

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4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 秋葉 道宏

令和5（2023）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	-----	3
秋葉道宏		
II. 分担研究報告		
1. シアノトキシンに関する文献調査	-----	11
秋葉道宏, 浅田安廣, 佐野友春		
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	-----	17
秋葉道宏, 藤本尚志, 浅田安廣		
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	-----	43
秋葉道宏, 浅田安廣, 清水和哉, 西村修, 藤本尚志		
4. 衛星データと機械学習アルゴリズムを活用したダム湖の 藻類異常発生予測モデルの構築	-----	79
西村修, 佐野大輔, 三浦耀平		
5. 藻類増殖に影響を与える環境因子サブモデルに関する研究	-----	87
秋葉道宏, 下ヶ橋雅樹, 西村修, 浅田安廣, 佐野大輔		
6. 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	-----	101
秋葉道宏, 高梨啓和, 藤原俊一郎, 北村壽朗		
7. 精密質量分析による藻類由来有機物の検知に関する検討	-----	109
秋葉道宏, 越後信哉		
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	-----	117
柳橋泰生		
9. 気候変動への適応を考慮した水安全計画の改善	-----	125
小坂浩司		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	131

研究班の構成

(令和4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
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
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
東洋大学生命科学部教授	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
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技術職員	北沢和
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

石巻専修大学理工学部教授

国立環境研究所環境計測研究センターシニアスタッフ

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

東北大学大学院工学研究科大学院生

高 崎 みつる

佐 野 友 春

三 浦 尚 之

三 好 太 郎

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4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5(2023)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 特任研究官

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

WHO 飲料水水質ガイドラインの更新に伴い、シアノトキシンの分析方法、処理方法に関する文献整理を行った。シアノトキシン分析方法では、質量分析の発展に伴い、一斉分析や迅速分析方法に関する手法の検討が進められていることが明らかとなった。シアノトキシンの処理方法では、シアノバクテリア本体の除去と溶存シアノトキシンの除去・分解の両者共に処理を行うためには、水源での状況を踏まえた上で効果的な組み合わせを検討する必要があることを示した。

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、カビ臭原因物質産生藻類である *Pseudanabaena* 属や *Microcoleus* 属の遺伝子による系統の違いとカビ臭原因物質産生能、増殖、カビ臭原因物質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。その結果、種によっては株間、もしくは系統間で産生能力が異なることも示唆された。カビ臭原因物質産生藻類の分子系統とカビ臭原因物質産生能、増殖・カビ臭原因物質産生に及ぼす温度、窒素源の影響等について知見を集積した上で、このような系統による違い、水温、窒素源といった環境条件による産生ポテンシャルの変化を踏まえた発生予測モデルの構築の必要性が示唆された。

気候変動に関連する環境条件とカビ臭原因物質合成酵素の活性に関与する Mg^{2+} 濃度条件に対して、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖およびカビ臭原因物質産生、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子群の発現への影響について評価した。特に光強度影響では、低光強度の際に最大増殖および 2-MIB 産生を示した。日長影響では、日長が長い時に藍藻類は早い増殖を示すとともに代謝産物を多く産生することを明らかにした。共存微生物影響では、カビ臭発生時期の共存微生物が、発生時期ではない時期の共存微生物群よりも、カビ臭原因物質産生を促進させる可能性を示した。

日本国内の 4 つのダム湖を対象とし、代表的な浮遊藻類である *Dolichospermum* spp. の異常発生予測モデルを構築した。室生ダムの 2 値分類における最良モデルは、正解率 91.7%、精度 100%、再現率 83.3%であった一方で、回帰モデルでは精度の良いモデルを構築することができなかった。ARD (automatic relevance determination) により選択された衛星データの種類から、小規模水域における藻類異常発生予測において、衛星センサーの空間解像度より衛星の回帰日数 (時間解像度) が重要であることが示された。

水道水源における藍藻類個体数予測モデルを構築するために必要となる水源での河川流量や水温、栄養塩等のミクロな環境変化を予測する数理モデルの構築を、奈良県の室生ダム貯水池流域を対象として、準分布型水文水質モデル Soil and Water Assessment Tool (SWAT) のうちの SWAT+、ならびに QSWAT+を用いて行った。現時点では、室生ダム貯水池への流入量の基底流量に関しては良好な予測を与えるシミュレーションを行うことができたが、その他のパラメータについては予測手法について再検討の必要性が確認された。

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。原因物質について 1 種類 (2 立体異性体) まで候補構造を絞り込むことに成功した。また、試料大容量注入型のガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) を用いることにより、水道原水中の原因物質が分析可能なことを示した。

培養した *Microcystis aeruginosa* Lemmermann (NIES-87 および NIES-2604 株) に由来する有機物の検知を精密質量スペクトルの差異解析により試みた。その結果、固相抽出による試料濃縮を用いれば、環境水中でも藻類増殖に由来する有機物を分別可能であることを示した。

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

河川水位の観測値が低減傾向にある筑後川について、河床の変化等による影響を受けにくいと考えられる河川流量を解析したところ、長期的に増加傾向にあることが判明した。さらに、筑後川中下流部を水源とする水道の原水におけるジェオスミン、2-MIB について一定濃度以上が検出された週数の経年変化を整理し、河川水位、河床高の変化の影響をみたところ、河川水位が高いときは、ジェオスミン、2-MIB 濃度の上昇はみられなかった。

全国の水道事業を対象に、水安全計画の運用、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を行い、206 水道事業から 208 浄水場の結果を得た。71%は定期的あるいは非定期に水安全計画のレビューを行っており、定期的に行っているうちの約 70%が年 1 回以上レビューしていた。World Health Organization、International Water Association による気候にレジリエントな水安全計画の策定に関する手引き「Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change」を翻訳し、「気候に対してレジリエントな水安全計画：気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理」を出版した。2022 年 9 月に、水安全計画の運用についてのオンラインセミナーを開催した。

研究分担者

西村修	東北大学大学院工学研究科 教授
柳橋泰生	福岡大学工学部 教授
藤本尚志	東京農業大学応用生物科学部 教授
下ヶ橋雅樹	叡啓大学ソーシャルシステム デザイン学部 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	東洋大学生命科学部 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、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予測モデルの構築

WHO 飲料水水質ガイドライン第 4 版（第 1 及び第 2 補遺を含む）が公表され、ガイドライン値の修正、追加が行われたことに伴い、最新のシアノトキシンに関する取り組みについて文献調査を行った。

水道水源から単離された藍藻類株 (*Pseudanabaena* 属、*Microcoleus* 属) 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分子系統解析並びにカビ臭原因物質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、 Mg^{2+} 濃度、温度影響および光強度影響、日長の影響をについて解析を行った。また、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、各ダム湖で定期的に計測された栄養塩データ、水理データ、最寄りのアメダス観測所の気象データ、及び空間解像度・回帰日数が異なる 2 つの衛星から取得されたデータを説明変数とし、関連度自動決定 (automatic relevance determination : ARD) により対象藻類 (*Dolichospermum* spp.) の異常発生に関連のある要因の特定を行なった。各ダム湖で関連があると推定された変数を用いて、複数の機械学習アルゴリズムによる予測モデルの構築及び比較を行なった。

室生ダム貯水池の流入河川流量予測手法を確立するとともに、水温および栄養塩の予測についても予備的な検討を行った。地形や土地利用に関しては国土数値情報、局所的な気候や土壌に関しては農研機構の情報をもとに動力学的パラメータや計算の環境条件を決定した。室生ダム貯水池

への流入水量（(独)水資源機構）に対する予測性を、3つのモデル性能指標（Nash-Sutcliffe efficiency、RSR、および PBIAS）を用いて評価しつつ、地下水と表流水の交換にかかわる2つのパラメータの補正を行った。

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

質量分析、選択的誘導体と量子化学計算を用いて生ぐさ臭原因物質の構造推定を進めた。TON=5の水道原水に含まれる生ぐさ臭原因物質を濃縮倍率1,000倍の条件で検出することを目標として、試料大容量注入型GC-MSを用いて分析するための試料注入条件を検討した。

培養した *Microcystis aeruginosa* Lemmermann (NIES-87 および NIES-2604 株) に由来する有機物の検知を精密質量スペクトルの差異解析により試みた。

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

気候変動の影響をみることができると考えられる長期間のデータが存在する九州地方の3河川（筑後川、遠賀川、大淀川）について河川水位および河川流量の変化について解析するとともに、年別に流量が零の時の河川水位を算出し、河床高とみなして年次推移をみた。水道事業体から提供のあったカビ臭物質の濃度データについて、週内の検出最高値が一定濃度以上になった年間週数を集計した。また、河川の状況によりカビ臭物質濃度が変化するかどうかをみるため、河川水位との関係を解析した。さらに、河川水位と河川流量の関係から導いた河床高のデータを利用し、河床の上昇の程度との関係を解析した。

水安全計画を策定済みの全国の355水道事業を対象に、①水安全計画の運用、および②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行った。気候にレジリエントな水安全計画の策定の手引きの一つとして「Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change」について翻訳した。また、オンラインで、「水安全計画を活用した水質管理システムの運用」を企画し、9月に開催した。

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

シアノトキシンの分析方法として、質量分析の発展に伴い、様々なシアノトキシンに対して感度良く分析可能である LC-MS/MS による分析が主流となりつつある。また、一斉分析や迅速分析に関する研究も進みつつあることが明らかとなった。処理方法では、シアノバクテリア本体の除去と溶存シアノトキシンの除去・分解の両者が必要であり、各処理方法で効果が異なることから、水道水源でのシアノバクテリアの発生状況、シアノトキシン濃度に合わせて効果的な処理方法の組み合わせを考えていく必要があることを示した。

Pseudanabaena 属に関しては分子系統によって

カビ臭原因物質の産生能が異なることが示唆された。10°Cにおいて2-MIB産生能力が高まる株の存在が明らかとなり、その系統の *Pseudanabaena* 属が存在する水域では、水温が2-MIB濃度に影響する可能性があり、*Pseudanabaena* 属の存在量を注意深く監視する必要があると考えられた。*M. autumnalis* に関しては、30°Cにおいて溶存態2-MIBが最も高まり、株によっては30°Cにおいて増殖できないことが明らかとなり、気候変動に伴う温度上昇が、カビ臭被害を促進したり、*M. autumnalis* の生物相に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、株間、もしくは系統間で産生能力が異なることも示唆された。

水の硬度にも関連する Mg^{2+} は、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖およびカビ臭原因物質産生に影響を与えた。低光強度の際に、藍藻類の増殖が良好かつ *mtf* 遺伝子発現量も高くなったが、*mtc* 遺伝子は低かった。一方、日長条件では、長期（16h）では、増殖が早く、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子発現量の最大地も早い時期に到達したが、短期（9h）では、増殖は遅く、遺伝子発現量は、徐々に増加した後に最大となった。夏期と冬期の微生物群集構造は、カビ臭原因藍藻類の増殖に影響を与えることを明らかにした。

全窒素濃度、風速、日射量、降水量、MODISの地表面温度が3つのダム湖で *Dolichospermum* spp. の異常発生に関連のある変数であると推定された。藻類濃度を予測する回帰モデルに関しては、サポートベクターマシン（SVM）、人工ニューラルネットワーク（ANN）の2つのアルゴリズムが有力な候補となることが示された。室生ダムの2値分類における最良モデルは、正解率91.7%、精度100%、再現率83.3%であった一方で、回帰モデルでは精度の良いモデルを構築することができなかった。

河川流量について、今回行ったパラメータ補正では、基底流量が十分に再現されたといえる。しかしながらピーク流量の再現は十分とはいえず、今後その予測性を改善する必要がある。水温に関しては冬期の水温はある程度予測できたが、藻類増殖において重要な夏期水温に関して十分な予測は得られなかった。栄養塩について、リンに関してはある程度オーダーの予測が可能であったが、窒素については全く予測できていない状況であり、抜本的なパラメータ設定が必要であると考えられた。

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

選択的誘導体化反応と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1種類（2立体異性体）まで絞り込むことに成功した。立体配置が異なると臭気の有無が異なる可能性があるため、本来は立体異性体を区別する必要がある、日常業務において立体異性体を区別して分析するのは困難と考えられ、両者の総濃度として管理する可能性を検討する必要がある。

また、検討に用いた水道原水3検体すべてで、生ぐさ臭原因物質の検出を確認することに成功し、高感度化を達成した。

NIES-87 と NIES-2604 の試料について、希釈段階を問わず藻類を添加したサンプルから多くの物質が検出された。100 倍で希釈を行った模擬藻類異常発生試料の分析結果としては、群間比が 2 倍以上を基準とした場合で NIES-87 においては 72 物質、NIES-2604 においては 35 物質検出されておりこちらも藻類由来溶存有機物を十分に捉えることが可能であったといえる。また、この 100 倍で希釈を行った模擬藻類異常発生試料は環境水中において藻類の異常増殖が発生した場合と同程度の細胞密度を有していることから、実際の環境水中でも同様の分析手法を用いて溶存有機物の動向を検知できる可能性を示したといえる。

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

筑後川の河川水位は 1960 年から 2000 年にかけて低減傾向にあるのに対して、河川流量は長期的に増加傾向にあることがみてとれた。河川水位が高い場合は、ジェオスミン濃度および 2-MIB 濃度が低くなっていることがわかった。さらに、ジェオスミン濃度および 2-MIB 濃度と河床高との相関をみたが、明確な関係はみられなかった。

アンケートの結果、水安全計画の策定を自ら行っていた浄水場は 164、委託で策定した浄水場は 44 であった。策定にあたり、厚生労働省の水安全計画策定ガイドライン、水安全計画作成支援ツール簡易版、他の水道事業者の水安全計画を参考にしているところが多かった。水安全計画のレビューの状況は、71%が定期的（時期を設定している場合、設定していない場合あり）あるいは非定期的にレビューを行っていた。定期的にレビューを行っている浄水場のうち約 70%が年 1 回以上レビューしていた。「Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change」を分担で翻訳を行い、「気候に対してレジリエントな水安全計画：気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理」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。セミナーの参加者は 102 名で、アンケート結果は、非常に良かったが 47%、良かったが 53%であった。具体的には、複数の参加者から、水安全計画の各事業者の運用の実態を知ることができ大変参考になった、とのコメントがあった。

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

WHO 飲料水水質ガイドライン第 4 版（第 1 及び第 2 補遺を含む）で新たに変更があったシアノトキシンについて、主流となる分析方法として LC-MS/MS による分析、そして処理特性に基づく処理方法の考え方について示した。

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、カビ臭原因物質産生藻類の分子系統とカビ臭原因物質産生能、増殖・カビ臭原因物質産生に及ぼす温度の影響等について知見を集積した上で、このような系統による違い、水温といった環境条件による産生ポテンシャルの変化を踏まえた発生予測モデルの構築の必要性が示唆された。

気候変動に関連する環境条件（温度、光強度、日長）とカビ臭原因物質合成酵素活性に関与する Mg^{2+} 濃度条件の変化が、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖およびカビ臭原因物質産生、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子群の発現への影響することが確認された。そのため、対象水源から分離したカビ臭原因物質産生藍藻類を用いた検証が、対象水源におけるカビ臭発生予防対策とカビ臭発生対策に重要であると考えられた。

日本国内の 4 つのダム湖を対象とし、現場（水質、水理、気象）データ、複数の衛星から取得されたデータを用いて、ARD による関連のある変数選択及び機械学習アルゴリズムによる藻類異常発生の予測モデルを構築した。衛星データが藻類発生予測に有用であり、特に時間解像度の高い（観測頻度が高い）衛星データがより重要であることが示された。

SWAT+を用いて、室生ダム流域の水文水質シミュレーションを実施した結果、室生湖への流入水について、基底流量に関しては良好な予測を与えるシミュレーションを行うことができたが、ピーク流量については過小評価傾向にあった。水温については、冬期の水温はある程度予測できたが夏期に過小評価する結果となった。各態窒素及びリン濃度については SWAT+での予測を確認したが、特に各態窒素濃度予測に関しては、施肥や植生等を考慮した抜本的な検討を行う必要があることが示された。

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

本研究で推定した物質は、多変量解析で TON および原因生物濃度と相関する物質を抽出した結果得られた物質であり、さらにその物質の構造も、質量分析、選択的誘導体化反応と量子化学計算を用いて推定した構造である。今後は、推定された物質を入手し、生ぐさ臭と関係するか否か、管理指標として適切か否かを検証する必要がある。

精密質量スペクトルの差異解析に基づき、藻類の異常増殖の検知の可能性について検討した結果、試料濃縮を用いれば、環境水中でも藻類増殖に由来する有機物を分別可能であることを示した。

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

河川水位の観測値が低減傾向にある筑後川について、河川流量を解析したところ、長期的に増加傾向にあることが判明した。さらに、筑後川中下流部を水源とする水道の原水におけるジェオスミン、2-MIB 濃度について一定濃度以上が検出された週数の経年変化を整理し、河川水位、河床

高の変化の影響をみたところ、河川水位が高い時（7日間の平均水位が3m以上の時）は、ジェオスミン、2-MIB 濃度の上昇はみられなかった。以上により、気候変動の適応策として、河川水位の監視の重要性が示唆された。

全国の水道事業を対象に、水安全計画の運用、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を行い、206 水道事業から 208 浄水場の結果を得た。「Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change」を翻訳し、「気候に対してレジリエントな水安全計画：気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理」を出版した。2022 年 9 月に、水安全計画の運用についてのオンラインセミナーを開催し、102 名の参加があった。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Asada Y, Hayasaka S, Miyoshi T, Tokuyasu M, Akiba M. Effects of raw water quality on adsorptive removal of 2-methylisoborneol by powdered activated carbon under non-equilibrium conditions. *AQUA - Water Infrastructure, Ecosystems and Society*, 2023. (accepted)

Zhang J, Shen Q, Miao H, Li Q, Shimada M, Yuan T, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Takanashi H, Fujimoto N, Ichise S, Asada Y, Nishimura O, Akiba M, Shimizu K. Development of a Quantification and Detection Method for 2-MIB-producing Cyanobacteria. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2023;23(4): TRJFAS21811(Article number).

Miao H, Zhang J, Shen Q, Ichise S, Asada Y, Tian Y, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Takanashi H, Fujimoto N, Nishimura O, Akiba M, Shimizu K. Development of Rapid PCR Methods for the Detection and Quantification of Geosmin - Producing *Dolichospermum* spp.. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2022; 233(9): 394(article number).

Shinfuku Y, Takanashi H, Nakajima T, Kasuga I, Akiba M. The Status Quo of Causal Substance Exploration for Fishy Odor in Raw Water for Taps. *J. Water and Environment Technology*, 2022;20(2):29-44.

神里良太, 浅田安廣, 小松一弘, 高篠鮎人, 浦上正, 茂田裕充, 秋葉道宏. 粉末活性炭の短時間接触による 2-メチルイソボルネオール除去に対する競合吸着有機物の特性評価. *水道協会雑誌*. 2022;91(12):4-13.

2. 学会発表

Hanchen Miao, Chi Zhang, Ji Zhang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Tian Yuan, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Michihiro Akiba, Kazuya Shimizu, Effect of Light/Dark Cycle on the Growth and Expression of Genes

Related to Geosmin from Cyanobacteria. The 1st International Conference on Bioprocess and Sustainability (ICBS 2023) ; 2023.3.-25-26; 茨城県.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 超球面探索/非調和下方歪追跡法による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定. 第 70 回質量分析総合討論会 ; 2022.6.22-24 ; 福岡.

浅田安廣, 藤本尚志, 江崎敦, 松本恭太, 山口晴代, 秋葉道宏. 水道水源で発生するカビ臭原因物質産生藍藻類の監視に向けたライブラリー構築. 京都大学環境衛生工学研究会第 44 回シンポジウム ; 2022.7.29-30 ; 京都.

仲門拓磨, 浅田安廣, 三好太郎, 増田貴則, 秋葉道宏. 藻類由来有機物が粉末活性炭処理によるカビ臭原因物質除去に及ぼす影響. 令和 4 年度全国会議 (水道研究発表会) ; 2022.10.19-21 ; 名古屋.

早坂俊一, 三好太郎, 浅田安廣, 秋葉道宏. 粉末活性炭処理による 2-MIB 除去への原水水質の影響評価に向けた水質指標の探索. 令和 4 年度全国会議 (水道研究発表会) ; 2022.10.19-21 ; 名古屋.

松本恭太, 浅田安廣, 藤本尚志, 秋葉道宏. 水道水源における複数種のカビ臭原因物質産生藍藻類の同定・定量手法の開発. 令和 4 年度全国会議 (水道研究発表会) ; 2022.10.19-21 ; 名古屋.

王静怡, 柳橋泰生, 原水濁度と水位の関係および河川水位の経年変化の解析. 令和 4 年度全国会議 (水道研究発表会) ; 2022.10.19-21 ; 名古屋.

下川栞, 藤本尚志, 大西章博, 清水和哉, 浅田安廣, 秋葉道宏. 河床付着性藍藻類 *Microcoleus* 属の分子系統解析およびカビ臭原因物質産生能の比較. 第 57 回日本水環境学会年会 ; 2023.3.15-17 ; 松山.

久保田雅也, 藤本尚志, 大西章博, 清水和哉, 浅田安廣, 秋葉道宏. 河床付着性藍藻類 *Microcoleus* 属の増殖およびカビ臭原因物質産生特性. 第 57 回日本水環境学会年会 ; 2022.3.15-17 ; 松山.

三浦耀平, 今本博臣, 峠嘉哉, 浅田安廣, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏, 西村修, 佐野大輔. 衛星データを活用した水道水源における藻類異常発生予測モデルの開発. 第 57 回日本水環境学会年会 ; 2022.3.15-17 ; 松山.

高岩凜太郎, 山下優輝, 新福優太, 中島常憲, 高梨啓和, 秋葉道宏. 試料大容量注入型 GC/MS による水道水生ぐさ臭の未知原因物質の相対定量法の開発. 第 57 回日本水環境学会年会 ; 2022.3.15-17 ; 松山.

山下優輝, 新福優太, 山田奈瑠実, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏. フラグメンテーション反応の全経路探索による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定. 第 57 回日本水環境学会年会 ; 2022.3.15-17 ; 松山.

王静怡, 柳橋泰生, 水道原水濁度と河川水位・流量の関係および経年変化の解析. 第 57 回日本水環境学会年会 ; 2022.3.15-17 ; 松山.

3. 図書

小坂浩司, 越後信哉, 島崎大, 下ヶ橋雅樹 (訳). 気候に対してレジリエントな水安全計画: 気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理 (Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change). 国立保健医療科学院, 2023.

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

シアノトキシンに関する文献調査

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	浅田	安廣
研究協力者	佐野	友春

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：シアノトキシンに関する文献調査

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 特任研究官
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 佐野 友春 国立環境研究所 環境計測研究センター シニアスタッフ

研究要旨

WHO 飲料水水質ガイドラインの更新に伴う変更点の一つとして、シアノトキシンに関するガイドライン値の変更が記載された。その中で特に大きな変更点としては、ガイドライン値として新たに *Anatoxin-a variants*、*Cylindrospermopsins*、*Saxitoxins* が追加されたことである。そこで、この変更に伴い、シアノトキシンの分析方法、処理方法に関する文献整理を行った。シアノトキシン分析方法では、質量分析の発展に伴い、一斉分析や迅速分析方法に関する手法の検討が進められていることが明らかとなった。シアノトキシンの処理方法では、各処理方法でのシアノトキシン除去・分解に対する処理効果が異なることが示され、シアノバクテリア本体の除去と溶存シアノトキシンの除去・分解の両者共に処理を行うためには、水源での状況を踏まえた上で効果的な組み合わせを検討する必要があることを示した。

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により、水道水の水質悪化、異臭味問題などが生じている。一方、世界では藻類の異常発生に伴う健康影響として、シアノバクテリア（藍藻類）が産生する毒性物質（シアノトキシン）について着目している。その中でも WHO 飲料水水質ガイドラインで記載されていた *Microcystin-LR* は、日本においても要検討項目として暫定目標値が記載されている。シアノトキシンの中ではガイドライン項目として *Microcystin-LR* のみが取り上げられていたのは、シアノトキシンに関する毒性評価の情報が限定されていたことによるものである。

令和4年3月に更新された WHO 飲料水水質ガイドライン第4版（第1及び第2補遺を含む）¹⁾が公表され、ガイドライン値の修正、追加が行われた。更新された項目にはシアノトキシンに関する内容が組み込まれており、ガイドライン値等が大幅に更新された。シアノトキシンについて、主な変更点は下記の通りである。

- ・ *Microcystin-LR* を *Total Microcystins* に変更
 - ・ シアノトキシンとして、*Anatoxin-a variants*、*Cylindrospermopsins*、*Saxitoxins* が新たに追加
 - ・ シアノトキシンのガイドライン値として短期曝露によるガイドライン値を新たに設定
- 一方、日本国内ではシアノトキシンの追加項目に対する調査自体があまり進められておらず、情報が非常に限定されていることから、これらの情

報収集が今後の水質基準等での検討において重要となると言える。そこで、今後の検討に向けた情報収集として、下記の2項目について中心的に文献調査を行なった。

- ・ シアノトキシン分析方法
- ・ シアノトキシン処理方法

B. 研究方法

最新のシアノトキシンに関する取り組みがまとめられている WHO 飲料水水質ガイドライン第4版（第1及び第2補遺を含む）¹⁾並びに WHO が出版している「*Toxic Cyanobacteria in Water*」²⁾をベースに文献調査を行った。なお、以降では *Microcystins* を MCs、*Anatoxin-a variants* を ATXs、*Cylindrospermopsins* を CYNs、*Saxitoxins* を STXs と表記する。

C. 研究結果および D. 考察

- ・ シアノトキシン分析方法

まず、シアノトキシンが持つ毒性²⁾について整理する。MCs は、肝臓毒性を持つ物質であり、急性毒性としては洞様毛細血管の損傷による肝臓出血、慢性毒性としては肝肥大や腫瘍促進（グループ 2B）が確認されている。ATXs は、摂取すると脳を含む体内全体に分布し、神経毒性を示す物質である。CYNs は、肝臓、腎臓、赤血球に対して毒性を持つ物質である。STXs は、摂取するといれん、筋肉および呼吸麻痺などの神経学的作用が生じる物質である。

続いて、WHO 飲料水水質ガイドライン第4版

(第1及び第2補遺を含む)に記載されたシアノトキシンのガイドライン値¹⁾を表1にまとめる。重要な点としては、STXsの短期曝露に対するガイドライン値以外は暫定値ということである。これは、毒性評価に関する情報が限定されていることが理由に挙げられている。しかし、暫定値ではあるがガイドライン値は数 $\mu\text{g/L}$ レベルであり、測定を行うためには高感度な分析技術が求められると言える。

ここで、WHO 飲料水水質ガイドライン第4版(第1及び第2補遺を含む)に記載されたシアノトキシンの分析方法とその感度に関する情報¹⁾を表2にまとめる。重要な点は、質量分析の発展に伴い、LC-MS/MSによる分析が全てのシアノトキシンに対して感度良く分析可能となっている点である。本手法では、化学物質ごとに標準物質による検量線が必要ではあるが、感度が良いことから濃縮等の前処理が必要なくなるという利点がある。そのため、現在のシアノトキシン分析の試料前処理方法としては、操作が簡略化された凍結再融解による手法が取り入れられている³⁻⁵⁾。

さらに近年では、シアノトキシンの一斉分析に関する検証も進められている。既にUSEPAでの分析方法では、ATXsとCYNsの同時分析⁴⁾について記述されている。さらにMatsukiらはMCs、ATXs、CYNsの一斉分析方法について取り組んでおり、実際のアオコが発生した湖沼での測定に適用し、その有用性を示している⁵⁾。また、Total MCsの測定として、田中らはMCsの共通骨格Adda残基の2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid(MMPB)に着目したLC-MS/MSによるTotal MCsの迅速分析方法を開発している⁶⁾。このように、シアノトキシンの分析方法については分析技術の発展に伴い、研究が進んでいることがわかる。

・シアノトキシン処理方法

ここでは、シアノトキシンの処理方法について「Toxic Cyanobacteria in Water」²⁾をベースに整理する。処理方法を検討する上で重要な点は、シアノトキシンを産生する「シアノバクテリア本体」を除去するか、シアノバクテリアの体内から放出されて水中に存在する「溶存シアノトキシン」を除去あるいは分解するかである。表3に各処理方法とシアノバクテリア本体、溶存シアノトキシンの除去・分解効果をまとめる。

シアノバクテリア本体を除去するためには、物理的処理として凝集沈殿処理、砂ろ過処理、膜ろ過処理が有効である。注意点としては、沈殿したフロックやろ材に捕捉されたフロックに含まれるシアノバクテリアが老化または細胞溶解によりシアノトキシンを放出する可能性があるため、頻繁な排泥および逆洗浄を行う必要があることである。

続いて、溶存シアノトキシンの除去・分解するためには、活性炭による除去あるいは化学酸化処理による分解が有効である。しかし、活性炭処理では、活性炭の材質等で除去性能が変わるため注意が必要である。また、化学酸化処理による分解は非常に有効であり、特にオゾン処理では全ての物質に有効であるが、塩素処理においてはATXsのみ分解効果が小さいことについて注意が必要である。塩素処理においては、日本では水道原水中の藻類の制御のため、処理工程前に塩素を注入する前塩素処理を行っているが、その場合シアノバクテリアの細胞内に存在する毒素を放出する可能性があることから、その後の処理工程でのシアノトキシンの除去効果を踏まえた塩素注入率の判断も必要となると考えられる。また、化学酸化処理による副生物としてTHMsやHAAs等が確認されているため、副生成物とのバランスについても検討が必要であると考えられる。最後に膜ろ過処理ではシアノバクテリア本体の除去にも有効なMF膜あるいはUF膜では孔径が大きいいため、溶存シアノトキシンの除去に有効ではないが、NF膜やRO膜では孔径によっては溶存シアノトキシンの除去に対して有効に働く可能性がある。

以上のように、シアノトキシンの処理には、シアノバクテリア本体の除去と溶存シアノトキシンの除去・分解の両者が必要である。そして、各処理方法で効果が異なることから、水道水源でのシアノバクテリアの発生状況、シアノトキシン濃度に合わせて効果的な処理方法の組み合わせを考えていく必要があると言える。

E. 結論

WHO 飲料水水質ガイドライン第4版(第1及び第2補遺を含む)で新たに変更があったシアノトキシンについて、分析方法、処理方法について文献整理を行った。

・シアノトキシン分析方法では、質量分析の発展に伴い、一斉分析や迅速分析方法の検討が進められていることが明らかとなり、既に実用可能な手法の存在も確認された。

・シアノトキシンの処理方法では、各処理方法でのシアノトキシン除去・分解に対する処理効果が異なることを示した。また、シアノバクテリア本体の除去と溶存シアノトキシンの除去・分解の両者共に処理を行うためには、水源での状況を踏まえた上で効果的な組み合わせを検討する必要があることを示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Asada Y, Hayasaka S, Miyoshi T, Tokuyasu M, Akiba M. Effects of raw water quality on adsorptive removal of 2-methylisoborneol by powdered activated carbon under non-equilibrium conditions. *AQUA - Water Infrastructure, Ecosystems and Society*, 2023. (accepted)

神里良太, 浅田安廣, 小松一弘, 高篠鮎人, 浦上正, 茂田裕充, 秋葉道宏. 粉末活性炭の短時間接触による 2-メチルイソボルネオール除去に対する競合吸着有機物の特性評価. 水道協会雑誌. 2022;91(12):4-13.

