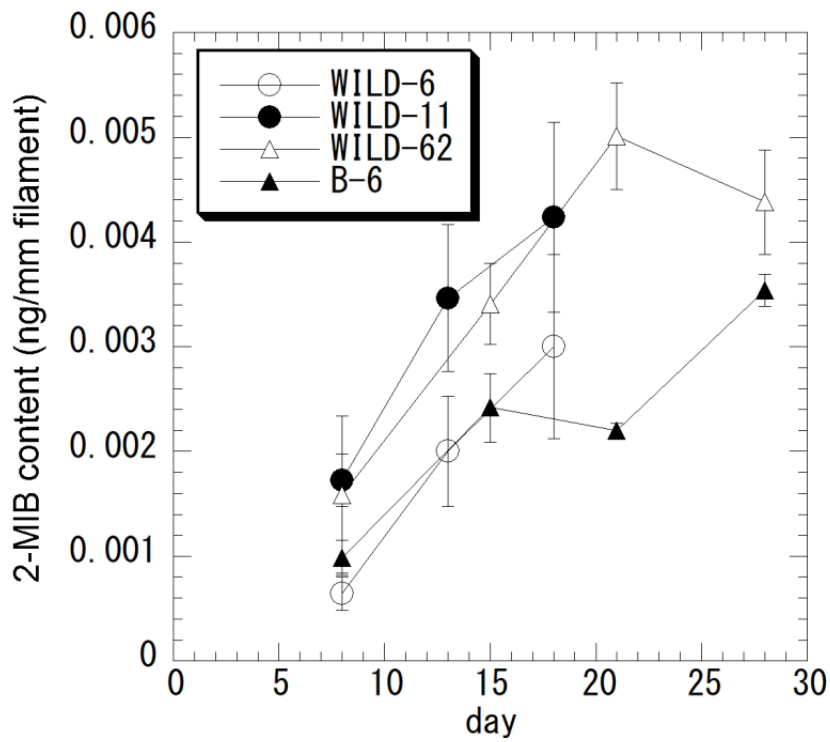


図4 *Pseudanabaena* 属4株の2-MIB含有量の推移 (CT培地)

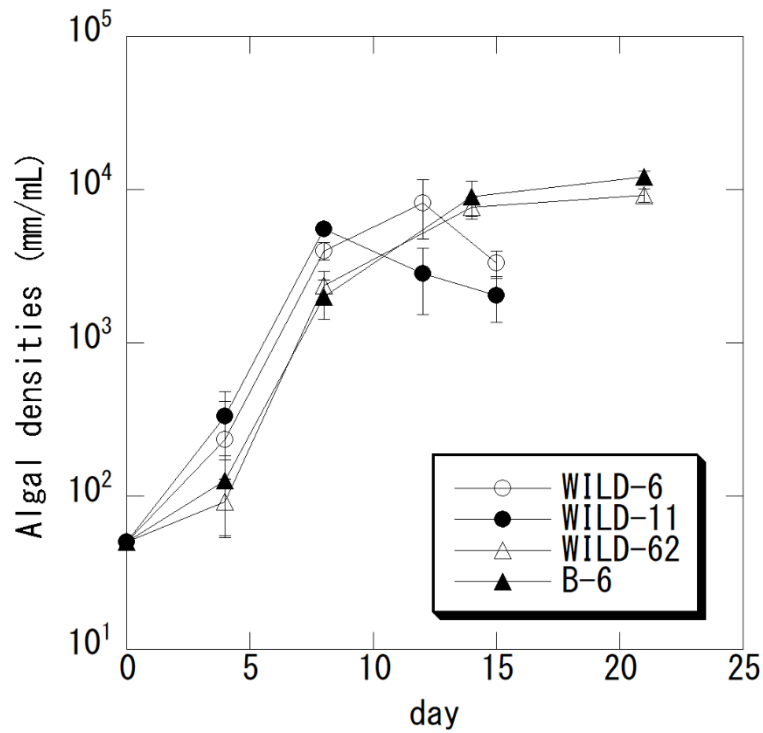


図5 窒素を制限した CT 培地における *Pseudanabaena* 属 4 株の増殖曲線

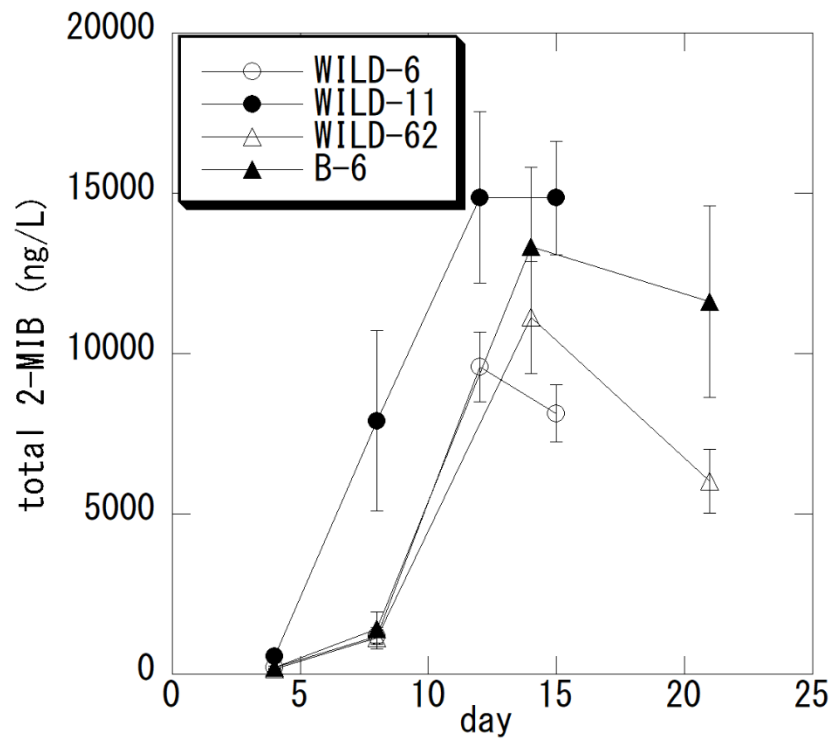


図6 窒素を制限した CT 培地における *Pseudanabaena* 属 4 株の 2-MIB 総量の推移

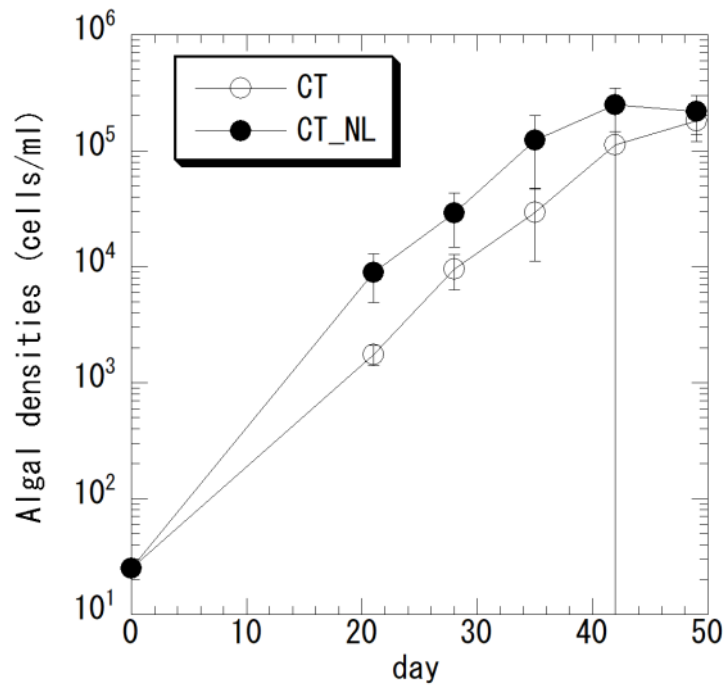


図7 CT 培地および窒素を制限した CT 培地における *D. minisporum* WILD-76 の増殖曲線
 CT_NL: 窒素 0mg/L

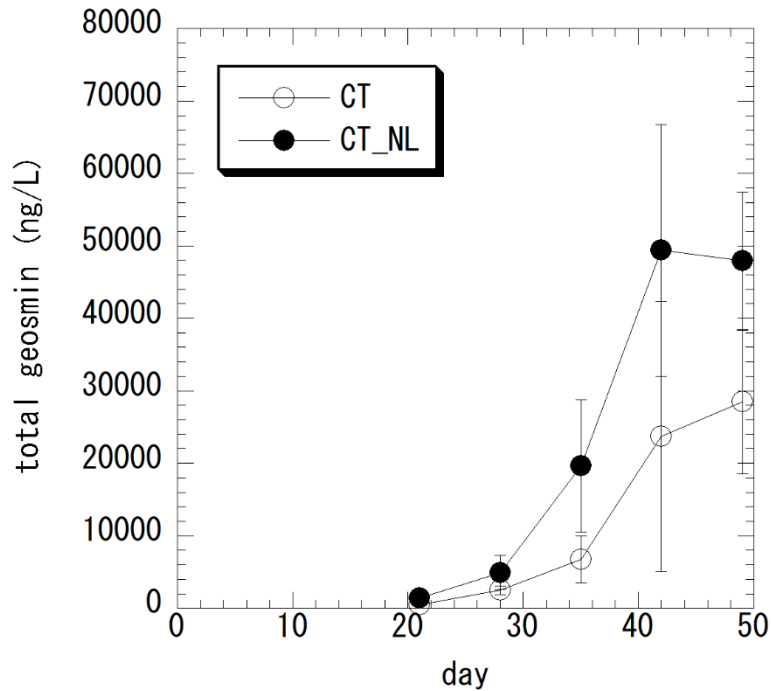


図8 *D. minisporum* WILD-76 の増殖における geosmin 総濃度の推移
 CT_NL: 窒素 0mg/L

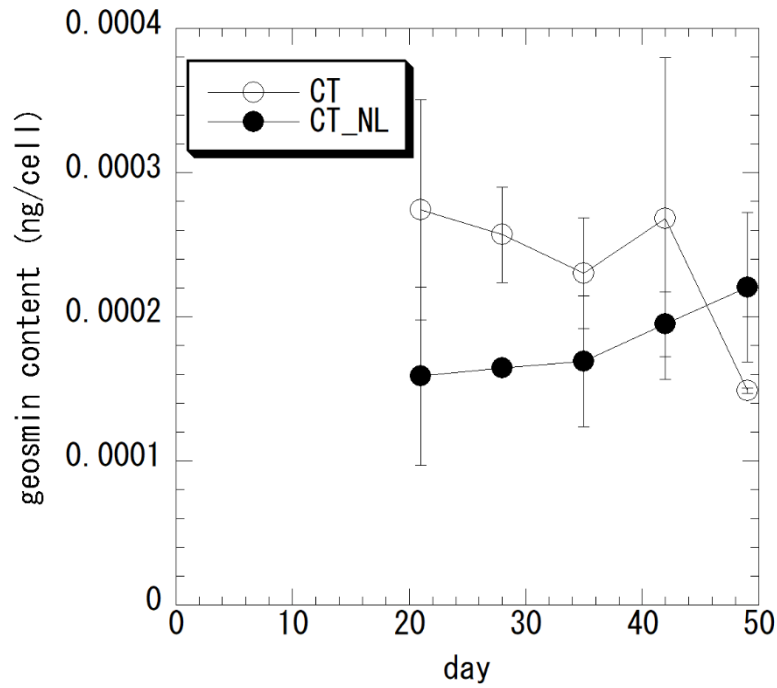


図9 *D. minisporum* WILD-76 の増殖における geosmin 含有量の推移
CT_NL: 窒素 0mg/L

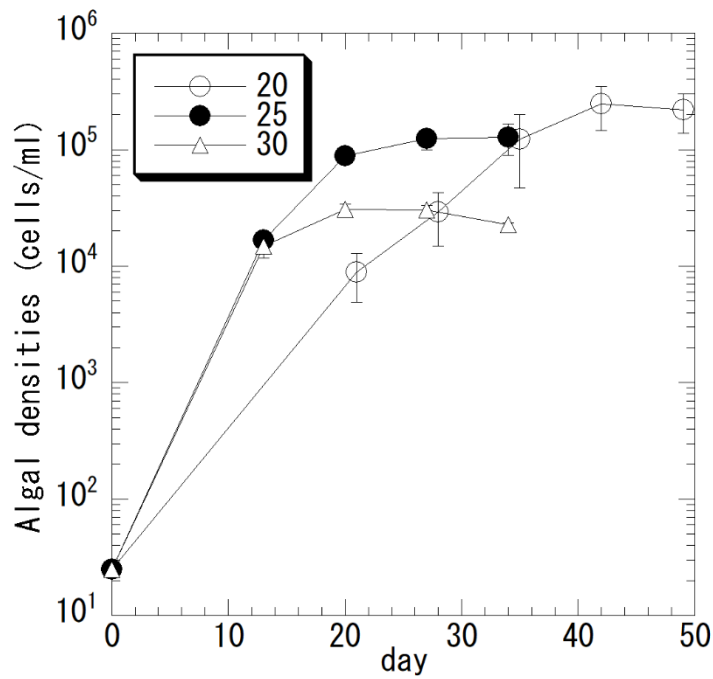


図10 *D. minisporum* WILD-76 の増殖に及ぼす温度の影響
(窒素を 0mg/L に制限した CT 培地)

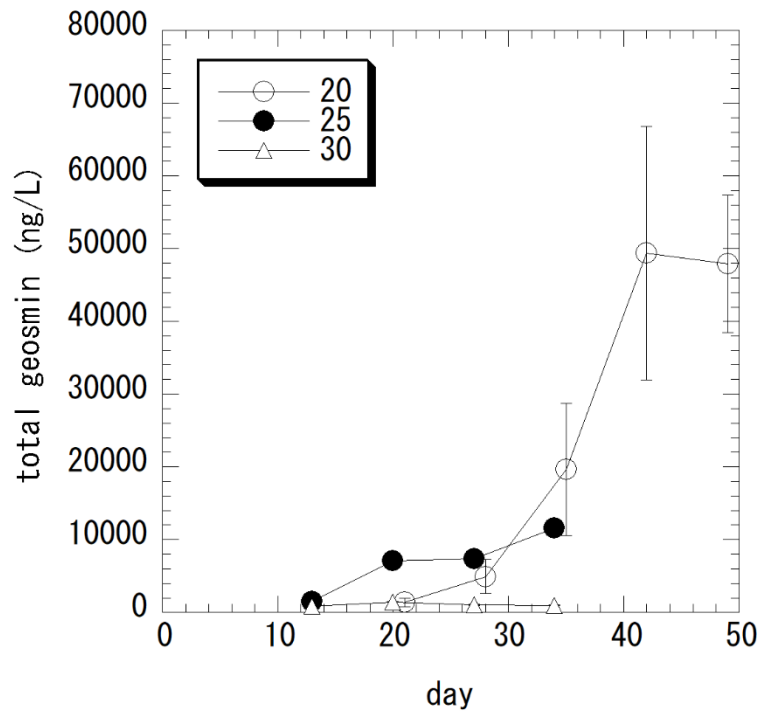


図 11 *D. minisporum* WILD-76 の各温度における geosmin 総濃度の推移 (窒素を 0mg/L に制限した CT 培地)

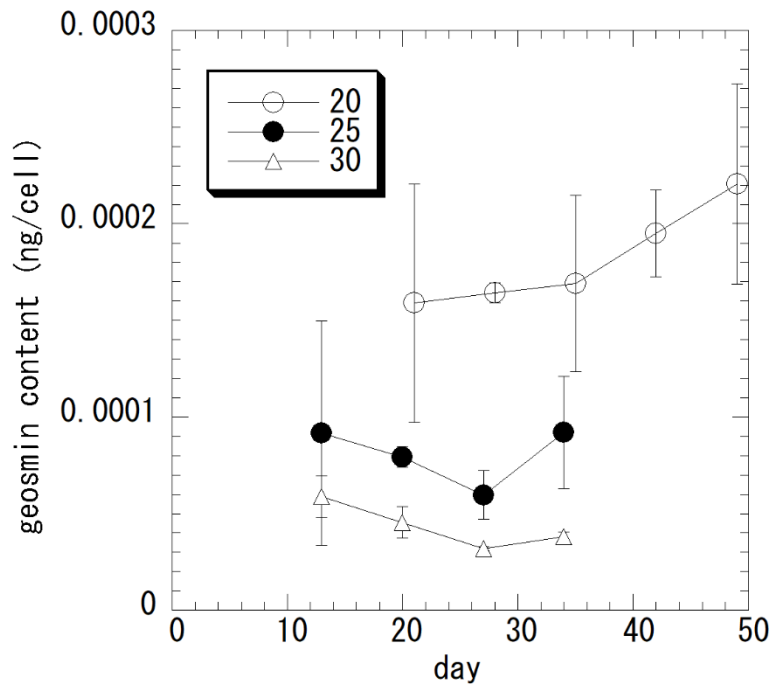


図 12 *D. minisporum* WILD-76 の各温度における geosmin 含有量の推移 (窒素を 0mg/L に制限した CT 培地)

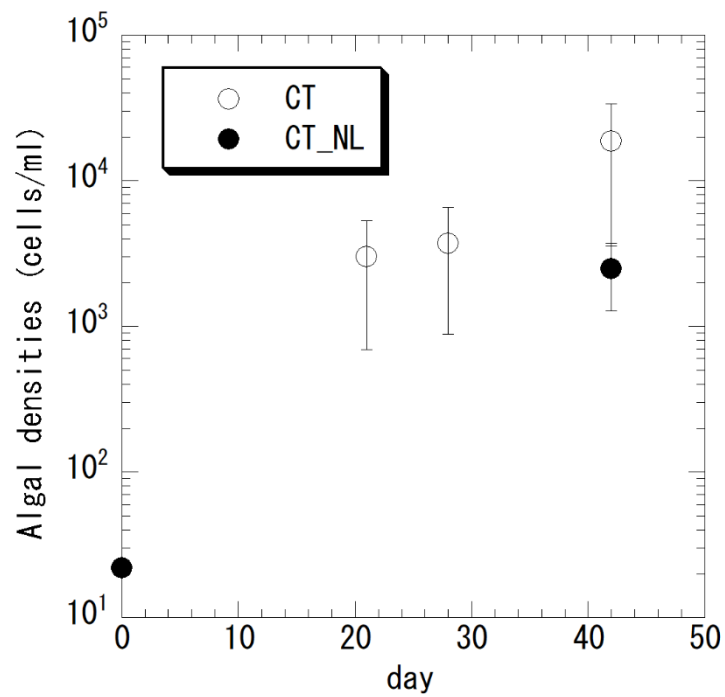


図 13 CT 培地および窒素を制限した CT 培地における *D. circinale* WILD-45 の増殖曲線
CT_NL: 窒素 0mg/L

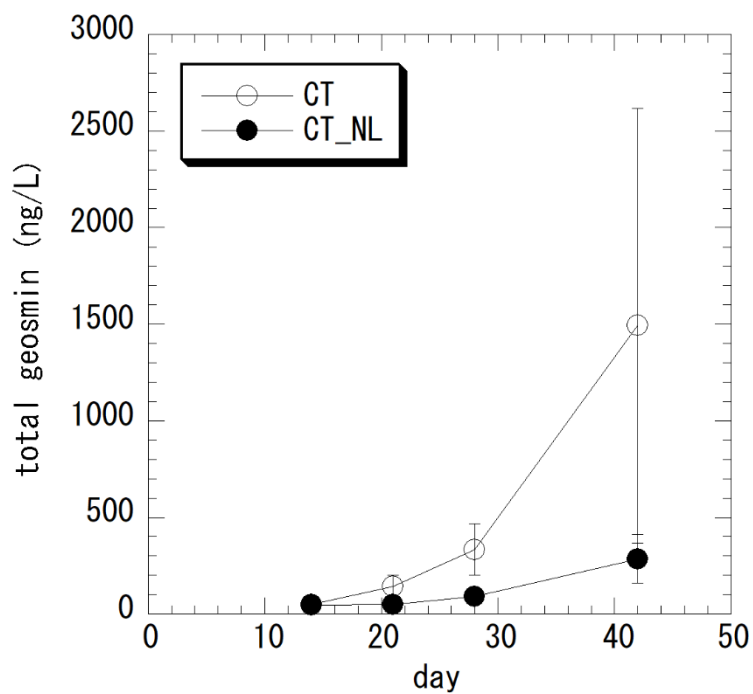


図 14 CT 培地および窒素を制限した CT 培地における *D. circinale* WILD-45 の
geosmin 総濃度の推移
CT_NL: 窒素 0mg/L

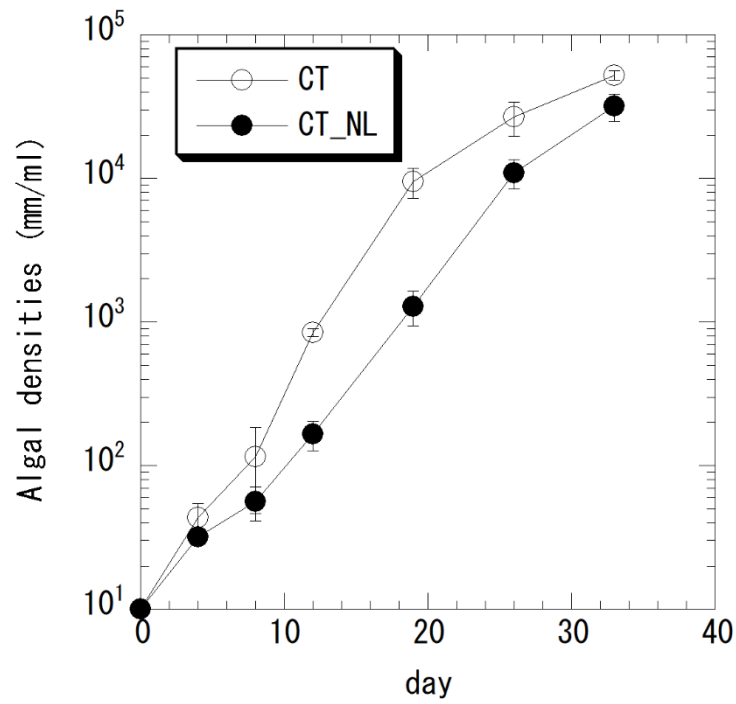


図 15 CT 培地および窒素を制限した CT 培地における *A. gracile* WILD-9 の増殖曲線
 CT_NL: 窒素 0mg/L

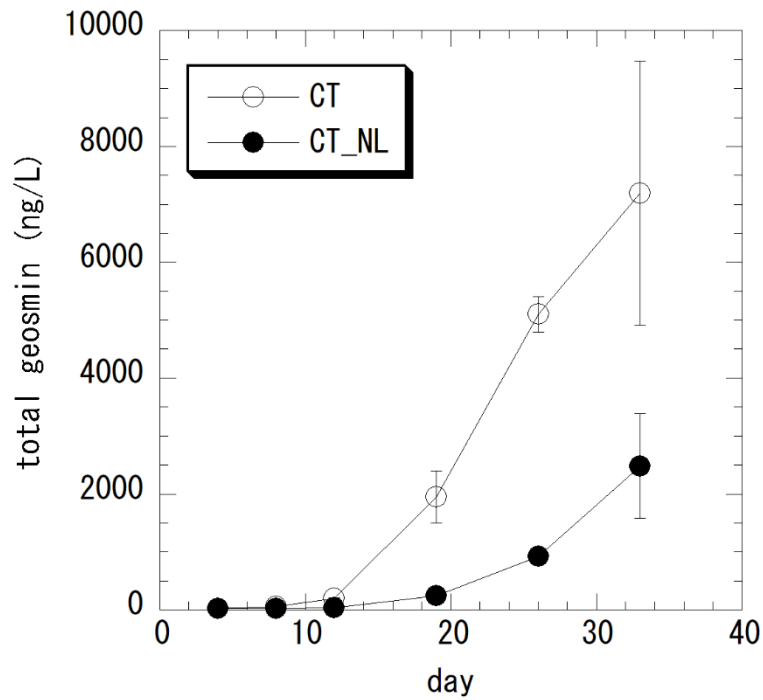


図 16 *A. gracile* WILD-9 の増殖における geosmin 総濃度の推移
 CT_NL: 窒素 0mg/L

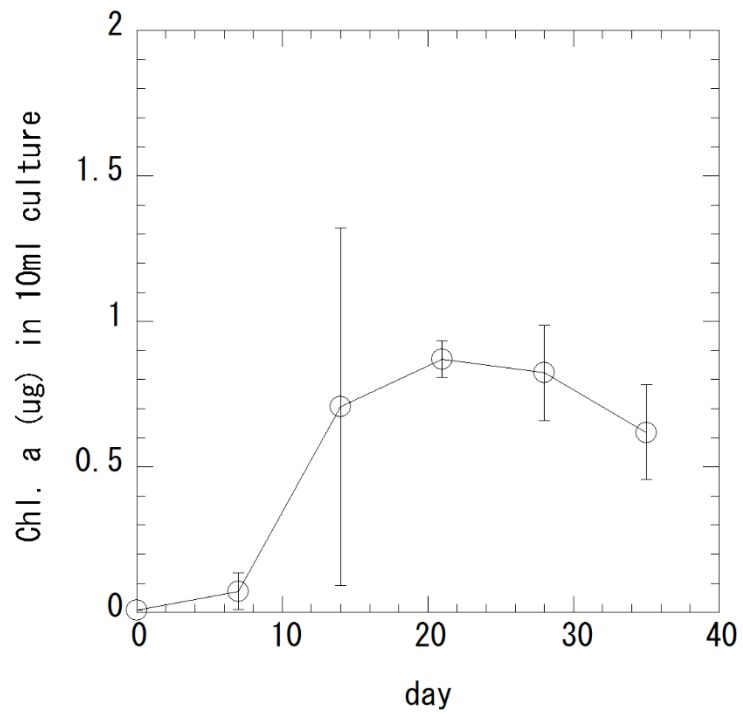


図 17 *M. autumnalis* WILD-52 の窒素を 1mg/L に制限した CT 培地における Chl. a の推移

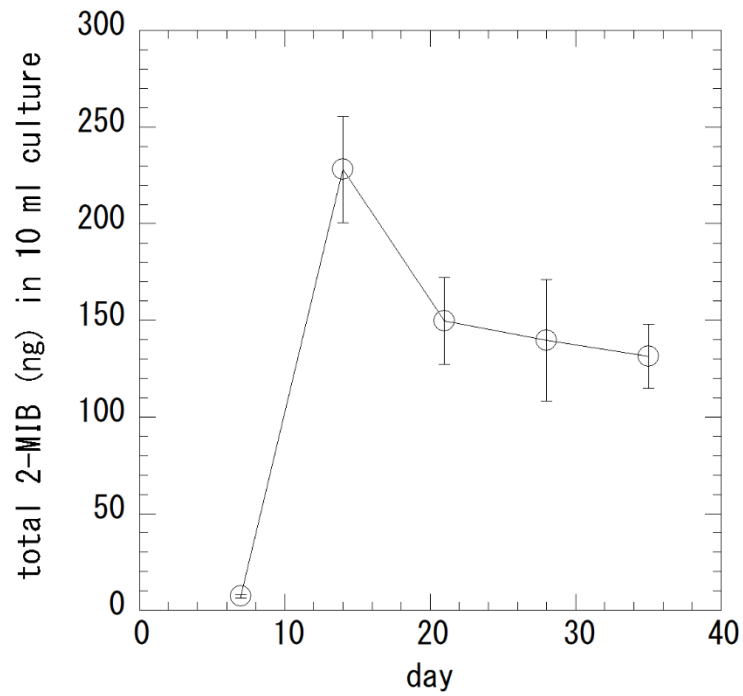


図 18 *M. autumnalis* WILD-52 の窒素を 1mg/L に制限した CT 培地における 2-MIB 総量の推移

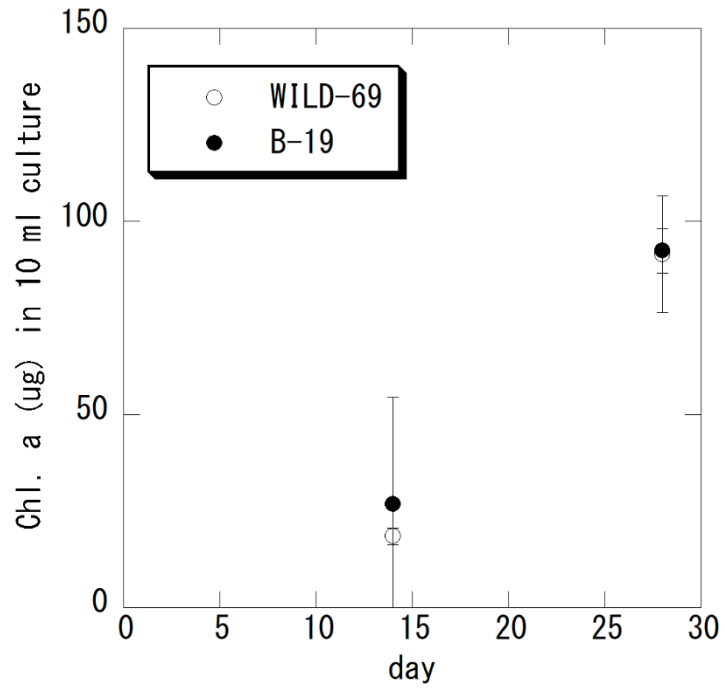


図 19 *Microcoleus* sp. WILD-69 および *Microcoleus* sp. B-19 の窒素を 1mg/L に制限した CT 培地における Chl. a の推移

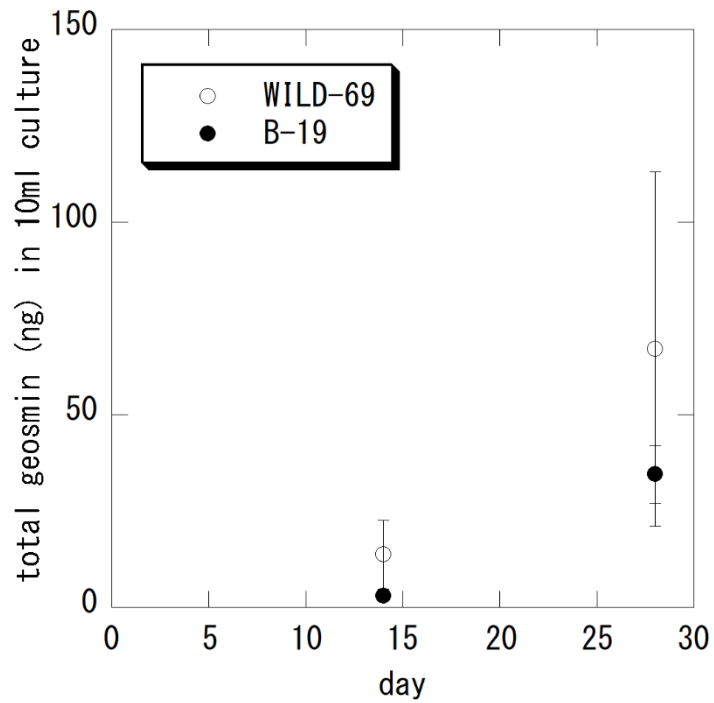


図 20 *Microcoleus* sp. WILD-69 および *Microcoleus* sp. B-19 の窒素を 1mg/L に制限した CT 培地における geosmin の推移

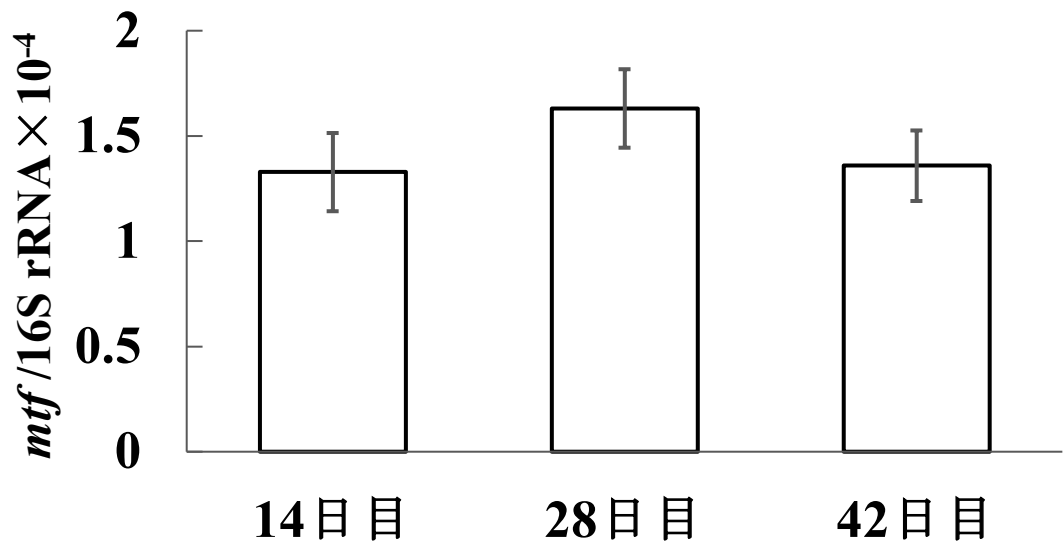


図 21 *Microcoleus autumnalis* WILD-53 の *mtf* 遺伝子発現量の経時的変化

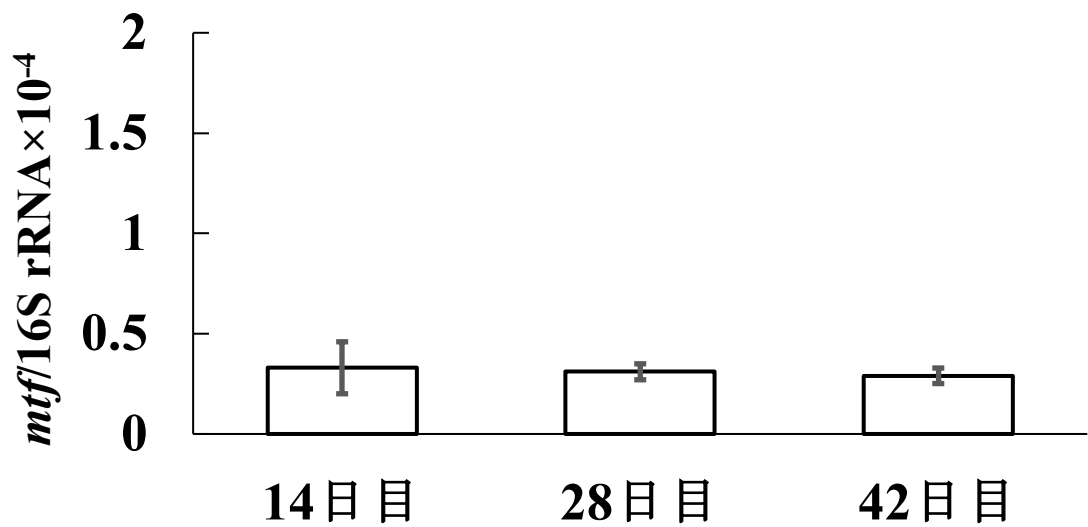


図 22 *Microcoleus autumnalis* WILD-54 の *mtf* 遺伝子発現量の経時的変化

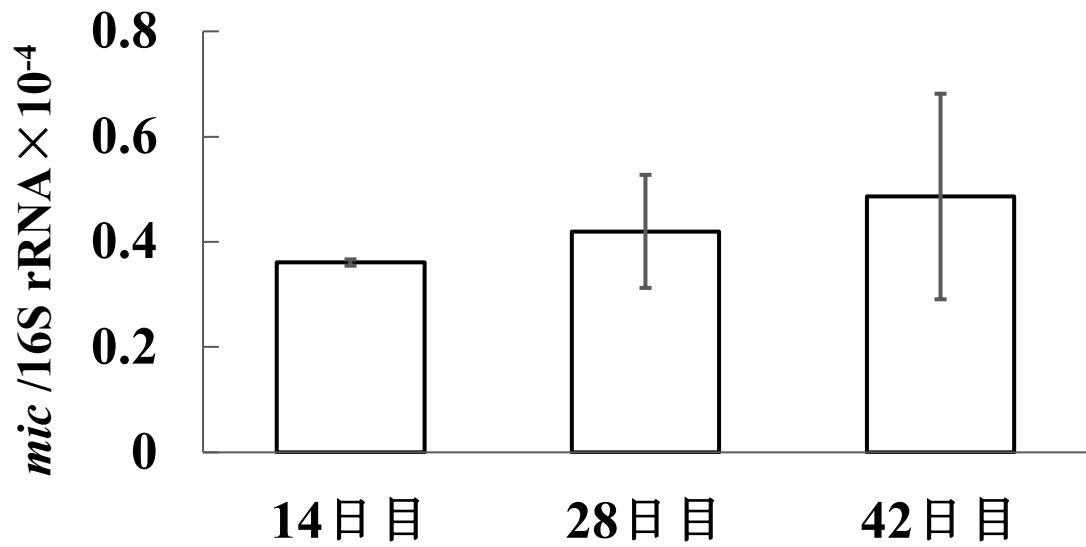


図 23 *Microcoleus autumnalis* WILD-53 の *mic* 遺伝子発現量の経時的変化

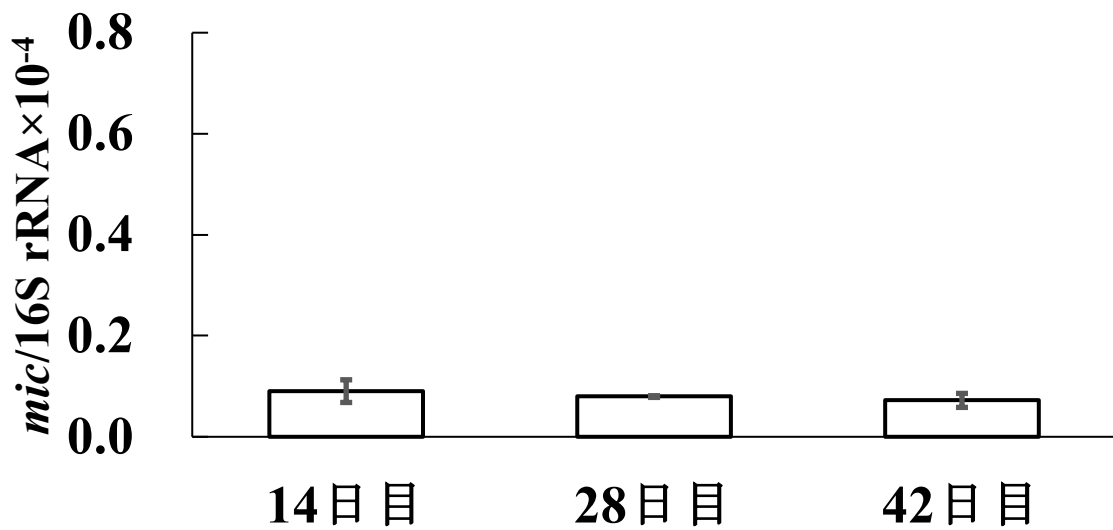


図 24 *Microcoleus autumnalis* WILD-54 の *mic* 遺伝子発現量の経時的変化

障害生物およびその代謝産物の発生メカニズムの解明

研究代表者	秋葉 道宏
研究分担者	清水 和哉
研究分担者	西村 修
研究分担者	藤本 尚志
研究分担者	浅田 安廣

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）
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
分担研究報告書

研究課題：障害生物およびその代謝産物の発生メカニズムの解明

研究代表者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院	生活環境研究部	主任研究官
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	西村 修	東北大学大学院	工学研究科	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	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

研究要旨

気候変動により生じうる環境条件下（温度、光条件、共存微生物）でのカビ臭産生藍藻類の増殖ポテンシャルとカビ臭物質産生能の変化やカビ臭発生メカニズムの解明を目的として研究を実施した。本年度は、温度、光強度、共存微生物群の変化によるカビ臭物質産生藍藻類のカビ臭物質産生のメカニズムの解明を試みた。さらに、水道水源での障害生物等の微生物群の特徴を把握し、水道水源での生物障害を予測できる環境マーカー等を創出することで、カビ臭発生予測手法を構築することを試みている。この結果、カビ臭物質産生藍藻類の同属・同種で、異なる株の場合、環境因子への応答は異なるものとなり、増殖に対しては、水温条件は異なる結果を与えやすいことを明らかにした。*mtf* 遺伝子の発現量は、水温では増殖が弱い条件（10°C もしくは 30°C: 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）、光強度では増殖に好条件（10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$:20°C）の際に高くなる傾向となったが、NIES-512 株のみ、増殖が弱くなる光条件（60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$:20°C）において高くなった。*mtc* 遺伝子の発現量は、増殖に好条件もしくは増殖が弱い条件（NIES-512）（20°C: 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）において高い傾向となった。また、微生物群集が *D. smithii* の増殖に好影響を与えていることを明らかにした。

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。環境因子では、気温上昇に伴う水温の上昇や光強度の変動は、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障害物質である。その産生原因生物は、放線菌と藍藻類であり、これら微生物は環境因子の変動に影響を受けやすい二次代謝が発達している。カビ臭物質が、生物由来の物質であることから、産業由来の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が困難である。近年のカビ臭物質産生微生物の分子生物学的知見により、培養や顕微鏡による手法に加えて、カビ臭物質産生放線菌¹⁾や藍藻類²⁾の定量手法（早期検出技術に応用可能）が構築された。一方、カビ臭発生にいたる際の環境因子、カビ臭産生藍藻類の挙動、カビ臭物質合成メカニズムについて未解明な点がまだ多くある。これら未解明な点が、カビ臭発生予測を難しいものとしている原因と考えられている。水源池におけるカビ臭発生予測手法の確立は、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。カビ臭発生予測が可能となると、例えば、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。今後の気候変動に

より、環境条件、とくに水温や光強度、共存微生物群集、が変化することにより、カビ臭物質産生藍藻類の個体群数の挙動やそのカビ臭物質産生活性に影響を与え、水源におけるカビ臭イベントの発生頻度が変化するものと予測されている。そのため、水源におけるカビ臭イベント発生の原因生物が藍藻類であることが多いことから、カビ臭物質産生藍藻類のカビ臭物質産生のメカニズムを明らかにすることが必要である。また、環境中の温度や光条件の変化は、微生物群集構造も変動することが、既往研究から推測できるため、微生物群集構造の変化が及ぼすカビ臭物質産生への影響を明らかにすることも重要である。

以上から、温度、光強度、共存微生物群の変化によるカビ臭物質産生藍藻類のカビ臭物質産生のメカニズムを解明することを目的とした。さらに、水道水源での障害生物等の微生物群の特徴を把握し、水道水源での生物障害を予測できる環境マーカー等を創出することで、カビ臭発生予測手法の構築を試みる。

B. 研究方法

1. カビ臭物質産生に及ぼす温度や光強度の影響

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 2-MIB 産生藍藻類 *Pseudanabaena foetida* NIES-512 (名古屋城より分離)、茨城県が霞ヶ浦より分離した *Pseudanabaena foetida* 1705-12、*Pseudanabaena foetida* 1803-12 を用いた。これら藍藻類は CT 培地にて培養を行った。温度影響および光強度影響を解析するために、1) 光強度を $30.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ に固定して、培養温度を、 10°C 、 20°C 、 30°C とした実験系と 2) 培養温度を 20°C に固定して、光強度を $10.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 $30.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 $60.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とした実験系を構築した。どちらの実験系でも明暗周期は 12 h とした。

細胞密度の変化は、クロロフィル a (Chl. a) の変化で解析した。Chl. a はホットメタノール抽出法にて行なった。カビ臭物質合成酵素遺伝子への影響を解析するために、一定の培養期間ごとに、全 RNA を抽出後、ランダムプライマーで cDNA を作成し、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、16S rRNA 遺伝子を内部標準遺伝子とした標準化を行った。全 RNA 抽出のサンプリングの際に、カビ臭物質 2-MIB の分析のためのサンプリングも実施している。

2. カビ臭物質産生に及ぼす共存微生物の影響

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 *Dolichospermum smithii* NIES-824 を用いた。共存微生物群集の供試藍藻類の増殖とカビ臭物質産生への影響を解析するために、霞ヶ浦から夏季 (サンプリング時の水温 31.5°C) と冬季 (サンプリング時の水温 9.2°C) に湖水をサンプリングして用いた。培養は、CT 培地を用い、培養温度は、温暖化の影響を考慮するため夏季サンプリング時の水温と同様の 31°C とした。光強度は、 $30.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、明暗周期を 12 h として培養した。参照系は滅菌水を添加した系とし、微小動物等を除くために、湖水をろ過 ($5 \mu\text{m}$) した湖水を添加した系、ろ過せずに微小動物等も含んだ湖水を添加した系の 3 つ試験系を構築した。

細胞密度の変化は、クロロフィル a (Chl. a) の変化で解析した。Chl. a はホットメタノール抽出法にて行なった。カビ臭物質合成酵素遺伝子への影響を解析するために、一定の培養期間ごとに、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) の発現量解析を qRT-PCR 法により実施し、解析中である。全 RNA 抽出のサンプリングの際に、カビ臭物質 2-MIB の分析のためのサンプリングも実施し、解析中である。加えて、真核および

原核微生物群集構造を 18S rRNA 遺伝子配列および 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を次世代シーケンサーにより解読し、解析を行なっているところである。

C. 研究結果および D. 考察

1) カビ臭物質産生に及ぼす温度の影響

細胞密度の指標とした Chl. a では、霞ヶ浦から分離した *P. foetida* 1705-12 と 1803-12 では培養温度 20°C にて、名古屋城から分離された *P. foetida* NIES-512 は、培養温度 30°C にて良好な増殖を示した。培養温度 10°C においては、どの藍藻類においても増殖が良好ではなかったが、 30°C においては、*P. foetida* 1705-12 のみが増殖が良好ではなかった (図 1)。同属・同種においても異なる株であると、増殖特性が異なった。