2. 学会発表

仲門拓磨, 浅田安廣, 三好太郎, 増田貴則, 秋葉道宏. 藻類由来有機物が粉末活性炭処理によるカビ臭原因物質除去に及ぼす影響. 令和 4 年度全国会議 (水道研究発表会); 2022.10.19-21; 名古屋.

早坂俊一, 三好太郎, 浅田安廣, 秋葉道宏. 粉末活性炭処理による 2-MIB 除去への原水水質の影響評価に向けた水質指標の探索. 令和 4 年度全国会議 (水道研究発表会); 2022.10.19-21; 名古屋.

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) WHO (2022) Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first and second addenda, WHO, Switzerland, 583p.

2) WHO (2021) Toxic cyanobacteria in water - Second edition, CRC press, London, 858p.

3) Greenstein, K.E., Zamyadi, A., Glover, C.M., Adams, C., Rosenfeldt, E., Wert, E.C. (2020) Delayed Release of Intracellular Microcystin following Partial Oxidation of Cultured and Naturally Occurring Cyanobacteria. *Toxins*, 12, 335(Article number).

4) USEPA (2015) Method 545, URL: <https://www.epa.gov/esam/method-545-determination-cylindrospermopsin-and-anatoxin-drinking-water-liquid-chromatography>. (2023 年 4 月 25 日時点)

5) Matsuki, M., Shimizu, N., Tobiishi, K., Tanaka, Y., Yamaguchi, H., Sano, T. (2022) An Analytical Method for Simultaneous Measurement of Various Cyanotoxins Using Stable Isotope-Labeled Surrogates and a Microbial Flora Analysis to Assign Each Cyanotoxin to its Source. *Journal of Water and Environment Technology*, 20(6), 261-272.

6) 田中義人, 飛石和夫, 村田さつき, 永島聡子, 高木博夫, 佐野友春 (2013) LC/MS/MS によるトータルミクロシスチンの迅速分析法の検討. 全国環境研会誌, 38(3), 140-144.

表 1 シアノトキシンに関するガイドライン値一覧¹⁾

	MCs	CYNs	ATXs	STXs
	(μg/L)			
AL1	1 (lifetime pGV)	0.7 (lifetime pGV)	3 (1/10 of AL2)	0.3 (1/10 of AL2)
AL2	12 (short-term pGV)	3 (short-term pGV)	30 (short-term provisional reference)	3 (acute GV)

*長期曝露に対するガイドライン値ではなく、短期曝露の 1/10 の濃度である

表2 シアノトキシン分析方法一覧¹⁾

手法 物質	PPA	RBA	ELISA	HPLC- UVPAD	LC- MS/PAD	HPLC-FD (ポストカラム 誘導化法、プレカラム誘 導化法)	LC- MS/MS*
MCs	+		++	++	++		+++
CYLs			++	++	++		+++
ATXs		+	++			+++	+++
SXTs		++	+			+++	+++

検出下限：+ (ガイドライン値(GV)の 1/10 から GV)、++(GV の 1/50 から 1/10)、
+++ (GV の 1/100 以下)

PPA:Protein Phosphatase assay, RBA:Receptor-binding assay, PAD:Photodiode Array Detector
FD : Fluorescence Detector

*化学物質ごとに標準物質による検量線が必要

表3 シアノトキシン処理方法一覧²⁾

	粉末活性炭	凝集沈澱 ・砂ろ過	膜ろ過	オゾン	粒状活性炭	生物処理	塩素処理
シアノバクテリア 本体	na	+++	+++	- (溶出)	na	na	- (溶出)
溶存シアノトキシン MC-LR	++	na	-	+++	++	+++	+++
MC-LA	+	na	-	+++	+	+++	++
MC-YR	+++	na	-	+++	+++	ie	+++
MC-RR	+++	na	-	+++	+++	ie	+++
CYLs	++	na	-	+++	ie	+++	+++
ATXs	ie	na	-	+++	ie	ie	-
STXs	++	na	-	++	++	-	++

+++ : >80%除去、++ : 50-80%除去、+ : 20-50%、-:処理方法として推奨しない

ie : 根拠不十分、na : 不適用

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

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 特任研究官
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 生活環境研究部 主任研究官

研究要旨

カビ臭原因物質産生藻類である *Pseudanabaena* 属や *Microcoleus* 属の遺伝子による系統の違いとカビ臭原因物質産生能、増殖、カビ臭原因物質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。*Pseudanabaena* 属は 16S rRNA 遺伝子の系統樹において、I～Vの5系統、2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 合成酵素遺伝子の系統樹においてA～Cの3系統に分かれた。*P. subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11は10℃、15℃、20℃において増殖し、低水温における *Pseudanabaena* 属の発生やそれにとまう2-MIBの発生を裏付ける結果となった。窒素濃度を1mg/Lに制限したCT培地を用いて10℃で培養を行ったところ2-MIB総濃度は *P. limnetica* WILD-11において他の株に比べて著しく高く推移した。10℃において *P. yagii* WILD-56は *P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62に比べて2-MIB産生能力が高く、2-MIB合成酵素遺伝子の系統樹においてCに位置づけられる *P. limnetica* WILD-11、*P. yagii* WILD-56は低温下における2-MIB産生能力が高いことが示唆された。河床付着性藍藻類 *Microcoleus autumnalis* の単離株は16S rRNA 遺伝子および16S-23S ITS領域の系統樹において、2-MIBを産生する株、ジェオスミンを産生する株、カビ臭原因物質非産生株が分かれて位置づけられることが明らかとなった。A川とB川において分子生物学的手法により *Microcoleus* 属の16S-23S ITS領域を解析し生物相を評価したところ、上流から下流といった採取地点の違いや、地点内における採取場所の違いによって *Microcoleus* 属の生物相が異なることが明らかとなった。さらに系統樹において、単離株と近い系統ではあるが、カビ臭原因物質産生に関する表現形質の推定が困難な OTU (Operational Taxonomic Unit) や単離株が存在しない系統の OTU の存在が明らかとなった。*M. autumnalis* の2-MIB産生株については株間で産生能力の違いが見られたが、分子系統による産生能力の違いは見られなかった。一方ジェオスミン産生株については分子系統によって産生能力が異なることが示唆された。*M. autumnalis* の単離株の中には20～30℃の間で増殖が可能な株、30℃において増殖が抑制される株が存在することが明らかとなった。2-MIB産生株である *M. autumnalis* WILD-54は20℃～30℃において、温度が高まるにつれて溶存態2-MIB濃度が高まり、浄水場における *M. autumnalis* によるカビ臭リスクに温度が影響することが示唆された。

以上の結果から *Pseudanabaena* 属に関しては分子系統によってカビ臭原因物質の産生能が異なることが明らかとなった。10℃において2-MIB産生能力が高まる株の存在が明らかとなり、その系統が存在する水域では、水温が2-MIB濃度に影響する可能性があり、*Pseudanabaena* 属の存在量を注意深く監視する必要があると考えられた。*M. autumnalis* に関しては、30℃において溶存態2-MIBが最も高まったり、株によっては30℃において増殖できなかつたりと、気候変動に伴う温度上昇が、カビ臭被害を促進したり、*M. autumnalis* の生物相に影響を及ぼす可能性が示唆された。さらに *M. autumnalis* について、株間、もしくは系統間で産生能力が異なることも示唆されている。このような系統によるカビ臭原因物質産生能力の違い、水温といった環境条件による産生ポテンシャルの変化等を踏まえた発生予測モデルの構築が必要と考えられた。

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。これまで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てきている。本年度は2-メチルイソボルネオール (2-MIB) を産生する藍藻類 *Pseudanabaena* 属の単離株について分子系統解析を行った。さらに窒素を制限した条件、温度を数段階に設定した条件で培養実験を行い分子系統と2-MIB産生能について評価を行った。さらに、河床附着性藍藻類の *Microcoleus autumnalis* の単離株について分子系統解析を行い、*M. autumnalis* によるカビ臭発生メカニズムに関する基礎的知見を得た。次に河床附着物中の *M. autumnalis* のカビ臭原因物質産生に関する表現形質について PCR およびクローニングにより推定を行った。最後に複数の系統に位置する *M. autumnalis* についてカビ臭原因物質産生能力の比較および増殖・カビ臭原因物質産生に及ぼす温度の影響について検討を行った。

B. 研究方法

1) 藍藻類 *Pseudanabaena* 属の分子系統解析と2-MIB産生能

水道水源から単離された *Pseudanabaena subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11、*P. limnetica* WILD-18、*P. yagii* WILD-56、*P. yagii* WILD-57、*P. subfoetida* WILD-62、*P. cinerea* B-6 を用いた。

単離株を CT 培地で 20°C、1500 lux の条件下 3 週間程度培養したのち、孔径 0.2μm のポリカーボネート製のメンブレンフィルター (ADVANTEC K020A047A, アドバンテック東洋株式会社) を用いた吸引ろ過により集菌を行った。ろ過量は培養試料 10mL とした。集菌を行ったフィルターを細かく裁断し、DNeasy® Powersoil® Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行った。16S rRNA 遺伝子の増幅には、PLG1.3 (CYA108F) と、16S-1492r のプライマーセットを用いた¹⁾。PCR 反応液は GoTaq Green Master Mix (Promega) 10 μL、ゲノム DNA 1 μL、プライマー(10 μM) をそれぞれ 2 μL、nuclease-free water 5 μL を混合した。サーマルサイクラー(T100 Thermal Cycler, BIO RAD)にセットして PCR 反応条件¹⁾に従って PCR を行った。PCR 終了後、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の確認を行った。この後精製し、ユーロフィンジェノミクス株式会社に塩基配列の解析を依頼した。本研究で解析した単離株の塩基配列およびこれまで報告されている塩基配列について njplot を用いて近隣結合法により系統樹を作成した。2-MIB 合成酵素遺伝子については Suurnäkki ら²⁾に従い解析し、単離株の塩基配列について European Bioinformatics Institute (EBI) の EMBoss Transeq(https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)によりアミノ酸配列に変換し、njplot を用いて近隣結合法により系統樹を作成した。

培養実験ではまず、CT 培地を用いて、10°C、15°C、20°C の条件で培養を行った。*P. subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11 を用いた。200ml 容三角フラスコを用いて培養を行った。CT 培地を 100ml を分取し、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。照度は

2000 lux (12 時間明/12 時間暗) とした。各条件につき 3 連で試験を行った。定期的に、培養液を採取し、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。また、SPME-GC/MS システム (Agilent 5973C GC/MSD, Agilent 及び Multiple Sampler MPS, Gerstel) を用いて 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 濃度を測定した。

次に、窒素濃度を実湖沼の濃度に近づけた条件で検討を行った。窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地を用いて 10°C および 20°C で培養を行い、2-MIB の産生について比較を行った。*P. subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11、*P. subfoetida* WILD-62 を用いて培養を行った。10°C においては *P. yagii* WILD-56 も用いて培養を行った。20°C では *P. cinerea* B-6 も用いた。CT 培地は窒素源として Ca(NO₃)₂・4H₂O、KNO₃ が含まれるが、KNO₃ を添加せず、Ca(NO₃)₂・4H₂O を減らして硝酸性窒素濃度を 1mg/L とした。減少した Ca、K はそれぞれ CaCl₂・2H₂O、KCl により補充した。計数および分析は上述の通り行った。

2) 河床附着性藍藻類 *Microcoleus autumnalis* の分子系統解析

分子系統解析には水道事業体より提供を受けた株(B と記載)、我々が単離した株(WILD と記載、系統樹では W と記載)を用いた。16S rRNA 遺伝子および 16S-23S ITS 領域を特異的に増幅させるプライマー PLG1.3 (CYA108F)、pits-CyanR を用いて PCR を行った¹⁾。PCR 終了後、アガロースゲル電気泳動によりターゲットの増幅確認を行った。その後 DNA を精製し、塩基配列を解析した。前述の通り系統解析を行った。

3) 分子生物学的手法による河床附着物中の *Microcoleus* 属のカビ臭原因物質産生に関する表現形質の推定

関東地方の A 川の最上流①(S7)と②(S8)、上流①(S9)と②(S10)、中流①(S11)と②(S12)、下流①(S13)と②(S14)の 4 地点の河床から 2021 年 8 月 2 日に採取した 8 試料、および関西地方の B 川の下流(Y1)、中流(本流・Y2)(支流・Y3)、上流(Y4)の 4 地点から 2022 年 3 月 8 日に採取した 4 試料について DNA 抽出を行った。DNA 抽出物について、*Microcoleus* 属の 16S-23S ITS 領域を特異的に増幅させるプライマー (m_16S_23S ITS F、m_16S_23S ITS R) を用いて PCR を行った。PCR 終了後、アガロースゲル電気泳動により得られた産物を精製、TOPO TA cloning kit を用いてクローニングを行った。クローニングにより得られた 24 コロニーについて DNA 精製を行い、塩基配列の解析を行った。配列間の相同性が 99% 以上の場合、同一の OTU (Operational Taxonomic Unit) とした。OTU 及び単離株の塩基配列を用いて近隣結合法により系統樹の作成を行った。

4) *Microcoleus autumnalis* の分子系統とカビ臭原因物質産生能の比較

カビ臭原因物質産生能の比較には、2-MIB を産生する 4 株 (B-1, WILD-102, WILD-105, WILD-109)、ジェオスミンを産生する 4 株 (WILD-81, WILD-104, WILD-106, WILD-110) を用いた。ネジ口試験管に窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地

を 10mL 加え、オートクレーブ滅菌後、糸状体が 0.5~5mm/mL となるように接種した。各株について 15 本程度試験管を用意し、これらを 20°C、2000 lux (12 時間明/12 時間暗)の条件で培養した。培養 28 日目に各測定項目ごとに 3 本ずつサンプリングし測定を行った。クロロフィル a およびカビ臭原因物質について測定を行った。カビ臭原因物質は前述の通り測定した。

5) *Microcoleus autumnalis* のカビ臭原因物質産生に及ぼす温度の影響

2-MIB を産生する *M. autumnalis* WILD-54 およびジェオスミンを産生する *M. autumnalis* WILD-104 を使用した。ネジロ試験管に窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地を 10mL 加え、オートクレーブ滅菌後、糸状体が 5mm/mL となるように接種した。WILD-54、WILD-104 それぞれについて 45 本程度試験管を用意し、これらを 20°C、25°C、30°C、2000 lux (12 時間 明/12 時間暗)の条件で培養した。サンプリングはクロロフィル a、2-MIB ごとに 3 本ずつ、7 日目、14 日目、21 日目、28 日目と経時的に行った。クロロフィル a およびカビ臭原因物質について測定を行った。カビ臭原因物質は前述の通り測定した。

また、*M. autumnalis* WILD-54 について 28 日目に 2-MIB 合成酵素遺伝子である methyltransferase 遺伝子(*mf* 遺伝子)、2-MIB synthase 遺伝子(*mic* 遺伝子)の発現解析を行った。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 PrimeScript™ RT reagent Kit (タカラバイオ)を用いて 0.5 もしくは 1ng RNA/μL 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 Taq™ II(タカラバイオ)を用いて説明書に従い、16S rRNA 遺伝子、*mf* 遺伝子、*mic* 遺伝子について qPCR にて遺伝子発現解析を行った。

C. 研究結果および D. 考察

1) 藍藻類 *Pseudanabaena* 属の分子系統解析と 2-MIB 産生能

16S rRNA 遺伝子の系統樹において、株間の相同性について約 98%を目安にグループ分けを行ったところ、*Pseudanabaena* 属はI~Vの5系統に分かれた(図1)。Iは *P. subfoetida*、*P. foetida* を含み、主に 2-MIB 産生株からなる系統、IIは *P. cinerea* の 2-MIB 産生株、非産生株が含まれる系統、IIIは *P. yagii* の 2-MIB 産生株を含む系統、IVは *Pseudanabaena* sp.の非産生株が含まれる系統、Vは *Limnothrix redekei* や *Pseudanabaena* sp.の非産生株からなる系統である。今回解析した 2-MIB 産生株 7 株はI~IVの系統に位置づけられた。*P. subfoetida* WILD-6 と *P. subfoetida* WILD-62 は *P. subfoetida*、*P. foetida* が含まれる系統Iに位置付けられた。*P. cinerea* B-6 は *P. cinerea* の産生株と非産生株が含まれる系統IIに位置づけられた。*P. yagii* WILD-56、WILD-57 は *P. yagii* NIVA-CYA 111 と同じ系統IIIに位置づけられた。*P. limnetica* WILD-11、WILD-18 は非産生株である *Pseudanabaena* sp. Ak1315 と同じ系統IVに位置づけられた。全体的に種名ごとに系統がわかれており、形態による分類と 16S rRNA 遺伝子の解析結果の間に整合性が見られている

と考えられた。

2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹において相同性 99%以上で同一の系統としたところ *Pseudanabaena* 属の単離株は、それぞれ *P. yagii* NIVA-CYA 111、*Pseudanabaena* sp. dqh15、*P. limnetica* str Castaic Lake を含む三つの系統(A~C)に位置づけられた(図2)。*Pseudanabaena* sp. dqh15、*P. foetida* NIES-512、*P. subfoetida* WILD-62 は同じ系統Bに位置づけられ、16S rRNA 遺伝子の系統樹でもIに位置づけられているので一致が見られた。*P. subfoetida* WILD-6 は 16S rRNA 遺伝子の系統樹ではIに位置したが、2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹では、上述の3株とは異なる系統Aに位置した。*P. yagii* NIVA-CYA 111、*P. yagii* NIES-4237、*P. limnetica* WILD-11、*P. limnetica* WILD-18、*P. yagii* WILD-56、*P. yagii* WILD-57 は系統Cに位置づけられた。*P. yagii* NIVA-CYA 111、*P. yagii* NIES-4237、*P. yagii* WILD-56、*P. yagii* WILD-57 は 16S rRNA 遺伝子の系統樹においてIIIに位置づけられているので、16S rRNA 遺伝子の系統樹と 2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹の間に一致がみられる。一方、*P. limnetica* WILD-11、*P. limnetica* WILD-18 は 16S rRNA 遺伝子の系統樹においてはIVに位置づけられたが、2-MIB 合成酵素遺伝子では *P. yagii* NIVA-CYA 111 と同じ系統Cに位置づけられた。*P. cinerea* B-6 と *P. cinerea* NIES-4063 の2株はAに位置づけられたが 16S rRNA 遺伝子の系統樹においてもIIに位置づけられており、一致が見られた。以上のことから、16S rRNA 遺伝子の系統樹における位置づけと 2-MIB 合成酵素遺伝子における位置づけが一致する株と一致しない株が存在することが明らかとなった。

次に単離株を CT 培地を用いて 10~20°C で培養を行った。*P. subfoetida* WILD-6 は 10°C、15°C、20°Cにおいて増殖し、最大増殖量に温度による違いは見られなかった(図3)。2-MIB 総濃度は培養日数の経過とともに高まり、最大値は 15°C で最も高く、10°C は 15°C の半分以下であった(図4)。20°C で 15°C よりも低いのは、培養を定常期に入ってからすぐに打ち切ったことが影響していると考えられる。10°C と 15°C で、最大増殖量は同程度で、2-MIB 総濃度が 10°C で低いことから、10°C において 2-MIB 産生が抑制されていることが考えられた。定常期における糸状体当たりの 2-MIB 含有量は 10°C 0.0007ng/mm、15°C 0.003ng/mm、20°C 0.0025ng/mm と 10°C において著しく低いことが明らかとなった。定常期における総濃度に占める溶存態の割合は 10°C 11.6%、15°C 17.9%、20°C 14.8%であり、温度による違いは見られなかった。

P. limnetica WILD-11 株は 10、15°C においても増殖するが、*P. subfoetida* WILD-6 に比べて増殖が遅れる傾向が見られた(図5)。15°C において 3 本のうち 1 本が生育しなかったため、2 本の平均値を示している。温度間で最大増殖量に大きな違いは見られなかった。2-MIB 総濃度の最大値は 15°C で最も大きく 297000ng/L であった(図6)。10°C においても 242000ng/L 程度であり、WILD-6 でみられたような 10°C における抑制は見られなかった。10°C において *P. subfoetida* WILD-6 と *P. limnetica* WILD-11 の間に大きな差がみられたが、15°C およ

び 20°Cにおいても、*P. limnetica* WILD-11 のほうが 2-MIB 総濃度が高い傾向であった。定常期における糸状体当たりの 2-MIB 含有量は 10°C 0.0037ng/mm、15°C 0.0045ng/mm、20°C 0.0039ng/mm と温度による違いは見られなかった。定常期における総濃度に占める溶存態の割合は 10°C 16.3%、15°C 11.3%、20°C 31.6%であり 20°Cで高いことが明らかとなった。近年、水温が 10°C程度の、低温の条件下においても 2-MIB の発生がみられることが報告されている。芹川ダムにおいて水温が 10°C以下となっても *Phormidium tenue* (*Pseudanabaena* 属)が生息し、2-MIB が検出されることが報告されている³⁾。田中らは、カビ臭発生事例と気象要因の関係性について検討を行い、高滝ダムにおける 10°C以下の 2-MIB 発生は *Phormidium* 属 (*Pseudanabaena* 属) が原因であると報告している⁴⁾。本培養実験において 10°Cにおいても増殖が可能であることが明らかとなったが、低水温における *Pseudanabaena* 属による 2-MIB の発生を裏付ける結果となった。

次に実際の富栄養化した湖沼を想定して窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地を用いて検討を行った。なお、通常の CT 培地の窒素濃度は、31.7mg/L である。また、10°Cにおいて、*P. subfoetida* WILD-6 と *P. limnetica* WILD-11 の 2-MIB 産生に違いがみられたことから、10°Cおよび 20°Cで検討を行った。10°C、窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地において増殖の傾きに差は見られるものの、4 株すべて増殖が見られ、21 日以降定常期となった (図 7)。株間で 0 日目における糸状体数が異なるのは、接種に伴う窒素の持ち込みを減らすため接種量を調整したためである。最大増殖量に大きな違いは見られなかった。2-MIB 総濃度は *P. limnetica* WILD-11 において著しく高く推移した (図 8)。2-MIB 総濃度の最大値は *P. subfoetida* WILD-6 4100ng/L、*P. limnetica* WILD-11 3400ng/L、*P. yagii* WILD-56 1000ng/L、*P. subfoetida* WILD-62 340ng/L であり、*P. limnetica* WILD-11 が最も高く、次いで *P. yagii* WILD-56 が高かった。*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 では低く、*P. subfoetida* WILD-62 は *P. limnetica* WILD-11 の 10 分の 1 であった。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 0.00061ng/mm、*P. limnetica* WILD-11 0.0039ng/mm、*P. yagii* WILD-56 0.0011ng/mm、*P. subfoetida* WILD-62 0.00045ng/mm となり、最大値の大きい順に、含有量も大きいことが明らかとなった。定常期における総濃度に占める溶存態の割合は *P. subfoetida* WILD-6 21.4%、*P. limnetica* WILD-11 12.3%、*P. yagii* WILD-56 25.8%、*P. subfoetida* WILD-62 28.5%であった。

20°Cにおいて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 9)。*P. subfoetida* WILD-62 株と *P. cinerea* B-6 株は 14 日以降定常期となった。2-MIB 総濃度の最大値は、*P. limnetica* WILD-11 が最も高く、次いで *P. cinerea* B-6 株であった (図 10)。*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 は *P. limnetica* WILD-11 と比べると低い傾向であった。溶存態 2-MIB 濃度の最大

値は、*P. limnetica* WILD-11 が他の株の 2 倍程度大きいことが明らかとなった。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 0.0006ng/mm、*P. limnetica* WILD-11 0.002ng/mm、*P. foetida* WILD-62 0.0006ng/mm、*P. cinerea* B-6 0.0008ng/mm となり、*P. limnetica* WILD-11 で最も大きいことが明らかとなった。定常期における総濃度に占める溶存態の割合は *P. subfoetida* WILD-6 24%、*P. limnetica* WILD-11 35.4%、*P. subfoetida* WILD-62 45%、*P. cinerea* B-6 35.8%であり、10°Cに比べて高い傾向であった。

窒素濃度を 1mg/L に制限した培地を用いて 10°C、20°Cで培養した時の最大増殖量、2-MIB 総濃度の最大値、定常期の 2-MIB 含有量をまとめた (表 1)。2-MIB 総濃度の最大値について一元配置分散分析を行ったところ、20°Cでは株間で有意な差はみられなかったが、10°Cにおいて *P. limnetica* WILD-11 とその他の株の間に有意差がみられた ($p<0.05$)。 *P. yagii* WILD-56 と *P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 の間にも有意差がみられた。

t-検定により、2-MIB 最大値について温度間の有意差について検討を行ったところ、*P. subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11、*P. subfoetida* WILD-62 いずれにおいても有意差がみられたが ($p<0.05$)、*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 は 20°Cにおいて高いに対して、*P. limnetica* WILD-11 は 10°Cにおいて高い。*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 は最大増殖量が 20°Cのほうが 10°Cに比較して 1.8 倍大きく、2-MIB 総濃度の最大値は 20°Cのほうがそれぞれ、2.3 倍、3.2 倍大きくくなっている。*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 については、20°Cにおいて増殖量の増加に伴い 2-MIB 濃度も高まると考えられた。

定常期における 2-MIB 含有量は 10°C、20°Cにおいて *P. limnetica* WILD-11 が大きいことが明らかとなった。*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 については定常期における 2-MIB 含有量に温度による違いはみられない。通常の CT 培地では *P. subfoetida* WILD-6 は 10°Cにおいて 2-MIB 産生が抑制される傾向が見られたが、1mg/L に窒素を制限した系では含有量に違いはみられず、そのような傾向は見られなかった。*P. limnetica* WILD-11 は 10°Cにおいて 20°Cの約 2 倍に高まっている。このことから *P. limnetica* WILD-11 は他の株に比べて 2-MIB 産生能力が高いが、特に 10°C、窒素 1mg/L の条件において 2-MIB 産生が促進されることが明らかとなった。Shen ら⁵⁾は *P. foetida* var. *intermedia* NIES-512 について 15°C、25°C、35°C で培養を行い、2-MIB 産生量や 2-MIB 合成酵素遺伝子の発現量について検討を行っている。その結果 2-MIB 総濃度は 15°Cで最も低いことを報告している。*P. foetida* var. *intermedia* NIES-512 と系統樹で同じ位置に位置づけられる *P. subfoetida* WILD-62 は 20°Cに比べて 10°Cで 2-MIB 総濃度の最大値が低いことから一致する傾向にあると考えられる。Shen らはこの論文の中で 2-MIB 合成酵素遺伝子発現量は 15°Cで最も高いことを報告している。一方 Kakimoto ら⁶⁾は、Shen らと同様の株を用いて、20°Cで培養したものを、4°Cもしくは

は 30°C の条件に移し、発現解析を行った。2-MIB 合成酵素遺伝子の発現レベルは 30°C、20°C、4°C の順に、温度が高いほど大きいことを報告している。実験条件が異なるものの相反する結果となり、発現量の温度依存性についてはさらなる検討が必要と考えられるが、*P. limnetica* WILD-11 のような低温で産生能力が高い株についても検討を行う必要があると考えられる。10°C において *P. yagii* WILD-56 は *P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 に比べて 2-MIB 産生能力が高いことが明らかとなったが、*P. limnetica* WILD-11、*P. yagii* WILD-56 は 2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹において C に位置づけられることから (図 2)、この系統に属する *Pseudanabaena* 属は低温下における 2-MIB 産生能力が高い可能性がある。

2) 河床付着性藍藻類 *Microcoleus autumnalis* の分子系統解析

16S rRNA 遺伝子に基づいた系統樹(約 1290 塩基)において、本研究に用いた 2-MIB 産生株とジェオスミン産生株の多くの株は同じ系統に位置づけられた。次に 16S rRNA 遺伝子および 16S-23S ITS 領域に基づいて系統樹を作成したところ、2-MIB を産生する株、ジェオスミンを産生する株、カビ臭原因物質非産生株はそれぞれ異なる系統に分かれて位置づけられた(図 11)。本研究で解析した 2-MIB 産生株は 3 系統、ジェオスミン産生株は 3 系統、カビ臭原因物質非産生株は 2 系統に分かれることが明らかとなった。このことからこの領域を解析することでカビ臭原因物質産生に関する表現形質を推定できることが示唆された。

3) 分子生物学的手法による河床付着物中の *Microcoleus* 属のカビ臭原因物質産生に関する表現形質の推定

採取した河床付着物のカビ臭原因物質濃度を表 2 に示す。A 川の S13 において 2-MIB が高濃度であった。B 川では Y1 においてジェオスミン、2-MIB とともに高濃度であった。A 川について塩基配列の解析を行ったところ、4 地点 8 試料で合計 43 OTUs が得られた。さらに相同性が 99% 以上のものを同一の OTU とすると 23 OTUs (D2021_1~D2021_23) が得られた。これを元に系統樹を作成したところ、D2021_19 と D2021_3 は 2-MIB 産生株、D2021_1 と D2021_14 はジェオスミン産生株、D2021_7 と D2021_8 は非産生株のクラスターに位置づけられた(図 12)。これらの OTU は A 川から単離された株(B-1, WILD-109, WILD-105, WILD-106, WILD-110, WILD-104, WILD-108, B-3) と同じ位置に位置づけられた。各 OTU がどの試料において検出されているのか表 3 にまとめた。A 川下流 (S13, S14) においては非産生のクローン数が多いが、S13 からのみ検出された D2021_19 が 2-MIB 産生株と同位置に位置づけられていることからこの OTU が S13 の高濃度の 2-MIB に寄与していると考えられる。上流、中流においては共通した OTU が検出されたが、最上流で採取された試料(S7, S8)は地点間の距離が 50m 程度であっても共通した OTU は検出されなかった。最上流から中流にかけて D2021_1、D2021_3 がクローン数が多く検出され、それぞれジェオスミン、2-MIB の発生に寄与していると考えられた。

B 川について塩基配列の解析を行ったところ、4 地点 4 試料で合計 29 OTUs が得られた。さらに相同性が 99% 以上のものを同一の OTU とすると 17 OTUs (Y2022_1~Y2022_17) が得られた。これを元に系統樹を作成したところ、D2022_3 と D2022_5 は 2-MIB 産生株、Y2022_1、Y2022_8、Y2022_11 はジェオスミン産生株のクラスターに位置づけられた(図 13)。これらの OTU は B 川から単離された株 (WILD-102, WILD-113, WILD-81, B-19) と同じ位置に位置づけられた。各 OTU がどの試料において検出されているのか表 4 にまとめた。Y2022_3 は全試料から検出され B 川の 2-MIB 発生に寄与していると考えられる。また、Y2022_8 は Y1(下流)からクローン数が多く検出されていることからこの OTU が高濃度のジェオスミンに寄与していると考えられる。A 川と B 川から検出された OTU をまとめて系統樹を作成したところ、30 OTUs が同じ位置に位置づけられた。共通して検出された OTU はいずれも A 川最上流部、上流部でクローン数が多く検出されている OTU であった。

以上の結果から、上流から下流といった採取地点の違いや、地点内における採取場所の違いによって *Microcoleus* 属の生物相が異なることが明らかとなった。さらに系統樹において、単離株と近い系統ではあるが、カビ臭産生に関する表現形質の推定が困難な OTU や単離株が存在しない系統の OTU の存在が明らかとなり、*Microcoleus* 属の多様性を示唆する結果となった。

4) *Microcoleus autumnalis* の分子系統とカビ臭原因物質産生能の比較

2-MIB 産生株について、培養 28 日目、培養液 10mL 中の 2-MIB 総量は *M. autumnalis* WILD-102、*M. autumnalis* WILD-109 で 100ng 程度であったが、*M. autumnalis* B-1 では 64 ng と低かった (図 14)。また溶存態の比率は *M. autumnalis* WILD-102、*M. autumnalis* WILD-109、*M. autumnalis* B-1 で 30~40% 程度であったが、*M. autumnalis* WILD-105 で 13% と低いことが明らかとなった。2-MIB 総量に株間での違いはみられるが、系統間での違いはみられなかった。ジェオスミン産生株について、培養液 10mL 中のジェオスミン総量は 同系統に位置づけられる *M. autumnalis* WILD-106 と *M. autumnalis* WILD-110 は 10~20ng 程度であったのに対し、*M. autumnalis* WILD-104 は 55ng と高く、系統によって産生能力が異なることが示唆された (図 15)。また溶存態の比率は 3~15% であり、2-MIB 産生株に比べて低い傾向であった。

5) *Microcoleus autumnalis* のカビ臭原因物質産生に及ぼす温度の影響

M. autumnalis WILD-54 は 20°C から 30°C において増殖を示した (図 16)。特に、より高い温度で増殖速度が大きい傾向が見られた。硝酸性窒素もそれに応じて 30°C において最も減少が速いことが明らかとなった (図 17)。2-MIB 総量は温度に関係なく 14 日目で最大となった (図 18)。さらに 20°C~30°C において、温度が高まるにつれて溶存態 2-MIB 濃度が高まるのが明らかとなった (図 19)。河床付着性藍藻類の産生する 2-MIB のうち、浄水場で問題になるのは溶存態のものであるた

め、水温が高くなると浄水場におけるカビ臭被害がおこりやすくなる可能性が示唆された。*M. autumnalis* WILD-54 について 28 日目に 2-MIB 合成酵素遺伝子である *mtf* 遺伝子、*mic* 遺伝子の発現解析を行ったところ、20°Cにおいてコピー数が大きいことが明らかとなった。25°C、30°Cは死滅期に近づいていたため低い可能性があり、経時的に測定し、比較する必要性が示唆された。

M. autumnalis WILD-104 について培養を行ったところ 20°C、25°Cにおいて増殖を示したが、30°Cは Chl.a が定量下限以下であった (図 20)。硝酸性窒素の減少は温度が 25°Cのときに最も速いことが明らかとなった (図 21)。Chl.a が定量下限以下の 30°Cでも減少がみられたが、増殖した細胞がすぐ死滅していることが考えられた。ジェオスミン総量は 20°C、25°Cにおいて 21 日目で最大となった (図 22)。30°Cではジェオスミンの増加がみられなかった。ジェオスミン溶存態濃度の経時的変化に関して、20°Cに比べて 25°Cのほうが高く、28 日目に最大となった (図 23)。

単離株によって生育可能な温度範囲が異なることが明らかとなり、このような特性の違いが地点間での生物相の違いの一つの要因と考えられた。

E. 結論

カビ臭原因物質産生藻類の分子系統の違いとカビ臭原因物質産生能、増殖、カビ臭原因物質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。藍藻類 *Pseudanabaena* 属の単離株の分子系統解析と 2-MIB 産生能について検討を行ったところ、16S rRNA 遺伝子の系統樹において、*Pseudanabaena* 属はI~Vの5系統に分かれ、形態による分類と 16S rRNA 遺伝子の解析結果の間に整合性が見られた。2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹において *Pseudanabaena* 属の単離株は、それぞれ *P. yagii* NIVA-CYA 111、*Pseudanabaena* sp. dqh15、*P. limnetica* str Castaic Lake を含む 3 系統 (A~C) に位置づけられた。*P. subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11 は 10、15°C、20°Cにおいて増殖し、低水温における *Pseudanabaena* 属による 2-MIB の発生を裏付ける結果となった。窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地を用いて 10°Cで培養を行ったところ 2-MIB 総濃度は *P. limnetica* WILD-11 において他の株に比べて著しく高く推移した。*P. limnetica* WILD-11 は他の株に比べて 2-MIB 産生能力が高いが、特に 10°C、窒素 1mg/L の条件において 2-MIB 産生が促進されることが明らかとなった。10°Cにおいて *P. yagii* WILD-56 は *P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 に比べて 2-MIB 産生能力が高く 2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹において C に位置づけられる *P. limnetica* WILD-11、*P. yagii* WILD-56 は低水温における 2-MIB 産生能力が高いことが示唆された。

河床付着性藍藻類 *Microcoleus autumnalis* の単離株は 16S rRNA 遺伝子および 16S-23S ITS 領域の系統樹において、2-MIB を産生する株、ジェオスミンを産生する株、カビ臭原因物質非産生株が分かれて位置づけられることが明らかとなった。

A 川と B 川において分子生物学的手法により河

床付着物中の *Microcoleus* 属の 16S-23S ITS 領域を解析し生物相を評価したところ、上流から下流といった採取地点の違いや、地点内における採取場所の違いによって *Microcoleus* 属の生物相が異なることが明らかとなった。さらに系統樹において、単離株と近い系統ではあるが、カビ臭原因物質産生に関する表現形質の推定が困難な OTU や単離株が存在しない系統の OTU の存在が明らかとなった。

M. autumnalis の 2-MIB 産生株については株間で産生能力の違いが見られたが、分子系統による産生能力の違いは見られなかった。一方ジェオスミン産生株については分子系統によって産生能力が異なることが示唆された。*M. autumnalis* の単離株の中には 20~30°Cの間で増殖が可能な株、30°Cにおいて増殖が抑制される株が存在することが明らかとなった。2-MIB 産生株である *M. autumnalis* WILD-54 は 20°C~30°Cにおいて、温度が高まるにつれて溶存態 2-MIB 濃度が高まり、浄水場における *M. autumnalis* によるカビ臭リスクに温度が影響することが示唆された。

以上の結果から *Pseudanabaena* 属に関しては分子系統によってカビ臭原因物質の産生能が異なることが示唆された。10°Cにおいて 2-MIB 産生能力が高まる株の存在が明らかとなり、その系統の *Pseudanabaena* 属が存在する水域では、水温が 2-MIB 濃度に影響する可能性があり、*Pseudanabaena* 属の存在量を注意深く監視する必要があると考えられた。*M. autumnalis* に関しては、30°Cにおいて溶存態 2-MIB が最も高まり、株によっては 30°Cにおいて増殖できないことが明らかとなり、気候変動に伴う温度上昇が、カビ臭被害を促進したり、*M. autumnalis* の生物相に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、株間、もしくは系統間で産生能力が異なることも示唆されている。カビ臭原因物質産生藻類の分子系統とカビ臭原因物質産生能、増殖・カビ臭原因物質産生に及ぼす温度の影響等について知見を集積した上で、このような系統による違い、水温といった環境条件による産生ポテンシャルの変化を踏まえた発生予測モデルの構築の必要性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

浅田安廣, 藤本尚志, 江崎敦, 松本恭太, 山口晴代, 秋葉道宏. 水道水源で発生するカビ臭原因物質産生藍藻類の監視に向けたライブラリー構築. 京都大学環境衛生工学研究会第 44 回シンポジウム; 2022.7.29-30; 京都.

松本恭太, 浅田安廣, 藤本尚志, 秋葉道宏. 水道水源における複数種のカビ臭原因物質産生藍藻類の同定・定量手法の開発. 令和 4 年度全国会議 (水道研究発表会); 2022.10.19-21; 名古屋.

下川栞, 藤本尚志, 大西章博, 清水和哉, 浅田安廣, 秋葉道宏. 河床付着性藍藻類 *Microcoleus* 属の分子系統解析およびカビ臭原因物質産生能の比較. 第 57 回日本水環境学会年会; 2023.3.15-17; 松山.

久保田雅也, 藤本尚志, 大西章博, 清水和哉, 浅田安廣, 秋葉道宏. 河床付着性藍藻類 *Microcoleus* 属の増殖およびカビ臭原因物質産生特性. 第 57 回日本水環境学会年会; 2022.3.15-17; 松山.

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) Niiyama, Y., Tuji, A.: *Microcoleus pseudautumnalis* sp. nov. (Cyanobacteria, Oscillatoriales) producing 2-methylisoborneol, Bulletin of the National Museum of Nature and Science Series B, 45 (3), 93-101 (2019).
- 2) Suurnäkki, S., Gomez-Saez, G. V., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Fewer, D. P., Sivonen, K.: Identification

of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds, Water Research, 68, 56-66 (2015).

3) 高橋 威一郎, 高瀬 勝教, 竹下 佳代子, 河野博幸, 馬見塚 守, 岐津 英明: 芹川ダムにおけるかび臭物質産生藍藻及び 2-メチルイソボルネオール の推移 についての評価, 水環境学会誌, 39 (2), 51-62 (2016).

4) 田中宏憲, 浅田安廣, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏: 藍藻類によるカビ臭発生と気象要因の関係性に関する全国事例解析, 用水と廃水, 64 (2), 131-139 (2022).

5) 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, Environ. Sci. Pollut. Res., 29(8), 12017-12026 (2022).

6) Kakimoto, M., Ishikawa, T., Miyagi, A., Saito, K., Miyazaki, M., Asaeda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M.: Culture temperature affects gene expression and metabolic pathways in the 2-methylisoborneol-producing cyanobacterium *Pseudanabaena galeata*, Journal of Plant Physiology, 171, 292-300 (2014).

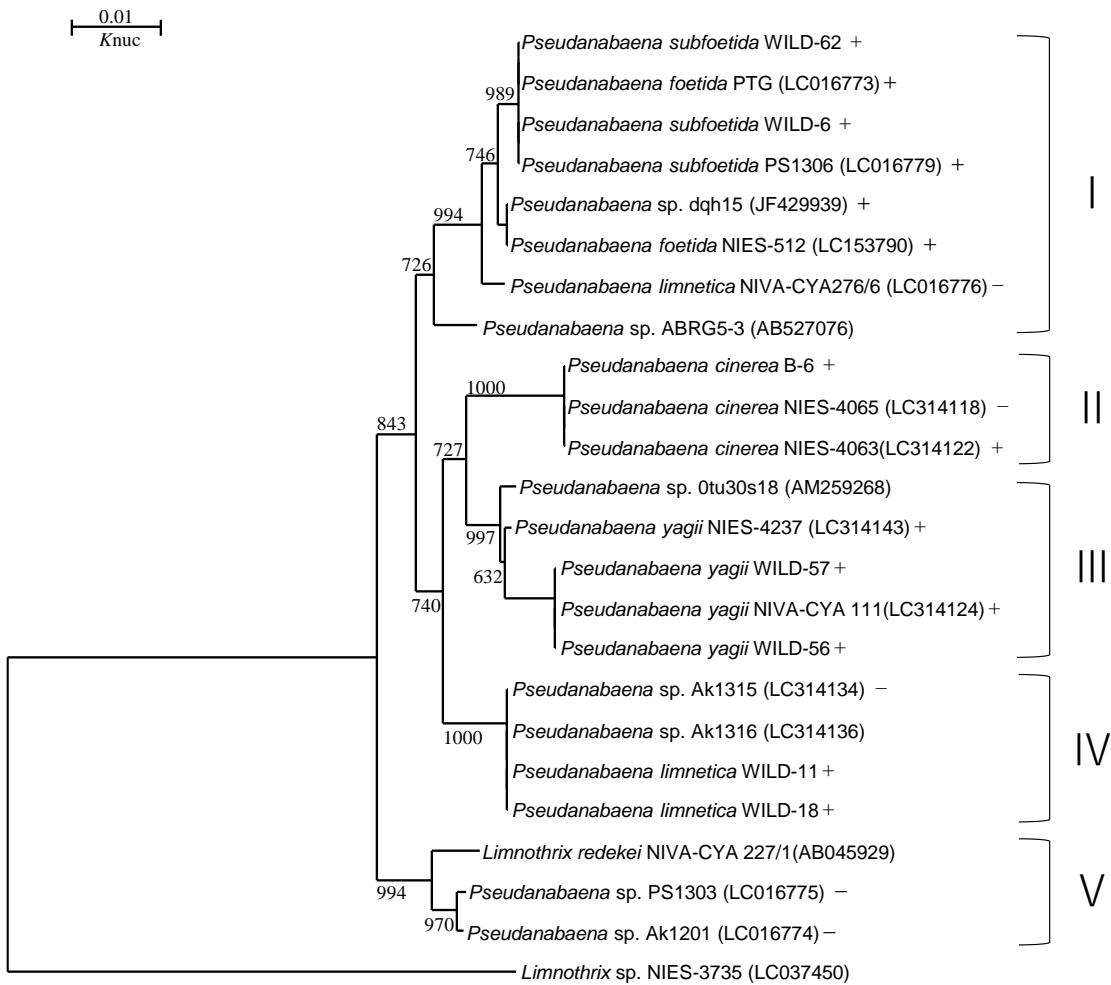


図1 *Pseudanabaena* 属の 16S rDNA 遺伝子に基づく系統樹
1245 塩基に基づいて作成、+は 2-MIB 産生株、-は 2-MIB 非産生株を示す。

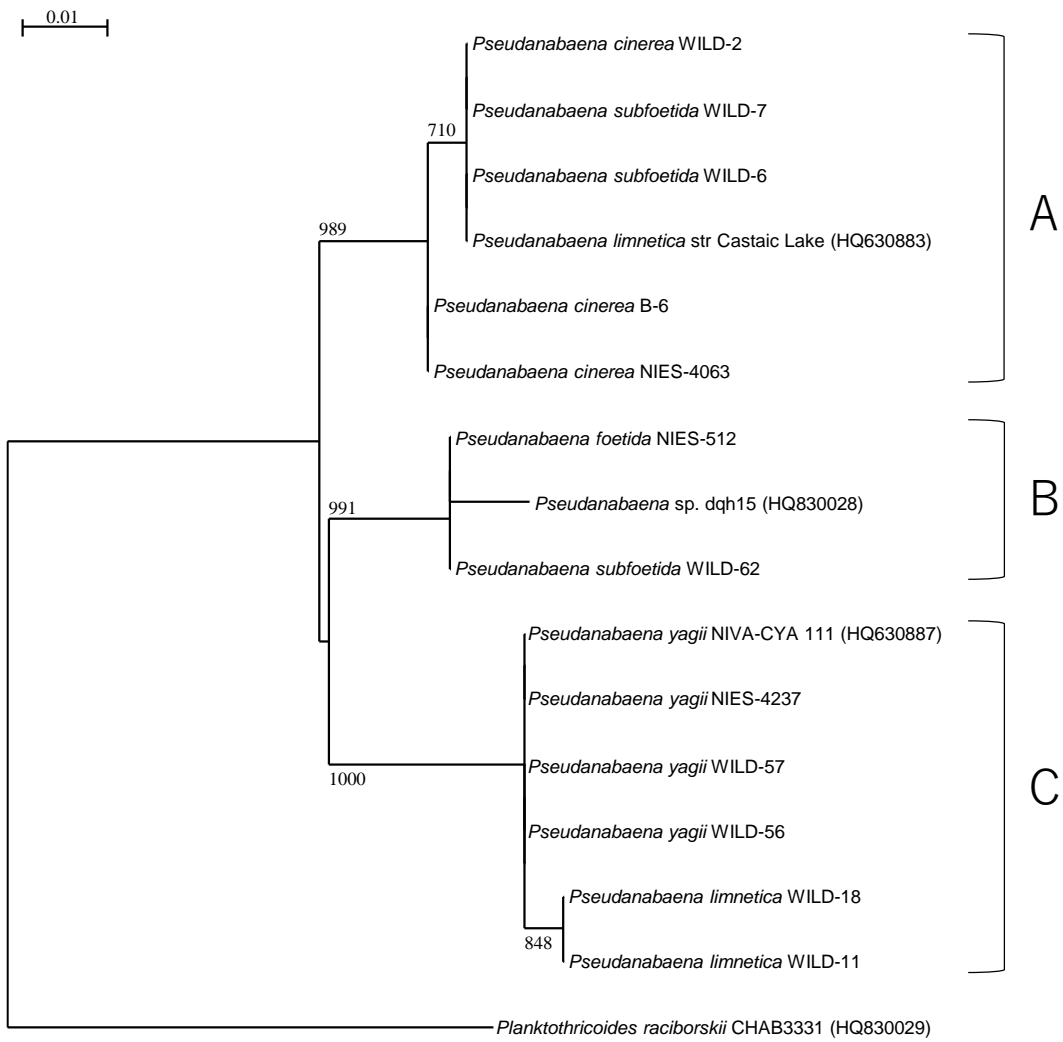


図2 2-MIB 合成酵素遺伝子 (monoterpene cyclase gene) のアミノ酸配列 (216 positions) に基づく系統樹 (バーはサイト当たりの置換数を示している)

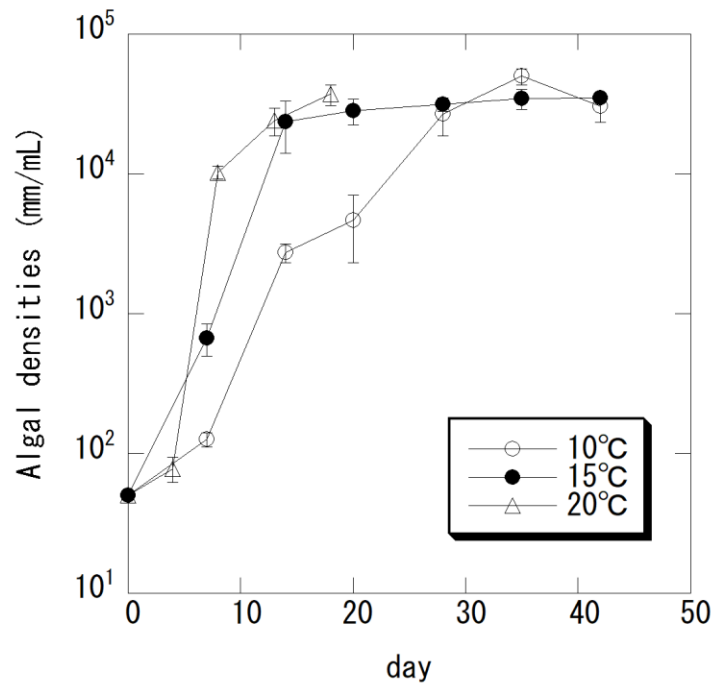


図3 *P. subfoetida* WILD-6 の増殖曲線 (CT 培地)

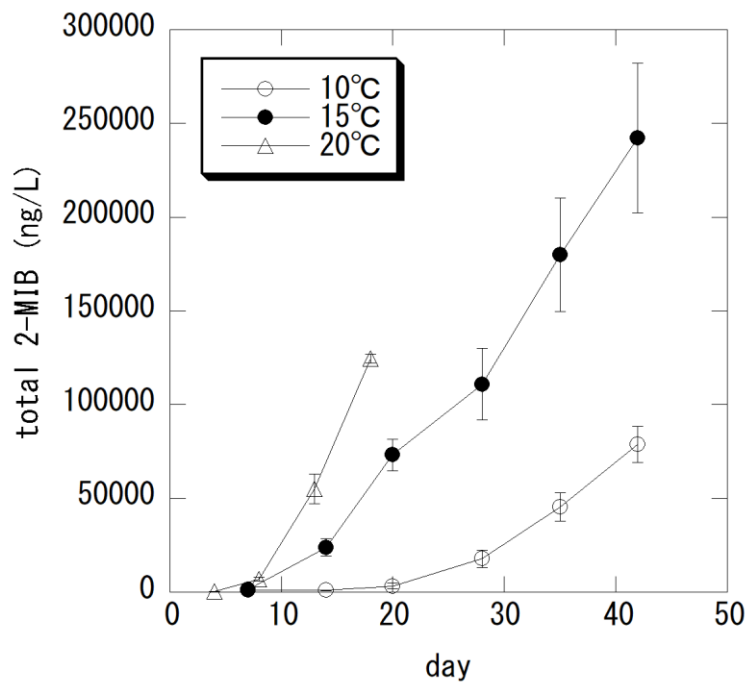


図4 *P. subfoetida* WILD-6 の増殖過程における2-MIB 総濃度の推移 (CT 培地)

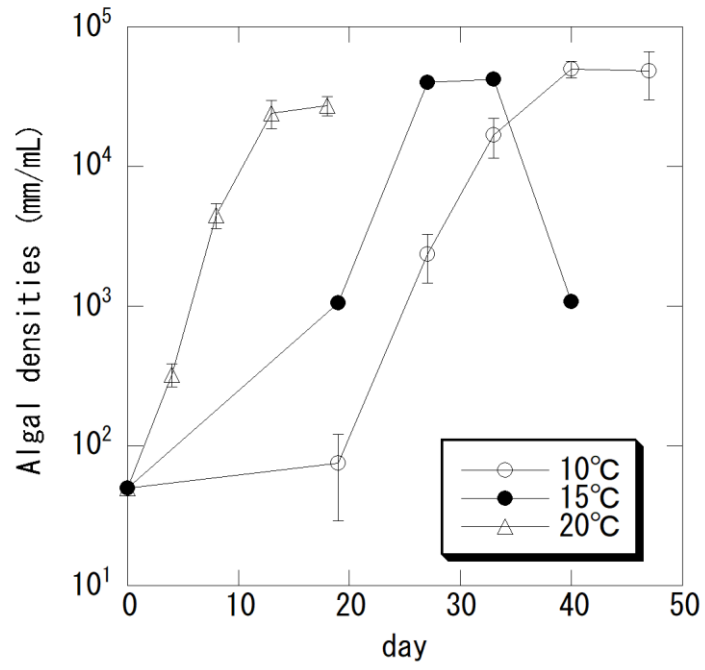


図5 *P. limnetica* WILD-11 の増殖曲線 (CT 培地)

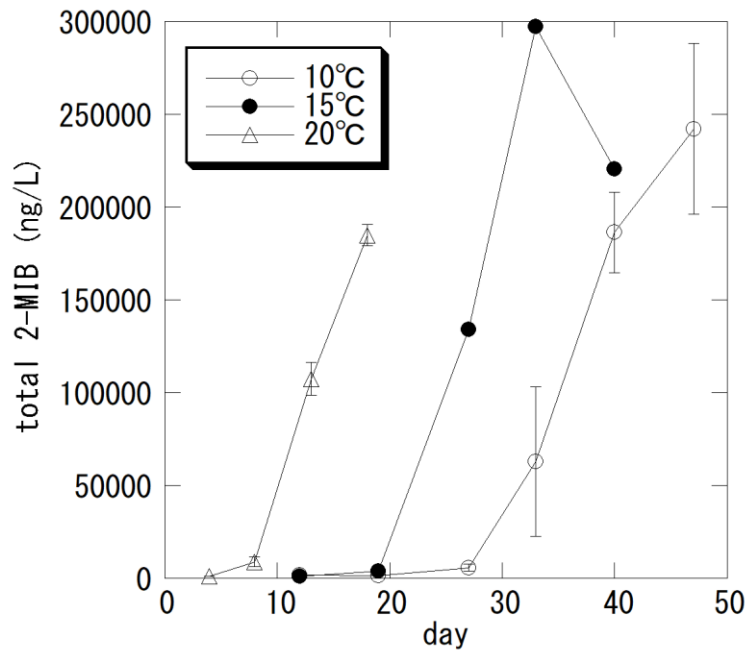


図6 *P. limnetica* WILD-11 の培養過程における 2-MIB 総濃度の推移 (CT 培地)

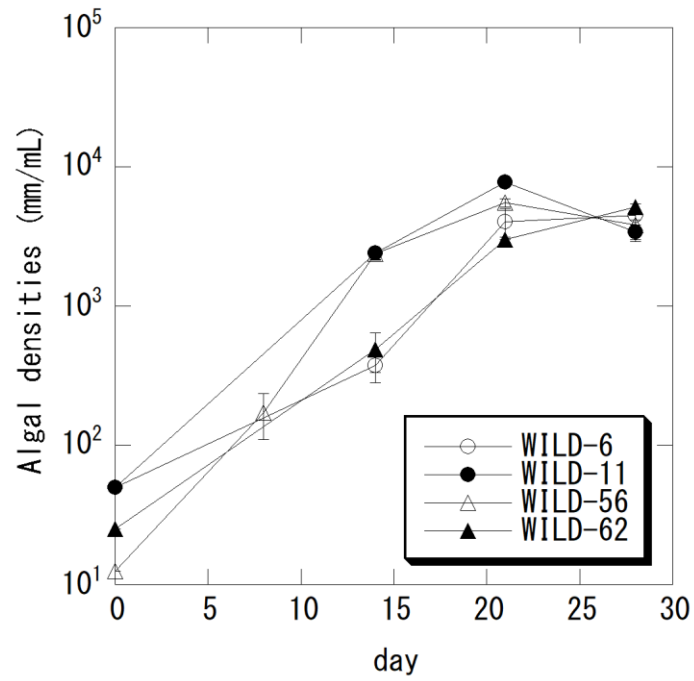


図7 窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地における増殖曲線 (10°C)

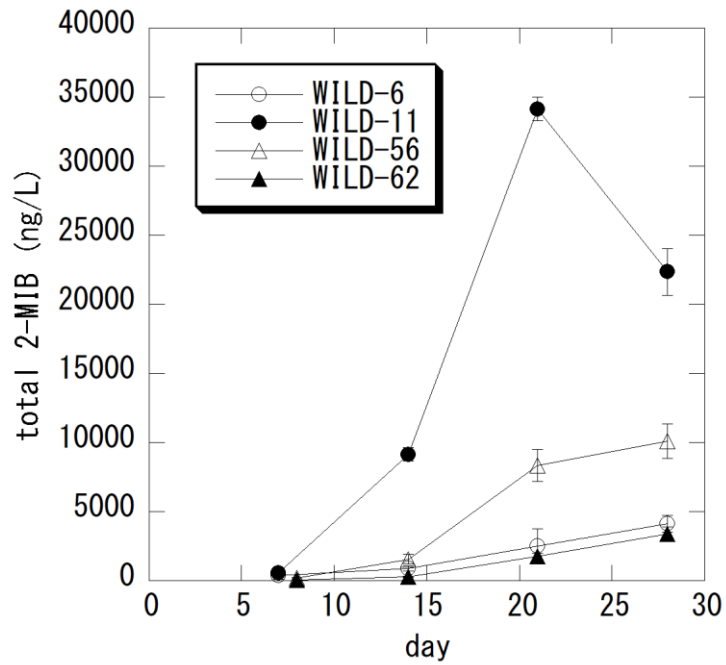


図8 窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地における培養過程における 2-MIB 総濃度の推移 (10°C)