カビ臭物質 2-MIB は、ゲラニル二リン酸 (GPP) メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 (*mtf*) と 2-MIB 合成のモノテルペンシクラーゼの遺伝子 (*mtc*) の 2 つの遺伝子の働きによって合成される。これら遺伝子は、オペロンを形成していると考えられている^{3,4,5)}。各藍藻類における *mtf* 遺伝子と *mtc* 遺伝子の発現量には相関はみられなかった。カビ臭物質 2-MIB の前駆体である 2-methyl-GPP を GPP から変換する *mtf* 遺伝子については、その発現量が *P. foetida* 1705-12 では 30°C 、*P. foetida* 1803-12 と NIES-512 では 10°C において高い傾向にあった。また *P. foetida* 1705-12 では 10°C も、良好な増殖を示していた 20°C よりも高い傾向にあった (図 2)。カビ臭物質 2-MIB に 2-methyl-GPP から環化する *mtc* 遺伝子 (2-MIB 合成酵素遺伝子ともされている遺伝子) の発現量は、*P. foetida* 1705-12 と 1803-12 では良好な増殖を示した 20°C 、*P. foetida* NIES-512 では良好な増殖を示した 30°C において高い傾向にあった (図 3)。

2) カビ臭物質産生に及ぼす光強度の影響

全ての *P. foetida* 供試藍藻類において、 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度で良好な増殖を示した。培養温度に対しては、株ごとに異なる結果を示したが、光強度においては、同様の結果となった。*P. foetida* 1705-12 と 1803-12 では、光強度と増殖の間に負の相関関係がみえたが、*P. foetida* NIES-512 では異なっていた (図 4)。*mtf* 遺伝子の発現量は、*P. foetida* 1705-12 と 1803-12 においては、良好な増殖を示した $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度にて高い傾向を示した。一方、*P. foetida* NIES-512 では増殖が良好ではない $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度において高い傾向を示した (図 5)。*mtc* 遺伝子の発現量は、全ての *P. foetida* 供試藍藻類で、 $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度の際に高い傾向を示した (図 6)。*P. foetida* 1705-12 と 1803-12 においては、 30

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度にても増殖するが、*P. foetida* NIES-512 では、 $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度では、ほぼ増殖しなかった。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 (*mtf* と *mtc*) 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³⁾。

藍藻類におけるカビ臭物質ジェオスミンや2-MIBの主要な生合成経路は、メバロン酸 (MVA) 経路やノンメバロン酸 (MEP) 経路で生合成されるイソペンテニルニリン酸から開始されるイソプレノイド経路であると提案されている⁶⁾。イソプレノイド経路では、クロロフィル・フィトール、カロテノイドといった光合成色素も生合成されるため、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^{6, 7, 8)}。

3) カビ臭物質産生に及ぼす共存微生物の影響

水温の変化は、微生物群集構造の変動要因となる。このため、微生物群集構造のカビ臭物質産生への影響と、水温変化によって変動する微生物群集構造およびそれが与えるカビ臭物質産生への影響を解析している。

Dolichospermum smithii NIES-824 を試験藍藻類として用いて、その増殖を解析した。参照系である滅菌水の添加系と比較して、微小動物等の大型微生物を除いたろ過湖水 ($5 \mu\text{m}$ 孔径の膜でろ過) の添加系は、夏と冬のどちらとも *D. smithii* の増殖を促進した (図7)。夏の湖水の方が、より好影響を与えた (図7a)。また、湖水の添加系では、ろ過湖水添加系と同様に夏と冬のどちらとも *D. smithii* の増殖を促進したが、冬の湖水の方が大きな影響を与えていた (図8b)。夏の湖水を用いた場合は、ろ過湖水の添加系が湖水添加系よりも増殖に大きな影響を与えた (図7a)。一方、冬の湖水では、湖水添加系がろ過湖水添加系よりも増殖の大きな影響を与えた (図7b)。大型微小動物等 ($5 \mu\text{m}$ を超えるサイズのもの) の影響や水温上昇によって変化した微生物群集が *D. smithii* の増殖に影響を与えたことが考えられるが、詳細な解析を行なっている。微生物群集構造解析では、藍藻類の増殖に好影響を与える微生物群集構造や指標微生物の特定を試み、カビ臭発生を予測できる環境マーカーの創出を目指している。

水源では、同属・同種でも多くの異なる株によって微生物群集を形成していることが考えられるため、既往研究における分離株を用いた知見や水源のモニタリング知見も組み合わせ、カビ臭発生予測法へとつなげることが重要である。

E. 結論

カビ臭物質産生藍藻類の同属・同種で、異なる株の場合、環境因子への応答は異なるものとなり、増殖に対しては、水温影響の方が異なる結果を与えやすいことを明らかにした。*mtf* 遺伝子の発現量は、水温では増殖が弱い条件、光強度では増殖に好条件の際に高くなる傾向となったが、NIES-512株のみ、増殖が弱くなる光条件において高くなった。*mtc* 遺伝子の発現量は、増殖に好条件もしくは増殖が弱い条件 (NIES-512) において高い傾向となった。水源では、同属・同種でも多くの異なる株によって微生物群集を形成していることが考えられるため、既往研究における分離株を用いた知見を加えることが、カビ臭発生予測法へとつなげる上で重要である。また、微生物群集が *D. smithii* の増殖に好影響を与えていることが明らかになったことで、藍藻類の増殖に好影響を与える微生物群集構造や指標微生物の特定により、カビ臭発生を予測できる環境マーカーの創出につながることが期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shen Q, Wang Q, Miao H, Shimada M, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M, Shimizu K. Temperature affects growth, geosmin/2-methylisoborneol production, and gene expression in two cyanobacterial species. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021. (Published Online)

2. 学会発表

Miao H, Shen Q, Zhang J, Asada Y, Utsumi M, Lei Z, Takanashi H, Fujimoto N, Akiba M, Tian Y, Zhang Z, Shimizu K. A rapid method for the monitor of geosmin-producing *Dolichospermum* sp. based on whole-cell PCR. 日本水処理生物学会第57回大会; 2021年10月; 神奈川 (オンライン開催) .

Zhang J, Shen Q, Miao H, Asada Y, Utsumi M, Lei Z, Takanashi H, Shimada M, Fujimoto N, Akiba M, Tian Y, Zhang Z, Shimizu K. Elucidation of 2-MIB production mechanism under different temperature. 日本水処理生物学会第57回大会; 2021年10月; 神奈川 (オンライン開催) .

Kazuya Shimizu. Production of musty odor by Cyanobacteria and Actinomycetes. The International of Workshop of "Three Water Overall Planning as a whole, comprehensively protect and restore the aquatic ecological environment"; Nanjin China; December 2021; Oral presentation (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. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

I. 参考文献

- 1) Auffret M., Pilote A., Proulx É., Proulx D., Vandenberg G., and Villemur R. (2011) Establishment of a real-time PCR method for quantification of geosmin-producing *Streptomyces* spp. in recirculating aquaculture systems. *Water Research* **45**(20), pp.6753-6762.
- 2) Su M., Gaget V., Giglio S., Burch M., An W., and Yang M. (2013) Establishment of quantitative PCR methods for the quantification of geosmin-producing potential and *Anabaena* sp. in freshwater systems. *Water Research* **47**(10), pp. 3444-3454.
- 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

J. 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

Target genes	Primers/Probe	Sequence (5' to 3')	Reference
<i>mtc</i>	Mtc-RTF	CGCTCGCTTTGTG AGTGAGATAG	Wang et al. (2011)
	Mtc-RTR	GGCAGTAGAGTGGTGAGGCAGTT	
16S rRNA	16S-RTF	ACGGAGTTAGCCG ATGCTTATTC	
	16S-RTR	CGAAAGCCTGACGGAGCAATA	

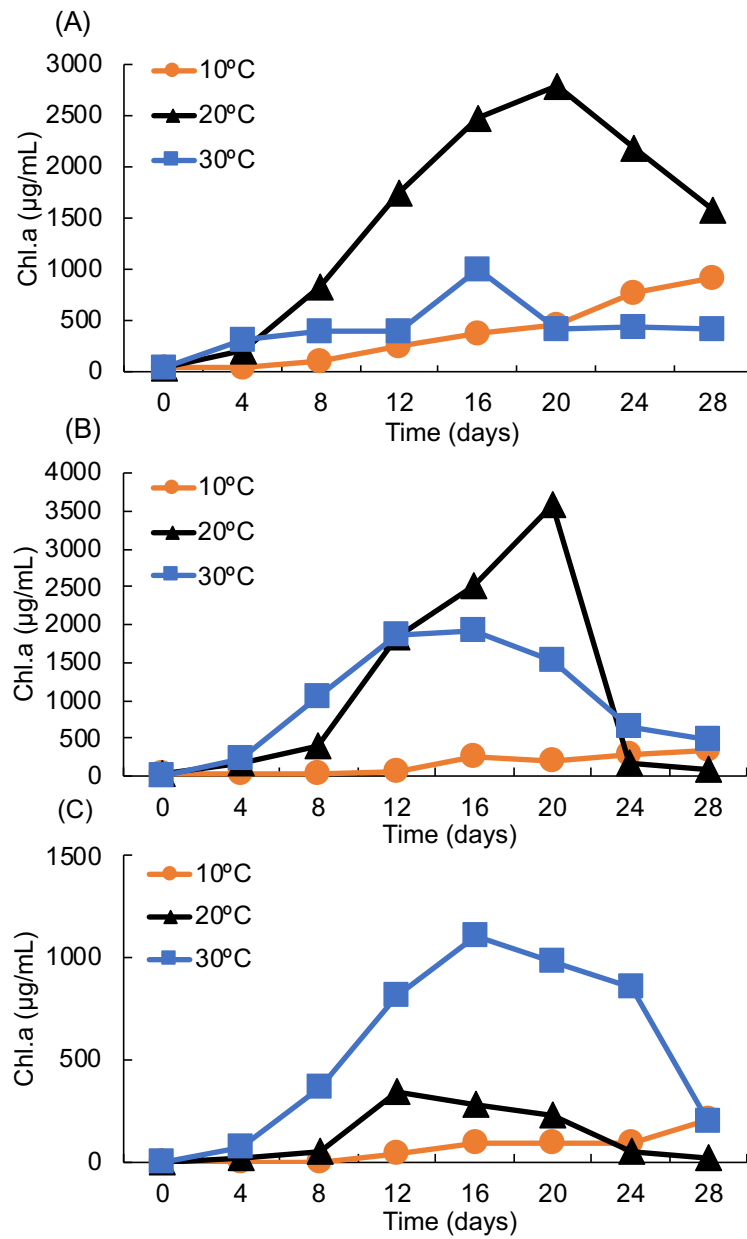


図1 異なる培養温度条件下における増殖特性
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

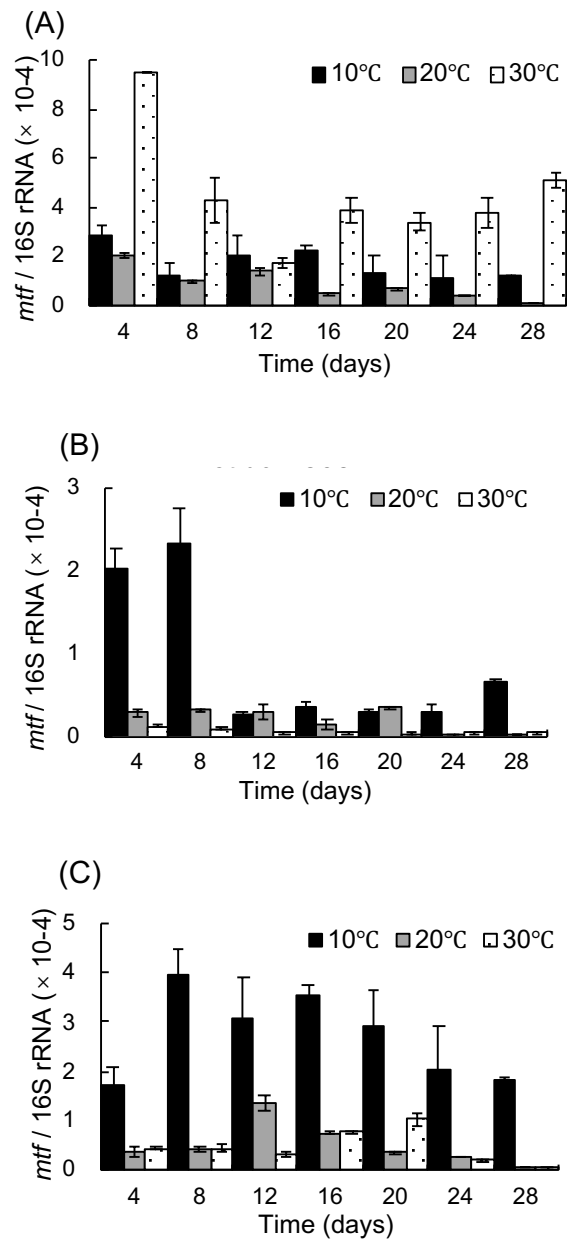


図2 異なる培養温度条件における *mtf* の発現量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

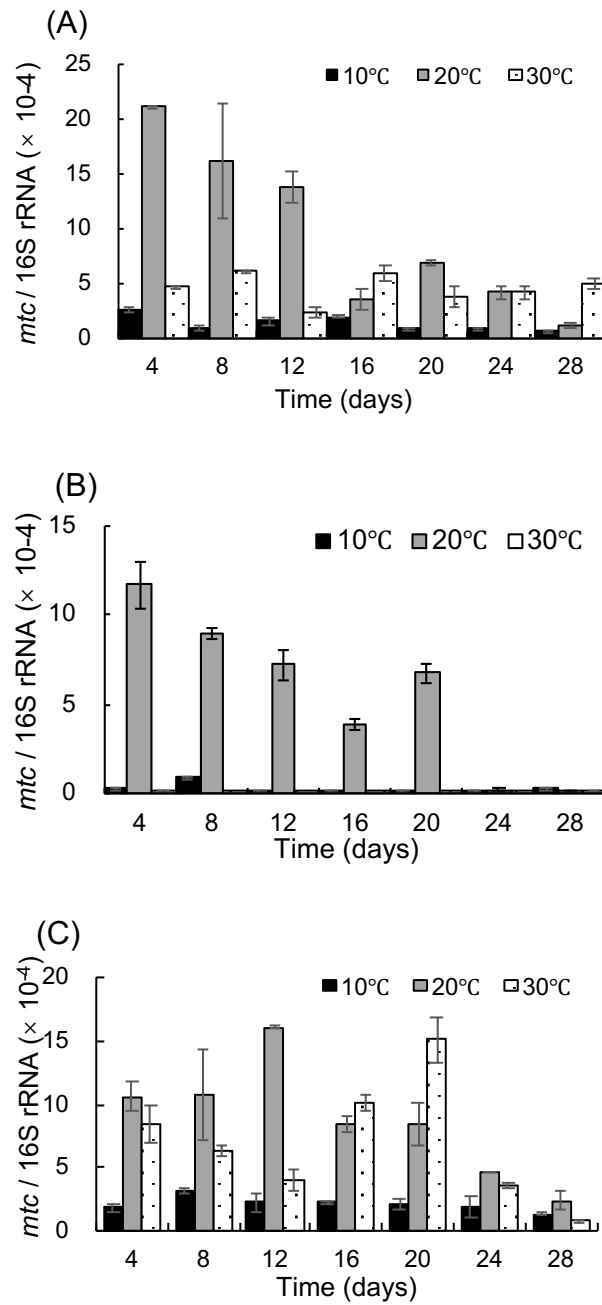


図3 異なる培養温度条件における 2-MIB 合成酵素遺伝子 *mtc* の発現量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

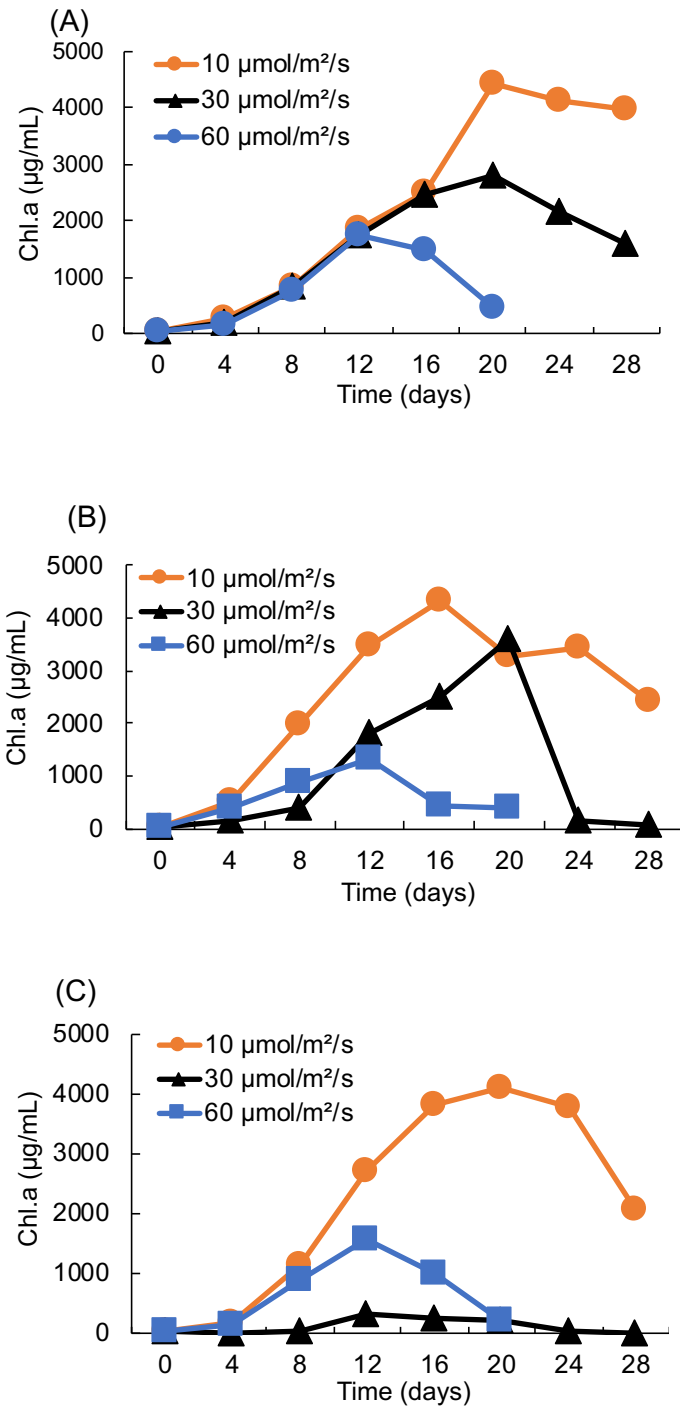


図4 異なる培養光強度条件下における増殖特性
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

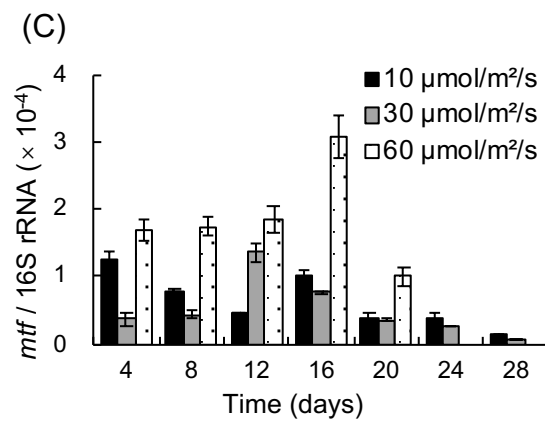
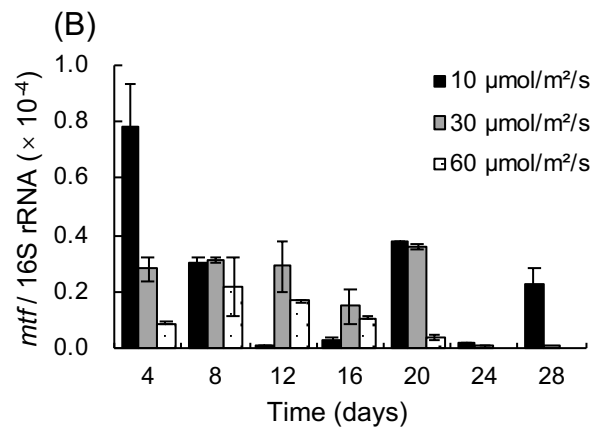
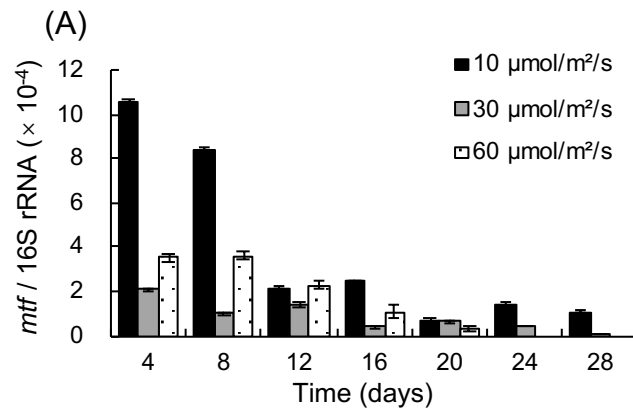


図5 異なる培養光強度条件における *mtf* の発現量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

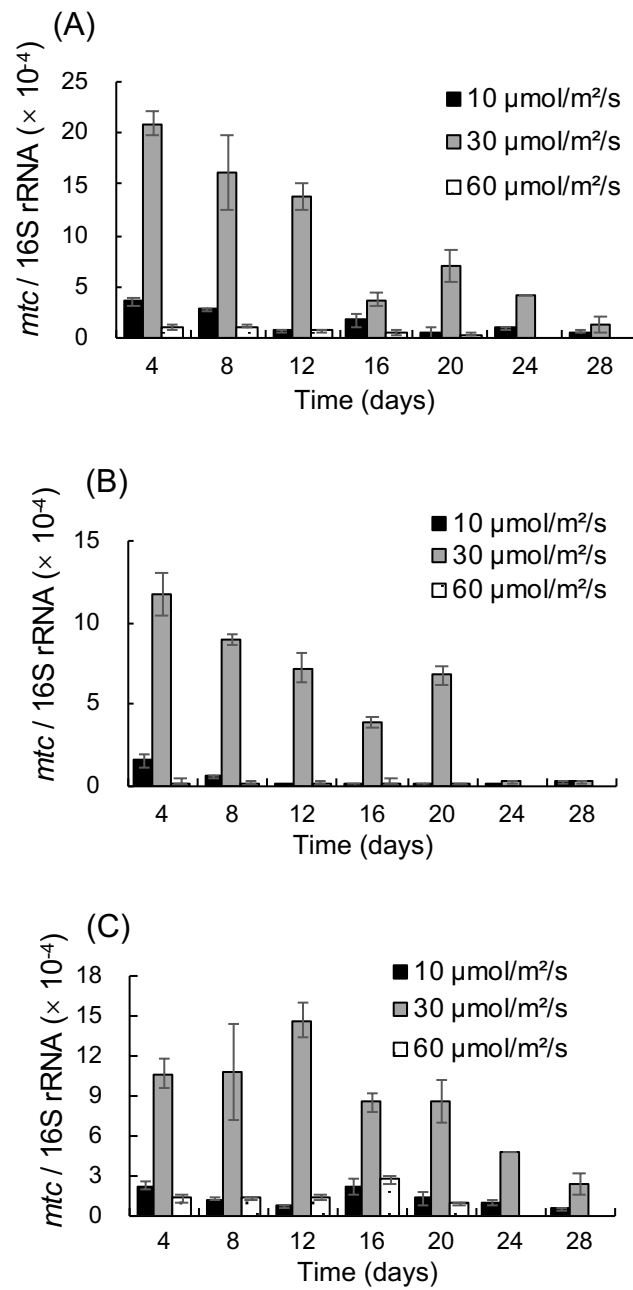


図 6 異なる培養光強度条件における 2-MIB 合成酵素遺伝子 *mtc* の発現量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