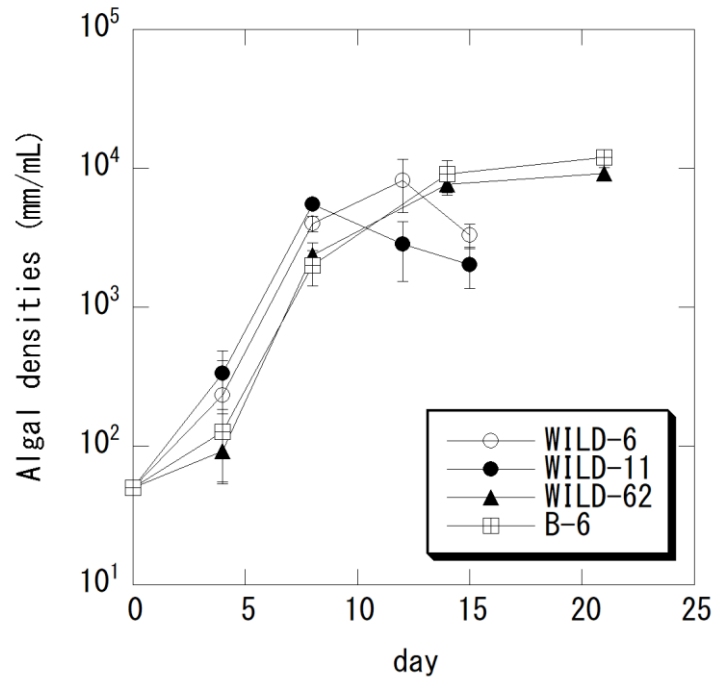


図9 窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地における増殖曲線 (20°C)

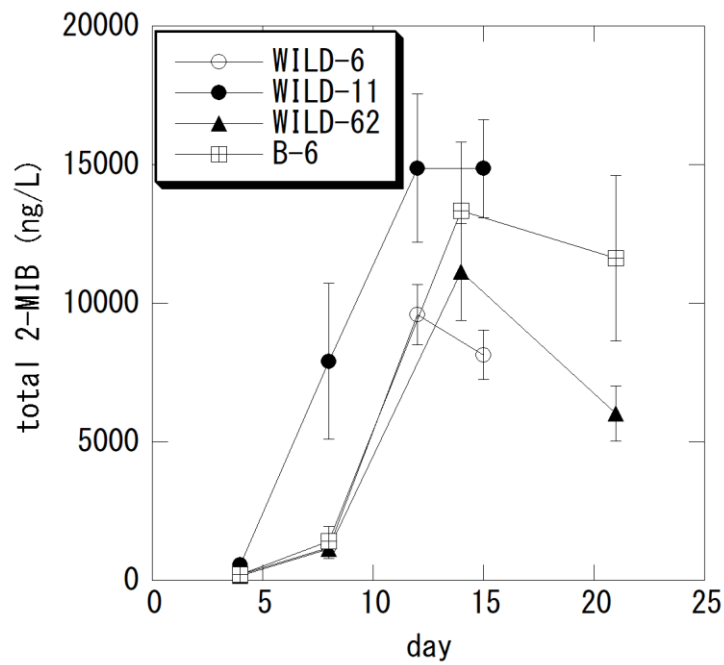


図10 窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地における培養過程における 2-MIB 総濃度の推移 (20°C)

表 1 窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地における最大増殖量、2-MIB 総濃度の最大値、定常期の 2-MIB 含有量 (2-MIB 総濃度の最大値、異なる文字間で有意差 (p<0.05))

	最大増殖量(mm/mL)		2-MIB総濃度の最大値(ng/L)		定常期の2-MIB含有量(ng/mm)	
	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C
<i>P. subfoetida</i> WILD-6	4500	8200	4100 ^c	9600	0.0006	0.0006
<i>P. limnetica</i> WILD-11	7800	5500	34000 ^a	15000	0.0039	0.002
<i>P. subfoetida</i> WILD-62	5200	9200	3400 ^c	11000	0.0005	0.0006
<i>P. yagii</i> WILD-56	5500	—	10000 ^b	—	0.0011	—
<i>P. cinerea</i> B-6	—	12000	—	13000	—	0.0008

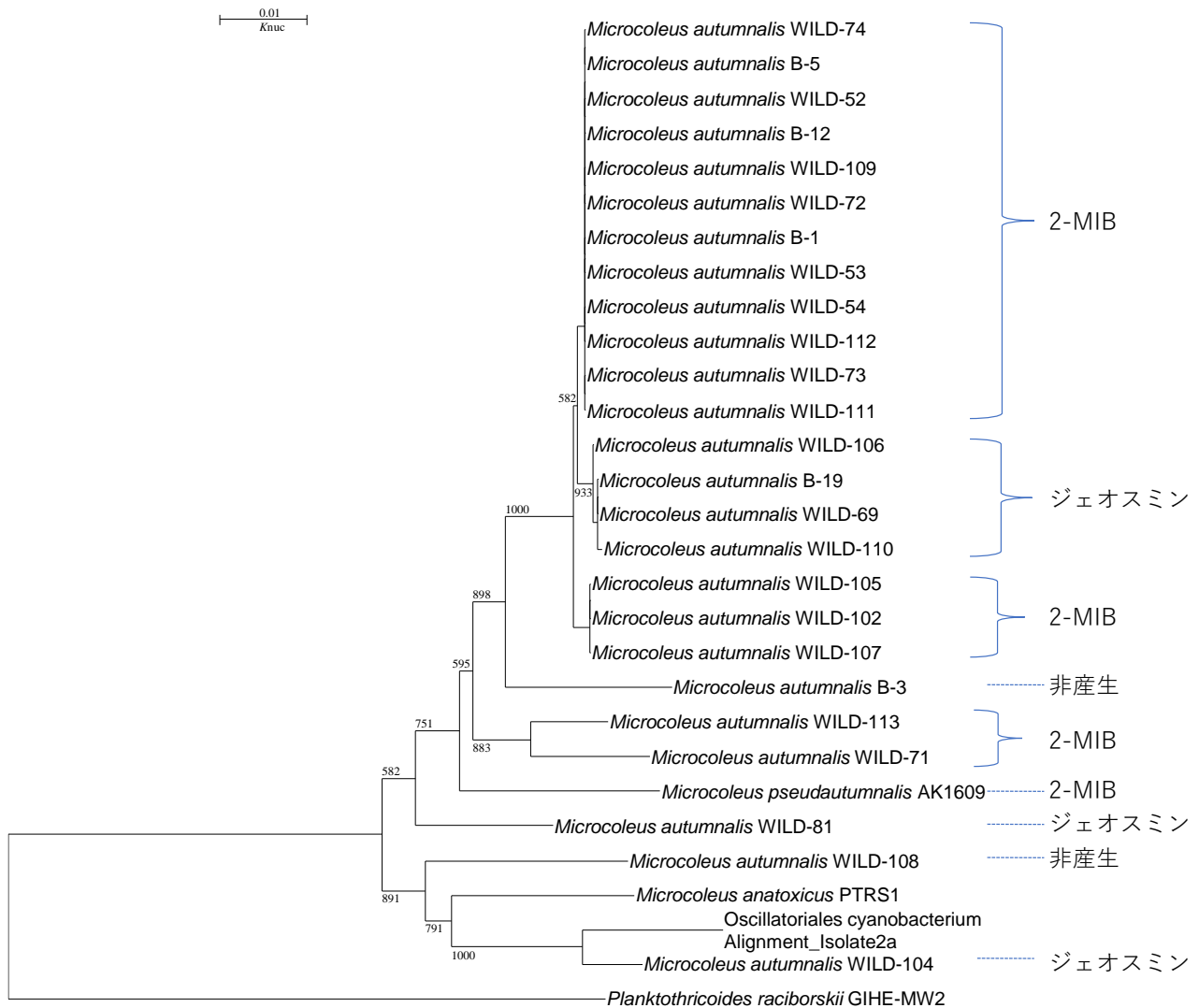


図 11 *Microcoleus* 属の 16S rDNA 遺伝子および 16S-23S ITS 領域に基づく系統樹 約 1840 塩基に基づいて作成

表 2 河床付着物試料のカビ臭原因物質測定結果

*カビ臭濃度は、固形物を水と共にシェイクして水サンプル部分を測定

	サンプル番号	サンプル名	geosmin(ng/L)	2-MIB(ng/L)
A川	S7	最上流①	1.0	8.2
	S8	最上流②	78.8	215.4
	S9	上流①	26.5	309.2
	S10	上流②	35.7	141.3
	S11	中流①	3.0	13.2
	S12	中流②	36.1	443.9
	S13	下流①	14.8	7634.5
	S14	下流②	5.1	222.9
B川	Y1	下流	302.6	441.3
	Y2	中流 本流	17.5	62.3
	Y3	中流 支流	1.4	1.6
	Y4	上流	21.2	40.0

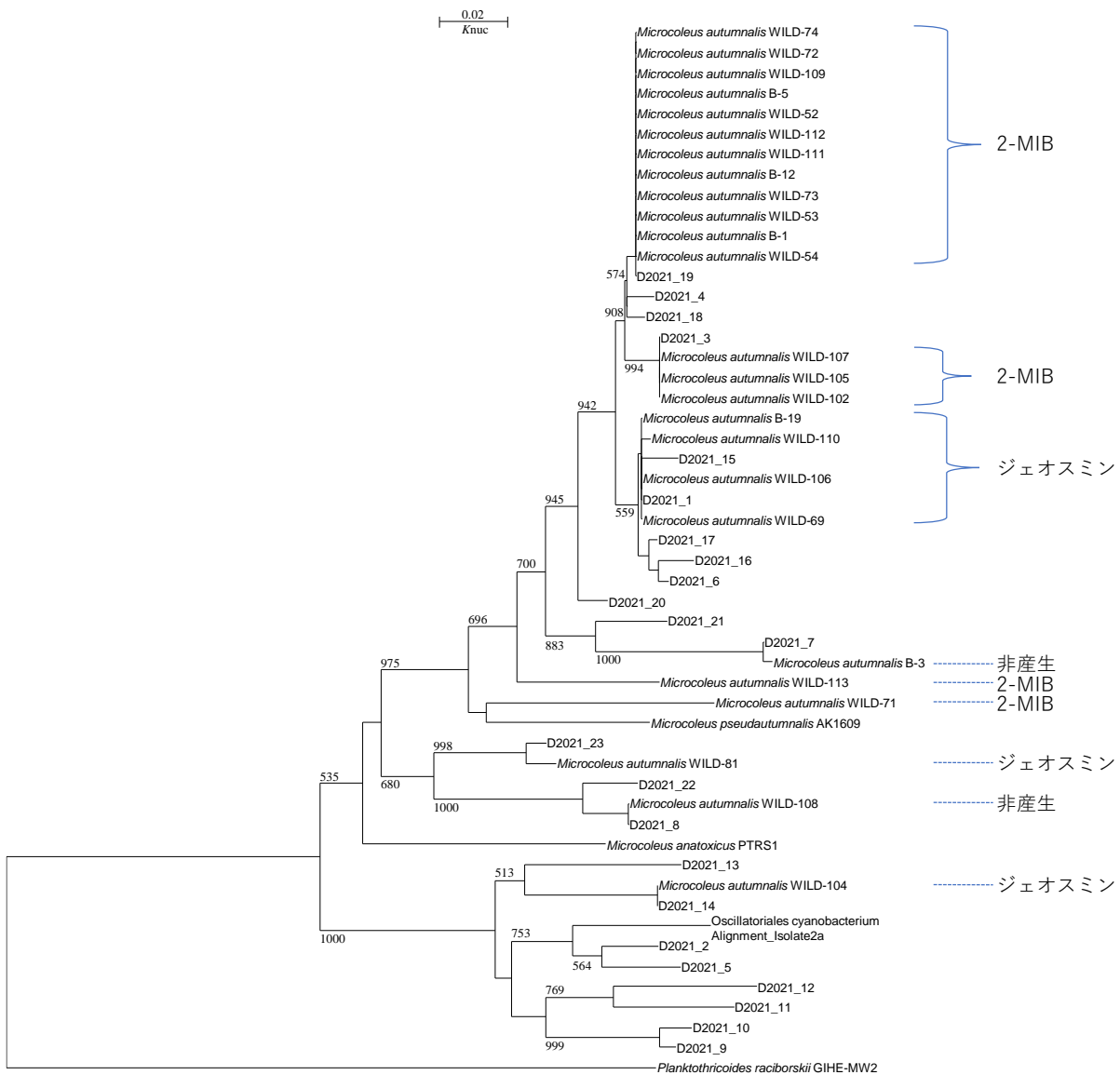


図 12 A 川から検出された OTU および *Microcoleus* 属の 16S-23S ITS 領域に基づく系統樹 約 400 塩基に基づいて作成

表3 A川から検出されたOTUの分布

○：1～4クローン検出、◎：5クローン以上検出

－：単離株との塩基配列の相同性が99%未満でカビ臭原因物質産生に関する表現形質を推定できなかった。

		最上流		上流		中流		下流	
		①	②	①	②	①	②	①	②
	カビ臭（推定）	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
D2021_1	geosmin	◎		◎	◎	◎	○		○
D2021_2	－					◎	○	○	○
D2021_3	2-MIB	◎		◎	◎	○			
D2021_4	－			○	○	○		○	
D2021_5	－			○		○	◎		
D2021_6	－	◎			○	○			
D2021_7	非産生							○	○
D2021_8	非産生							◎	◎
D2021_9	－		○						
D2021_10	－		○						
D2021_11	－		◎						
D2021_12	－		◎						
D2021_13	－		○						
D2021_14	geosmin		◎						
D2021_15	－				○				
D2021_16	－				○				
D2021_17	－	○							
D2021_18	－				○				
D2021_19	2-MIB							◎	
D2021_20	－		○						
D2021_21	－			○					
D2021_22	－							○	
D2021_23	－		○						

表4 B川から検出された OTU の分布

○ : 1~4 クローン検出、◎ : 5 クローン以上検出

— : 単離株との塩基配列の相同性が 99%未満でカビ臭原因物質産生に関する表現形質を推定できなかった。

	カビ臭 (推定)	下流	中流(本流)	中流(支流)	上流
		Y1	Y2	Y3	Y4
Y2022_1	geosmin		○	◎	○
Y2022_2	—		◎	○	○
Y2022_3	2-MIB	○	◎	○	○
Y2022_4	—			○	○
Y2022_5	2-MIB			○	○
Y2022_6	—	○	◎		
Y2022_7	—	○			
Y2022_8	geosmin	◎			
Y2022_9	—				○
Y2022_10	—				○
Y2022_11	geosmin		○		
Y2022_12	—		○		○
Y2022_13	—			○	○
Y2022_14	—			○	
Y2022_15	—				○
Y2022_16	—				○
Y2022_17	—				○

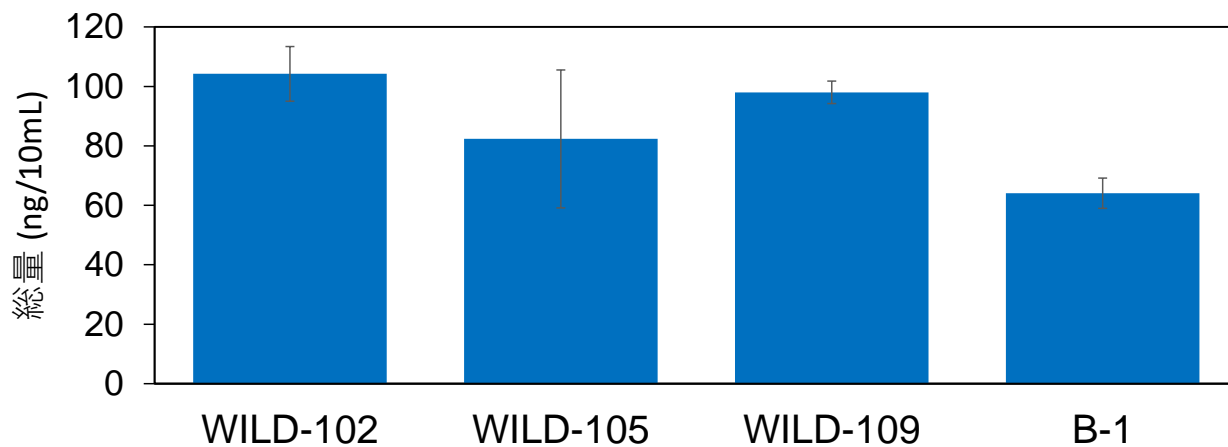


図 14 *M. autumnalis* の各株の 2-MIB 産生能の評価
 WILD-102 と WILD-105、WILD-109 と B-1 は 16S rRNA 遺伝子及び 16S-23S ITS 領域
 に基づく系統樹において同系統

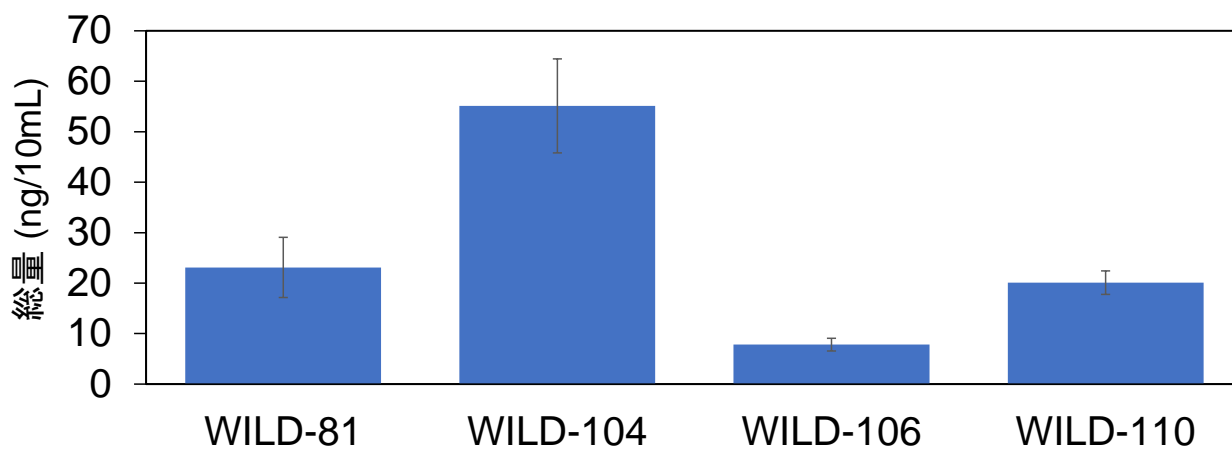


図 15 *M. autumnalis* の各株のジェオスミン産生能の評価
 WILD-106 と WILD-110 は 16S rRNA 遺伝子及び 16S-23S ITS 領域に基づく系統樹
 において同系統

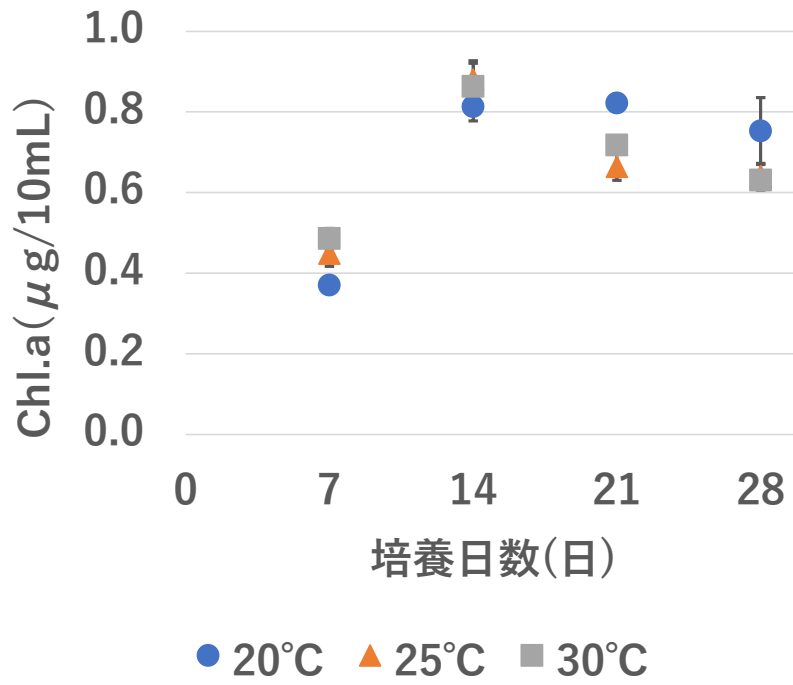


図 16 *M. autumnalis* WILD-54 の増殖に及ぼす温度の影響

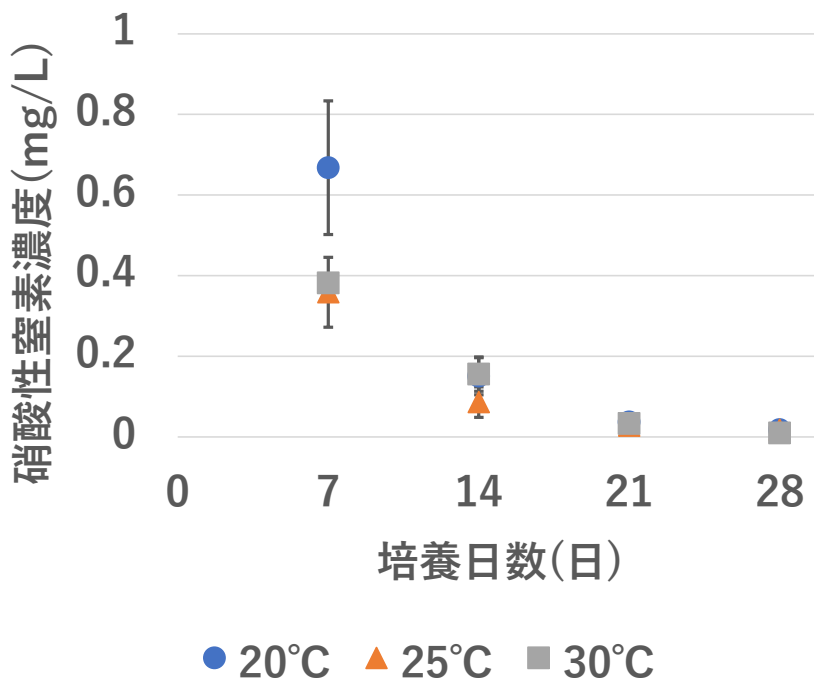


図 17 *M. autumnalis* WILD-54 の増殖過程における硝酸性窒素濃度の変化

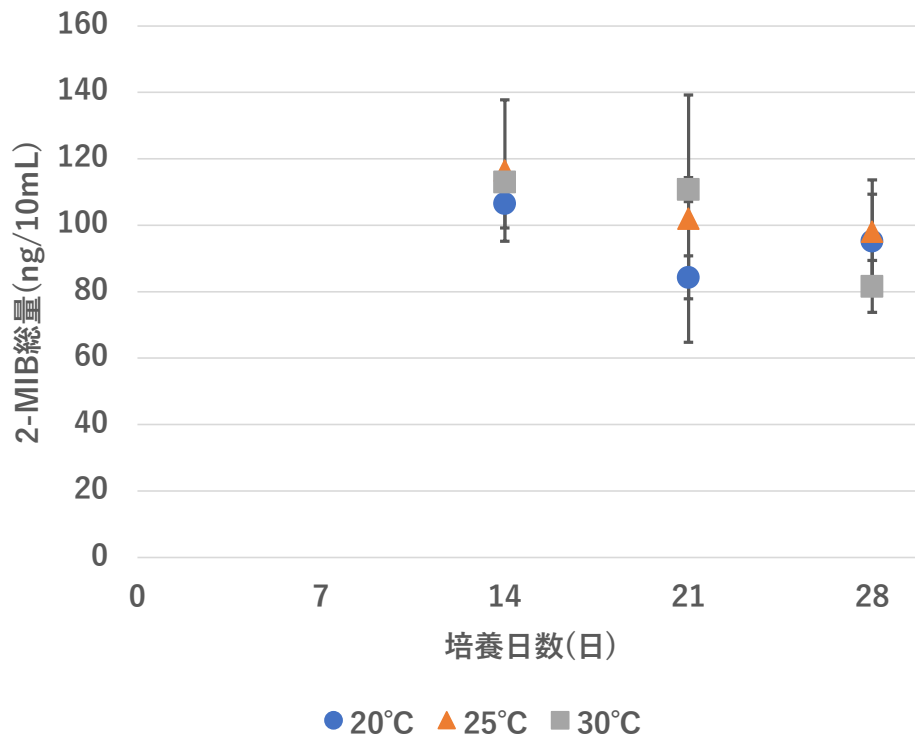


図 18 *M. autumnalis* WILD-54 の各温度の増殖過程における 2-MIB 総量の変化

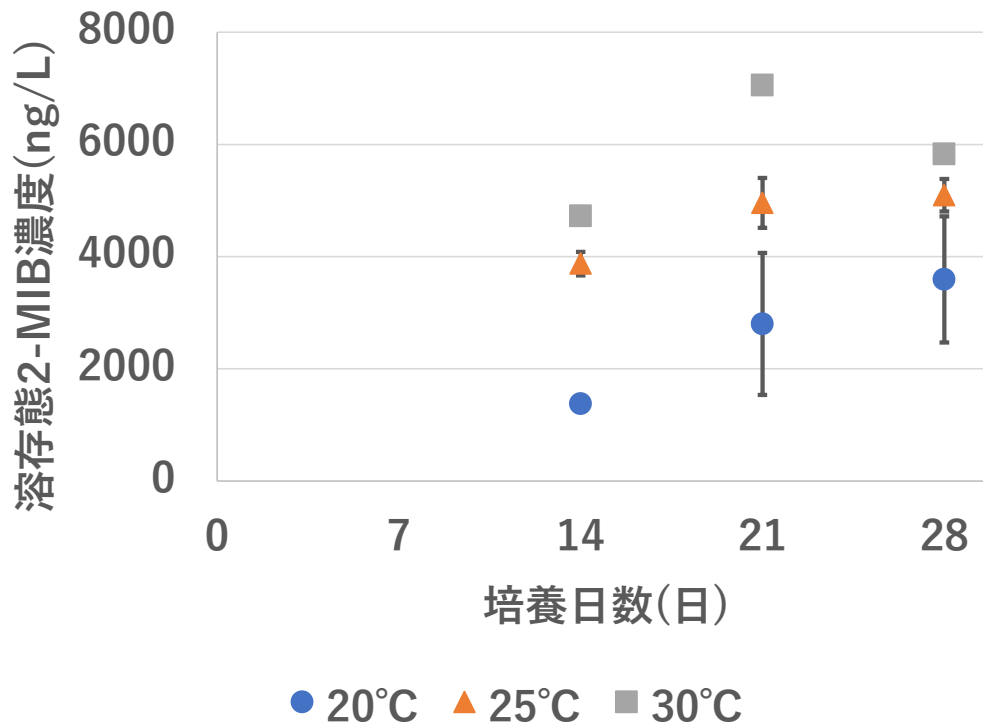


図 19 *M. autumnalis* WILD-54 の各温度の増殖過程における溶解態 2-MIB 濃度の変化

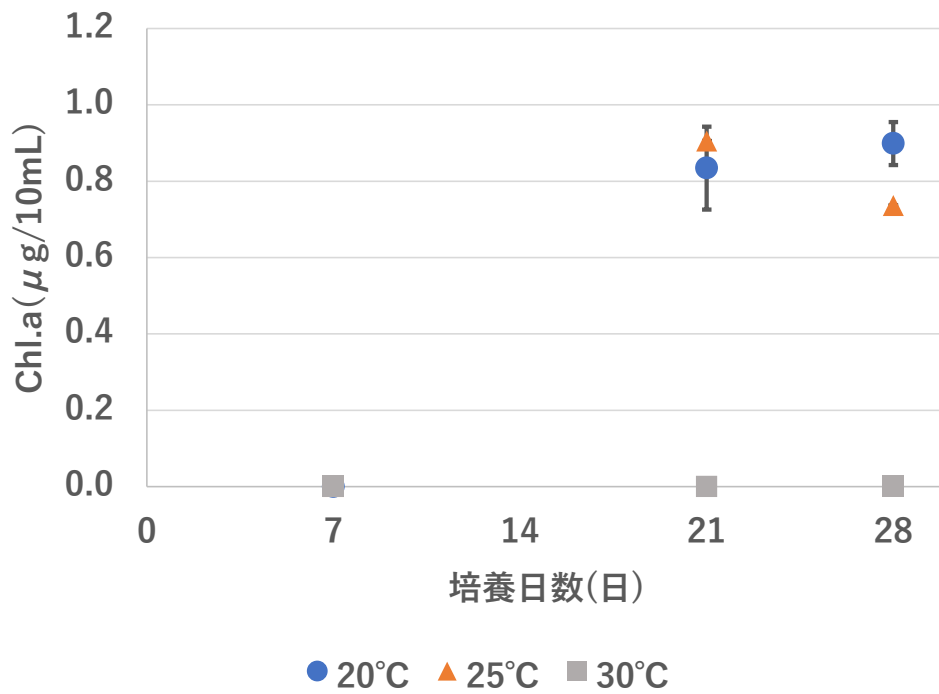


図 20 *M. autumnalis* WILD-104 の増殖に及ぼす温度の影響

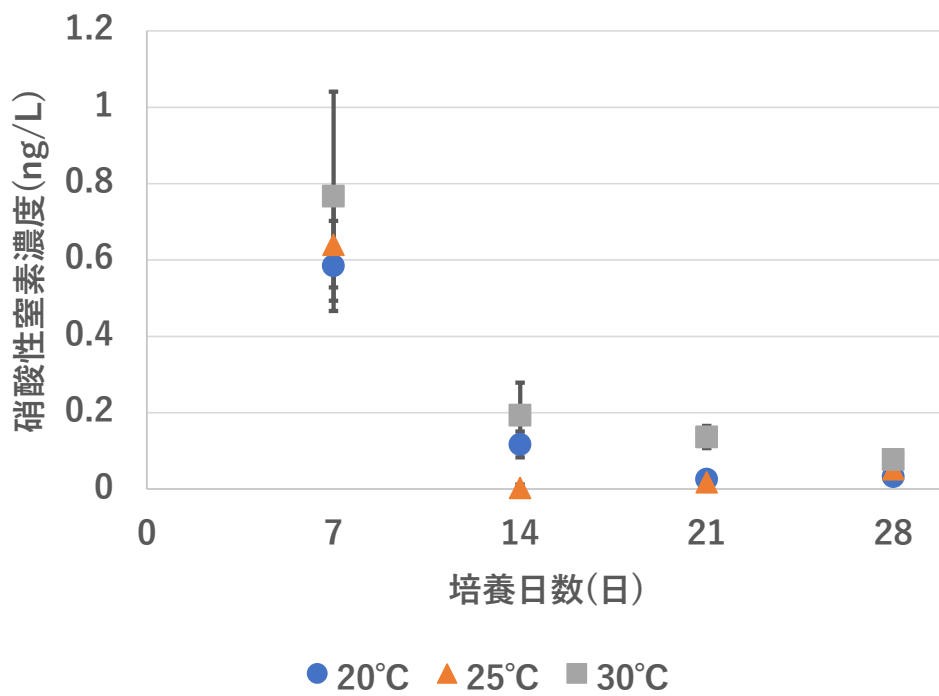


図 21 *M. autumnalis* WILD-104 の増殖過程における硝酸性窒素濃度の変化

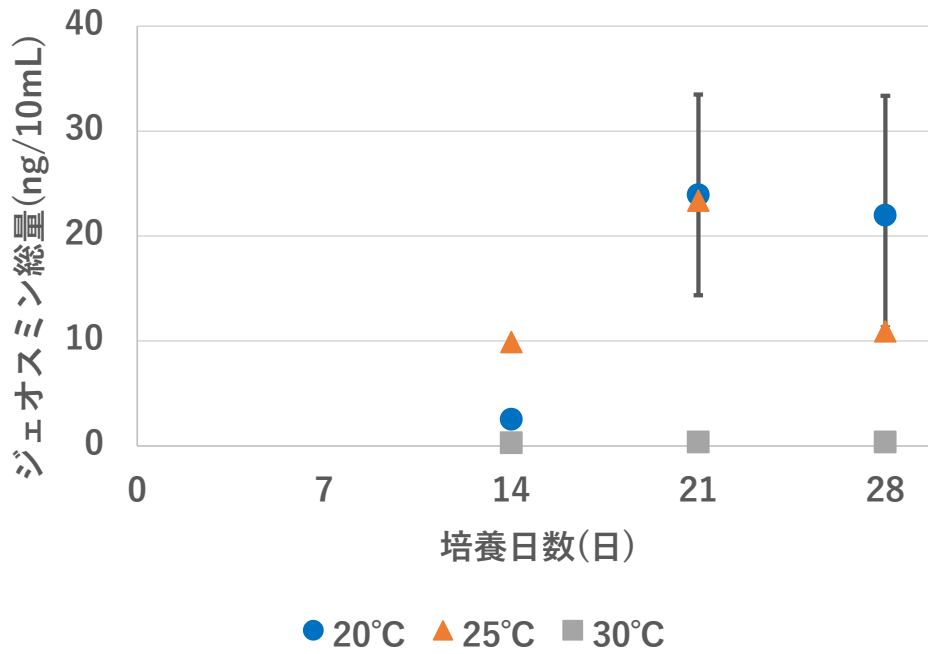


図 22 *M. autumnalis* WILD-104 の各温度の増殖過程におけるジェオスミン総量の変化

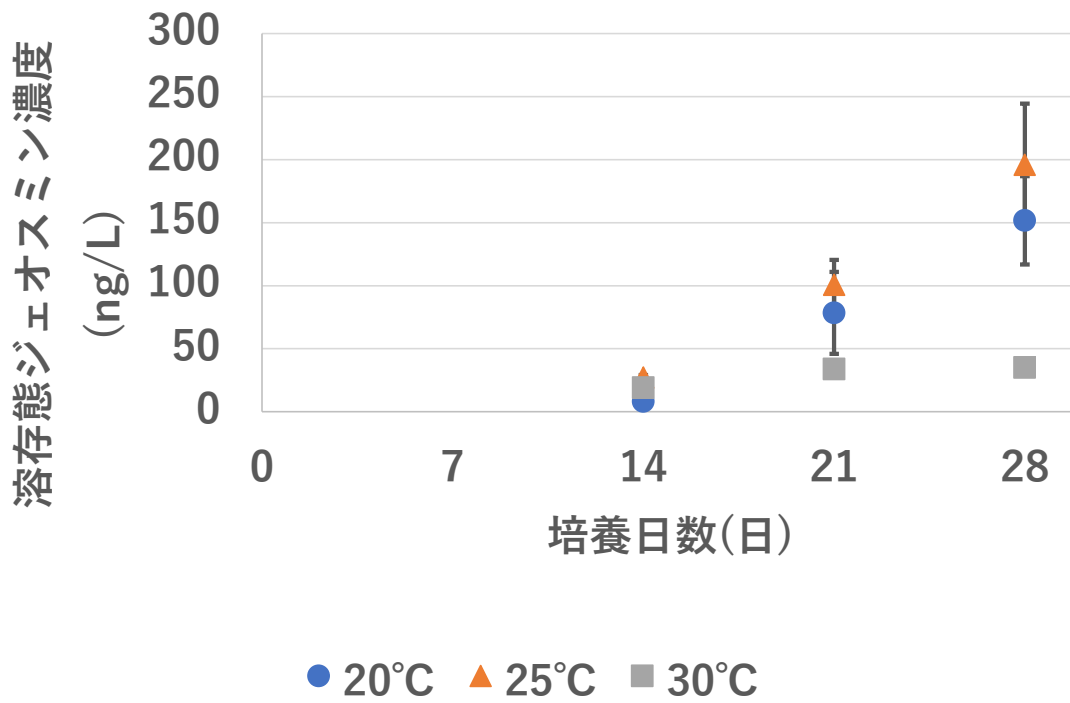


図 23 *M. autumnalis* WILD-104 の各温度の増殖過程における溶存態ジェオスミン濃度の変化

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	浅田 安廣
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

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	特任研究官
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
研究分担者	清水 和哉	東洋大学	生命科学部	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

研究要旨

気候変動により生じうる環境条件下（光条件（光強度、日長）、共存微生物）や水の硬度に関連するとともにカビ臭原因物質合成酵素に必要なとされる Mg^{2+} 濃度に着目して、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖ポテンシャルとカビ臭物質産物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た研究を実施した。この結果、10 mg- Mg^{2+} /L において、細胞密度、Chl. a、総ジェオスミン/総 2-MIB 濃度が最大となった。一方、過剰な Mg^{2+} (50 mg/L) は細胞増殖を抑制し、細胞密度と Chl-a 含有量は 10 mg- Mg^{2+} /L よりも低かった。さらに、*geoA*、*mtf*、*mtc* 遺伝子の発現量は 0 mg- Mg^{2+} /L で最も低く、過剰条件 (50 mg- Mg^{2+} /L) 条件では 10 mg- Mg^{2+} /L と比較して遺伝子発現を促進した。カビ臭原因物質産生藍藻類の同属・同種で、分離源が異なる場合、環境因子への応答は異なり、とくに、光強度と総 2-MIB 産生量は負の関係性が見られる場合や、2-MIB の細胞内外の局在が異なっていた。実際の水環境において藍藻類と共存する微生物（夏期と冬期）がカビ臭原因物質産生藍藻類 *Dolichospermum smithii* NIES-824 に与える影響を解析した。その結果、藍藻類群集構造とジェオスミン産生は、異なる微生物群によって変化した。冬期の微生物群集が夏期の微生物群集よりも *D. smithii* が増殖したが、培養の後期には明らかに他の藍藻類が優占となった。日長の長短は、*D. smithii* の増殖や *geoA* 遺伝子発現量、溶存有機物濃度 (DOC) 産生に影響を与えた。日長が長い (16 h) 場合は、増殖が早く、*geoA* 遺伝子発現量は培養初期に最大を示し、また DOC も多く産生した。日長が短い (9 h) 場合は、増殖とともに *geoA* 遺伝子発現量も増加していったが、DOC 産生量は低かった。

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、とくにカビ臭原因物質は、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。カビ臭原因物質が、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。近年のカビ臭原因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、カビ臭原因物質産生放線菌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、カビ臭原因物質産生藍藻類の挙動、カビ臭原因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、水温や光強度といった環境条件が変化し、またその変化に伴って共存微生物群集が変化することが予想される。それら条件の変化が、カビ臭原因物質藍藻類の個体群数の挙動やそのカビ臭原因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。カビ臭原因物質ジェオミンや 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) の合成経路について、カビ臭原因物質産生の藍藻類と放線菌のそれぞれで解析が進み、生合成に関与する酵素遺伝子群が明らかとなっている^{3,4,5)}。このジェオスミンや 2-MIB 合成酵素 Mg^{2+} が重要であることが明らかにされている^{5,6)}。また、 Mg^{2+} は、細菌の正常な増殖と細胞分裂に用いられている。特に藍藻類のクロロフィルは、 Mg^{2+} が中心イオンであるため Mg^{2+} は光合成に必須である⁷⁾。これまで、藍藻類のジェオスミン/2-MIB 生産に対する Mg^{2+} の影響に関する研究は行われていない。

以上から、温度、光強度、共存微生物群の変化や Mg^{2+} が及ぼすカビ臭原因物質産生藍藻類の増殖やカビ臭原因物質産生への影響を明らかにし、カビ臭原因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に試みる。

B. 研究方法

1) カビ臭原因物質産生に及ぼす Mg^{2+} 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 *Dolichospermum smithii* NIES-824、2-MIB 産生藍藻類として *Pseudanabaena foetida* NIES-512 を用い、CT 培地で 25°C 、 $30.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期を 12 h として培養した。表層水の平均 Mg^{2+} 濃度がおおよそ 10 mg/L と報告されている⁸⁾ことから、 Mg^{2+} 濃度を 0、10、24、50 mg/L とした条件で解析を実施した。 Mg^{2+} 濃度 10 mg/L で培養したものを対照群とした。

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) とジェオスミン合成酵素遺伝子 (*geoA* 遺伝子) の発現解析を qRT-PCR 法により実施した。使用したプライマーは、表 1 に示した。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、カビ臭原因物質ジェオスミンや 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光強度の影響

供試藍藻類は、2-MIB 産生藍藻類 *P. foetida* NIES-512、茨城県が霞ヶ浦より分離した *P. foetida* 1705-12、*P. 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 $30.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 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 $10.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、 $30.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、 $60.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 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、Chl. a の変化で解析した。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。

3) 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、ジェオスミン産生藍藻類 *D. smithii* NIES-824 (非無菌であるが単藻化された培養株) 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、 $30.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期を 12 h として培養した。参照系は滅菌超純水を用いた CT 培地 (SW) とし、微小動物等を除くために、湖水をろ過 (孔径 $5 \mu\text{m}$ フィルター) したろ過湖水を用いた CT 培地 (FW)、ろ過せずに微小動物等も含んだ湖水を用いた CT 培地 (LW) の 3 つ試験系を構築した。

細胞密度の変化は、Chl. a の変化で解析した。ジェオスミン合成酵素遺伝子 (*geoA* 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、*geoA* 遺伝子 (フィコシアニン遺伝子を内部標準遺伝子とした) の発現解析を 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、カビ臭原因物質ジェオスミン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、原核微生物群集構造を 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。

4) カビ臭原因物質産生に及ぼす日長の影響

ジェオスミン産生藍藻類として *D. smithii* NIES-824 を用い、CT 培地を用いて、 28°C 、 $60 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗サイクル 12 h : 12 h の条件で培養した。日長の影響解析のために、対数増殖期まで前培養した細胞を初期 Chl. a 濃度は $20 \mu\text{g/L}$ に調整する様、100 mL の CT 培地に接種し、温度 28°C 、 $60 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ の条件の下、日長条件を明 16 h : 暗 8 h、9 h : 15 h、12 h : 12 h (対照系) として実施した。培養は 21 日間行い、サンプルは 3 日ごとに採取した。すべてのグループは 3 連で採取した。採取したサンプルを用いて、Chl. a や *geoA* 遺伝子発現量 (16S rRNA 遺伝子を内部標準遺伝子とした)、溶存有機物濃

度 (DOC) を分析した。

C. 研究結果および D. 考察

1) カビ臭原因物質産生に及ぼす Mg^{2+} の影響

Mg^{2+} 制限条件下 ($0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) では、*D. smithii* は正常に生育できず、8日目以降に培養液が黄色に変化した。 $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ での細胞密度および Chl. a 含有量は、8日目以降、 $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ でのそれよりも著しく低かった ($p < 0.05$, 図 1)。Chl. a 濃度では、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件と $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件の間に、明らかな差はなかったが、細胞密度は $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ でわずかに高くなった。しかし、4日目以降の細胞密度および Chl. a 濃度は、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の方が $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ および $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の場合よりも低く ($p < 0.05$, 図 1)、過剰な Mg^{2+} は細胞の成長を阻害する可能性も示した。異なる Mg^{2+} 濃度条件下で、細胞密度および Chl. a 濃度と比較した総ジェオスミン濃度についても同様の結果となった (図 2)。総ジェオスミン濃度は $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ で最も低く、8日目以降は $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ よりも有意に低い値となった ($p < 0.05$, 図 2)。4日目から 16日目までは、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下と $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下で総ジェオスミン濃度に明らかな差はなかった。しかし、8日目から 16日目にかけて、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下では、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下と $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下よりも総ジェオスミン濃度が低くなった ($p < 0.05$, 図 2A)。ジェオスミン生産性 (ジェオスミン/Chl. a 濃度) については、異なる Mg^{2+} 条件下で明らかな差は認められなかった (図 2B)。 Mg^{2+} 制限条件下 ($0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) では、12日目以降、ジェオスミン生産性は $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ のものよりわずかに高くなったが、これは細胞死と Chl. a 濃度の減少が原因と考えられた (図 2B)。

全実験期間中 (20日間) において、*geoA* 遺伝子発現量は $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ で最も低かった (図 3)。培養4日目には $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の間で差はなかった。*geoA* 遺伝子発現量は、12日目から 20日目にかけて、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ で $0\text{--}24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。また、8日目から 16日目にかけては、 $20\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の方が $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の場合よりも *geoA* 遺伝子発現量が少なかった。

P. foetida の細胞バイオマスは 8日目に最大となり、その後急速に減少した (図 4)。異なる Mg^{2+} 濃度での細胞増殖は、*D. smithii* と比較して *P. foetida* で同様の結果が得られた。細胞密度および Chl. a 濃度は、8日目および 12日目において、 $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の方が $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の方よりも有意に低かった ($p < 0.05$)。最大細胞密度 (1.82×10^6 filament/mL) と Chl. a 濃度 (0.61 mg/L) は、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の条件下であった。 $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件と $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件の間には、明らかな差は見られなかった。

異なる Mg^{2+} 条件下での総 2-MIB 濃度の変化は、細胞増殖の傾向と一致した (図 5)。総 2-MIB 濃度は、8日目以降、 $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の場合よりも $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の場合の方が有意に低かった ($p < 0.05$, 図 5A)。総 2-MIB 濃度は、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ で、24 および $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下よりも高くなった。最大総 2-MIB 濃度 ($118.5\text{ }\mu\text{g/L}$) は、12日目の $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下であった。また、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ での総 2-MIB 濃度は、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ および $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ での濃度に比べて低かった。2-MIB の生産性 (2-MIB/Chl-a) については、異なる Mg^{2+} 条件下で明確なパターンは見られなかった (図 4 および 図 5)。培養開始後 8日間は、 $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の方が総 2-MIB 生産性がわずかに高かった。 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ では、 0 、 24 、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下よりも 2-MIB の生産性が有意に増加した ($p < 0.05$, 図 5B)。

試験した 4条件の Mg^{2+} 濃度 (0 、 10 、 24 、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) のうち、*P. foetida* の *mtf* 遺伝子および *mtc* 遺伝子の発現量は、8日目と 12日目に $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ で $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ に比べ有意に低く ($p < 0.05$, 図 4~図 6)、*geoA* 発現結果とも一致した (図 3)。 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ では、4日目および 12日目に $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ および $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下と比較して、*mtf* 遺伝子および *mtc* 遺伝子の発現量が増加した。

以上から、本研究結果から Mg^{2+} 濃度が、遺伝子発現レベルよりも細胞増殖とジェオスミン/2-MIB 産生に影響を与えた。 Mg^{2+} 制限条件 ($0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) では、*D. smithii* と *P. foetida* の細胞成長を阻害された。その上、*D. smithii* と *P. foetida* の総ジェオスミンと 2-MIB 濃度は、それぞれ $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下で最低であった。高 Mg^{2+} 濃度 ($50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) でも、 $10\text{--}24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下と比較して、細胞増殖およびジェオスミン/2-MIB 濃度をわずかに抑制された。これは、高 Mg^{2+} 濃度により他のイオン (Ca^{2+} や K^+ など)の細胞への取り込みが抑制されたことが原因であると考えられた⁷⁾。遺伝子発現量では、*geoA* 遺伝子、*mtf* 遺伝子、*mtc* 遺伝子の発現量は $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 処理で最も低く、過剰な Mg^{2+} ($50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) 条件下では $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 処理と比較して標的遺伝子の発現量が高いことが確認された。既往研究において、 Ca^{2+} が *Lyngbya kuetzingii* UTEX 1547 の Chl. a 濃度およびジェオスミン産生に影響を与え、 Ca^{2+} 濃度が高い条件下において低い条件下よりもジェオスミン濃度が高くなることを明らかにされている⁹⁾。以上から、天然水の硬度は、増殖や二次代謝産物 (ジェオスミンや 2-MIB など) 産生に影響を与えていることを示している。

2) カビ臭原因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、 $10\text{ }\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ の光強度で良好な増殖を示した

(図 7)。 *P. foetida* NIES-512 のみ光強度に対する増殖の応答が異なっていた。

mtf 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 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度にて発現量が高い傾向を示した (図 8)。一方、 *P. foetida* NIES-512 では増殖が良好ではない 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度において発現量が高い傾向を示した。また、 *mtc* 遺伝子の発現量は、全ての *P. foetida* 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 9)。 *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。

異なる光条件下で、 *P. foetida* 株の総 2-MIB 濃度は有意差を示し (図 10)、 *P. foetida* 1705-12、 *P. foetida* 1803-12、 *P. foetida* NIES-512 の総 2-MIB 濃度は 20 日目の 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ において、それぞれ 593 ng/L、 460 ng/L、 360 ng/L だった。総 2-MIB 産生量は *P. foetida* 1705-12、 *P. foetida* 1803-12 では、明確な光強度と負の相関があり、 *P. foetida* NIES-512 では、明確な関係が見出されなかったが、全株において 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 条件下にて産生した 2-MIB 濃度は他の光強度条件と有意な差 ($p < 0.05$) があった。細胞内 2-MIB 濃度では、 3 株ともに 10 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$ 条件で最大を示した (図 11)。 *P. foetida* 1705-12 と *P. foetida* NIES-512 の細胞内 2-MIB 濃度は、 20 日目に 502 ng/L、 260 ng/L だった。 *P. foetida* 1803-12 は 16 日目に 313 ng/L であった。細胞外 2-MIB は、 *P. foetida* 1705-12 と *P. foetida* 1803-12 では細胞内 2-MIB よりも少ないことが示されたが、 *P. foetida* NIES-512 では細胞外 2-MIB が細胞内 2-MIB よりも高い傾向にあった (図 11 と図 12)。 2-MIB の細胞外および細胞内といった局在は、いくつかの物理化学的要因に影響されると考えられるが、本研究では、光強度を上げると、より多くの 2-MIB が培養液中に放出される傾向であることが示された (図 12)。

本研究では、藍藻類のバイオマス (Chl. a として評価) の増加に伴い、 2-MIB 濃度は一般的に増加した。光強度が低いと *P. foetida* による 2-MIB 産生が促進されることが提案されている。光強度は、藍藻類の増殖や二次代謝産物である 2-MIB 産生に影響を与える環境条件のひとつであるが、焦点を当てた研究報告は少ない。既往報告に、 *Pseudanabaena* sp. Dqh15 を用いて、 2-MIB 産生と 2-MIB 合成酵素遺伝子発現に対する光の影響がある³⁾。報告では、 *mtf* 遺伝子と *mtc* 遺伝子の発現量は、対照条件 (30 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) と比較して低光条件 (10 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) では増加し、高光条件 (60 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) で減少したが、暗条件においてはこれらの遺伝子が誘導されていなかった。また、底生性 *Planktothrix* sp. の増殖制限のメカニズムを解

析し、 2-MIB 産生と水中光の強度 (5, 17, 36, 85, 250 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) の間に負の関係を明らかにし、高光量 (250 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) では 2-MIB 産生の抑制されることを見出した¹⁰⁾。以上から、光によって制御される 2-MIB 合成過程は即時的かつ一過性であると提案されている。

3) カビ臭原因物質産生に及ぼす共存微生物の影響

夏期実験群の 28 日間の培養期間中 (図 13A)、滅菌超純水系 (SW) が他の系よりも先んじて最大 Chl. a 濃度を示した (20 日目に 4,951 $\mu\text{g}/\text{L}$)。他の 2 つのグループ (ろ過湖水系 (FW) と湖水系 (LW)) は、実験終了まで増殖を維持した。これは、FW 系や LW 系では SW 系には含まれない湖水中に含まれる成分によるものと考えられた。一方、冬に培養したグループは異なる挙動を示した (図 13B)。SW 系の Chl. a は 24 日目に 5335 $\mu\text{g}/\text{L}$ の最大値に達し、夏期実験系とほぼ同じ傾向であった。FW 系も夏期実験系とほぼ同様であった。しかし、LW グループの Chl. a は他の 2 系よりもはるかに高い Chl. a を示した。

geoA 発現量は、夏期実験系のうち、SW 系、FW 系、LW 系のいずれも培養初期 (4 日目) は、他の培養日数での発現量と比較して相対的に高かった (図 14)。これは、藍藻類が新しい培地に添加され、増殖するために代謝が活発になったためと考えられた。その後、徐々に減少するものの、細胞増殖が活発な時期と考えられる 16 日目または 20 日目に発現量が高くなった。冬期実験系での *geoA* 発現量も同様な傾向であったが、夏期実験系よりも発現量が全体的に高かった。これは、季節によってもたらされる共存微生物の違いに関係していると考えられた。

夏期実験系で採取湖沼水由来の共存微生物が存在する培地に接種した実験系 (FW、LW) は、対照系 (SW) に比べて、総ジェオスミン濃度 (図 15) および細胞外ジェオスミン濃度 (図 16) は、非常に低かった。また、FW 系の総ジェオスミン濃度と細胞外ジェオスミン濃度のピークは、LW 系に比べはるかに高かった。このことから、SW 系以外の 2 系では、 *D. smithii* を含むジェオスミン産生藍藻類の細胞密度が低いことが推量された。ジェオスミンの生態系内での役割は未解明であるが、捕食者に対する防御機構のひとつとして機能していると考えられている。このため、藍藻類によるジェオスミンの放出は、他の生物に危険信号を伝達する機能を持つ可能性がある。そこで、ジェオスミンの局在解析から、増殖期間は、産生されたジェオスミンは、細胞内に局在していることが示された (図 17)。また増殖後期は、細胞の崩壊に伴い、多くのジェオスミンが放出されることが明らかにされた。冬期実験系における総ジェ

オオスミン濃度 (図 18) は、夏期実験系と比較して SW 系 (対照系) や LW 系は、同様の傾向であった。FW 系は、夏期実験系と比較して高いジェオスミン産生量を示した。一方、細胞外ジェオスミン濃度 (図 19) は、夏期実験系と異なり、LW 系が FW 系よりも高い時期があった。ジェオスミンの局在解析から、夏期実験系と異なり FW 系は、SW 系と同様に実験期間全体でジェオスミンは細胞内に局在していることが示された (図 20)。

培地に用いた「水」の前処理 (超純水/濾過/無処理 (湖水)) の違いにより、微生物群集構造と多様性に大きな違いが見られた (図 21)。細菌群集の相対存在量が最も高かったのは、LW であった。Nostocaceae はフィラメント状を形成する藍藻類の科であり、供試藍藻類である *Dolichospermum* 属も、Nostocaceae に分類されている。藍藻類に分類される Oscillatoriaceae は、夏期実験系の LW と FW の両方で優占種となった (28 日目の群集はそれぞれ 40% 以上、50% 以上)。Oscillatoria 属 (現在は、Planktothrix 属に再分類されたものもある) はジェオスミンの一般的な産生者として知られており、過去の霞ヶ浦のかび臭発生時の原因藍藻類であった。一方、冬期実験系では、異なる結果が得られた。当初、FW 系では、添加した *Dolichospermum* が優占したことから、Nostocaceae が圧倒的に優勢であった。LW 群では、霞ヶ浦湖水由来の Oscillatoriaceae が保持され、28 日目に優占種となった。以上の結果から、FW 系および LW 系のジェオスミン濃度が SW 系より低い結果は、ジェオスミン産生藍藻類が十分に増殖していないためと考えられた (図 15, 図 16, 図 21)。

微生物群集構造の変化を解析するために、8 日目と 28 日目の微生物群集構造を主成分分析 (PCA) した結果、対照系 (SW) の微生物群集構造は、ほぼ変化がないことが示された。また冬期実験系は、夏期実験系よりも培養 8 日目 FW 系と LW 系の微生物群集構造が SW 系のそれと近いことが明らかとなった。一方、夏期および冬期実験系のどちらの FW 系および LW 系の微生物群集構造は、8 日目から 28 日目に至る際に大きく変化することが示された。

水圏生態系における淘汰によって、優占される藍藻類が決定されるが、夏期と冬期の微生物群集の差が添加 *Dolichospermum* の増殖に影響を与えることが示された。どの様な機構によってかび臭原因物質産生藍藻類が優占できるのか、冬期実験系の 8 日目の FW 系において *Dolichospermum* が属する Nostocaceae が優占していることに着目して解析を深める。加えて、霞ヶ浦は、夏期は *Microcystis* が多くなり、かび臭原因物質産生藍藻類は、冬期~早春期に多くなる傾向であることにも着目して解析する。

4) カビ臭原因物質産生に及ぼす日長の影響
日長が *D. smithii* の増殖への影響は顕著に観察された (図 23)。培養 12 日目まで、長期群 (L:D=16:8 時間) の Chl. a は、短期群 (L:D=9:15 時間) および対照群 (L:D=12:12 時間) よりも常に高い値を示した。また、定常期に至るまでの期間が長期群よりも長かった。一方、長期群は、12 日目以降に急速に死滅期に入った。短期群は、培養 21 日においても Chl. a の減少は見られなかった。つまり、*D. smithii* の増殖は日長の長さに応じて増加し、その結果、指数関数期だけでなく減衰期にも早く至ることが明らかとなった。また、長期群の *D. smithii* の最大値 Chl. a (2606 $\mu\text{g/L}$) は、対照群 (3018 $\mu\text{g/L}$) および短期群 (2829 $\mu\text{g/L}$) よりも小さかった。

日長条件ごとの *geoA* 遺伝子発現量は、長期群 (L:D=16h:8h) では 15 日目まで *geoA* 遺伝子の発現が徐々に減少し、短期群 (L:D=9h:15h) では発現が徐々に増加することがわかった (図 24)。以上から、日長が長い (L:D=12h:12h) 場合、*D. smithii* は急速に増殖するものの、*geoA* 遺伝子発現量は、短期群 (3 日目) で最大値となり、増殖期間は、ある程度の一定値を示した後、死滅期に入ると急速に減少することが明らかになった。対照群 (L:D=12h:12h) では、*geoA* 遺伝子発現量は、増殖に伴い徐々に増加し、最大 Chl. a に到達する前の 15 日目に発現量が最大となった。定常期/死滅期に到達する最大 Chl. a を示した 18 日目から減少した。この様に、*D. smithii* の増殖が最大 Chl. a なるまで、*geoA* 遺伝子発現量は増加傾向となり、その後、減少した。短期群 (L:D=9h:15h) では、実験終了までに *D. smithii* の増殖は、定常期/死滅期を示さなかった。他の 2 群よりも、試験期間における最大 Chl. a に到達するのは培養日数を要し、増殖期間中に *geoA* 遺伝子発現量は増加する傾向となり、他の 2 群と同様であったが、最大 *geoA* 遺伝子発現量を示したのは、細胞増殖期の途中であった (15 日)。その後、Chl. a は増加しているものの、*geoA* 遺伝子発現量は減少する傾向となり、他の 2 群とは異なった。1 日の平均日照時間は季節によって大きく異なり、例えば、日本における最大日照時間は、夏季で約 14.5 時間、冬季で約 9.8 時間である。かび臭発生時期も水源に応じて季節によって異なり、日照時間は重要な影響要因のひとつと考えられる。前項 3) の研究において冬期実験の培養 8 日目では、FW 系における添加した *D. smithii* 由来の Nostocaceae が優占した。日長条件が対照群 (L:D=12h:12h) と同様であり、*geoA* 遺伝子発現量も同様な傾向であった本項目での結果を合わせて勘案すると、冬期の短い日長条件下では、長期間 *geoA* 遺伝子発現量を維持することが推測された。また、増殖中は、*geoA* 遺伝子発現量が高値に維持されている

ことから、ジェオスミンが産生藍藻類の増殖の促進に関連していることが仮説として考えられた。この結果、冬期において、水源におけるカビ臭発生が引き起こされているのではないかと考えられた。

異なる日長条件下で、DOC として分析した細胞外有機代謝物の放出量の変化は、有意に異なっていた。3 群の *D. smithii* 細胞濾液について、培養 3 日目に対する DOC 変化量 (Δ DOC) について分析した (図 25)。DOC の増加は、長期群 (L:D=16:8 時間) で他の 2 群より有意に高く、常に増加傾向にあった。最大は 21 日目で、3 日目に比べて 94.85 mg/L も増加した。しかし、短期群 (L:D=9 h:15 h) の Δ DOC 最大値は 21 日目の 13.48 mg/L で、長期群 (94.85 mg/L, L:D=16 h:8 h) および対照群 (34.50 mg/L, L:D=12 h:12 h) より低かった。3 群とも、増殖期における死滅期においても全体的に Δ DOC が増加する傾向が見られた。これは、細胞の崩壊や分解によって細胞内の代謝物がより多く放出されているからと考えられた。したがって、細胞を破壊せず無傷に藍藻類細胞を除去することは、ジェオスミンを含む細胞内有機物を放出するリスクを低減すると考えられた。

E. 結論

水の硬度にも関連する Mg^{2+} は、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖およびカビ臭原因物質産生に影響を与えた。水圏の Mg^{2+} の平均濃度と報告がある 10 mg- Mg^{2+} /L の条件下で、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖、カビ臭原因物質の濃度が最大となった。カビ臭原因物質合成酵素遺伝子群の発現量は他の条件と比較して、高い傾向を示した。

カビ臭原因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が、採取源が同じ場合、応答は類似な結果となった。低光強度の際に、藍藻類の増殖が良好かつ *mtf* 遺伝子発現量も高くなったが、*mtc* 遺伝子は低かった。一方、日長条件では、長期 (16 h) では、増殖が早く、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子発現量の最大地も早い時期に到達したが、短期 (9 h) では、増殖は遅く、遺伝子発現量は、徐々に増加した後最大となった。日長が長期の場合には DOC 産生量が高かった。

夏期と冬期の微生物群集構造は、カビ臭原因藍藻類の増殖に影響を与えることを明らかにした。夏期の微生物群集は、冬期よりも添加したカビ臭原因藍藻類の増殖を抑制することが明らかになった。各対象水源のカビ臭発生時期の微生物群集が、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖が可能となっていることが考えられた。

以上から、対象水源から分離したカビ臭原因物質産生藍藻類を用いた検証が、対象水源におけるカビ臭発生予防対策とカビ臭発生

対策に重要である。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Zhang J, Shen Q, Miao H, Li Q, Shimada M, Yuan T, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Takanashi H, Fujimoto N, Ichise S, Asada Y, Nishimura O, Akiba M, Shimizu K. Development of a Quantification and Detection Method for 2-MIB-producing Cyanobacteria. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2023;23(4): TRJFAS21811(Article number).
- Miao H, Zhang J, Shen Q, Ichise S, Asada Y, Tian Y, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Takanashi H, Fujimoto N, Nishimura O, Akiba M, Shimizu K. Development of Rapid PCR Methods for the Detection and Quantification of Geosmin-Producing *Dolichospermum* spp.. Water, Air, & Soil Pollution, 2022; 233(9): 394(article number).