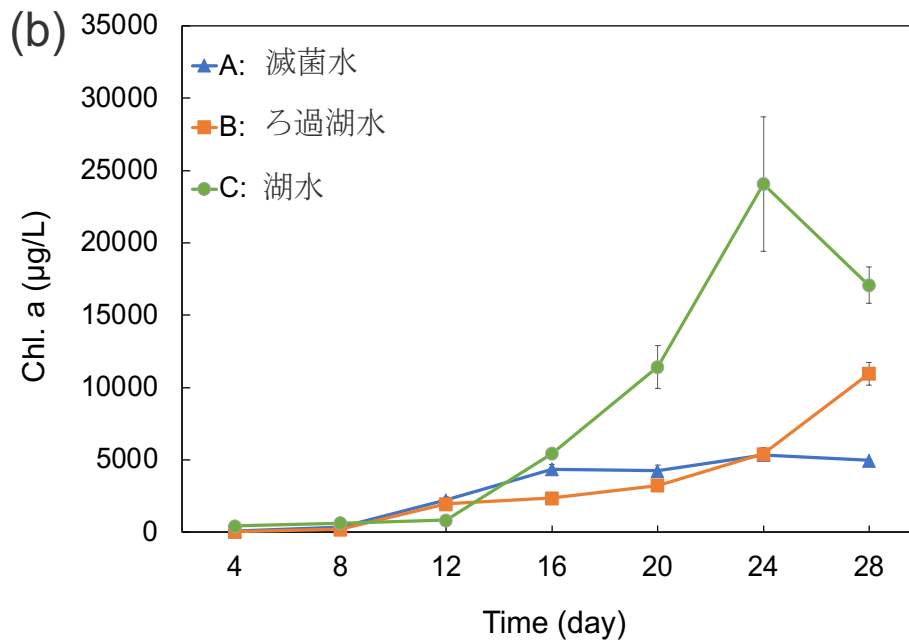
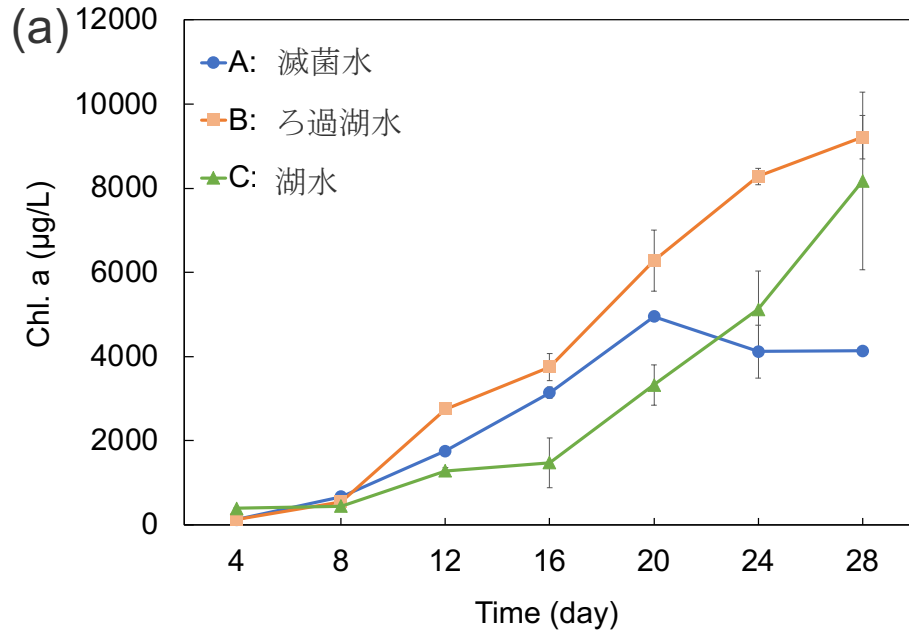


図 7 geosmin 産生藍藻類 *Dolichospermum smithii* NIES-824 の増殖に及ぼす共存微生物の影響、(a) 夏サンプル湖水、(b) 冬サンプル湖水

ダム湖の藻類異常発生予測モデルの
構築における再解析データ・衛星データ等の
活用可能性の検討

研究分担者	西村	修
研究協力者	佐野	大輔
研究協力者	今本	博臣
研究協力者	三浦	耀平

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)
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
分担研究報告書

研究課題：ダム湖の藻類異常発生予測モデルの構築における衛星データ等の活用可能性の検討

研究分担者 西村 修 東北大学大学院 工学研究科 教授
研究協力者 佐野 大輔 東北大学大学院 工学研究科 教授
研究協力者 今本 博臣 水資源機構 総合技術センター
研究協力者 三浦 耀平 東北大学大学院 工学研究科 大学院生

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ダム湖において藻類が異常発生し、水道水質や景観に悪影響を与えていることが確認されている。藻類の異常発生を事前に予測することができれば、藻類異常発生の頻度や範囲を抑制するために効果的な工学的な対応の事前の検討が可能となる。モデル開発において使用するデータはダム湖付近において高頻度で取得されることが望まれる。アメダス観測所からダム湖まで距離があることが一般的であるため、気象データとしてのアメダス観測所のデータは適当ではないと考えられる。藻類異常発生予測モデルに活用可能な、よりダム湖に近く正確な気象データの供給が必要とされている。

本研究では日本国内の4つのダム湖において、再解析データ、レーダー・アメダス解析雨量(RAP)データの活用可能性を、アメダスの気象データと比較することで検討した。

室生ダム、阿木川ダム、一庫ダム、寺内ダムを対象として、栄養塩データ、水文データ、アメダスの気象データ、再解析データ、RAPのデータを説明変数、対象藻類の濃度を目的変数とし、関連度自動決定(automatic relevance determination: ARD)により対象藻類の濃度に関連のある要因の特定を行なった。その結果、アメダスの衛星データに比べ再解析データ及びRAPデータがより藻類の濃度に関連のある要因として特定された。再解析データやRAPは実測値ではないが、よりダム湖に近い気象データの分布を取得することができるため、より重要な要因として特定されたと考えられる。今後は、地表面温度データ等の衛星データの活用可能性の検討を行なう。

A. 研究目的

温暖化や富栄養化等による水源水質の悪化によりダム湖において藻類が異常発生し、様々な障害を引き起こしている。藻類の異常発生を抑制する適切な対策を講じるためには、事前に異常発生を予測する必要がある。水道水源における藻類異常発生予測手法としては、統計モデルやシミュレーションモデルが構築されてきたが、データ収集の負担や計算負荷が大きいことが欠点として指摘されている¹⁾。近年では、人工ニューラルネットワーク、遺伝的アルゴリズム、決定木等の機械学習のアルゴリズムを用いた藻類異常発生予測モデルが多く構築されている²⁾。機械学習の手法は予測結果についての明確な根拠の説明が難しい一方、それぞれのダム湖に対して一から複雑な計算過程を構築する必要がないため汎用性に優れていると考えられている。

本研究では、これまで機械学習の手法を用いて予測モデルの構築を行い、データとしては水道水源の水質データ及び水文データ、水道水源に最も近いアメダス観測所の気象データを使用してきた。しかしながら、研究対象の水道水源からアメダス観測所まで直線で数~10km程度の距離があり、水道水源における気象を代表したデータが得られているとは限らない。藻類の異常発生と現場における気温には相関があることが確認されていることから、水道水源の現場における正確な気象データを如何に確保するかが重要と考えられる。

そこで本研究では、アメダス観測所の気象データの代わりとして、再解析データ及びレーダー・アメダス解析雨量(RAP)データの活用可能性を検討した。再解析データとは、時空間的にまばらな観測データを物理法則と整合するように補間して格子点データとして作成したデータである。代表的なものとしては、欧州中期予報センターが提供するERA5(The fifth generation of European reanalysis)や気象庁が提供するDSJRA-55があげられる。また、レーダーアメダス解析雨量(Radar-AMeDAS composite precipitation: RAP)データとは、気象庁・国土交通省が保有する気象レーダーの観測データに加え、気象庁・国土交通省・地方自治体が保有する全国の雨量計のデータを組み合わせ、降水量分布を格子点データとして解析したものである。ERA5、DSJRA55、RAPデータの水平分解能はそれぞれ31km、5km、1kmであり、アメダス観測所よりダム湖に近い正確なデータを取得できる可能性がある。

日本国内の4つのダム湖を対象として、栄養塩データ、水文データ、アメダスの気象データ、再解析データ、RAPのデータを説明変数、対象藻類の濃度を目的変数とし、関連度自動決定(automatic relevance determination: ARD)により対象藻類の濃度に関連のある要因の特定を行なった。

B. 研究方法

独立行政法人水資源機構から、奈良県の室生ダ

ム、岐阜県の阿木川ダム、兵庫県の一庫ダム、福岡県の寺内ダムの 2001 年から 2017 年の *Microcystis* spp. と *Dolichospermum* spp. (*Anabaena* spp.) の濃度、栄養塩データ、流入水量・流出水量データを取得した。最高気温、日射時間、風速、降水量等の気象データに関しては、各ダム湖近辺のアメダス観測所のデータを気象庁のホームページから取得した。ERA5 の最高気温データ (2001-2017)、DSJRA の最高気温データ (2001-2012)、RAP の降水量データ (2006-2017) を解析に用いた。DSJRA 及び RAP のデータは 2001 年から 2017 年の全期間分がないため、①2001 年-2012 年、②2006 年-2012 年、③2006 年-2017 年の 3 つの期間に分割し解析を行った。対象ダムが 4 つ、対象藻類が 2 種、期間が 3 種類であり、合計 24 のケースのデータセットを準備した。ERA5、DSJRA55、RAP データの取得には、東北大学大学院工学研究科・峠嘉哉助教にご協力いただいた。

栄養塩の窒素とリンの濃度はそれぞれ一年間の平均値 (TN1y、TP1y)、流入水量・流出水量は過去 7 日間の平均値 (Inflow7、Discharge7) を用いた。アメダス観測所の最高気温及び風速データに関しては過去 7 日間の平均値 (AveMaxTemp7、AveWind7)、日射時間及び降水量は過去 7 日間の合計値 (Sun7、Rain7) を用いた。ERA5、DSJRA55 の最高気温データについては過去 7 日間の平均値 (ERA5_AveMaxTemp7、DSJRA55_AveMaxTemp7)、RAP データに関しては過去 7 日間の合計値 (RAP_Rain7) を使用した。

藻類の濃度を目的変数とし、残りの変数を説明変数としたデータセットを用いて、ARD のアルゴリズムにより藻類の濃度に関連する変数の分析を行なった。ARD とは、データセットの目的変数に対する各説明変数の関連の度合いを係数として推定することができるアルゴリズムのことである。係数に事前分布を設定し計算を行い、最小二乗法に比べてより疎な係数が算出されやすいため、関連の低い説明変数を除外する際に役立つ。解析の前には説明変数の標準化を行ない、Python 3.8.8 の scikit-learn ライブラリーを使用して、ARD の計算を行った。

C. 研究結果及び D. 考察

24 ケースのデータ数を表 1 に示す。ケースごとに取得できた藻類の濃度データ数が大きく異なる (最小値: 8、最大値: 239)。各ケースに関して ARD を用いて係数を算出した結果を表 2 に示す。関連のある変数として計算された (係数≠0) 変数はセルに色が付けられている。関連のある変数として選択された割合の比較では、TN1y の値が最も高く、Rain7 の値が最も低かった。本研究で目的としていた、アメダス観測所のデータと ERA5、DSJRA55、RAP のデータに関して選択された割合で比較を行ったのが図 3 である。アメダス観測所のデータである AveMaxTemp7 や Rain7 よりも ERA5 や RAP の変数の方が選択される割合が高いことが判明した。AveMaxTemp7 と ERA5 の比較では全ケースの関連のある変数として選択された割合では同じ値だが、データ数が比較的少ない 2006-2012 のケースの比較を除いた場合 ERA5 の

値の方が高い。

RAP データの水平分解能は 1km であり、アメダス観測所が各ダム湖から数~10km 離れている。このことを考慮すると RAP データが Rain7 より正確であることで RAP データが藻類の濃度により関連のある変数として選択されたと考えられる。一方、DSJRA55 とアメダス観測所の AveMaxTemp7 の選択された割合は ERA5 よりも低かった。ERA5 の水平分解能は他の 2 つに比べて粗く、データの正確性は劣ると考えられる。一方、水平分解能が粗いことは広範な地域の気温を捉えることができると言い換えられる。湖に流入する河川の水温はダム湖の水温に大きな影響を与える。ERA5 のデータは流域の気温も考慮することができたため、より関連のある変数として計算された可能性がある。

上で述べた通り、データ数にはばらつきが見られる。データ数が小さいケースと大きいケースを同列で比較を行っているが、説明変数×10 倍程度のデータ数を閾値とし、それ以上のデータ数を持つケースで検討を行う必要性も考えられる。

今後は、本研究で検討を行ない有用であることが示された ERA5、RAP に加え、Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) の地表面温度データ等の衛星データや ERA5 の水平分解能を向上させた ERA5-Land の検討を行なっていく。MODIS とは、米国航空宇宙局 (NASA) の地球観測衛星 Terra/Aqua に搭載されているセンサーのことであり、地表面からの赤外線放射を捉えることで地表面温度の推定を行っている。地表面温度データは湖沼においては水表面温度データとなる。水温は藻類の異常発生に関連のある関数として報告されており³⁾、地表面温度は非常に有用なデータになると考えている。

E. 結論

日本国内の 4 つのダム湖を対象とし、再解析データ (ERA5、DSJRA55)、レーダー・アメダス解析雨量 (RAP) データの活用可能性を ARD により検討した結果、ERA5 及び RAP データが藻類の濃度に関連のある要因として特定された。今後は地表面温度等の衛星データの活用可能性の探索及び藻類異常発生予測モデルの構築を行う。

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) 梅田信・和泉恵之(2008), ダム湖の植物プランクトン予測, 応用生態工学, 11(2) : 213-224.
- 2) Rousso BZ, Bertone E, Stewart R, Hamilton DP, (2020) A systematic literature review of forecasting and predictive models for cyanobacteria blooms in freshwater lakes, Water Res., 182, 115959.
- 3) Steven CC, Brent B, Charles F, Victor JB, Jim H, David M, Diane MLM, Lisa R, Lesley J, Jeremy M,

Kenneth MS, Hans WP. (2017) Climate change impacts on harmful algal blooms in U.S. Freshwaters: A screening-level assessment, Environ. Sci. Technol., 51, 8933-8943.

J. 謝辞

本研究を進めるに当たり、東北大学大学院工学研究科峠嘉哉助教の協力を得ました。記して謝意を表します。

表 1 各ケースの藻類濃度のデータ数

	ERA5+DSJRA55 (2001-2012)	ERA5+DSJRA55+RAP (2006-2012)	ERA5+RAP (2006-2017)	全期間 (2001-2017)
室生ダム <i>Microcystis</i> . spp	149	104	212	257
室生ダム <i>Dolichospermum</i> . spp	30	26	139	143
阿木川ダム <i>Microcystis</i> . spp	61	26	125	160
阿木川ダム <i>Dolichospermum</i> . spp	18	8	20	30
一庫ダム <i>Microcystis</i> . spp	239	149	207	297
一庫ダム <i>Dolichospermum</i> . spp	80	52	142	170
寺内ダム <i>Microcystis</i> . spp	87	21	58	124
寺内ダム <i>Dolichospermum</i> . spp	103	44	117	176

表2 ARDにより算出された各ケースの説明変数の係数及び関連のある変数として選択された割合

追加の変数		データ数	TN1yp	TP1yp	Inflow7	Discharge7	AveMaxTemp7	Sun7	AveWind7	Rain7	ERA5_AveMaxTemp7	DSJRA55_AveMaxTemp7	RAP_Rain7
室生ダム <i>Microcystis . spp</i>	ERA5, DSJRA55	149	0.17	0.00	0.65	-0.95	0.40	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	-
	ERA5, DSJRA55, R-AMeDAS	104	0.23	0.03	2.25	-2.41	0.52	0.00	0.00	0.47	0.00	0.00	-0.46
	ERA5, R-AMeDAS	212	0.18	0.08	0.36	-0.45	0.00	0.00	0.00	0.41	0.44	-	-0.42
室生ダム <i>Dolichospermum . spp</i>	ERA5, DSJRA55	30	0.22	-0.16	-0.33	0.00	0.00	-0.34	0.07	0.11	0.40	0.00	-
	ERA5, DSJRA55, R-AMeDAS	26	0.51	-0.24	0.00	-0.32	-0.50	-0.04	0.34	0.00	0.94	0.00	-0.06
	ERA5, R-AMeDAS	139	0.21	0.00	-0.15	0.00	0.00	0.00	-0.004	0.00	0.18	-	0.00
阿木川ダム <i>Microcystis . spp</i>	ERA5, DSJRA55	61	0.00	0.00	0.00	0.73	0.00	0.00	-0.96	-0.62	0.00	0.00	-
	ERA5, DSJRA55, R-AMeDAS	26	-0.003	-0.32	0.00	0.00	-0.00005	0.00	0.00	0.00	-0.0002	-	0.53
	ERA5, R-AMeDAS	125	0.00	0.00	0.00	0.12	0.02	0.18	-0.48	0.00	0.00	-	0.19
阿木川ダム <i>Dolichospermum . spp</i>	ERA5, DSJRA55	18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.03	-1.19	-0.84	0.00	0.78	-
	ERA5, DSJRA55, R-AMeDAS	8	-0.11	-0.08	-0.001	-0.32	0.00	0.10	-0.53	-0.0003	0.00	0.00	-0.001
	ERA5, R-AMeDAS	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.59	-0.46	-0.92	0.00	0.00	-	-0.41
一庫ダム <i>Microcystis . spp</i>	ERA5, DSJRA55	239	0.00	0.04	-0.15	0.00	0.00	0.00	-0.13	0.00	-0.57	0.91	-
	ERA5, DSJRA55, R-AMeDAS	149	-0.09	0.00	-0.18	0.00	0.0001	0.08	-0.15	0.00	-0.36	0.77	0.00
	ERA5, R-AMeDAS	207	0.41	-0.18	0.00	-0.03	-2.04	0.26	0.00	0.72	2.22	-	-0.77
一庫ダム <i>Dolichospermum . spp</i>	ERA5, DSJRA55	80	0.34	-0.15	0.00	0.002	0.13	0.00	0.56	0.00	0.00	0.00	-
	ERA5, DSJRA55, R-AMeDAS	52	0.23	0.00	0.42	0.00	0.07	0.00	0.68	-0.04	0.00	0.00	-0.41
	ERA5, R-AMeDAS	142	0.54	0.00	0.47	-0.41	-0.86	0.00	0.47	0.00	1.12	-	0.00
寺内ダム <i>Microcystis . spp</i>	ERA5, DSJRA55	87	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.54	0.00	0.00	0.46	0.11	-
	ERA5, DSJRA55, R-AMeDAS	21	0.00	0.00	0.68	-0.0004	0.00	0.43	-0.10	0.00	-0.002	0.00	0.00
	ERA5, R-AMeDAS	58	-0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.17	0.00	0.00	-	0.00
寺内ダム <i>Dolichospermum . spp</i>	ERA5, DSJRA55	103	0.11	0.25	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	-
	ERA5, DSJRA55, R-AMeDAS	44	0.00	0.003	0.00	0.00	-1.90	0.09	0.02	-0.001	0.00	2.08	0.00
	ERA5, R-AMeDAS	117	0.10	0.05	0.00	0.13	0.00	0.21	0.00	0.00	0.17	-	0.00
全ケース		0.71	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.67	0.42	0.50	0.44	0.56
関連のある変数 として選択された割合	ERA5, DSJRA55		0.63	0.50	0.50	0.38	0.25	0.38	0.63	0.50	0.38	0.50	-
	ERA5, DSJRA55, R-AMeDAS		0.75	0.63	0.63	0.50	0.75	0.63	0.75	0.50	0.50	0.38	0.63
	ERA5, R-AMeDAS		0.75	0.38	0.38	0.63	0.50	0.50	0.63	0.25	0.63	-	0.50

表3 アメダス観測所データ及び再解析データの比較

		アメダス観測所データ		検討する追加のデータ			
		AveMaxTemp7	Rain7	ERA5 AveMaxTemp7	DSJRA55 AveMaxTemp7	RAP Rain7	
関連のある変数 として選択された割合	全ケース	0.50	0.42	0.50	0.44	0.56	
	ERA5, DSJRA55	0.25	0.50	0.38	0.50	-	
	ERA5, DSJRA55, R-AMeDAS	0.75	0.50	0.50	0.38	0.63	
	ERA5, R-AMeDAS	0.50	0.25	0.63	-	0.50	

障害生物発生時における分析方法の開発

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）
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
分担研究報告書

研究課題：障害生物発生時における分析方法の開発

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 主任研究官
研究分担者 高梨 啓和 鹿児島大学大学院 理工学研究科 准教授
研究協力者 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

水道水の異臭障害の中で2番目に発生件数が多い生ぐさ臭については、その原因物質が十分に明らかとなっているとは言い難い。このため浄水場では、機器分析による水質管理は行われておらず、官能試験によって水質管理が行われている。そこで本研究では、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。これまでの研究により、原因物質の分子式は $C_{13}H_{20}O_3$ であり、同物質がシクロヘキセノン、炭素鎖長5または6のアルキルケトン、メトキシ基を有することが示唆されており、全体構造を14種類まで絞り込むことに成功している。本研究により、14種類から4種類まで絞り込める可能性が示された。また、試料水の前処理方法を検討した結果、一般的に使用されているガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)では分析感度は不足する可能性が高いことを明らかにした。さらに、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で取得したマススペクトルから、原因物質を自動検出するための条件を確立した。

A. 研究目的

水道水の異臭被害の中で2番目に被害件数が多い生ぐさ臭¹⁾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²⁾が指摘されている。しかし、浄水場では、これらの物質から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。生ぐさ臭の原因物質(以下、Fishy Smell X, FX)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、FX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)による分子式推定などにより行われる。しかし、FTIRやNMRでの測定を行うためには、夾雑物を除去したサンプルが数百 μg ~数mg必要になる。揮発性物質と考えられるFXを、精製した上で数百 μg 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ガスクロマトグラフ-質量分析計

(GC-MS)や液体クロマトグラフ-質量分析計(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構造推定が必要となる。構造推定には、分析種の分子量情報を保存した状態で精密質量を測定して分子式を推定することから始める必要がある。分子量情報を保存した状態で測定するためには、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法などのソフトイオン化法でイオン化可能な質量分析計が適している。分子量情報を得た後に、電子イオン化(EI)法などのハードイオン化法でFXに過剰なエネルギーを与えてイオン化し、イオン化と同時に分解(結合開裂)させて構造情報を取得する必要がある。

昨年度までに、FXの分子式を推定し、さらにLC-MSⁿとGC-EI-MSを用いて構造を部分的に推定した結果、FXの分子式は $C_{13}H_{20}O_3$ であり、構造中にメトキシ基1個、シクロヘキセノン、炭素鎖長5または6のアルキルケトンを有することが示唆された。その全体構造は、構造異性体、位置異性体からなる4種類の異性体、さらに立体異性体を考慮すると14種類の異性体のいずれかと考えられるが、詳細は不明なままである。

そこで本年度は、昨年度推定した14種類の候補構造について量子化学計算に基づいた絞り込みを試みた。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. 試料水前処理条件の検討

2021年4月に生ぐさ臭の被害が発生した際に採取した水道原水を試料として用いた。採取した水道原水のTONは60であり、中程度の値であった。採取した試料水に亜硫酸ナトリウムを適量添加し、水中に含まれる溶存酸素を除去した。この試料水を、以下の2種類の異なる固相抽出法で濃縮・精製した。

試料水170 mLに対し、塩化ナトリウムを25 g添加し、円盤状の吸着剤(monotrap DSC18、ジーエルサイエンス)を入れ、容器を密閉して70 °Cで1時間振盪した。円盤状の吸着剤は水面に浮揚し、気液平衡により水相から気相に移動したFXが吸着剤と吸着平衡に達し、FXが吸着剤に濃縮・精製される。振盪後、容器から吸着剤を取り出し、ジクロロメタン200 µLで超音波脱離(10分間)した。すなわち、濃縮倍率は850倍であった。得られた濃縮・精製液は、分析に供された。

また、濾紙(保持粒子径5 µm)を用いて自然濾過した3,000 mLの試料水を吸着剤カートリッジ(Sep-Pak PS2、日本ウォーターズ)に通水し、0.5 mLのアセトニトリルで脱離して、6,000倍に濃縮・精製した。円盤状の吸着剤を用いた固相抽出とは濃縮・精製の原理が異なり、吸着剤カートリッジを用いた方法は、水相に存在するFXを直接吸着する。通水の手間を要するが、酸化されやすいと考えられるFXを、酸化的雰囲気である気相に移動することなく回収できるため、FXの回収率が高くなると期待される。得られた濃縮・精製液は、分析に供された。

2. 生ぐさ臭原因物質の自動探索条件の検討

2018年4月～2020年4月に生ぐさ臭の被害が発生した際に採取した水道原水3検体、およびウログレナの培養液を試料として用いた。既報³⁾に準じて固相抽出により6,500倍に濃縮・精製して分析に供した。

3. 濃縮・精製試料の分析

濃縮・精製した試料を、高分解能GC-MS(JMS-T200GC AccuTOF GCx-plus、JEOL)を用いてプリカーサーイオン分析した。イオン源にはEIを、分離カラムにはDB-5MS(膜厚0.25 µm、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 °C(1.5 min)→5 °C/min→200 °C(3 min)とした。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速は1.0 mL/min(線速度33.95 mm/sec)とした。注入溶媒はアセトニトリル、注入液量は1 µLとした。得られたデータに3種類の解析ソフトウェア(msFineAnalysis、JEOL、AnalyzerPro、Spectral Works、AMDIS、NIST)を用いてピークデコンボリューション処理を実施し、夾雑物由来のイオンを除去してFXのマススペクトルを抽出した。

4. 生ぐさ臭原因物質の構造推定

昨年度推定した14種類(図1)の候補構造のうち、アルキルケトンの炭素鎖長が6の構造について、量子化学的に生成可能なフラグメント(断片)イオンを探索した。探索は、計算プログラムGRRM17を用いて超球面探索/非調和下方歪追跡(SHS/ADDF)法^{4,5)}を用いて実施した。計算レベルはPM6-D3とした。エネルギー・勾配・二次微分行列Gaussian16を用いて算出した。

C. 結果およびD. 考察

1. 試料水前処理条件の検討

円盤状の吸着剤を用いて得た濃縮・精製液を分析した結果、FXは検出されなかった。分析機器の検出感度に対して、1 µLの濃縮・精製液中に存在したFXの量が少なかったためと考えられる。FXの量が少なかった理由は、円盤状の吸着剤によるFXの回収率が低いか、濃縮倍率が不足しているか、その両者と考えられる。

そこで、円盤状の吸着剤と比較してFXの回収率が同等以上と予想される吸着剤カートリッジを用いて、円盤状の吸着剤を用いた濃縮操作の濃縮倍率である850倍より高倍率の6,000倍に濃縮・精製して同様の分析を行った。FXの抽出イオンクロマトグラムを描写したところ、FXのピークが観察されたが、S/N比が小さく、また、マススペクトルの再現性が得られなかった。このため、吸着剤カートリッジを用いた濃縮操作でも、分析感度が不足していることが明らかとなった。

日常的な分析業務において、6,000倍以上に濃縮・精製することは困難である。また、本研究の結果が生ぐさ臭の臭気強度が中程度の試料水を対象とした結果であること、より臭気強度が弱い試料水を対象とした前処理条件を検討する必要があることに鑑みると、吸着剤や脱離溶媒の種類など、吸着脱離の条件を検討しても、日常的な分析業務に使用可能な分析方法を確立することは困難と考えられる。

このため、特殊な試料注入装置を用いてGC-MSに注入する試料液量を現在の1 µLから50～100 µLに増加させること、本年度実施したプリカーサーイオン分析から選択イオンモニタリングに分析方法を変更することによって、過度な前処理を必要としない分析方法を確立する必要がある。GC-MSへの試料液注入量の増加により25～50倍程度、選択イオンモニタリングへの分析方法の変更により5倍程度、総合して125～250倍程度の高感度化が見込まれ、TONが12分の1の5、濃縮倍率が3分の1の2,000倍であっても、3.5～6.9倍高感度分析が期待できる。

2. 生ぐさ臭原因物質の自動探索条件の検討

すでにFXの保持指標(RI)が1,692であることが明らかになっている。そこで、水道原水および培養液の濃縮・精製液を分析し、RI=1,692のマススペクトルを測定した。しかし、得られたマススペクトルは、サンプル毎に異なっていた。これは、GCカラムから共溶出したサンプル中の夾雑物のマススペクトルがFXのマスス

ペクトルと重なったこと、および夾雑物がサンプル毎に異なることが原因と考えられる。通常、マススペクトルを得るためには分析種の標準物質を用いた測定を実施するが、FXは構造が未確定であり、標準物質を準備することができない。

そこで、3種類の解析ソフトウェアを用いて異なるデコンボリューションアルゴリズムで夾雑物由来のイオンを除去した。その結果、 m/z 43, 123, 124, 193 の4個のイオンが比較的強い強度(1,900 count以上)で再現性良く観察された。また、それらの相対強度の算術平均の比は、21.8 : 100 : 9.9 : 11.9であった。得られたマススペクトルを図2に示す。

推定されるFXの構造からこれら4つのイオンが生成する機構を推定したところ、遠隔水素転移反応(RHR)、ラジカル共鳴(RR)、電子共有(ER)、電荷共鳴(CR)、 α 開裂反応(ACR)、単純誘起結合開裂(SIC)を経て生成すると推定された。FX1を例に、4つのイオンの生成機構の推定結果を図3に示す。

図2のマススペクトルとRIをAMDISのin-house databaseに登録することによって、FXの構造が未知あり、標準物質を用いた実験が実施できない状況であっても、FXが検出されたか否かを明らかにし、検出された場合にはFXの濃度に比例するピーク面積値を求めることができる。以上を実証するために、水道原水を濃縮・精製した試料3検体、およびウログレナの培養液を濃縮・精製した試料1検体の分析結果をAMDISで解析し、FXを自動探索した結果、すべての検体からFXを正しく検出し、ピーク面積値を求めることに成功した。そこで、AMDISのin-house databaseと化学物質探索システムを連携させた。化学物質探索システムとは、WEB上で稼働するシステムで、GC-MSで測定した結果をアップロードすることにより、半自動的に検出が示唆された物質の物質名やピーク面積値を、アップロードしたユーザーの画面上に表示させることができるシステムである。無償で利用可能であり、解析結果の利用に制限がないため、水道事業体による利活用が期待される。化学物質探索システムによるFXの検出結果の例を図4に示す。

3. 生ぐさ臭原因物質の構造推定

FXの候補構造のうち、アルキルケトンの炭素鎖長が6の構造について、量子化学的に生成可能なフラグメント(断片)イオンを探索した。それぞれの候補構造について64コアのCPUを2機用いて24~300時間計算した結果、表1に示すように、6,809個の安定(EQ)構造、11,983個の遷移状態(TS)構造、607個の分解物(DC)の構造が発見された。分解物とは、フラグメントイオンと中性ロスの組み合わせであり、EQ/TS/DCを結び付けたものが開裂反応経路である。発見された反応の大半は非開裂反応経路(異性化反応経路、変角反応経路、伸縮反応経路など)であった。開裂反応経路は、表2に示すように15経路発見された。これらの開裂反

応経路により生成するフラグメントイオンがGC/MSによる n_1 と n_2 の2回の繰り返し測定において実測マススペクトルから安定して観察されることを確認した。

発見された開裂反応経路のうち#14の経路は、図5に例を示したように、アルキルケトンの炭素鎖長が6の構造から発見されている。これに対してアルキルケトンの炭素鎖長が5の構造から m/z 99のフラグメントイオンは生成し得ないため、アルキルケトンの炭素鎖長が5の構造、すなわちFX3~6、11~14の8個の構造を否定可能であった。すなわち、候補構造を14種類から6種類に絞り込める可能性が示された。ただし、#14の反応経路のプロダクトイオンは m/z 125のみが算出されており、 m/z 99は算出されていない。このため、結論は m/z 99の算出を待つ必要がある。また、炭素鎖長が6のFX10は、計算レベルPM6-D3およびUB3LYP/6-31+G(d,p)で全経路計算を実施しても、開裂反応経路が発見されなかった。このことから、孤立電子対と単結合が入れ替わる立体配座異性化反応や原子の結合が入れ替わる転位反応が起こらないとFX10は開裂反応を起こさないと考えられる。このため、FX10を否定することができ、候補構造を5種類まで絞り込むことに成功した。

さらに候補構造を絞り込むために、準平衡理論(QET)に着目した。QETは、分析種が質量分析計内部でエネルギーを受けて分解する速度を求める理論である。マススペクトル上の2個のイオン強度比と、仮定した候補構造からQETにより算出されたイオンの強度比が一致しない候補構造は否定することができる。本年度は、FX2を対象に予備的な検討を行った。FX2の2つの開裂反応経路(#2と#14)に着目した。量子化学計算により求めた振動数とエネルギー障壁の高さは、 $3,672\text{ cm}^{-1}$ と 1.39 eV (#2)、 $1,100\text{ cm}^{-1}$ と 3.65 eV (#14)であった。これらの値とQETを用いて求めたイオン強度比は1:0.97であった。一方、マススペクトルに記録された実測のイオン強度比は1:0.01であり、大きく異なった。したがって、FX2を否定可能であったが、低い計算レベルでの検討であったため、今後、高い計算レベルでの検証が必要である。現時点での暫定的な絞り込み結果を図6に示す。

E. 結論

量子化学計算を用いて生ぐさ臭原因物質の構造を検討した結果、候補構造を14種類から4種類まで絞り込める可能性が示された。ただし、最終的な結論を得るためには、高い計算レベルでの全経路探索計算の終了を待つ必要がある。また、GC-MSを用いて生ぐさ臭原因物質を自動検出するための条件を確立した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

新福優太, 山下優輝, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏. LC/HRMS および GC/HRMS の組み合わせによる水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定. 第 69 回質量分析総合討論会; 2021 年 5 月; オンライン開催.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏. 水道水生ぐさ臭原因物質を自動検出するためのマススペクトルと保持指標の取得. 環境科学会 2021 年会; 2021 年 9 月; オンライン開催.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏. 量子化学計算による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定. ; 2022 年 3 月; 富山 (オンライン開催).

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

新福優太, ベストプレゼンテーション賞・ポスター発表部門, LC/HRMS および GC/HRMS の組み合わせによる水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 一般社団法人日本質量分析学会, 2021 年 5 月.

山下優輝, 第 56 回日本水環境学会年会優秀発表賞 (クリタ賞), 量子化学計算による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 公益社団法人日本水環境学会, 2022 年 3 月.

I. 謝辞

本研究を実施するにあたり, 京都市上下水道

局水質管理センター水質第 1 課の職員より, 試料水採取などで協力を受けた。また, 神奈川県企業庁水道水質センターの職員より, *Uroglena americana* 培養液の提供およびその前処理への協力を受けた。さらに, 計算の一部は, 東北大学のサイバーサイエンスセンターの計算機を用いて行われた。ここに記して謝意を表す。

J. 参考文献

1) 秋葉道宏, 岸田直裕, 下ヶ橋雅樹 (2014) 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 水道システムにおける生物障害の実態把握とその低減対策に関する研究 平成 25 年度総括・分担研究報告書.

2) Watson S.B., Satchwill T., Dixon E., McCauley E. (2001) Under-ice blooms and source-water odour in a nutrient-poor reservoir: biological, ecological and applied perspectives. *Freshwater Biology*, **46**, 1553-1567.

3) 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

4) Ohno, K. and Maeda, S. (2004) A Scaled Hypersphere Search Method for the Topography of Reaction Pathways on the Potential Energy Surface. *Chem. Phys. Lett.*, **384**, 277-282.

5) Maeda, S. and Ohno, K. (2003) A New Method for Constructing Multidimensional Potential Energy Surfaces by a Polar Coordinate Interpolation Technique. *Chem. Phys. Lett.*, **381**(1-2), 177-186.

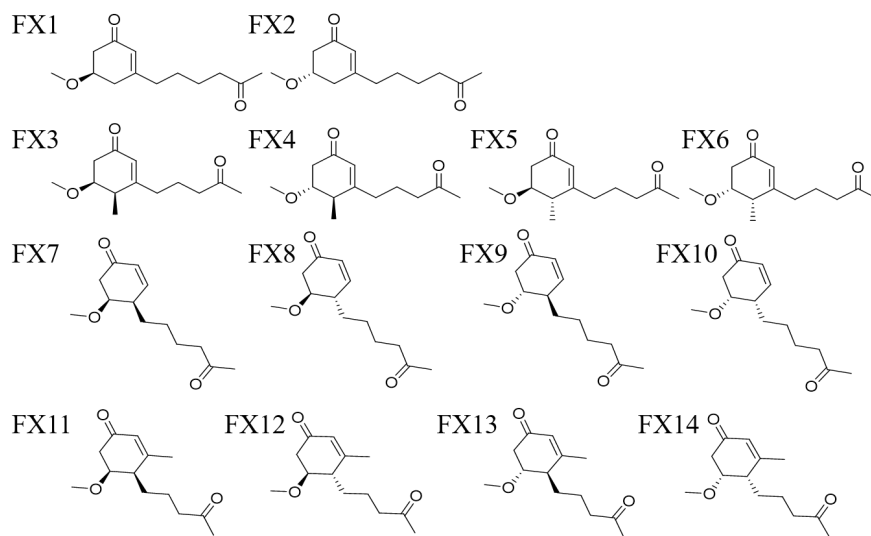


図 1 推定される FX の候補構造

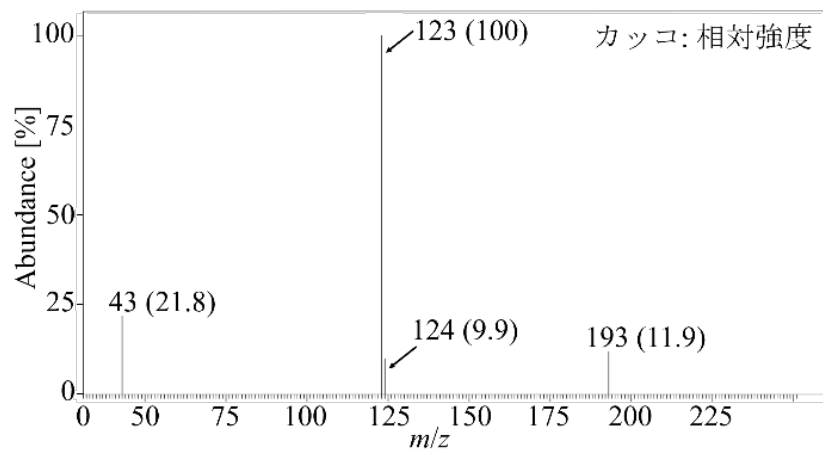


図 2 生ぐさ臭原因物質のマススペクトル

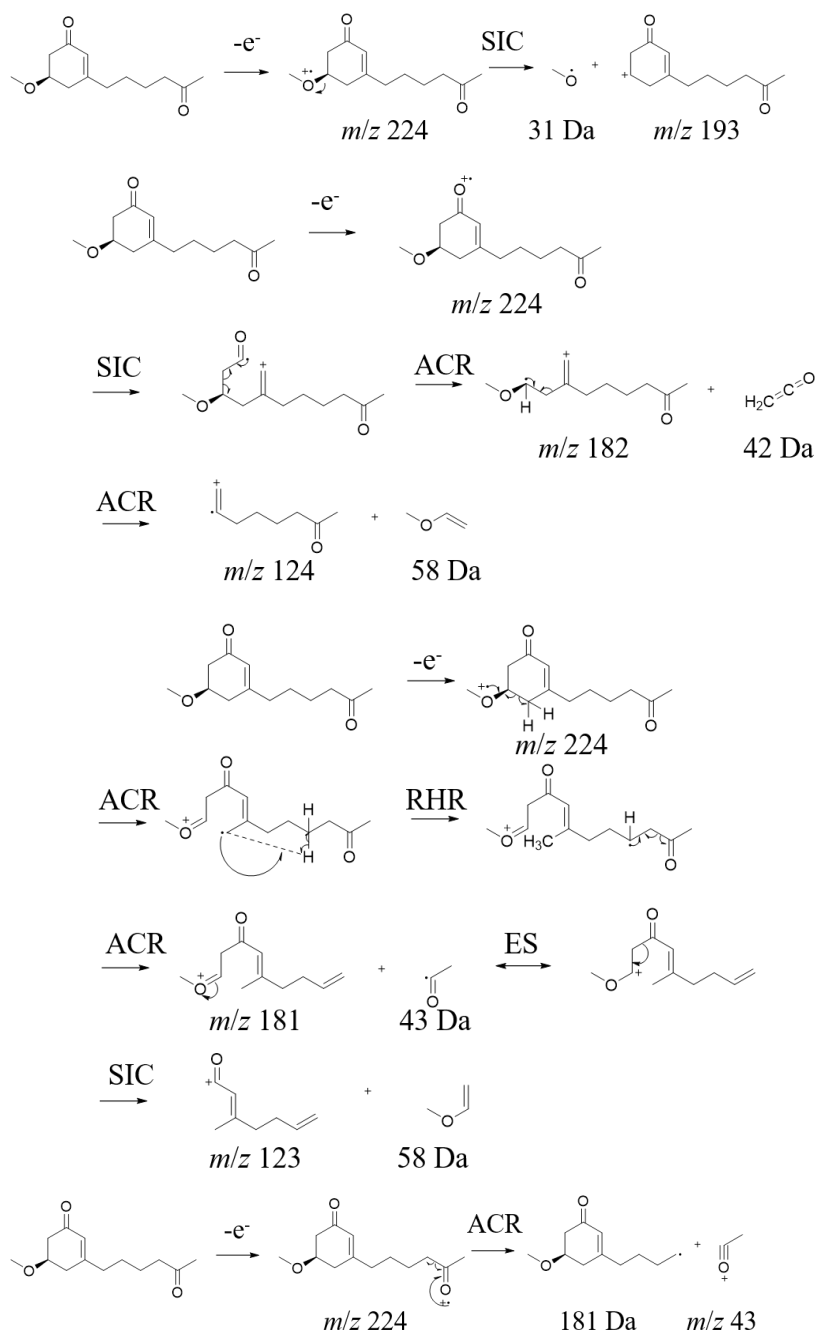


図3 生ぐさ臭原因物質の候補構造からのプロダクトイオン生成機構解析例

化学物質探索システム
A mass spectrometric exploration system for environmental chemicals

探索依頼 探索結果一覧

探索結果詳細

メタデータDL 測定データDL 測定結果データDL

受付番号	データ種別	登録年月日	採取時期	サンプル種類
202106250001	GC/MS	2021.06.25	2021.06	水温水

No	物質名	CASRN	分子式
1	Fishy smell X	0000-00-0	C13H20O3

原因物質を指す ↑
ダミー番号

No	物質名	CASRN	分子式
1	Fishy smell X	0000-00-0	C13H20O3

ピーク面積 → 180,768

ピーク面積[count]	硝化阻害活性ランク	日本国内での主な用途
180,768	分類できない	NITE-CHRIP

硝化阻害発生の応急処置 二次元格選

ChemSpider Explore Chemistry

その他情報

生物毒性	PRTR対象	化審法
-	-	-

図 4 化学物質探索システムを用いた生ぐさ臭原因物質の半自動検出例

表 1 計算時間と発見された EQ/TS/DC の数

計算対象構造	計算時間 [h]	EQ	TS	DC
FX1	300	1,504	2,885	152
FX2	240	1,088	1,903	104
FX7	300	1,386	2,313	125
FX8	240	1,451	2,552	120
FX9	240	1,380	2,380	106
FX10	24	0	0	0