2. 学会発表

- Hanchen Miao, Chi Zhang, Ji Zhang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Tian Yuan, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Michihiro Akiba, Kazuya Shimizu, Effect of Light/Dark Cycle on the Growth and Expression of Genes Related to Geosmin from Cyanobacteria, The 1st International Conference on Bioprocess and Sustainability (ICBS 2023), 2023 年 3 月 25 日 - 3 月 26 日, 茨城県.

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) Giglio S, Jiang J, Saint CP, Cane DE, Monis PT (2008) Isolation and characterization of the gene associated with geosmin production in cyanobacteria. *Environ Sci Technol* **42**: 8027–8032.
 - 7) Pohland AC, Schneider D (2019) Mg²⁺ homeostasis and transport in cyanobacteria - at the crossroads of bacterial and chloroplast Mg²⁺ import. *Biol Chem* **400**: 1289–1301.
 - 8) Potasznik A and Szymczyk S (2015) Magnesium and calcium concentrations in the surface water and bottom deposits of a river-lake system. *J Elem* **20**: 677–692.
 - 9) Zhang T, Li L, Zheng L, Song L (2017) Effects of nutritional factors on the geosmin production of *Lyngbya kuetzingii* UTEX 1547 (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *Phycologia* **56**, 221–229.
 - 10) Zeyu J, Su M, Liu T, Guo Q, Wang Q, Burch M, Yu J, Yang M (2019) Light as a Possible Regulator of MIB-Producing *Planktothrix* in Source Water Reservoir, Mechanism and in-Situ Verification. *Harmful Algae* **88**:101658
 - 11) Suzuki M.T., Taylor L.T., DeLong E.F. (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4605–4614.
- 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	
	Mtc-RTR	GGCAGTAGAGTGGTGAGGCAGTT	
16S rRNA	16S-RTF	ACGGAGTTAGCCG ATGCTTATTC	3
	16S-RTR	CGAAAGCCTGACGGAGCAATA	
	TM1389BACT2	[FAM]-CTTGTACACACCGCCCGTC- [TAMRA]	11
	geoA666F	AAAAGACACATTTGCTGATGGTG	
<i>geoA</i>	geoA774R	ATCACGCGGTCATCAGGCTT	This study
	geoAprobe	[FAM]-TTCACCTTCCTCTTCCACCTCTC- [TAMRA]	
	cpcB36F	GCTTAAATGGCTTACGGGAAACC	
phycocyanin	cocB115R	TTTCATTTTGCCAACACCAACTGC	This study
		[FAM]-CAAGCTTTGGGTACTCCTGG- [TAMRA]	
	cpcBprobe36-115	[TAMRA]	

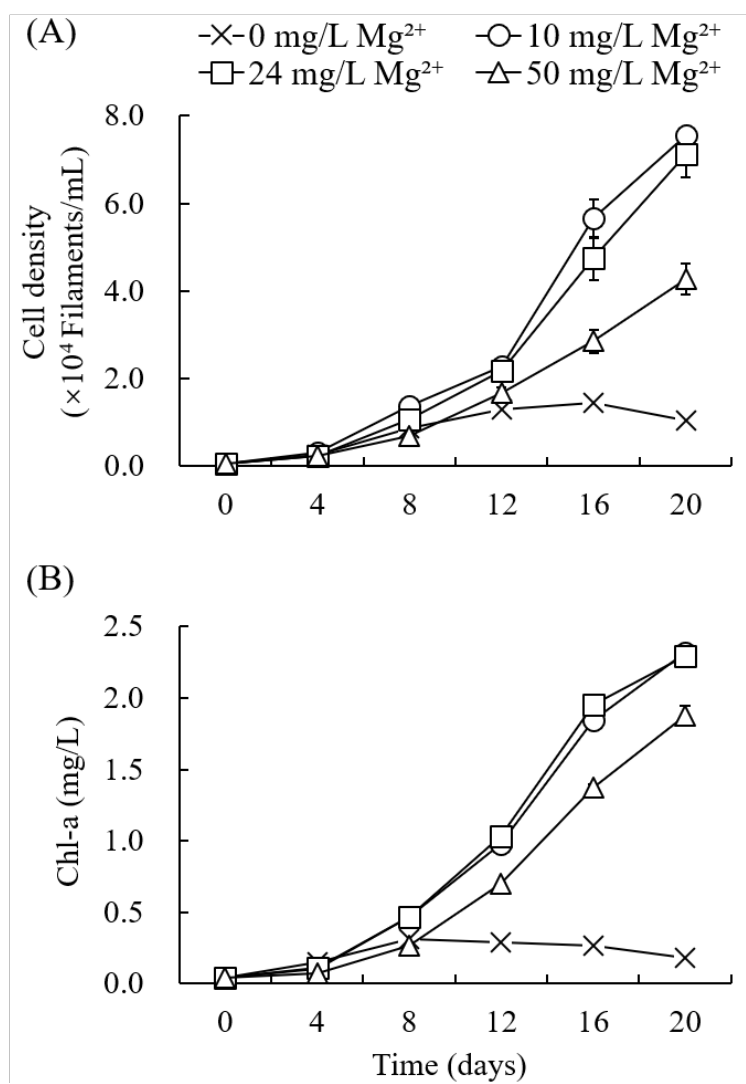


図1 異なる Mg^{2+} 濃度条件下における *D. smithii* 増殖特性
(A) 細胞密度 (B) Chl-a 量

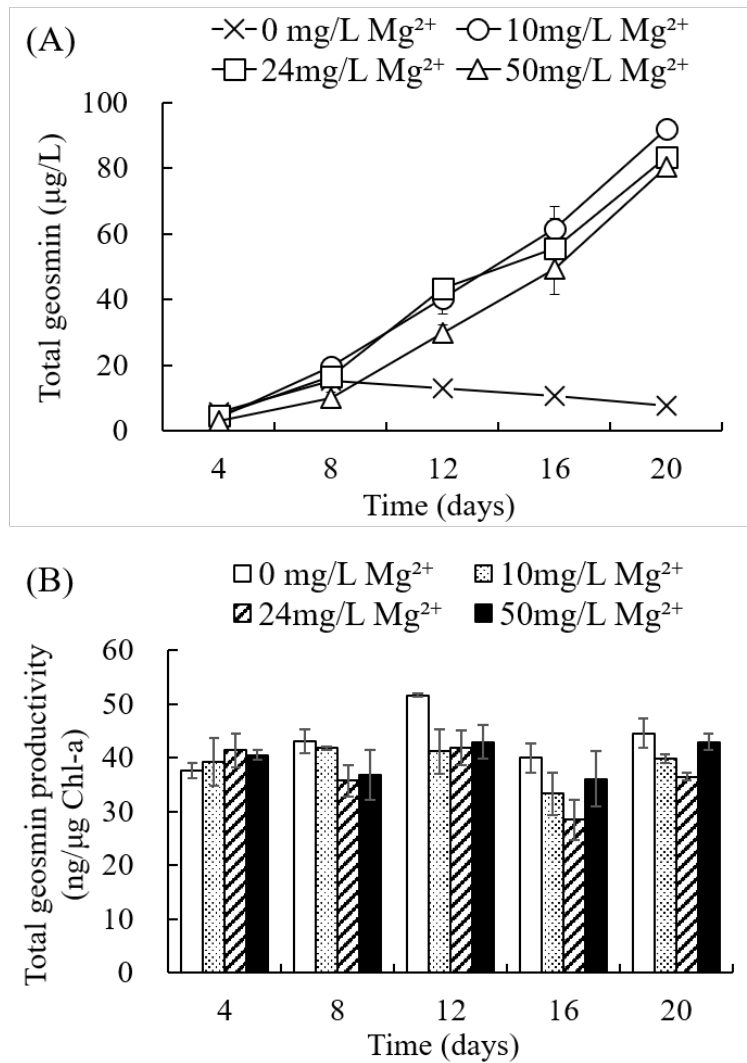


図2 異なる Mg²⁺濃度条件下における *D. smithii* による geosmin 産生量
 (A) 総 geosmin (B) 総 geosmin 産生活性

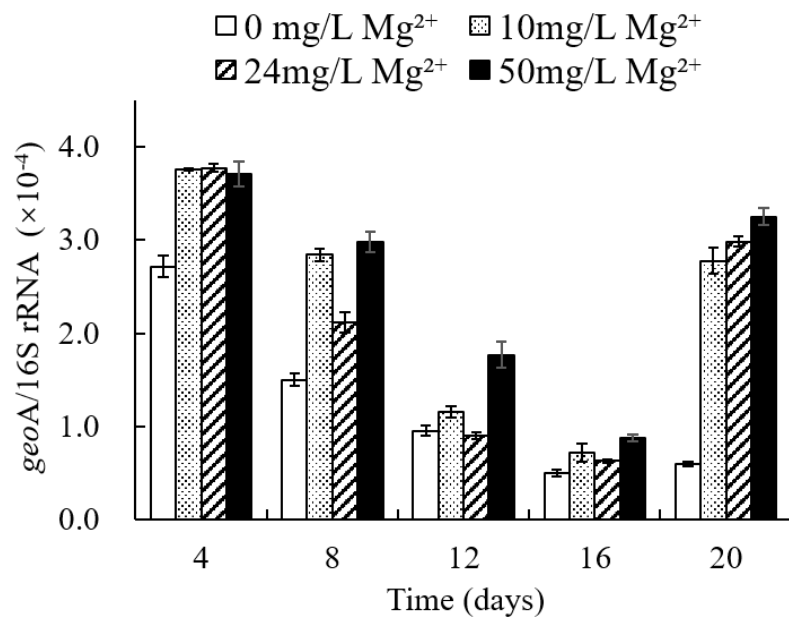


図3 異なる Mg²⁺濃度条件における geosmin 合成酵素遺伝子 *geoA* の発現量変化

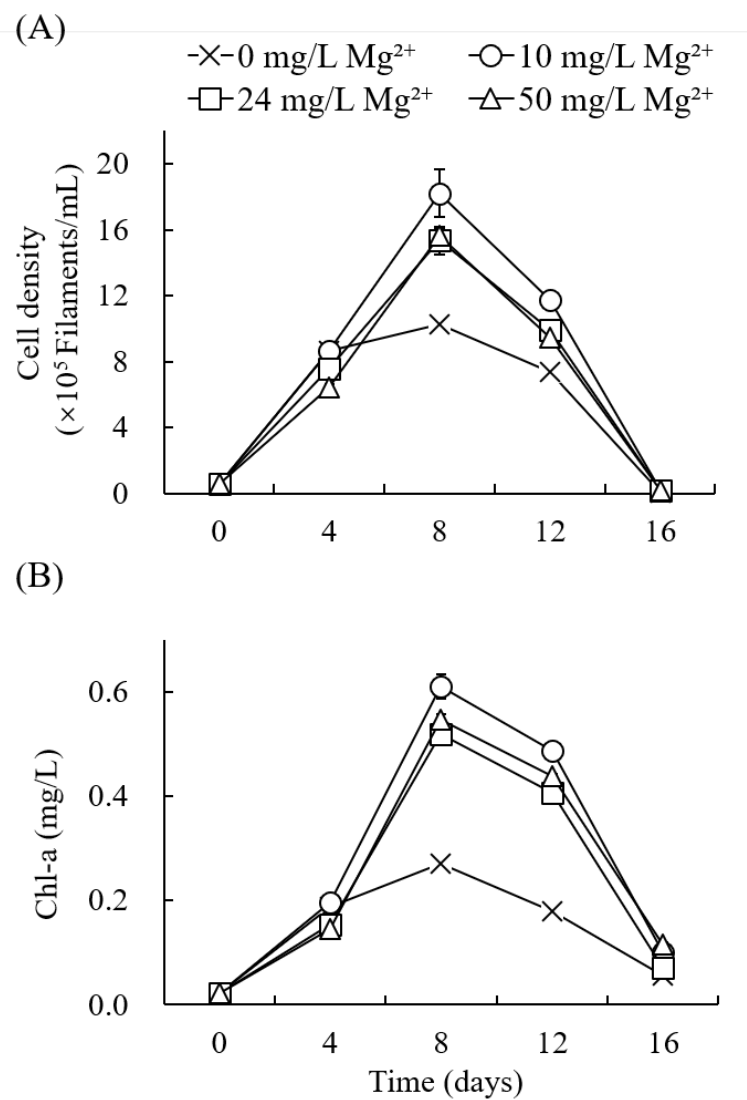


図4 異なる Mg^{2+} 濃度条件下における *P. foetida* NIES-512 による増殖特性
(A) 細胞密度 (B) Chl-a 量

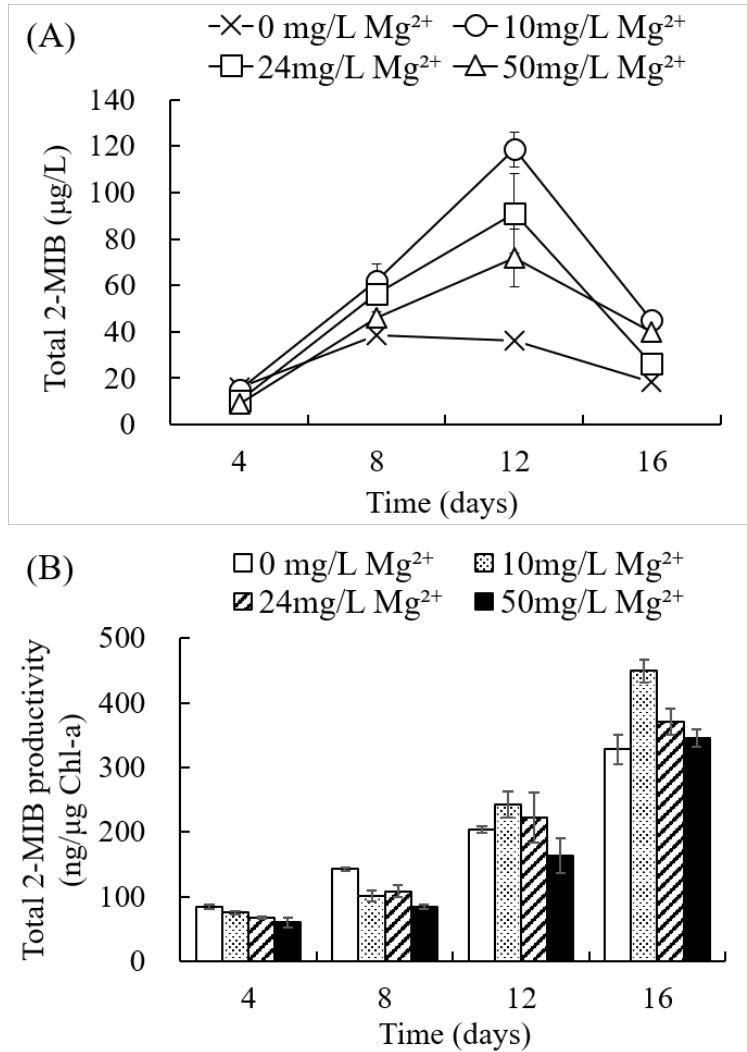


図5 異なる Mg²⁺濃度条件下における *P. foetida* NIES-512 による 2-MIB 産生量
 (A) 総 2-MIB (B) 総 2-MIB 産生活性

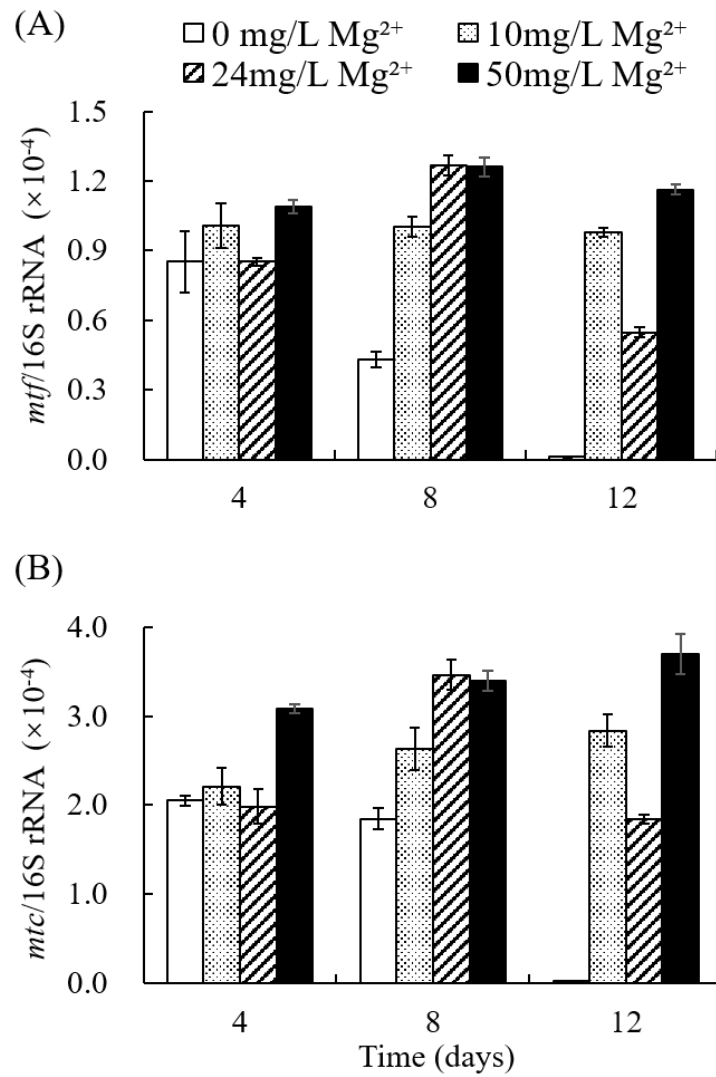


図6 異なる Mg²⁺濃度条件における 2-MIB 合成酵素遺伝子群の発現量変化
 (A) *mtf* 遺伝子 (B) *mtc* 遺伝子

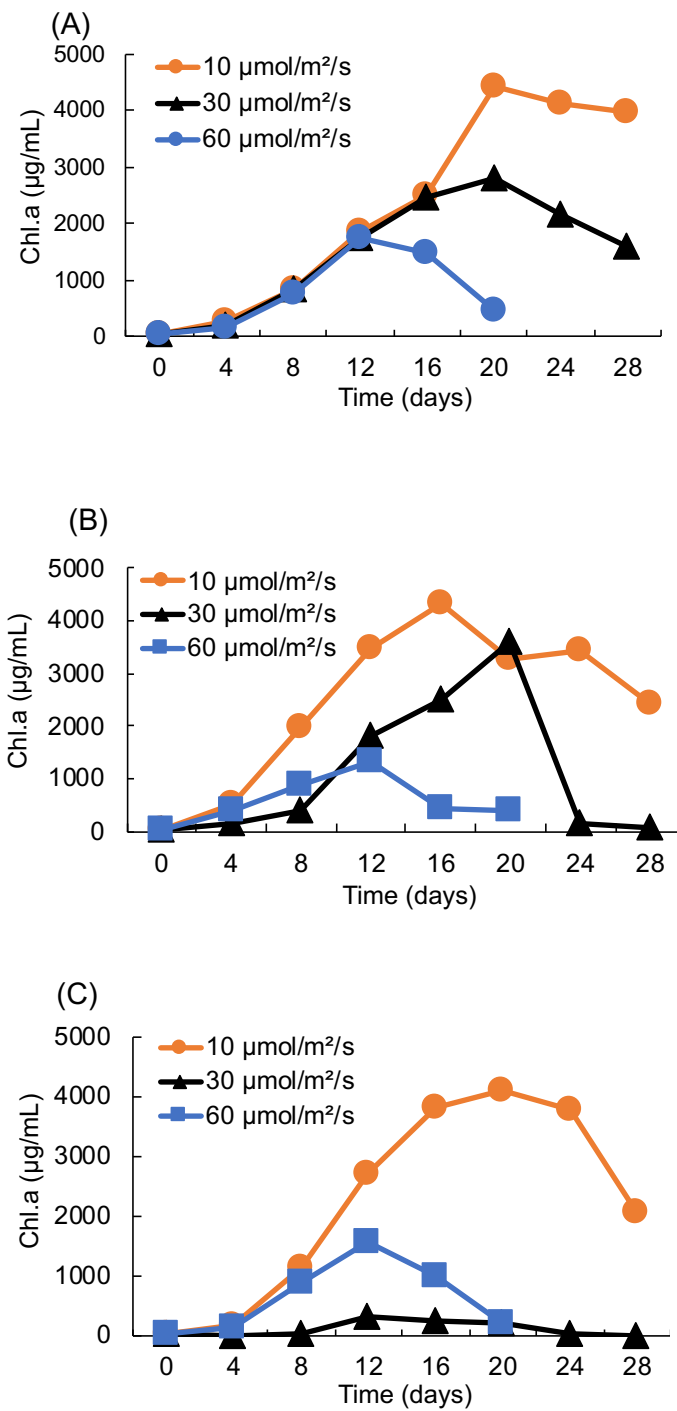


図7 異なる培養光強度条件下における増殖特性
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

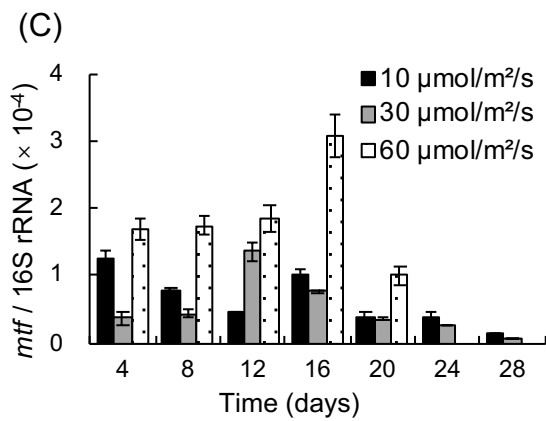
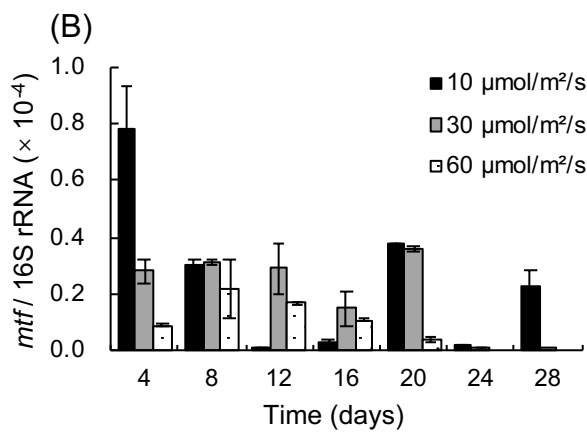
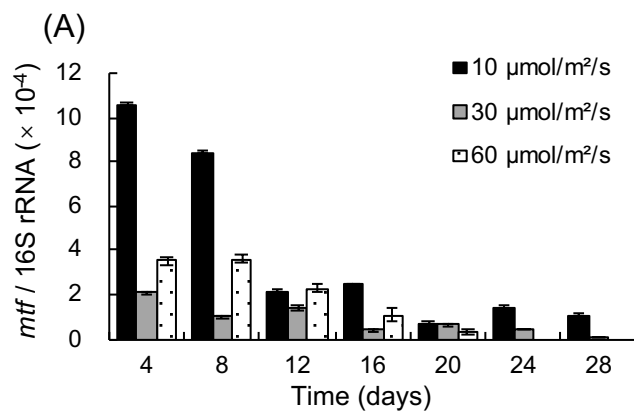


図 8 異なる培養光強度条件における *mtf* の発現量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

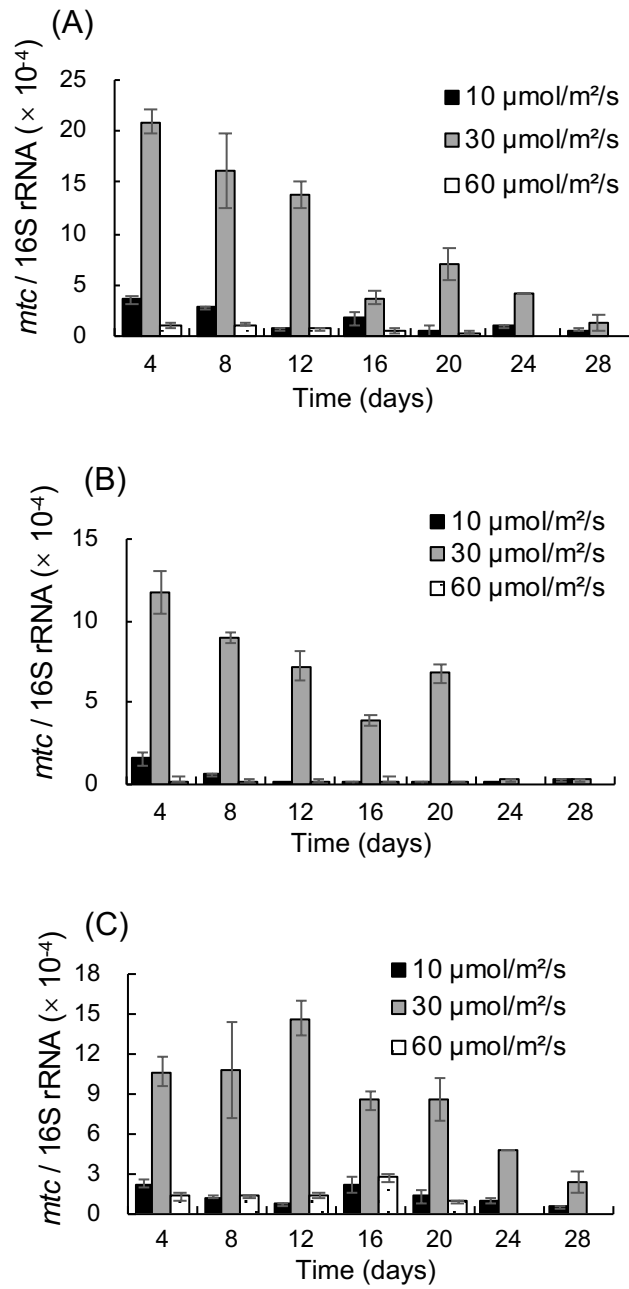


図9 異なる培養光強度条件における 2-MIB 合成酵素遺伝子 *mtc* の発現量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