EQ: 安定構造, TS: 遷移状態構造, DC: 分解物の構造

表 2 発見された開裂反応経路

#	mass	formula	実測マススペクトルからの検出 ^{a)}				候補構造からの予測結果 ^{b)}					
			mass	formula	n1	n2	FX1	FX2	FX7	FX8	FX9	FX10
1	15	CH ₃	82	C ₁₂ H ₁₇ O ₃	○	○	△	△	△	×	△	×
2	31	CH ₃ O	193	C ₁₂ H ₁₇ O ₂	○	○	△	△	○	△	△	×
3	43	C ₂ H ₃ O	181	C ₁₁ H ₁₇ O ₂	○	○	△	△	△	○	△	×
4	44	C ₂ H ₄ O	67	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	○	○	×	△	×	×	×	×
5	56	C ₃ H ₄ O	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	○	○	△	△	×	×	△	×
6	57	C ₃ H ₅ O	167	C ₁₀ H ₁₅ O ₂	○	○	△	×	×	×	△	×
7	58	C ₃ H ₆ O	166	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	○	○	△	×	△	×	△	×
8	70	C ₄ H ₆ O	154	C ₉ H ₁₄ O ₂	○	○	×	△	△	△	×	×
9	71	C ₄ H ₇ O	153	C ₉ H ₁₃ O ₂	○	○	△	×	△	△	×	×
10	72	C ₄ H ₈ O	152	C ₉ H ₁₂ O ₂	○	○	△	△	×	△	△	×
11	84	C ₅ H ₈ O	140	C ₈ H ₁₂ O ₂	○	○	△	△	△	×	△	×
12	85	C ₅ H ₉ O	139	C ₈ H ₁₁ O ₂	○	○	△	△	△	△	×	×
13	86	C ₅ H ₁₀ O	138	C ₈ H ₁₀ O ₂	○	○	×	×	×	△	△	×
14	99	C ₆ H ₁₁ O	125	C ₇ H ₉ O ₂	○	○	△	△	△	△	△	×
15	100	C ₆ H ₁₂ O	124	C ₇ H ₈ O ₂	○	○	×	×	×	△	△	×

a) ○: ≥ 30 count、×: < 30 count、b) ○: 検出/発見、△: 示唆、×: 未発見

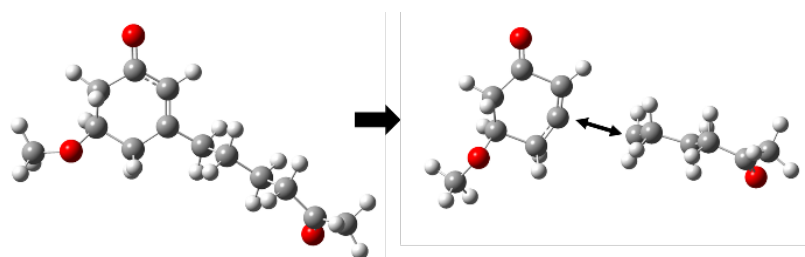


図 5 #14 の反応経路の例 (FX1)

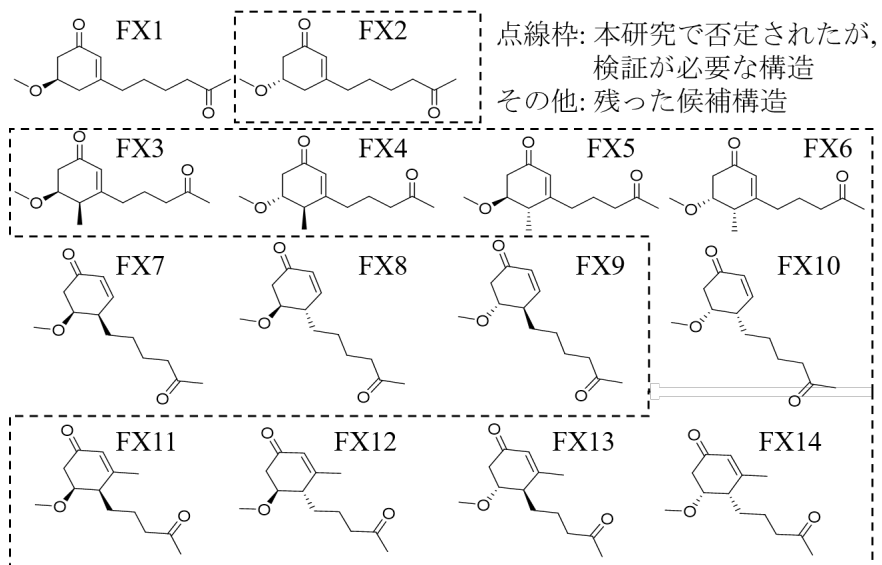


図 6 暫定的な絞り込み結果

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)
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化 に向けた研究
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 主任研究官

研究分担者 越後 信哉 京都大学大学院 地球環境学堂 教授

研究要旨

水道原水中の藻類の増殖等、原水水質の異常やその兆候を検知する技術が求められている。このことを踏まえ、溶存有機物 (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、下水処理水の混入を想定した模擬汚染水を用いて検討した。その結果、バックグラウンドの季節変動は観測されるが、異常が起こった際にそれらの変動の影響は、特異的なシグナルに注目することで、十分に回避可能と考えられた。

A. 研究目的

水道原水中の藻類の増殖等、原水水質の異常やその兆候を検知する技術が求められている。本研究では、特に精密質量分析により、迅速な原水水質の変動の検知を目指している。

今年度の研究は、環境水中の季節変動が精密質量分析を用いた異常の検出可能性に与える影響の確認を目的に、湖沼水を対象とした精密質量分析の結果に季節変動が与える影響についての確認を行った。過去の分析結果と現在の分析結果を照らし合わせて異常の検出を行う場合、水温等の季節変動による環境水中の構成物質の変化が分析を阻害する可能性が考えられる。そこで下水処理水後の放流水により溶存有機物 (DOM) の構成の変化を模擬し、環境水における季節変動が精密質量分析を用いた異常検知に与える影響についての確認を行った。

B. 研究方法

1. 試料

本研究において環境水として用いた試料は、琵琶湖・大津港、桂川・鳥羽水門 (下水放流水) (以下、それぞれ琵琶湖湖水、桂川河水) の2地点で取水を行った。また、各環境水サンプルは、取水後迅速にガラス繊維ろ紙 GF/F (孔径 0.70 μm , Whatman) で吸引ろ過を行い対象試料とした。ろ過後は冷蔵庫で保管し、測定時は室温に戻してから実験を行った。採水は、2021年2月、5月、10月、11月の4回行った。

2. バックグラウンドの季節変動の影響評価

複数日時に採水した環境水中に同一の下水処理水 (桂川河水) を混合し、ブランクサンプル (平時の環境水) との比較を行い、下水汚水の混合を検出できるか検討した。試料として、2021年2月1日、5月10日、10月6日、11月16日に採水した琵琶湖湖水及び10月6日に採水した桂川河水を用いた。これら4つの琵琶湖湖水に、桂川下水放流水口前で取水したサンプルを50%で混合した後に、PPLカートリッジを用いて100倍

に濃縮した。桂川河水は下水処理水放流口直下で取水しており、本実験においては下水処理水とみなセルと考えた。また、これらの桂川河水を混合し、濃縮を行ったサンプルについては模擬汚染水と表記する。ブランク試料として、琵琶湖湖水の4つのサンプルを同様にPPLカートリッジを用いて100倍に濃縮した。これらのブランクサンプル及び模擬汚染水に精密質量分析を行い、同日時に取水したサンプル同士を比較することで環境水における季節変動が精密質量分析の結果に与える影響について検討した。

また、季節変動の影響評価の他に、異常の検出下限の検討のために、2021年10月6日に琵琶湖において取水した琵琶湖湖水には、2021年10月6日に採取した桂川下水放流水口前で取水したサンプルを50%の他に10%、1%でも溶解し、同様の操作を行い、ブランクサンプルとの比較を行った。

3. 試料の前処理

精密質量の前に、試料の濃縮を行った。濃縮には近年溶存有機物の濃縮のための固相抽出のカートリッジとして一般的に用いられている逆相系のカートリッジである Bond Elut PPL カートリッジ (500 mg, 3 mL; Agilent Technologies, 以下、PPL カートリッジ) を用いた。PPL カートリッジは優れた抽出効率を有することが報告されており¹⁾、極性物質と非極性物質の両方を保持することができる²⁾。具体的な固相抽出の手順は以下の通りである。まずコンディショニングとして10 mLのメタノールを約1 mL/minで通液し、その後1 M HCl 20 mLを約1 mL/minで通液した。次に5 M HClを用いてサンプルをpH 2に調製し、コンセントレーターを用いてこのサンプル (0.1, 0.2, または1.0 L) を20 mL/minで通液した。その後カートリッジの内部を洗浄するために20 mLの1 M HClを約1 mL/minで通液し、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。これらの操作の結果、サンプル中のDOMを濃縮し、回収し

た。

4. 精密質量分析

精密質量分析は Orbitrap 質量分析計 (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific) を使用した。イオン化法は ESI のネガティブモードを用いて行った。サンプルの注入には付属の HPLC のポンプとオートサンプラーを用い、水とメタノールがそれぞれ 50% となるように 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ にて送液している状態で 10 μL 注入した。ただしカラムを用いた試料の分離は行わず、ランタイム (一回の分析時間) は 5 分とした。また分解能は 70,000 に設定、スキャン範囲を $m/z = 100-1500$ に設定して測定を行った。キャリブレーションは分析の直前に毎日行った。イオン化条件については、スプレー電圧を 4.5 kV、キャピラリー温度を 400 $^{\circ}\text{C}$ と設定した。分析条件を表 1 に示す。

上記の条件において精密質量分析を行うことで得られた精密質量スペクトルから得られた結果を用いて、差異解析を行った。解析ソフトウェアは Compound Discoverer 3.1.0.305 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。解析手法にはワークフローのうち、メタボロミクスを使用し、MS スペクトルのピーク強度が 500,000 を超えるものについて検出を行った。その他パラメーターは Compound Discoverer のデフォルト値を用いた。

さらに、解析手法としてボルケーノプロットを用いて解析を行った。ボルケーノプロットとは群間比 (fold change) と p 値 (有意水準の指標) の散布図であり、横軸が検出された物質の濃度の比を表し、縦軸が有意水準を表す。本研究においては群間比が 2 倍以上かつ p 値が 0.05 以下の物質について検出されたとした。また、異常検知の群間比についてその基準を 2 倍の他に、5 倍についても検討を行い、検出基準の設定が検出可能性に与える影響についても検討した。

C. および D. 研究結果及び考察

はじめに、各月の模擬汚染水とブランクサンプルである 10 月に取水した琵琶湖湖水を濃縮した試料との差異分析の結果を図 1 に示す。群間比がプラスの部分で示されている図右側の検出物質が、模擬汚染水と比較して琵琶湖湖水に多く検出された物質群である。従ってこれらの検出物質が季節変動によって変化した琵琶湖湖水中の構成物質の一部であると考えられる。それぞれの分析において季節変動による環境水中の変化として図右側で検出された物質の数を比較すると同日時 (10 月 6 日) の琵琶湖湖水を用いた場合では、ほとんど検出されていない一方で、そのほかの分析においては物質群が検出された。このことから季節変動による環境水中の構成物質の変化を精密質量分析が検知していることがわかる。また、模擬汚染水において琵琶湖湖水の濃度が希釈され、図右側において検出物質として群間比が 1/2 倍である箇所を中心に示されていると考えられる。

また、図 1 を見るとこれらの季節変動と比較し、群間比が負となっている図左側の模擬汚染水特有の物質群が、より高い群間比で検出されている。

検出物質数を表 2 に示す。また、ブランクサンプルである 10 月に採水した琵琶湖湖水との比較において検出された 135 物質の物質が他の分析の検出物と比較した場合に占めている物質の割合は、表 3 のようになり、いずれの分析においても 90% の検出物質は共通している。また、これらの 4 つの模擬汚染水から共通して検出された物質は 80 物質であり、これらが模擬汚染水特有の構成物質であると考えられる。これにより、検出物の多くは桂川河川水特有の物質であることがわかった。このことから、精密質量分析を用いた水道原水における分析は、環境水の季節変動による差異を検出するが、水道原水に異常が発生した場合にその季節変動に関わらず異常の検知に有用であることが示された。したがって異常が発生した場合の精密質量分析の結果を過去の同一地点における精密質量分析の結果と比較することで、季節変動は検出されるが、異常があった場合においては異常物質の検出が可能である可能性が指摘できる。

次により、現実的な条件を想定し、下水処理水の混合濃度が低下した場合における精密質量分析を用いた異常検知についての検討を行った。模擬汚染水における桂川河川水の濃度を 50% の他に 10%、及び 1% で混合し、上記と同様の実験方法で分析を行った結果を図 2 である。あわせて模擬汚染水特有と考えられる検出物質の総数を表 4 に示す、また、そのうち同一の検出物質の割合を表 5 に示す。桂川河川水を混合したサンプルのみで検出された物質の多くは先述の固有物質であったものの、検出物質数は濃度が下がることで低下した。

琵琶湖湖水に混合した模擬汚染水の割合を下げた場合の検出ピーク数の減少の理由を調査するため、2 月、5 月、10 月、11 月との全比較において模擬汚染水から検出された模擬汚染水特有と考えられる 80 物質について、低濃度の分析におけるピークエリアについて検討をした。共通して検出された 80 物質が、50% で下水処理放流水を混合した模擬汚染水を分析した際に得られた各物質のピークエリアと、10% 及び 1% で下水処理放流水を混合した模擬汚染水を分析した際に得られた各物質のピークエリアとの比率のプロットを行ったのが図 3 である。この結果より、それぞれの物質は検出されていないわけではなく、濃度が下がるにつれてそのピークエリアは低下するものの、イオン化され、かつ検出されていることがわかった。従って、検出及び不検出は比較する琵琶湖湖水におけるピークエリアに依存することがわかる。図 4 において上記の 80 物質についてブランクサンプルである琵琶湖湖水において精密質量分析を行った結果検出された物質のピークエリア強度の分布を示す。この結果より、模擬汚染水から検出されたほとんどのピークエリアのオーダーは変わらないものの、琵琶湖湖水の分析によって得られたそれらの物質のピークエリアは、 10^4 から 10^7 とばらつきが大きいことがわかった。このことから検出可能性は、検出する物質それぞれの河川中に存在する濃度に依存することが示唆された。従って、精密質量分析を用い

た DOM の動向の異常検知手法を検討する際に、異常発生時の検知手法のみに努めるのではなく、平常時にそれらの物質がどの程度の濃度で存在するかについての知見を蓄積することが重要であると考えられる。

なお、今回の一連の実験では、ピーク検出のしきい値を比較的高く設定しているが、それを下げることでより、それぞれの水質異常に特異的な物質（ピーク）を検出できるものと考えられた。

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、下水処理水の混入を想定した模擬汚染水を用いて検討した。その結果、季節変動は精密質量分析を用いることで観測されるが、異常が起こった際にそれらの変動の影響は、特異的なシグナルに注目することで、十分に回避可能と考えられた。

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

I. 参考文献

1) Dittmar, T., Koch, B., Hertkorn, N. and Kattner, G.(2008) A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater, *Limnology and Oceanography: Methods*, 6(6), 230–235.

2) Chen, M., Kim, S., Park, J.-E., Kim, H. S. and Hur, J. (2016) Effects of dissolved organic matter (DOM) sources and nature of solid extraction sorbent on recoverable DOM composition: Implication into potential lability of different compound groups, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408, 17, 4809–4819.

表 1 分析条件まとめ

LC 部	機種	UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific)
	移動相	A液：メタノール,B液：水(それぞれ50%)
	注入量(μL)	10
	流量(μL/min)	200
分離カラム		なし
MS部	機種	Q Exactive (Thermo Fisher Scientific)
	スキャンタイプ	Full MS
	ランタイム(min)	5
	イオン化法	ESI ⁻
	スキャン範囲	100-1500
	解像度	70000
	AGCターゲット	3x10 ⁶
	最大注入時間(ms)	100
	シースガス流量(L/min)	45
	Auxガス流量(L/min)	10
	スweepガス流量(L/min)	2
	スプレー電圧 (kV)	4.5
	キャピラリー温度(°C)	400
	S-レンズRFレベル	50
Auxガスヒーター温度(°C)	400	

表 2 模擬汚染水由来と考えられる検出物質数

試料	Log2 Fold Change	
	> 1	> 2.3
2月	112	87
5月	109	80
10月	135	105
11月	94	73

表 3 模擬汚染水由来と考えられる検出物質中の同一検出物質数とその割合

	検出物質数	同一の検出物質数	同一の検出物質数の割合
10月	135	135	-
2月	112	102	91%
5月	109	99	91%
11月	94	88	94%

表 4 群間比 2 倍及び 5 倍を検出基準に設定した場合の模擬汚染水由来と考えられる検出物質数

	Log2 Fold change			
	< -1	> 1	< -2.3	> 2.3
模擬汚染水10%	74	2	36	1
模擬汚染水1%	18	3	1	2

表 5 群間比 2 倍及び 5 倍を検出基準に設定した場合の模擬汚染水由来と考えられる検出物質数のうち、同一の検出物質数の割合

	検出物質数	同一の検出物質数	同一の検出物質数の割合
50%	135	135	-
10%	74	67	91%
1%	18	10	56%

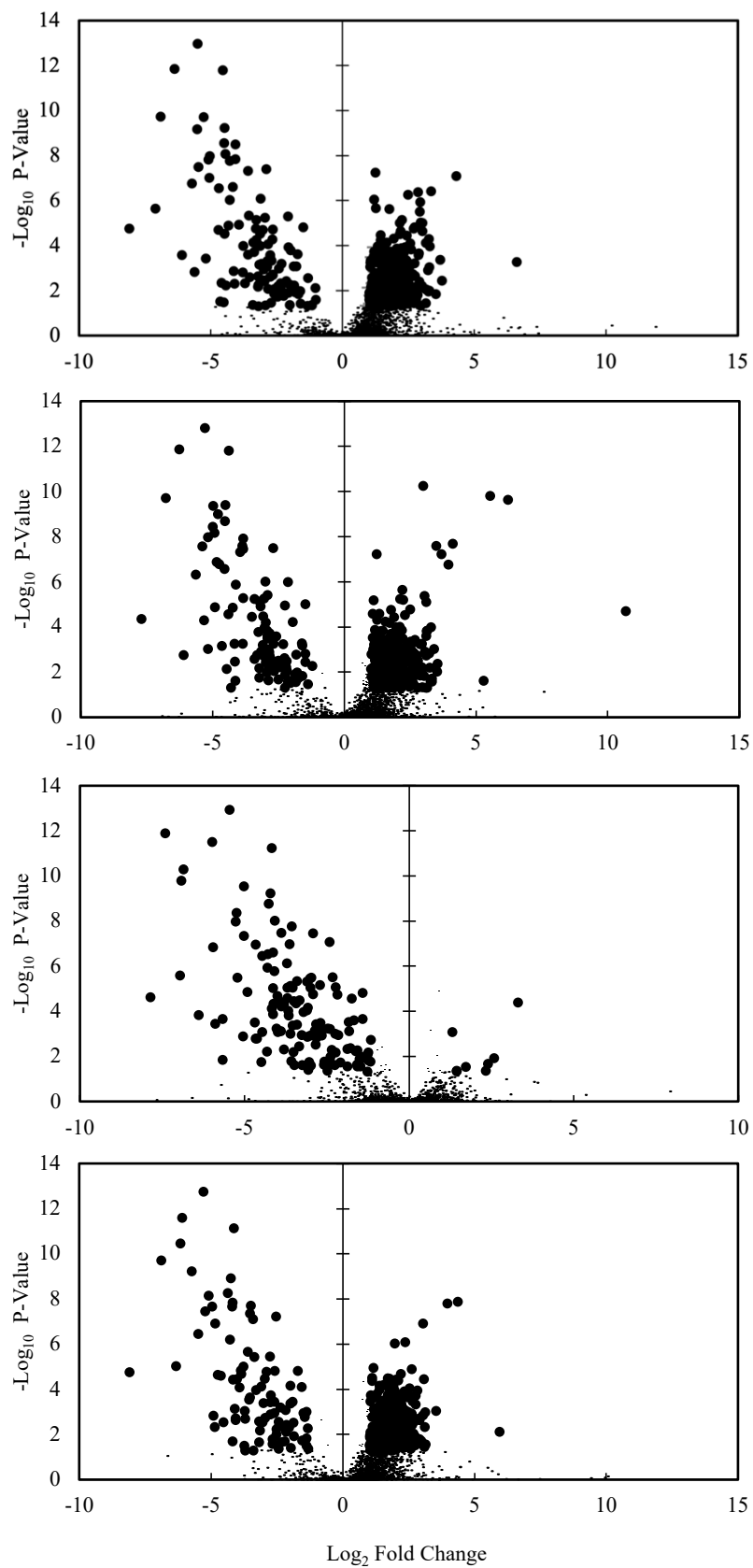


図1 下水処理水の混入の検知に対するバックグラウンドの影響（上から，2，5，10（下水処理水はこの水と混合），11月の琵琶湖湖水を基準とした解析）

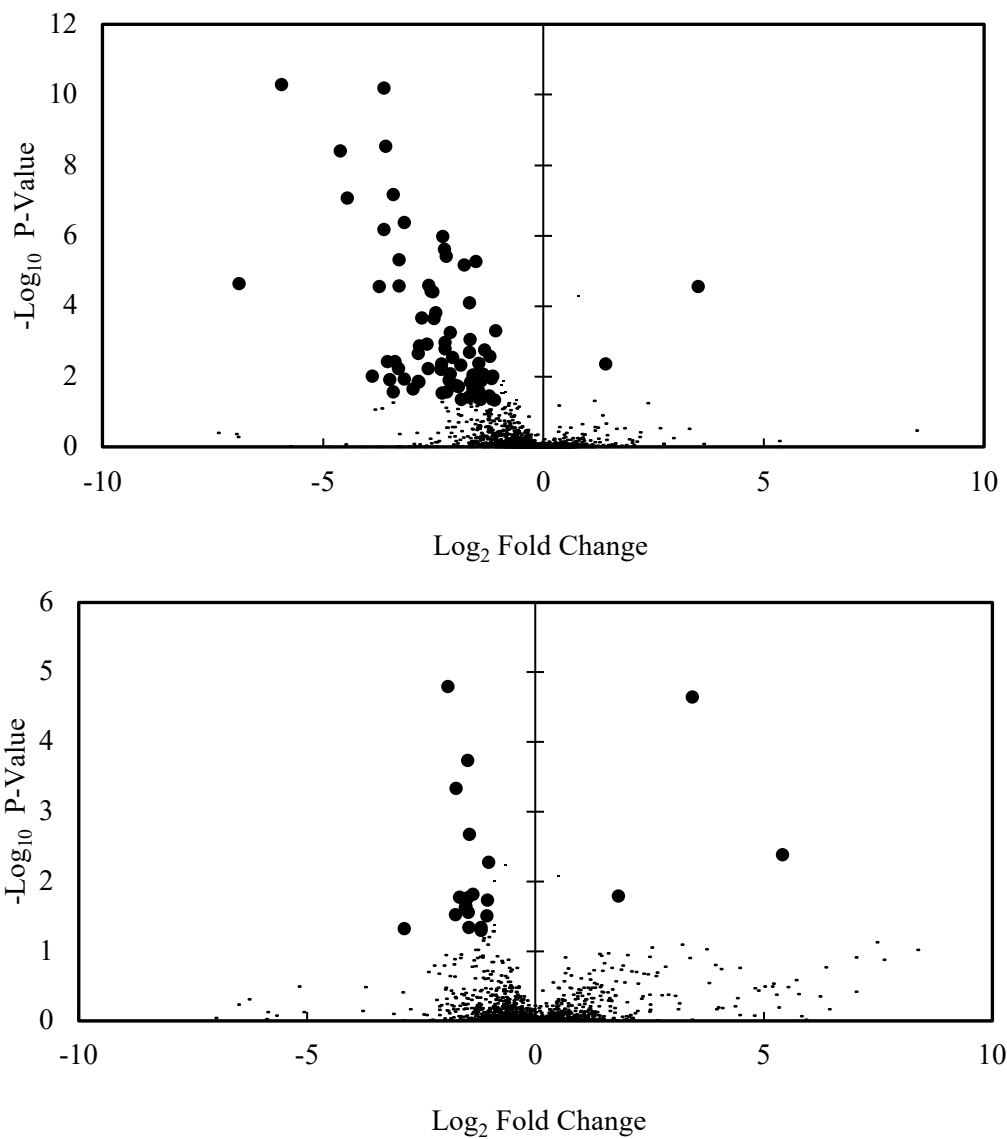


図2 下水処理水混入の検出（左上のプロットが下水処理水由来物質の検出，上段：10%，下段：1%）

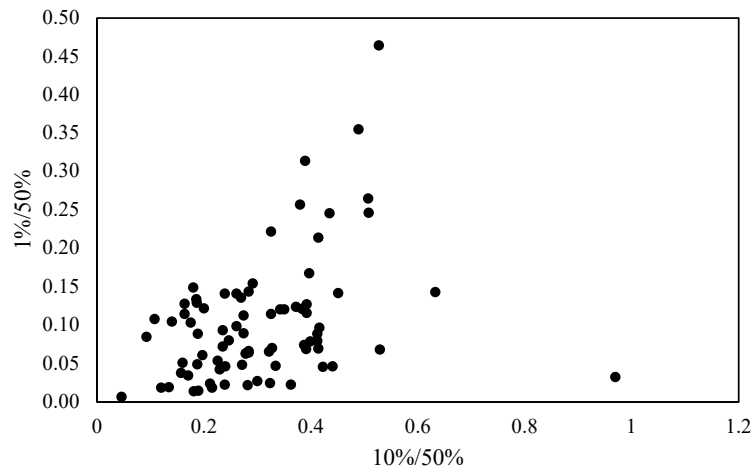


図3 50%で混合した模擬汚染水から得られた各物質のピークエリアと、10%及び1%で混合した模擬汚染水から得られた各物質のピークエリアの比率

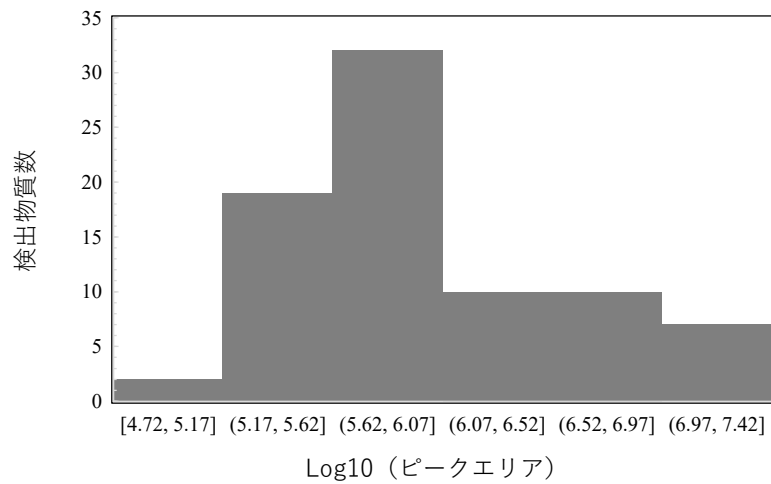


図4 琵琶湖湖水中において検出された物質のピークエリアの分布

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	仲門	拓磨

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)
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
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 主任研究官
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 仲門 拓磨 国立保健医療科学院 生活環境研究部 研究生

研究要旨

粉末活性炭による 2-MIB の効率的除去に向けて、前段処理による粉末活性炭処理への吸着競合影響の低減について検討を行った

腐植物質（琵琶湖フルボ酸）を用いて有機物濃度と粉末活性炭処理による 2-MIB 除去率の関係について確認したところ、0.1 mgC/L 程度の有機物濃度でも吸着競合が生じることが確認された。

またオゾン-活性炭処理を含む浄水処理の工程水を用いて、2-MIB 除去率を評価した結果、高分子有機物の除去に有効な凝集沈澱、急速ろ過処理では吸着競合の改善が見られなかった一方で酸化処理、吸着処理ではわずかではあるが吸着競合の改善が確認された。ただし、酸化処理については前段における高分子有機物の除去が重要であることが指摘された。

以上より、吸着競合影響の低減には低分子有機物の除去が重要であり、それらを対象とした吸着剤や凝集剤の開発が必要であることが指摘された。

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。

今までの研究より、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など少しずつ特徴が明らかになりつつある。一方、粉炭処理の効果を向上させる取り組みについては取り組み自体は限定的である。

以上の背景を踏まえ、本研究では粉末活性炭による 2-MIB の効率的除去に向けて、前段処理による粉末活性炭処理への吸着競合影響の低減について検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象試料

粉炭処理での競合有機物濃度を把握するために、吸着競合の原因物質の一つとして明らかになっている腐植物質（琵琶湖フルボ酸 JHSS 参照試料）を用いた。

オゾン-活性炭処理を導入している A 浄水場の原水並びに各処理工程水（凝集沈澱処理水、急速ろ過処理水、オゾン処理水、活性炭処理水）を粉炭処理試験用として採水依頼した。各採水試料は、冷蔵で郵送後、試料調整前まで 4℃で保存した。

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

市販の木質系粉炭で、50%粒子径 15 μm、細孔表面積 1,162 m²/g（窒素吸着、BET）、ミクロ孔（孔径<2 nm）0.472 cm³/g、メソ孔（孔径 2~50 nm）0.082 cm³/g、マクロ孔（孔径>50 nm）0.016 cm³/g、0.41 nm に細孔容積ピーク（窒素吸着、HK プロット）を有するものを使用した。前処理として、110℃にて 3 時間処理し、使用時までデシケータにて保管した。

超純水を用いた実験や希釈には、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。

琵琶湖フルボ酸試料については、濃度が 0（超純水使用）、0.01、0.1、0.3、0.5、1.0、3.0 mgC/L となるように段階希釈し、pH7.0-7.5、電気伝導率 17.5±2.5 mS/m となるように調製した。

調製フルボ酸試料、原水、処理工程水試料について、2-MIB 保存溶液を添加し、最終 2-MIB 濃度を 100 ng/L とした。これらの調製試料は容量 50 mL の茶透明摺合せ遠沈管（IWAKI）に 50 mL 取分けた。次に、粉炭懸濁液（0.51 mg/mL）を作製し、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℃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中

の残留 2-MIB 濃度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) を用いて測定した。また、対照として粉炭を添加せずに超純水 1 mL を加え、上記と同様の操作を行った。対照ろ過水の 2-MIB 残留濃度を初期濃度とし、粉炭処理後の 2-MIB 残留濃度から 2-MIB 除去率を算出した。なお、上記の実験は室温・水温を 20 °C に設定し実施した。

2-MIB の粉炭による吸着に影響を与える成分を推定するため、全有機炭素 (TOC) 濃度、254 nm 吸光度 (UV254) 及び 3 次元蛍光スペクトル (Excitation-Emission Matrix, EEM) を測定した。

C. 研究結果および D. 考察

琵琶湖フルボ酸濃度と 2-MIB 除去率の関係について図 1 に示す。有機物濃度の変化に応じて、2-MIB 除去率が変動していることがわかる。0.01 mgC/L では超純水での除去率とほぼ同程度であったが、0.1 mgC/L レベルまで濃度を上げると 2-MIB 除去率の低下が確認され、吸着競合が生じていると考えられる。本調査では、0.01 - 0.1 mgC/L での変化を確認できていないため、吸着競合が生じる正確な有機物濃度は把握できていないが、一つの基準として 0.1 mgC/L レベルで吸着競合が生じることが明らかとなった。

続いて、各処理工程水での 2-MIB 除去率の変化について検討した。各処理工程水の水質測定結果を表 1 に示す。EEM データについては、図 2 に示す通りである。TOC 濃度については、原水-凝集沈澱-急速ろ過を経ることで濃度が低下していることが確認された一方で、オゾン処理-活性炭処理では濃度の変動は確認されなかった。一方で、UV254 あるいは EEM データでは、各処理工程を経ることで強度の低下が確認された。2-MIB 除去率については、原水-凝集沈澱-急速ろ過では除去率に変化はなかった一方で、オゾン処理、活性炭処理では若干ではあるが除去率の上昇が確認された (図 3)。

粉炭処理への吸着競合の影響が大きい有機物の特徴として 1000 Da 未満の低分子有機物を取り上げられている¹⁾。しかし、凝集では高分子有機物の除去が主である²⁾ことから、その後の沈澱、急速ろ過処理でも高分子有機物の除去が主であると予想され、吸着競合の影響を低減できなかったと推察される。しかしながら、本調査の結果より、低分子有機物を高分子化できた場合には吸着競合の影響を改善できる可能性があると考えられる。

オゾン処理では有機物が酸化処理により分解され、有機物が親水化することから、吸着競合の影響を低減させる効果があると考えられる。本調査でも、除去率が上昇したことから、芳香族化合物、フミン物質が減少し、粉炭による 2-MIB 除去が改善されたと推察される。一方、スワニー川のフミン酸試料にオゾン処理を行った場合には、反応初期段階でフミン酸の低分子化が生じ、逆に 2-MIB との競合作用を強めることが指摘されている³⁾。本調査ではオゾン処理の前段で凝集沈澱-急速ろ過処理を行っていることから、高分子有機物が大きく除去されている状況下でのオゾン処理

の効果となる。そのため、高分子有機物が除去されていない状況下では、高分子有機物の低分子化が生じ、粉炭による 2-MIB 除去が改善されない可能性がある。そのため、2-MIB 除去の改善目的で酸化処理を前処理として行う場合は、高分子有機物の除去との組み合わせが必要であるといえる。

活性炭処理では、2-MIB 除去の改善がわずかであるが確認された。活性炭処理では、活性炭自体が持つ吸着効果と活性炭に生息する微生物による有機物分解効果が考えられ、2-MIB 除去の改善効果は活性炭自体が持つ吸着効果によるものと推察される。しかし、活性炭処理の前段がオゾン処理であることから、親水化した有機物の割合が高い試料に対する除去となる。すなわち、活性炭に吸着しやすい疎水性有機物の存在割合が低い状況となる。そのため、2-MIB 除去の改善効果としては限定的であったと推察される。

以上より、粉炭による 2-MIB 除去を改善するためには、低分子有機物を除去可能な吸着処理あるいは、低分子有機物を高分子化する処理が有効であると考えられる。将来的に 2-MIB 除去を改善するためには、上述した対策については、活性炭処理の併用や低分子有機物に対応する吸着剤、凝集剤の開発などの技術開発が重要となる。

E. まとめ

本研究では粉末活性炭による 2-MIB の効率的除去に向けて、前段処理による粉末活性炭処理への吸着競合影響の改善について検討を行った。得られた知見を以下に示す。

- ・粉末活性炭処理による 2-MIB 除去に対する水中有機物の吸着競合について、腐植物質 (フルボ酸) では 0.1 mgC/L の有機物濃度から吸着競合が生じることが示された。

- ・高分子有機物を除去可能な凝集沈澱、急速ろ過処理では粉末活性炭処理による 2-MIB 除去率は改善できないことを示した。

- ・有機物を分解、親水化可能なオゾン処理は、2-MIB 除去改善に有効であったが、前段に高分子有機物を除去可能な処理と組み合わせる必要があることを指摘した。

- ・活性炭処理では、2-MIB 除去の改善効果は活性炭自体が持つ吸着効果であると考えられたが、前段処理がオゾン処理であったため、その効果が限定的であることを指摘した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

三好太郎, 早坂俊一, 浅田安廣, 秋葉道宏. 2-メチルイソボルネオール除去への粉末活性炭混合注入方式の適用性評価. 令和 3 年度日本水道協会全国会議; 2022 年 2 月; オンライン (配信). 令和 3 年度全国会議 (水道研究発

表会).

仲門拓磨, 浅田安廣, 三好太郎, 秋葉道宏, 増田貴則. 粉末活性炭処理による 2-MIB 除去に対する藻類由来有機物が及ぼす影響. 第 56 回日本水環境学会年会; 2022 年 3 月; 富山 (オンライン開催).

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) 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 (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 (2-MIB) の粉末活性炭への非平衡吸着. 水道協会雑誌, 89(6), 2-10.
- 2) 李富生, 海老江邦雄, 東義洋, 湯浅晶, 萩下隆, 松井佳彦 (2000) 水の pH が凝集後に残留するフミン質の活性炭吸着特性に及ぼす影響, 水道協会雑誌, 69(11), 9-19.
- 3) Wang, Q., Zietzschmann, F., Yu, J., Hofman, R., An, W., Yang, M., Rietveld L. C. (2020) Projecting competition between 2-methylisoborneol and natural organic matter in adsorption onto activated carbon from ozonated source waters, Water Research, 173, 115574.

J. 謝辞

A 浄水場から水道原水、処理工程水のご提供をいただきました。記して謝意を表します。

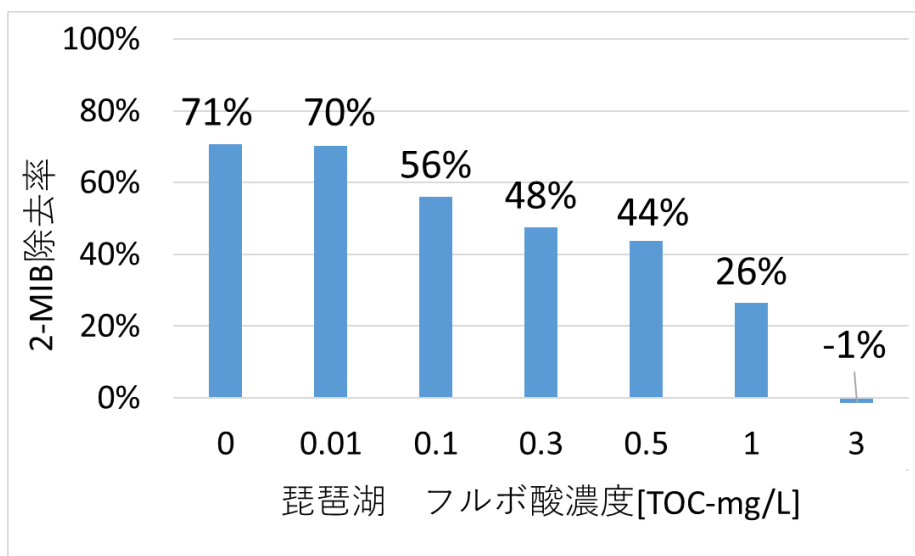


図 1 琵琶湖フルボ酸濃度と粉炭処理による 2-MIB 除去率の関係

表 1 各処理工程水の水質測定結果

	原水	凝集沈澱処理	急速ろ過処理	オゾン処理	活性炭処理
TOC[mg/L]	2.2	1.5	1.1	1.0	1.0
UV254nm 吸光度	0.237	0.140	0.105	0.070	0.057

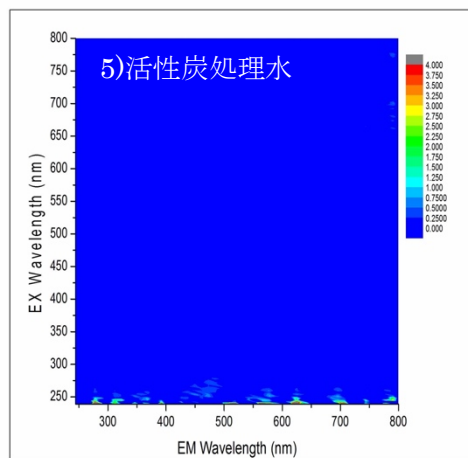
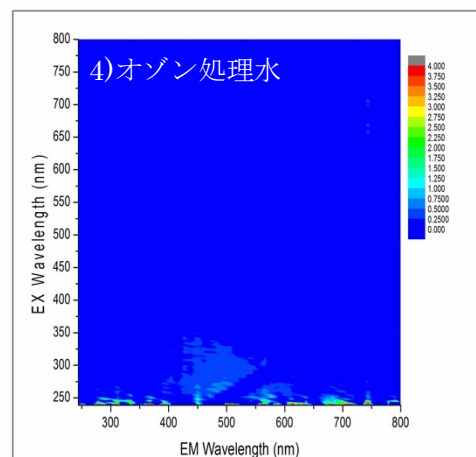
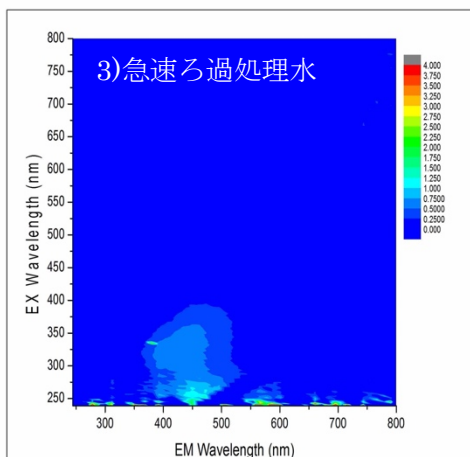
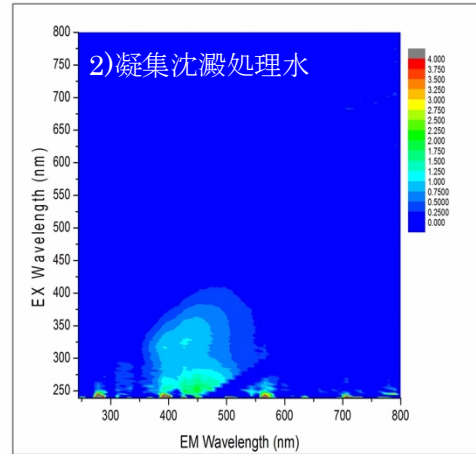
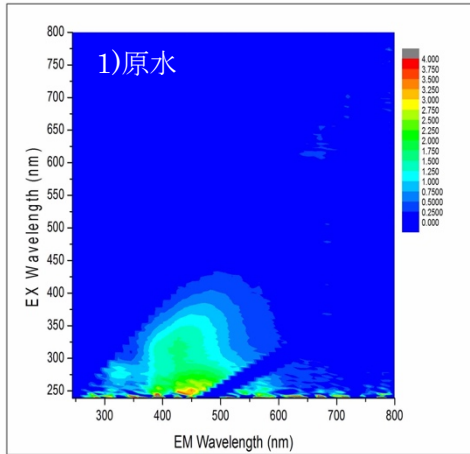


図2 各処理工程水の EEM データ

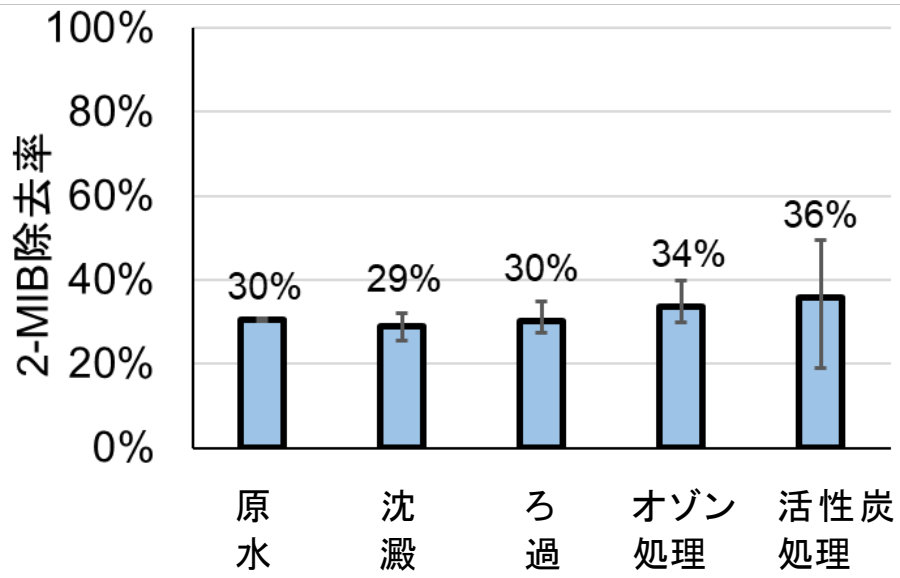


図3 各処理工程水に対する粉炭処理による2-MIB除去率

気候変動により生じる生物障害等リスク
に対する対応策の検討

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)
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
分担研究報告書

研究課題：気候変動により生じる生物障害等リスクに対する対応策の検討

研究分担者 柳橋 泰生 福岡大学 工学部 教授

研究要旨

地球温暖化の影響と考えられる水道原水の水質悪化事案として、集中豪雨の頻度・規模の増加による濁度の上昇の問題がある。九州北部地域では、2017年の九州北部豪雨以来、毎年のように豪雨が発生しており、水道事業者では濁度管理に苦労している。このため、豪雨等による水道原水の濁度上昇が発生した水道事業者における対応策等について聴取したところ、経験的に水源河川の水位を観察し原水濁度の管理に役立てているとの情報を得たため、データに基づき相関解析を行った上で、河川水位の長期間の変化の状況と気候変動の関係について考察した。その結果、水道の原水濁度と水源の水位に比較的高い相関があることが示され、豪雨時に水道において原水濁度の監視とともに、水源河川の水位を注視することが有効であることが示された。また、降雨強度および河川水位の長期的変化を解析したところ、降雨強度は増加傾向にあり気候変動との関係が考えられたが、河川水位については河川により傾向が異なり河川施設等種々の要因の関与が示唆された。

A. 研究目的

地球温暖化の影響と考えられる水道原水水質悪化の例として、集中豪雨の頻度・規模の増加による濁度の上昇の問題がある。将来的にも水害頻度の増加等が予想されることから、そのリスクに対して適応可能な水道システムを考え、安全で安心な水供給を実現する必要がある。九州北部地域では、2017年の九州北部豪雨以来、毎年のように豪雨が発生している。このため、豪雨等による水道原水の濁度上昇が発生した水道事業者における対応策等について情報収集を行い、水源河川と水道原水の濁度の関係について相関を解析した上で、河川水位の長期間の変化の状況と気候変動の関係について考察した。

B. 研究方法

筑後川中下流部に位置する水道事業者から豪雨・出水時の濁度管理について情報を収集したところ、経験的に水道原水の濁度上昇の監視手段として水源となっている河川の水位の変化を利用しているとのことであった。このため、豪雨・出水時の水道原水の濁度等の水質および取水口の水位に関する詳細なデータの提供を受け、相関関係を解析した。また、河川水位については、気候変動の影響を見ることができると考えられる長期間のデータベースが構築されており¹⁾²⁾³⁾、九州地方の3河川について河川水位の変化について解析し、降雨データも含め、気候変動との関係を考察した。

C. 研究結果およびD. 考察

筑後川中下流部に位置する水道事業者における2018年、2019年、2020年および2021年に発生した豪雨時における取水ポンプ井水位と原水濁度の関係を図1および図2(2018年の例)に示した。4回の豪雨時全体のポンプ井水位と原水濁度の関係を2次式で近似したところ⁴⁾、決定係数 R^2 は0.64と比較的高かった。各年の豪雨時における決定係数 R^2 は、0.94(2018年)、0.87(2019年)、0.52(2020年)、0.56(2021年)であった。4回の豪雨時も濁度250に達しており、その時のポンプ井水位は、年により4~9mと差があった。時期に関係なく水位により原水濁度が予測できるとは言えないものの、各豪雨時には水位および濁度は連続的に変化することから、豪雨・出水時に濁度とともに水位を連続監視することは濁度管理を行う上で有効と考えられた。

九州地方の筑後川、遠賀川、大淀川について日水位の変化を図3から図5に示す。途中欠測期間はあるが、筑後川および遠賀川は1960年以降、大淀川は1928年以降のデータが存在する。国土交通省筑後川河川事務所によると、筑後川片ノ瀬水位観測所は1981年1月1日に標準高が変更されており、1980年以前のデータは補正(4.53m加算)した。一つの目安として、日水位がはん濫注意水位および水防団待機水位を超過した回数について10年毎の年代別推移を図6および図7に示した。筑後川および遠賀川については、高い水位となる日数が長期的に減少する傾向にある一方、大

淀川については増加する傾向がみられた。気候変動により高水位の日数が増加することが想定されたが、解析対象とした河川の様相は区々であった。

気候変動による影響をより直接的に示すものとして強雨強度が強くなることが考えられる。このため、筑後川、遠賀川および大淀川流域の代表的地点（朝倉、飯塚、宮崎）の時間最大降水量の年次推移を整理し^{5,6,7)}、図8（筑後川の例）に示した。程度の差異はあるが、3地点とも年間の時間最大降水量が増加している傾向があった。以上のことから、水位については、影響を与える要因として、ダム等の建設・運用状況等も考えられ、それらの施設の気候変動適応策としての可能性も示唆された。

E. 結論

最近頻発している豪雨時のデータを解析したところ、水道の原水濁度と取水施設の水位に比較的高い相関があることが示され、豪雨時に水道において原水濁度の監視とともに、水源河川の水位を注視することが有効であることが示された。また、降雨強度および河川水位の長期的変化を解析したところ、降雨強度は増加傾向にあり、気候変動との関係が考えられたが、河川水位については河川による傾向が異なり、河川施設等種々の要因の関与が示唆された。

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) 国土交通省，水文水質データベース，片ノ瀬水位・流量観測所，<http://www1.river.go.jp/cgi-bin/SiteInfo.exe?ID=309061289901130>.