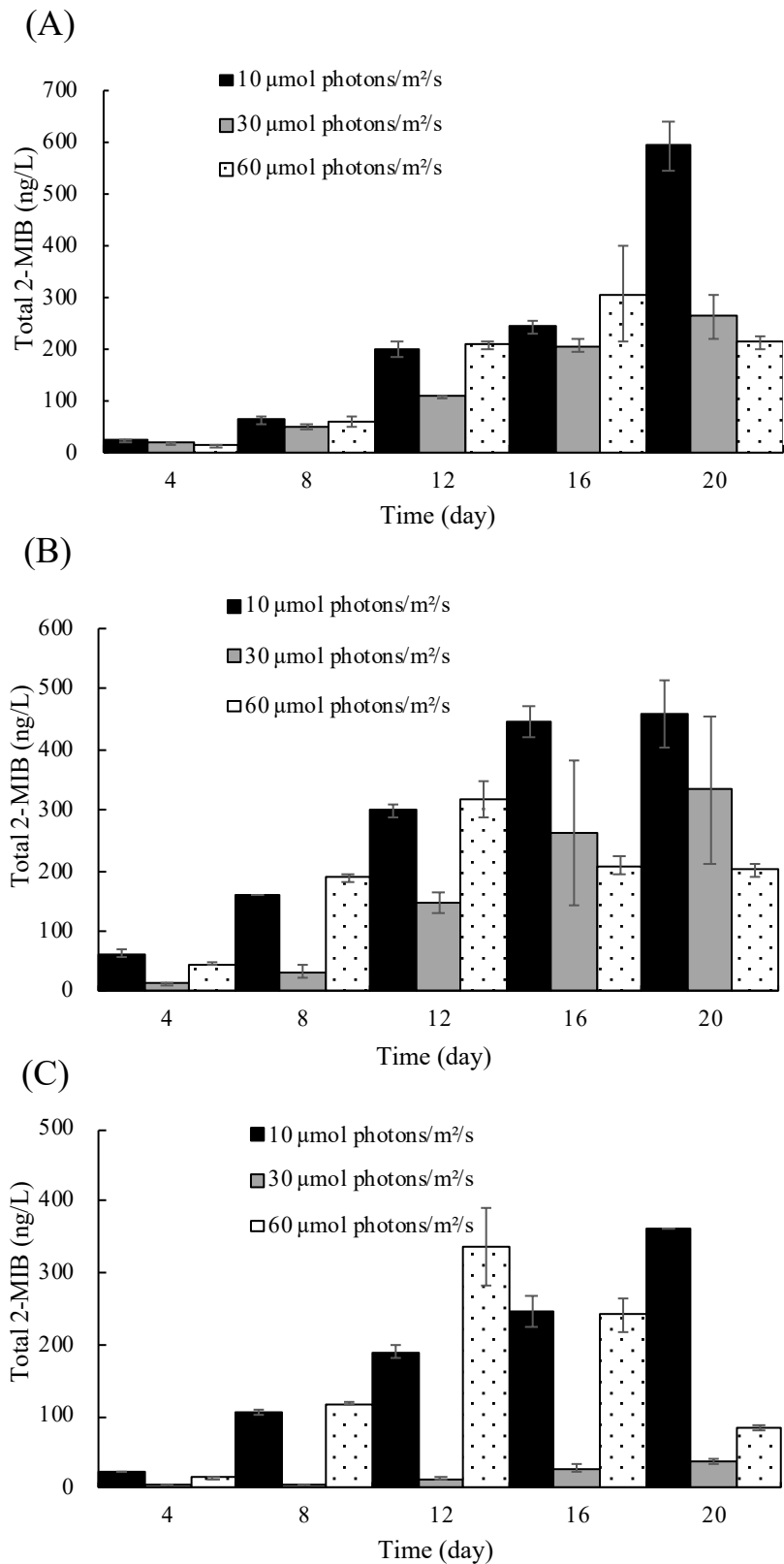
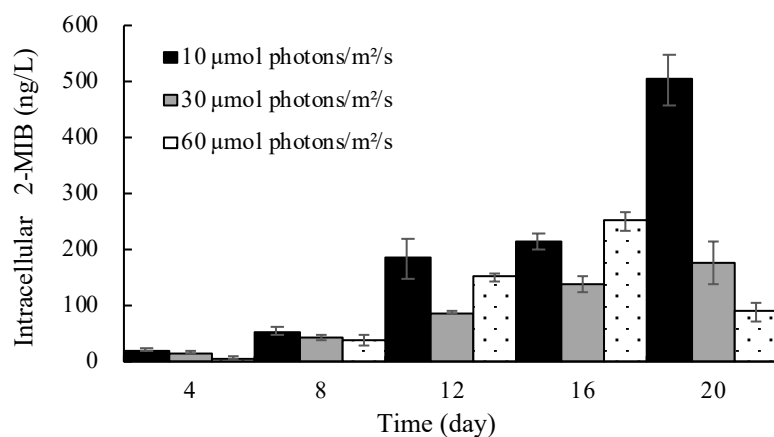
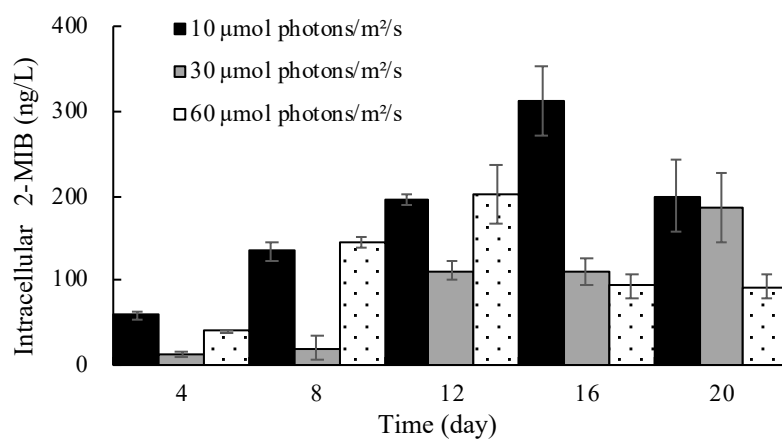


図 10 異なる培養光強度条件における総 2-MIB 産生量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

(A)



(B)



(C)

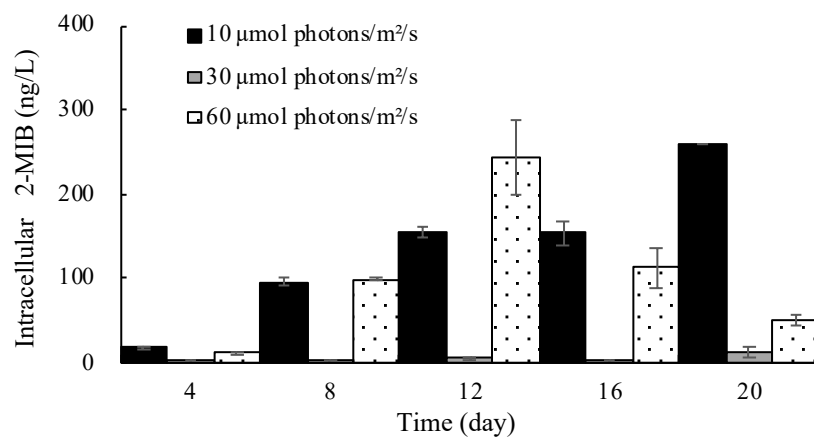


図 11 異なる培養光強度条件における細胞内 2-MIB 産生量変化
(A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

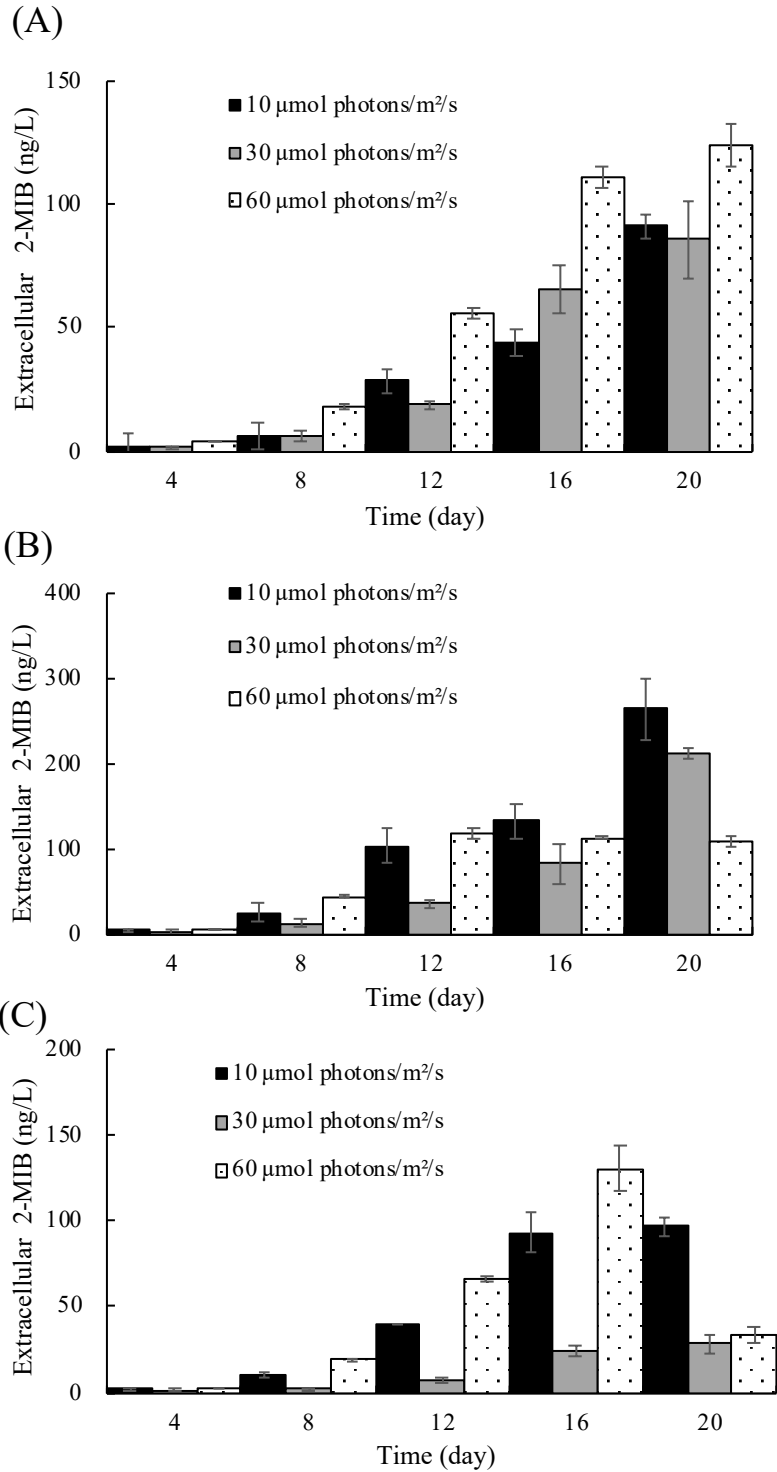


図 12 異なる培養光強度条件における細胞外 2-MIB 産生量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

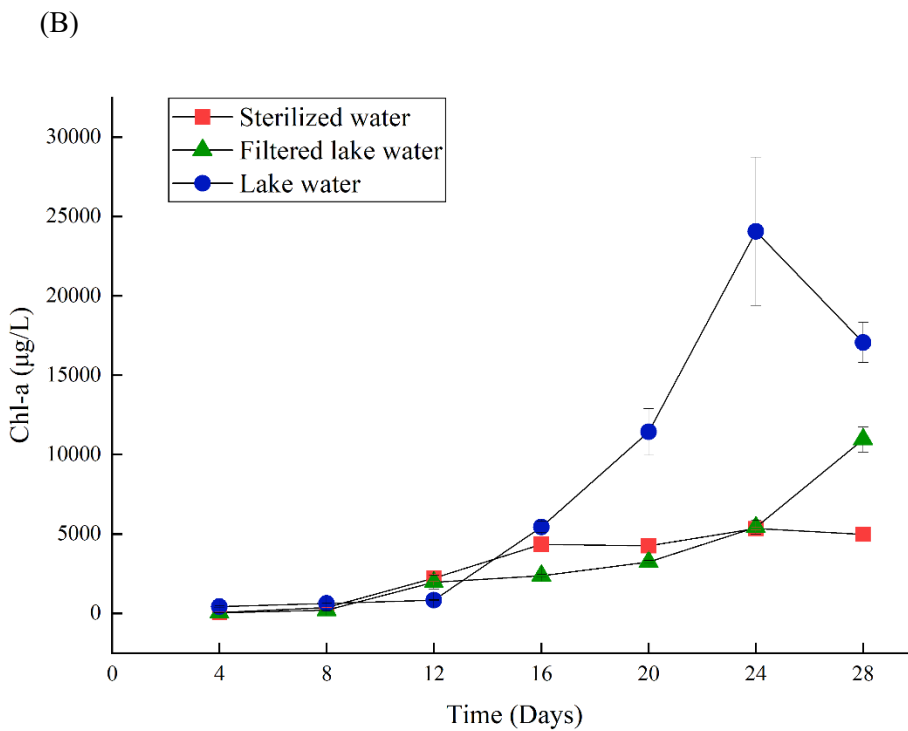
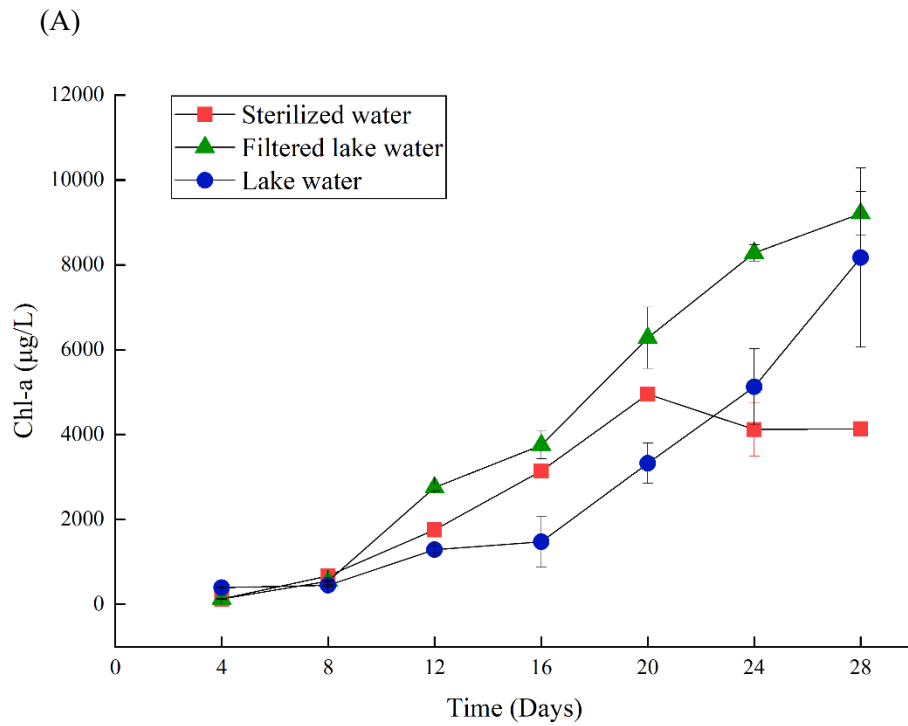


図 13 geosmin 産生藍藻類 *D. smithii* NIES-824 の増殖に及ぼす共存微生物の影響
 (A) 夏サンプル湖水、(B) 冬サンプル湖水

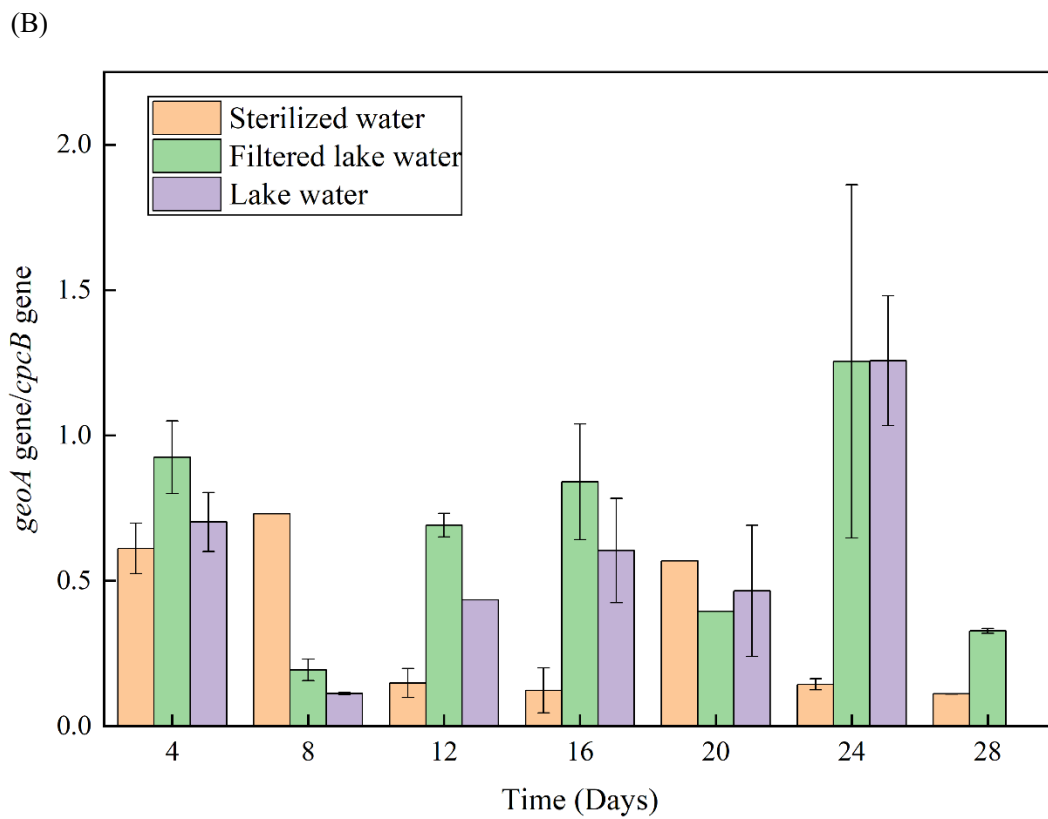
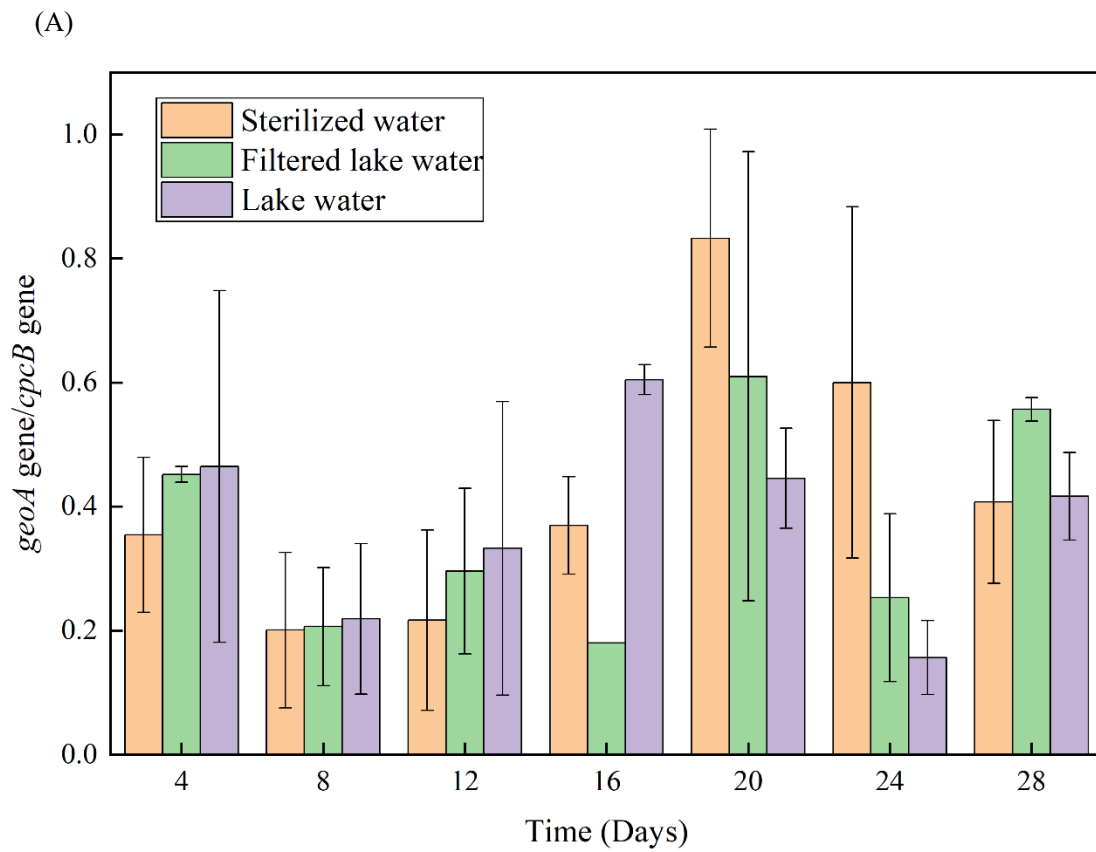


図 14 *geoA* 遺伝子発現量に及ぼす共存微生物の影響
 (A) 夏サンプル湖水、(B) 冬サンプル湖水

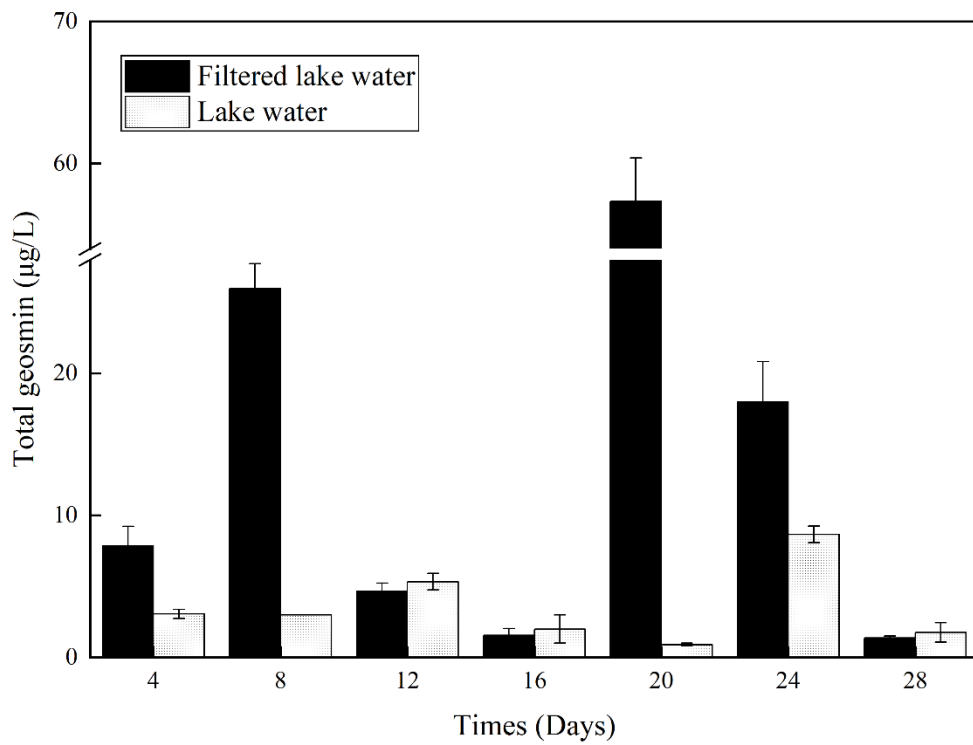
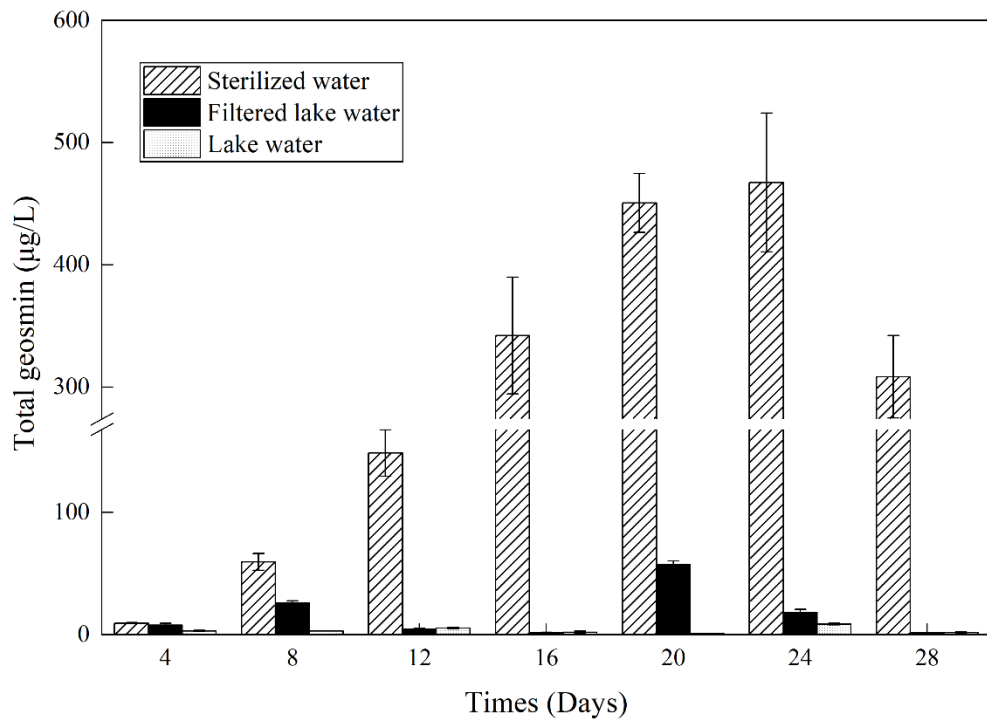


図 15 *D. smithii* NIES-824 の総 geosmin 産生の変化
 (A) 夏サンプル湖水、(B) 夏サンプル湖水 (低濃度結果の拡大図)

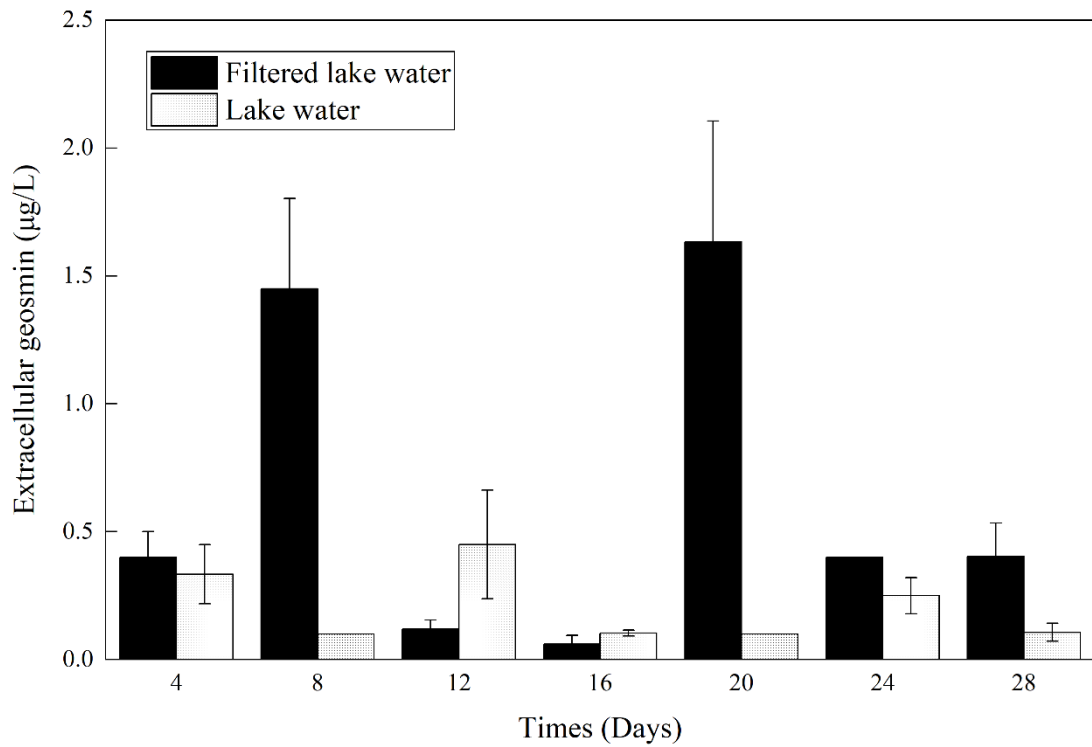
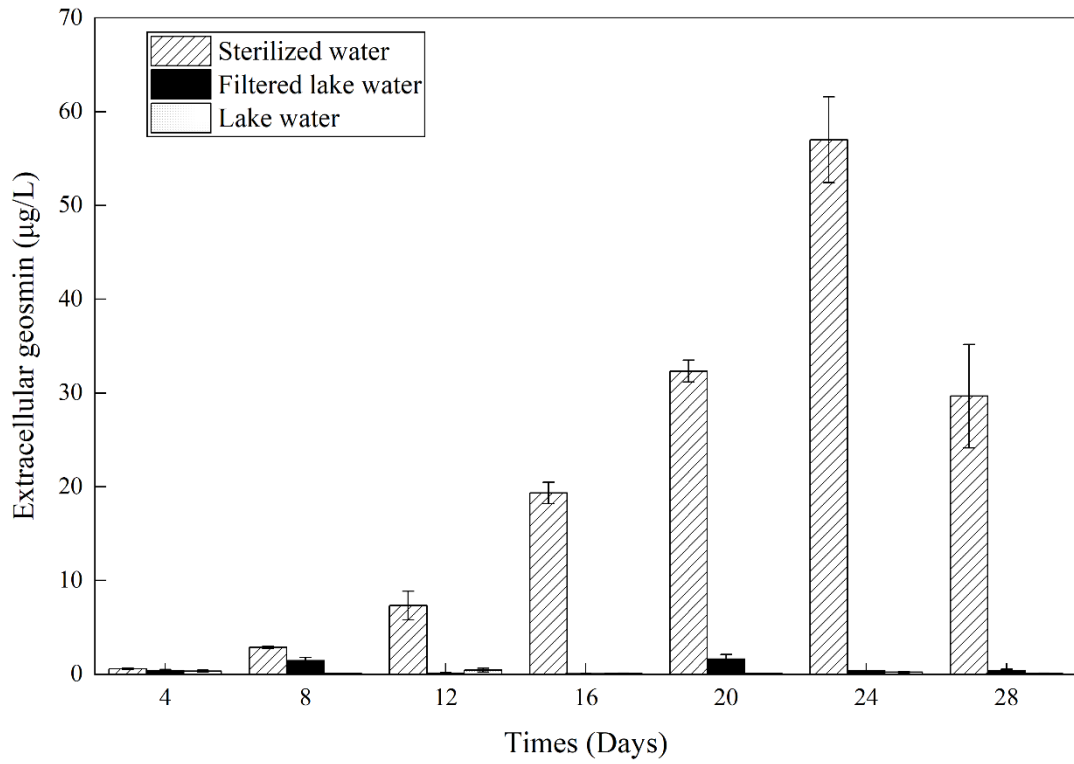