2) 国土交通省，水文水質データベース，中間水位・流量観測所，<http://www1.river.go.jp/cgi-bin/SiteInfo.exe?ID=309011289902070>.

3) 国土交通省，水文水質データベース，柏田水位・流量観測所，<http://www1.river.go.jp/cgi-bin/SiteInfo.exe?ID=309141289916080>.

4) 田村隆雄，山下瑛人，武藤裕則，雨量・水位データと流出モデルを用いた水位流量曲線作成法の実用性，土木学会論文集 B1, 69(4)517-522, 2013.

5) 気象庁ホームページ，過去の気象データ検索，福岡県朝倉，https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/annually_a.php?prec_no=82&block_no=0788&year=&month=&day=&view=.

6) 気象庁ホームページ，過去の気象データ検索，福岡県飯塚，https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/annually_s.php?prec_no=82&block_no=47809&year=&month=&day=&view=.

7) 気象庁ホームページ，過去の気象データ検索，宮崎県宮崎，https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/annually_s.php?prec_no=87&block_no=47830&year=&month=&day=&view=.

J. 謝辞

本研究を進めるに当たり、福岡県南広域水道企業団の協力を得ました。記して謝意を表します。

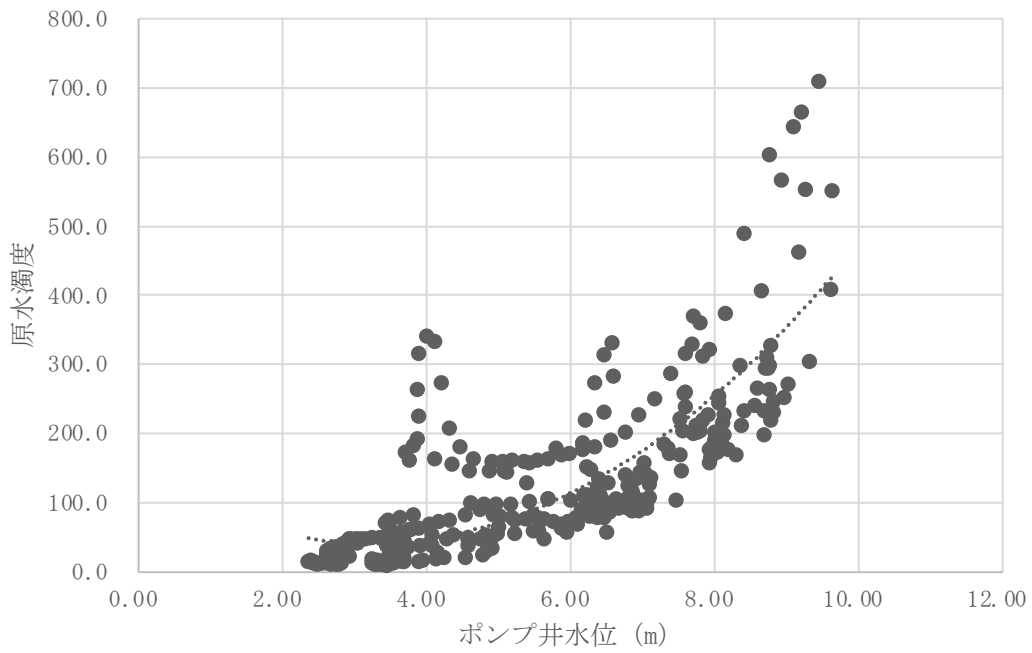


図1 筑後川中下流を水源とする水道事業体におけるポンプ井水位と濁度の関係
(2018年、2019年、2020年、2021年の豪雨時のデータによる)

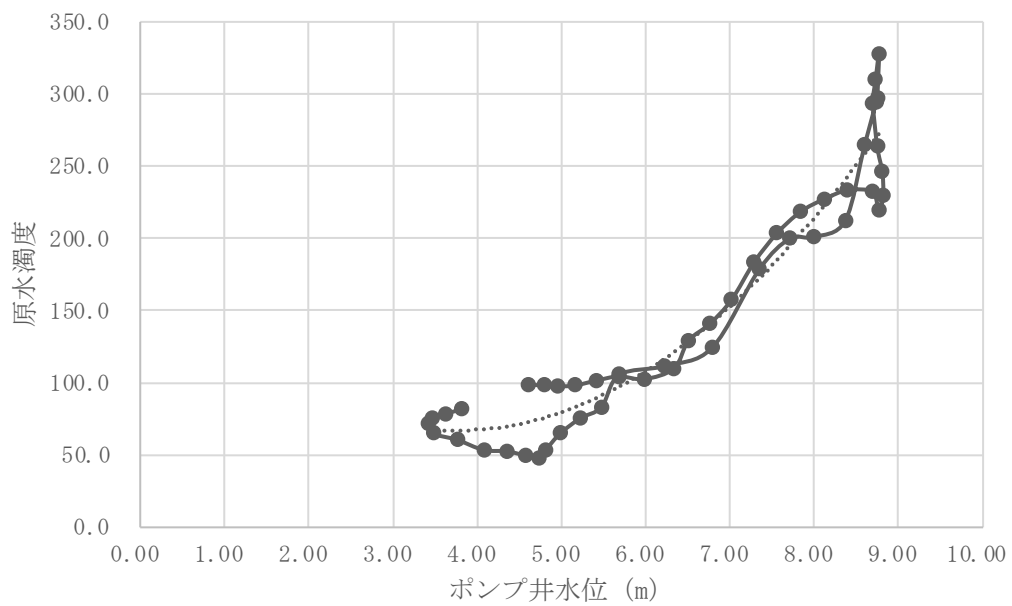


図2 筑後川中下流を水源とする水道事業体におけるポンプ井水位と濁度の関係
(2018年7月6日～7日)

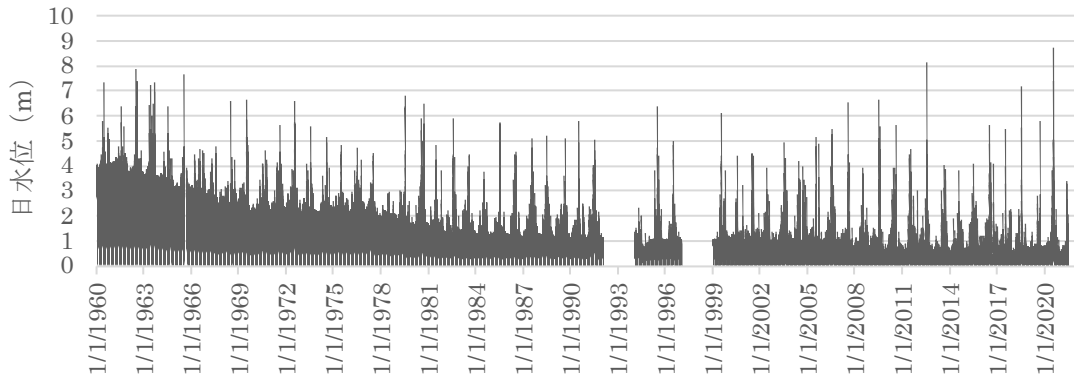


図3 筑後川（片ノ瀬観測所）の日水位の変化

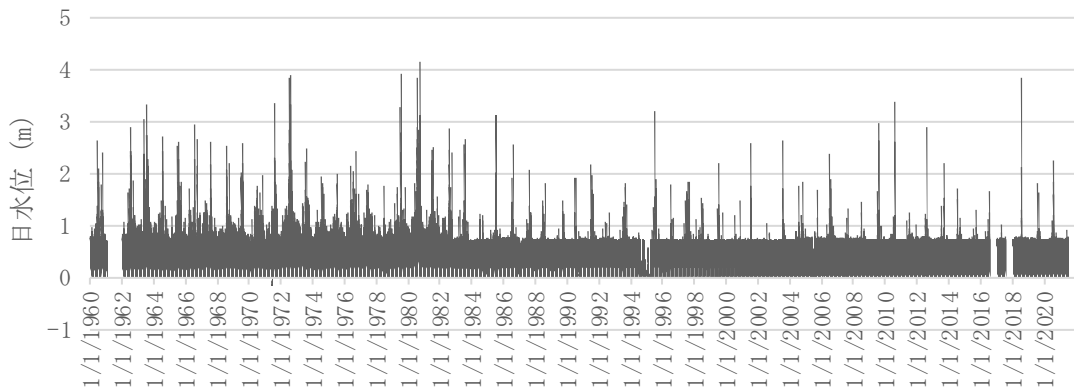


図4 遠賀川（中間観測所）の日水位の変化

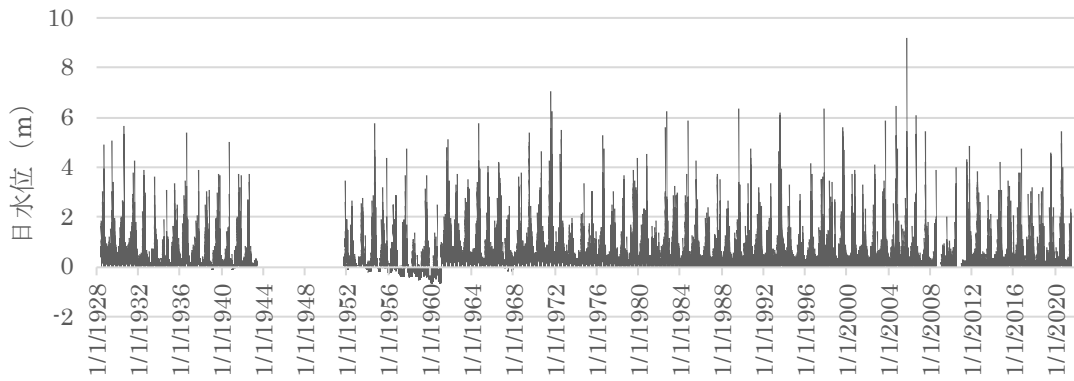


図5 大淀川（柏田観測所）の日水位の変化

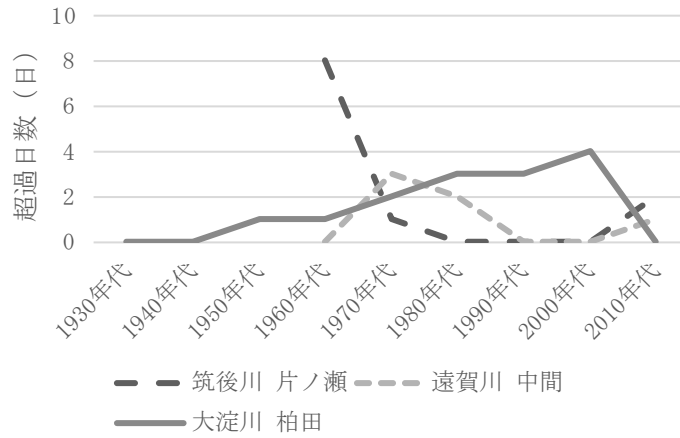


図6 日水位がはん濫注意水位を超過した日数

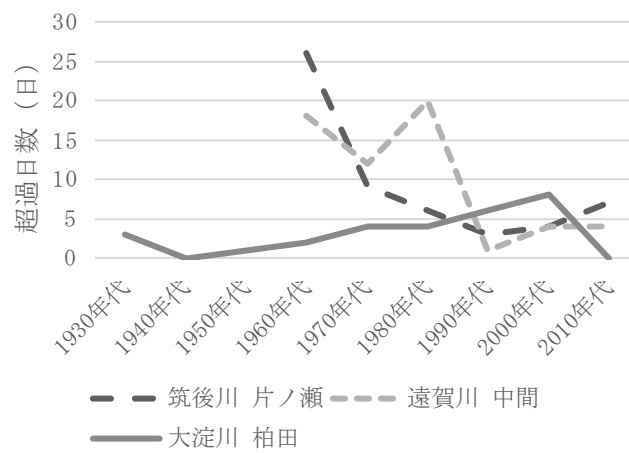


図7 日水位が水防団待機水位を超過した日数

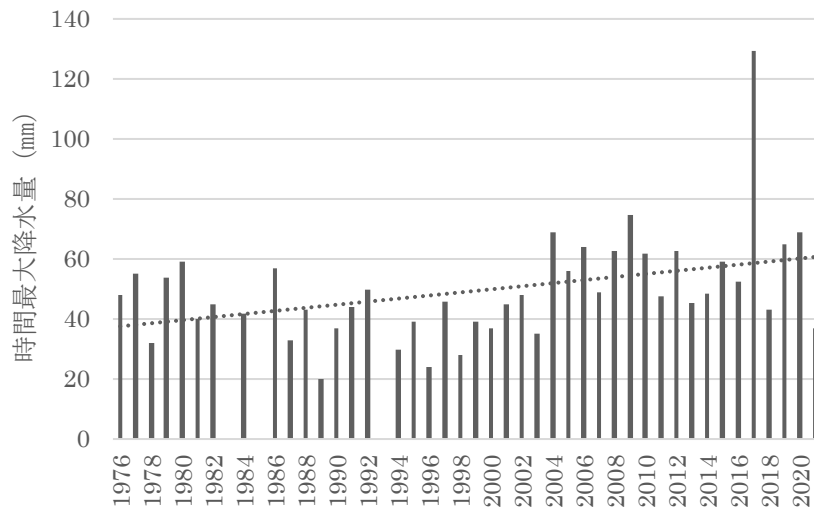


図8 年間時間最大降水量の変化 (筑後川・朝倉)

気候変動への適応を考慮した水安全計画の改善

研究分担者 小坂 浩司

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)
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
分担研究報告書

研究課題：気候変動への適応を考慮した水安全計画の改善

研究分担者 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

研究要旨

気候変動による水道システムへの影響のうち、優先度が高い内容として考えられている豪雨時の原水の高濁度について、水安全計画に基づく対応について検討することとした。事業体での実態や改善状況を調査するためのアンケート調査を計画し、その内容について精査した。World Health Organization、International Water Association による水安全計画の見直し、改善に関連した手引き「A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans」を翻訳し、「水安全計画の監査に関する実践ガイド」を出版した。

A. 研究目的

近年、気候変動による水道システムへの影響が報告され、将来的にも気候変動にともなう水道事業への被害が予想される。このうち、巨大台風や豪雨は、影響の大きい原因事象の一つと考えられている。

水安全計画は、水源流域から消費者に至る各段階でリスク評価とリスク管理を行う、飲料水の安全管理のためのリスクベースの予防的アプローチである¹⁾。水安全計画は、気候変動への適応策の一つとして考えられている。また、水安全計画を有効に運用するためには、PDCA サイクルにより、見直し、改善が必要である。WHO は、水安全計画に関する多くのガイダンス、ガイドを公表しているが、運用に関連したガイドも公表している。本研究では、水道システムへの気候変動影響のうち、これまでの報告で優先度が高い内容として挙げられている豪雨による濁度への影響に着目し²⁾、水安全計画での管理方法、運用・改善について検討した。また、水安全計画の運用に関連する WHO のガイドについて翻訳し、公表することとした。

B. 研究方法

1. 豪雨による高濁度発生時の対応に関するアンケート調査

水安全計画における豪雨による高濁度原水への対応策、監視方法、高濁度対応の経験を踏まえた水安全計画の改善についてのアンケート調査を考え、そのためのアンケート内容について検討した。素案について、研究協力者の水道事業体の方々にコメントをもらった。

2. WHO/IWA の手引きの翻訳

水安全計画の見直し、改善を行うための手引き一つとして、2015 年、WHO/International Water

Association (IWA) は「A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans」を公表した³⁾。同ガイドを翻訳し、出版することとした。

C. 研究結果および D. 考察

1. 豪雨による高濁度発生時の対応に関するアンケート調査

今年度は、アンケート調査実施に向けて、アンケート内容について検討した。作成にあたって、(公財)水道技術研究センターによる、「高濁度原水への対応の手引き」⁴⁾等を参考にした。

対象：過去数年間で原水濁度が 200 度以上のケースがあった浄水場（ただし、水道統計のデータだけでは把握できていない可能性があるため、注意を要する）。対象とする浄水場は、凝集沈殿ろ過処理を導入している浄水場を想定とした。

- ・水安全計画チームメンバー構成
- ・水安全計画の策定、運用開始時期
- ・水安全計画の策定方法
- ・水安全計画のレビュー状況
- ・原水高濁度の発生状況
- ・発生時の対応状況、報告、公報
- ・高濁度発生時の監視、管理基準、対応方法
- ・終息後の水安全計画の見直し、レビュー
- ・最新の濁度管理に対する管理点、監視方法、対応措置等

- ・凝集剤注入率に対する考え方
- ・その他

今後は、アンケート内容を精査し、水道事業者を対象にアンケート調査を行う。

「A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans」を分担で翻訳を行い、「水安全計画の監査に関する実践ガイド」として出版した（図 1）（小坂ら、2021）。同ガイドは、国立保健医療科学院のサイト上で公表し（https://www.niph.go.jp/publications/water_safety_plans.pdf）、また、WHO の原本のサイト上でも公表された（<https://www.who.int/publications/i/item/9789241509527>）。WHO Water, Sanitation, Hygiene and Health (WASH) のニュースレターでも紹介された（WHO WASH、2021）。



図 1 水安全計画の監査に関する実践ガイド（小坂ら、2021）

E. 結論

- ・ 気候変動による水道システムへの影響のうち豪雨時の原水の高濁度を、適応策として水安全計画を採り上げ、事業者での対応状況を調査するためのアンケート調査の内容について検討した。
- ・ WHO/IWA による水安全計画の見直し、改善に関連した手引き「A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans」を翻訳し、「水安全計画の

監査に関する実践ガイド」を出版した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表
該当なし

3. 図書

小坂浩司，越後信哉，島崎大（訳）．水安全計画の監査に関する実践ガイド（A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans）．国立保健医療科学院，2021．

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) WHO. Guidelines for Drinking-water Quality, 3rd edition. WHO, 2004.

2) 江端克明，和田亮太，清水くるみ，大野浩一，小坂浩司，秋葉道宏．表流水を水源とする急速ろ過方式の浄水場における水安全計画を用いた代表的な危害対応方法の解析．平成 29 年度全国会議（水道研究発表会）講演集，848–849，2017．

3) WHO WASH. Latest news, events, knowledge and tools (No. 325). 2021.

WHO, IWA. A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans. WHO, 2015.

4) (公財) 水道技術研究センター．高濁度原水への対応の手引き．2014．

J. 謝辞

翻訳書の作成にあたって、越後信哉先生（京都大学）、島崎大先生（国立保健医療科学院）にご協力いただいた。記して謝意を表する。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小坂浩司, 越後信哉, 島崎大 (訳)	水安全計画の監査に関する実践ガイド (A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans)	小坂浩司	水安全計画の監査に関する実践ガイド (A Practical Guide to Auditing Water Safety Plans)	国立保健医療科学院	埼玉	2021	78

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
Shen Q, Wang Q, Miao H, Shimada M, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asaeda Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M, Shimizu K	Temperature affects growth, geosmin/2-methylisoborneol production, and gene expression in two cyanobacterial species	Environmental Science and Pollution Research	印刷中		2021
矢野留実子, 平健司, 浅田安廣, 藤本尚志, 秋葉道宏	かび臭発生糸状藍藻類の遺伝子学的試験法の検討	水道協会雑誌	91(3)	2-12	2022

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 曾根 智史

次の職員の令和3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 気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 生活環境研究部・主任研究官
(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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立保健医療科学院長 殿

機関名 東北大学

所属研究機関長 職 名 総長

氏 名 大野 英男

次の職員の令和3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 気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
- 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 福岡大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 朔 啓二郎

次の職員の令和3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 気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立保健医療科学院長 殿

機関名 東京農業大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 江口 文陽

次の職員の令和3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 気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人鹿児島大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 佐野 輝

次の職員の令和3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 気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院理工学研究科・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立保健医療科学院長 殿

機関名 京都大学大学院地球環境学堂
所属研究機関長 職名 学堂長
氏名 勝見 武

次の職員の令和3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 気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院地球環境学堂・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立保健医療科学院

所属研究機関長 職名 院長

氏名 曾根 智史

次の職員の令和3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 気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 生活環境研究部・上席主任研究官
(氏名・フリガナ) 小坂 浩司・コサカ コウジ

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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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4年3月29日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人 筑波大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 永田 恭介

次の職員の令和3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 気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
- 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立保健医療科学院

所属研究機関長 職名 院長

氏名 曾根 智史

次の職員の令和3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 気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。