図 16 *D. smithii* NIES-824 の細胞外 geosmin 産生の変化
 (A) 夏サンプル湖水、(B) 夏サンプル湖水（低濃度結果の拡大図）

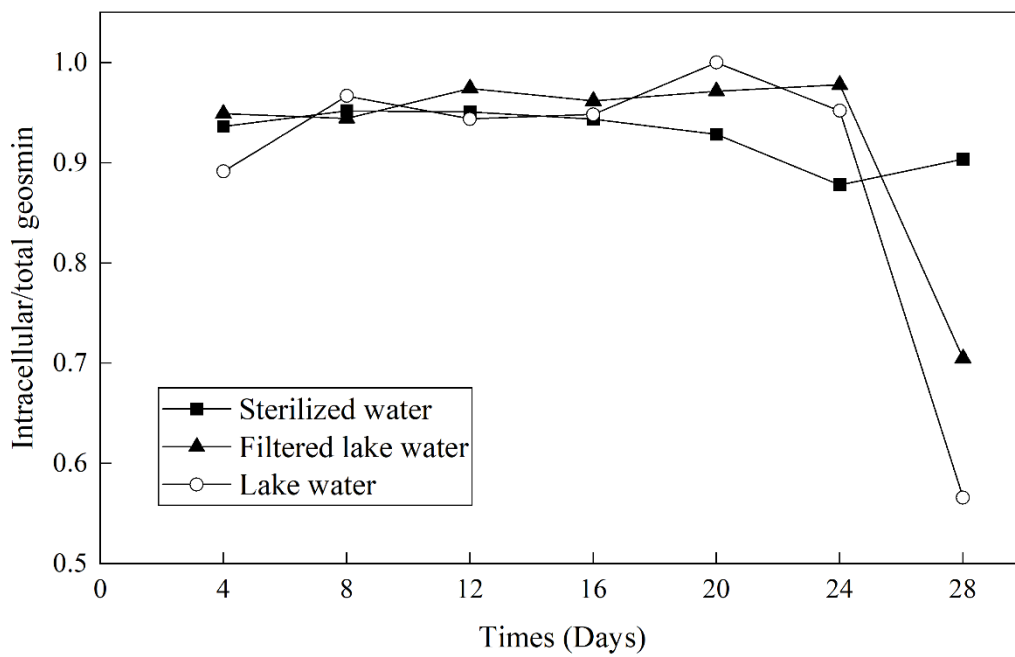


図 17 夏サンプル湖水における *D. smithii* NIES-824 の細胞内 geosmin 比率の変化

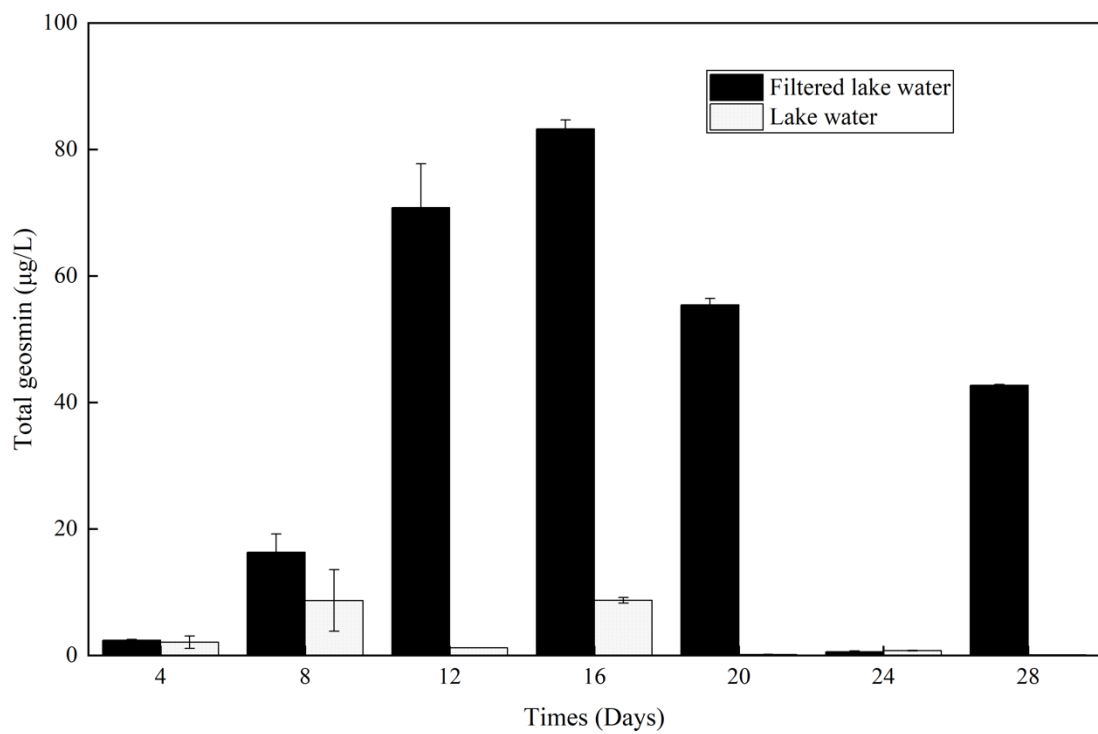
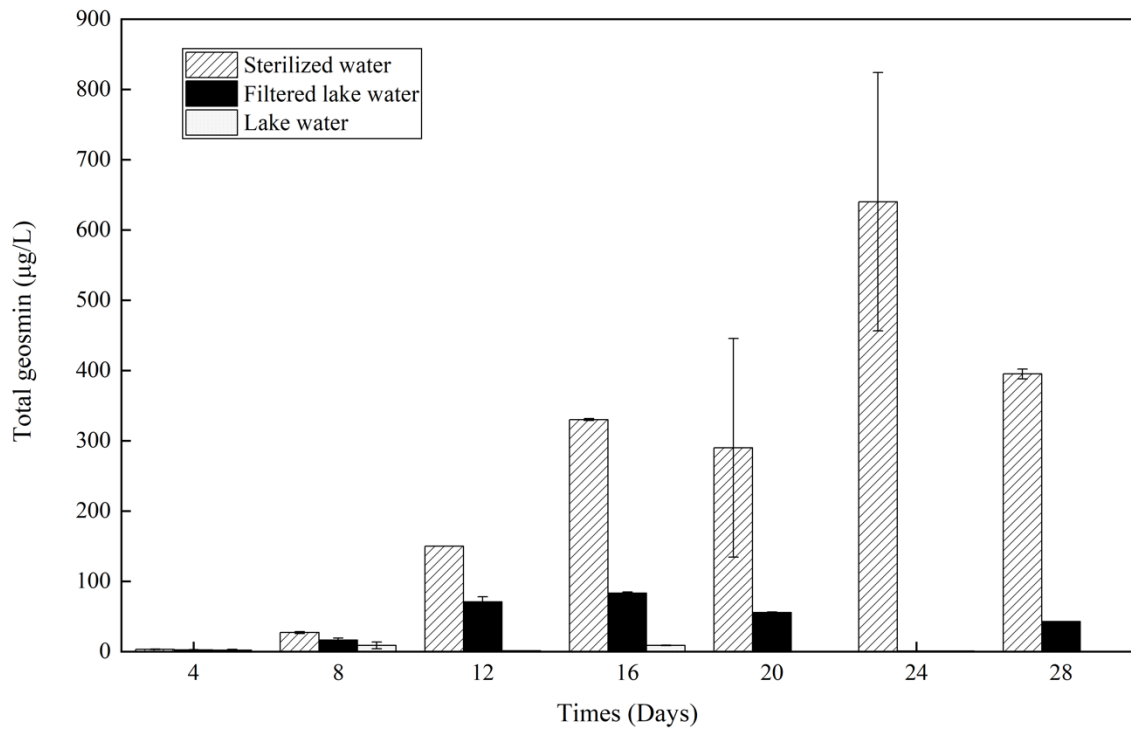


図 18 *D. smithii* NIES-824 の総 geosmin 産生の変化
 (A) 冬サンプル湖水、(B) 冬サンプル湖水 (低濃度結果の拡大図)

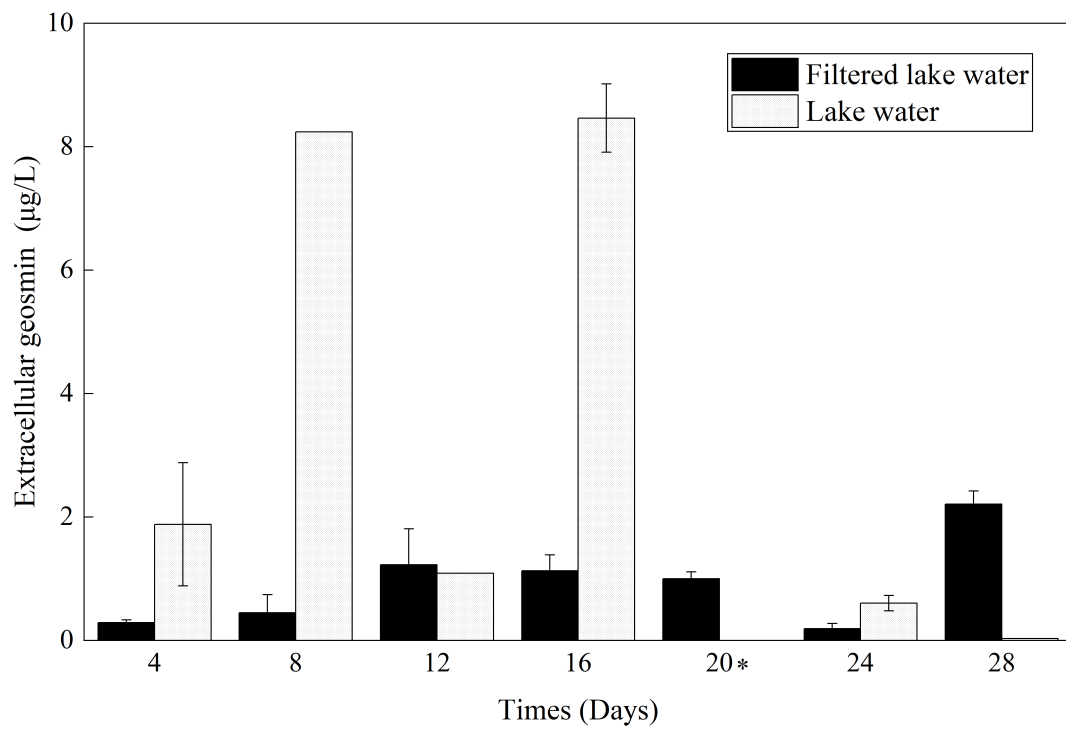
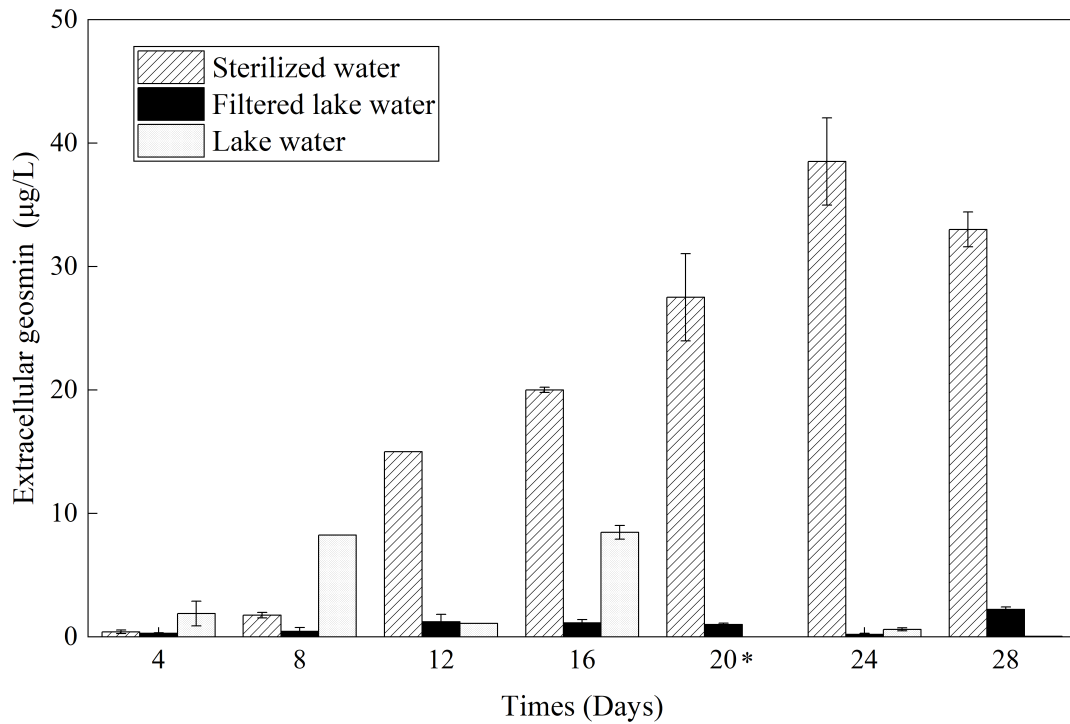


図 19 *D. smithii* NIES-824 の細胞外 geosmin 産生の変化

(A) 冬サンプル湖水、(B) 冬サンプル湖水 (低濃度結果の拡大図)

* 培養 20 日のデータは、分析装置エラーのためデータ無

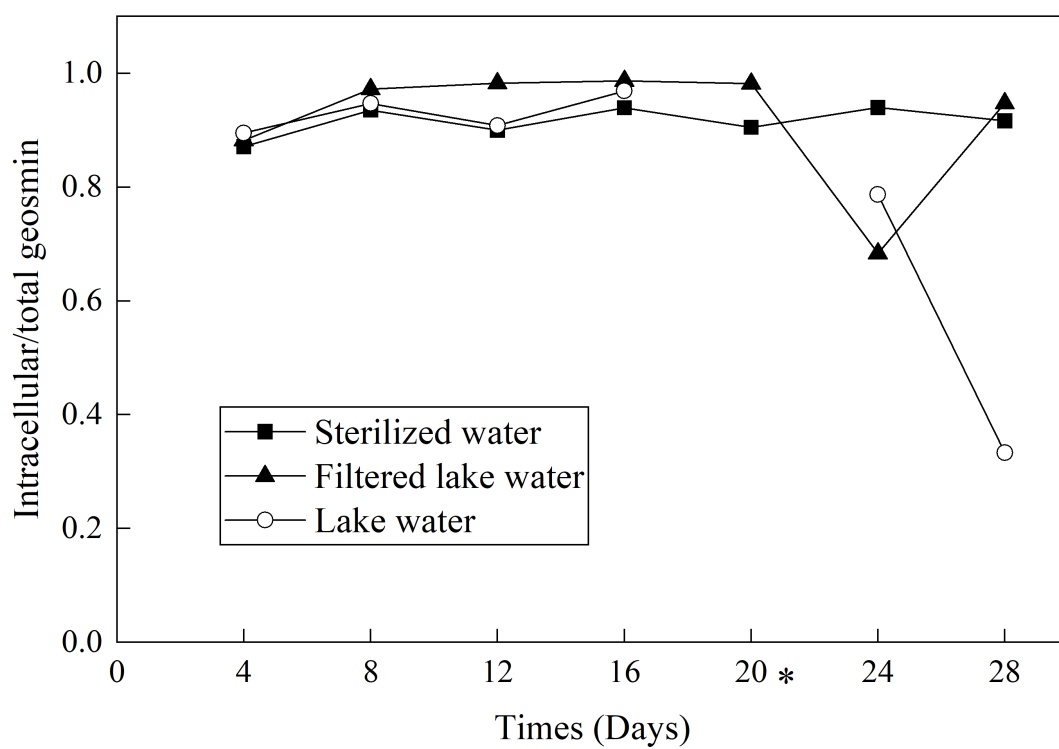


図 20 冬サンプル湖水における *D. smithii* NIES-824 の細胞内 geosmin 比率の変化

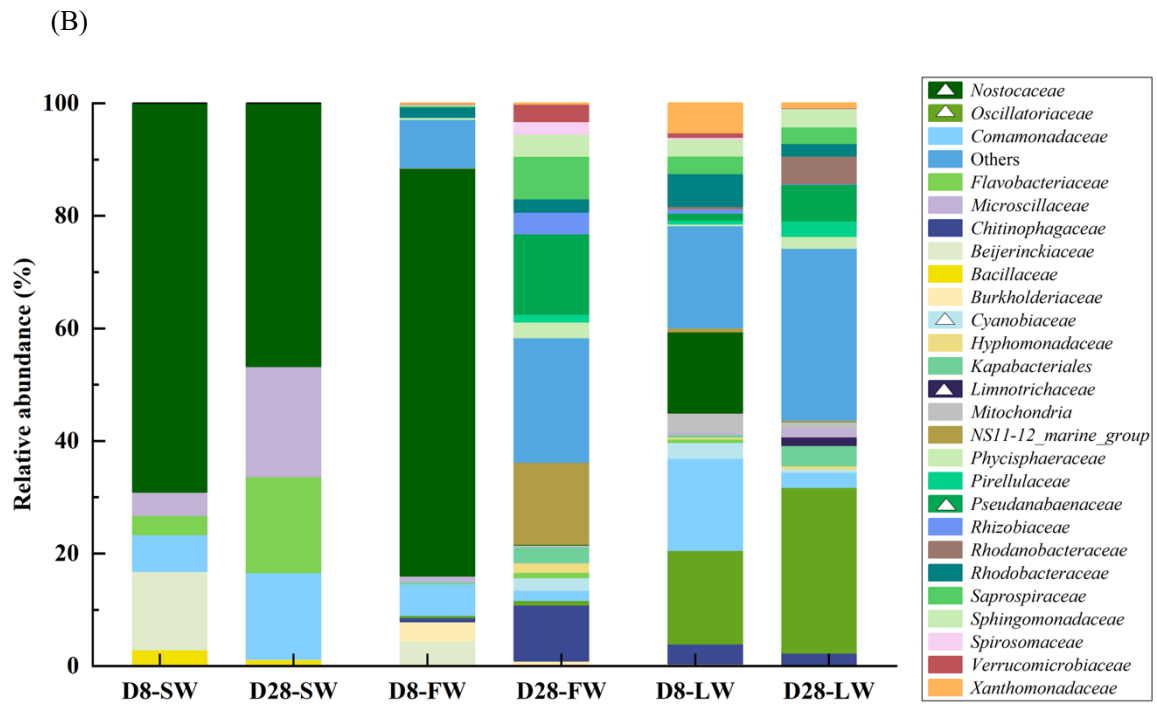
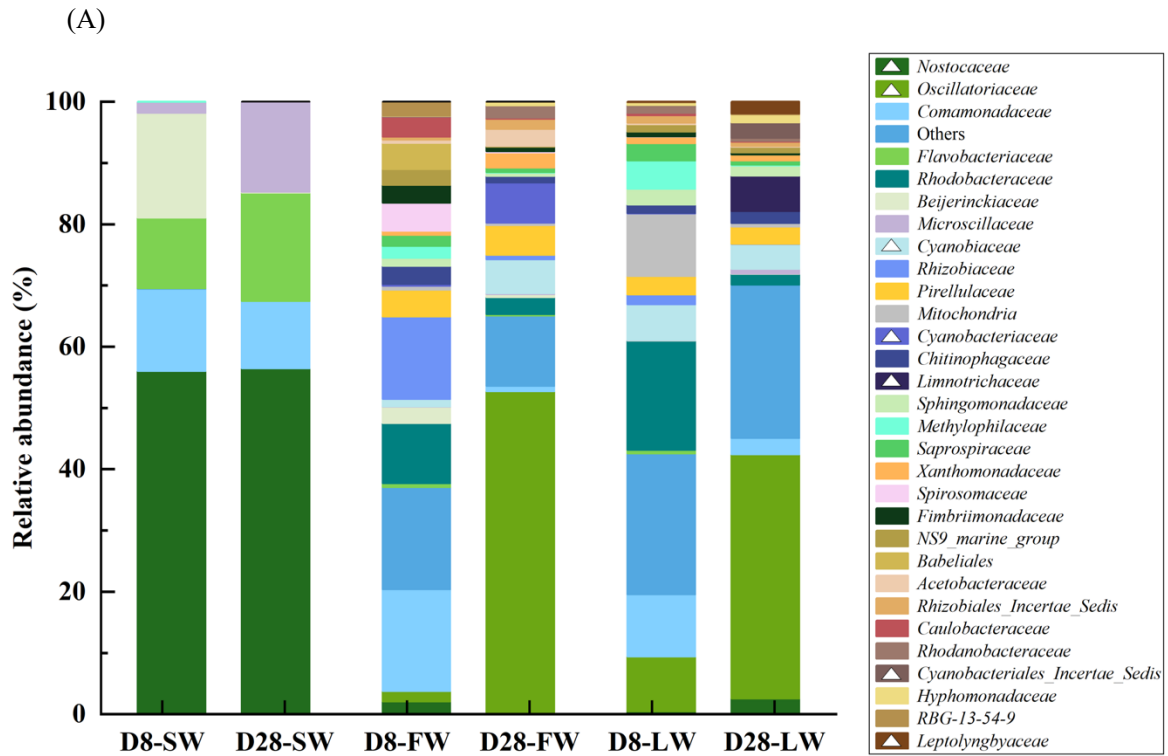


図 21 微生物群集構造解析

(A) 夏サンプル湖水を用いた実験結果、(B) 冬サンプル湖水を用いた実験結果

D8: 培養 8 日目、D28: 培養 28 日目、SW: 滅菌水系、FW: フィルターろ過湖水系、LW: 湖水系
シアノバクテリア門に属する科は、白三角で示す。Others は、比率が 5%未満であった科をまとめた。

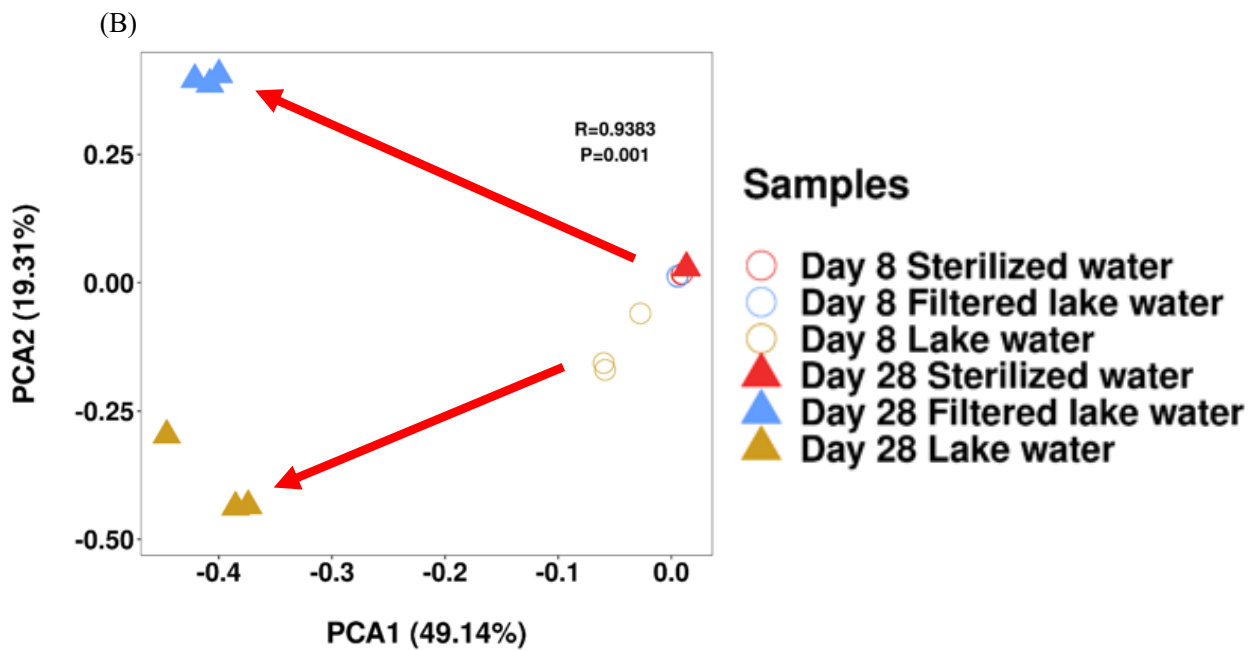
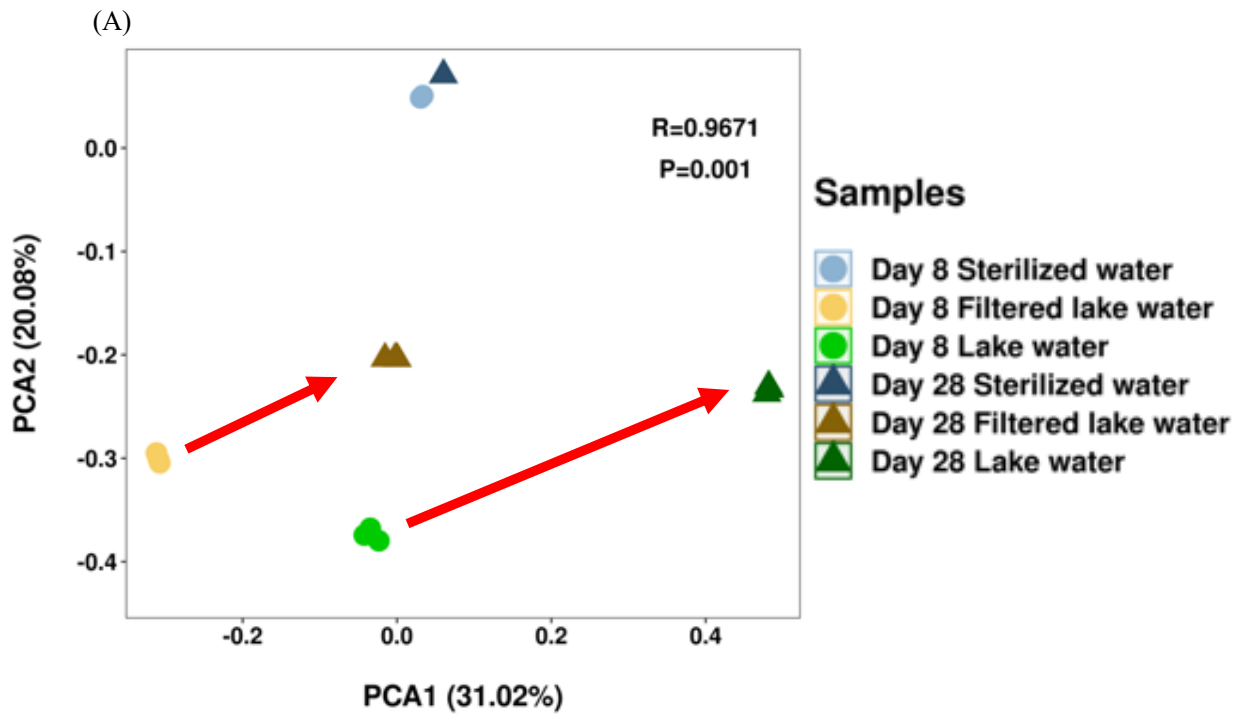


図 22 微生物群集構造の変化
(A) 夏サンプル湖水、(B) 冬サンプル湖水

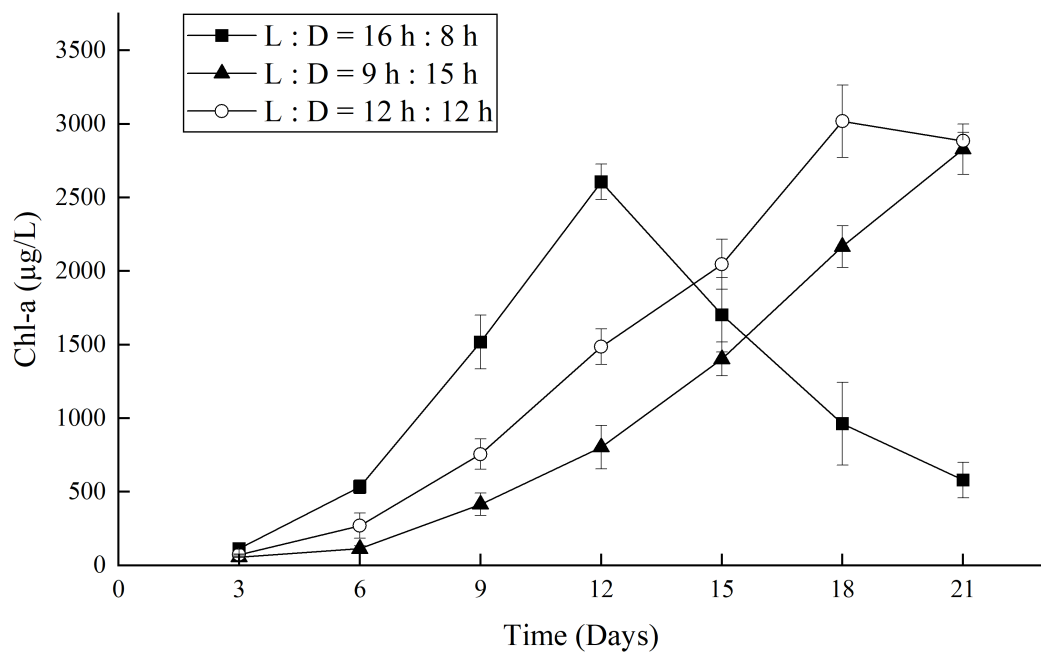


図 23 異なる日長条件における *D. smithii* NIES-824 の増殖特性

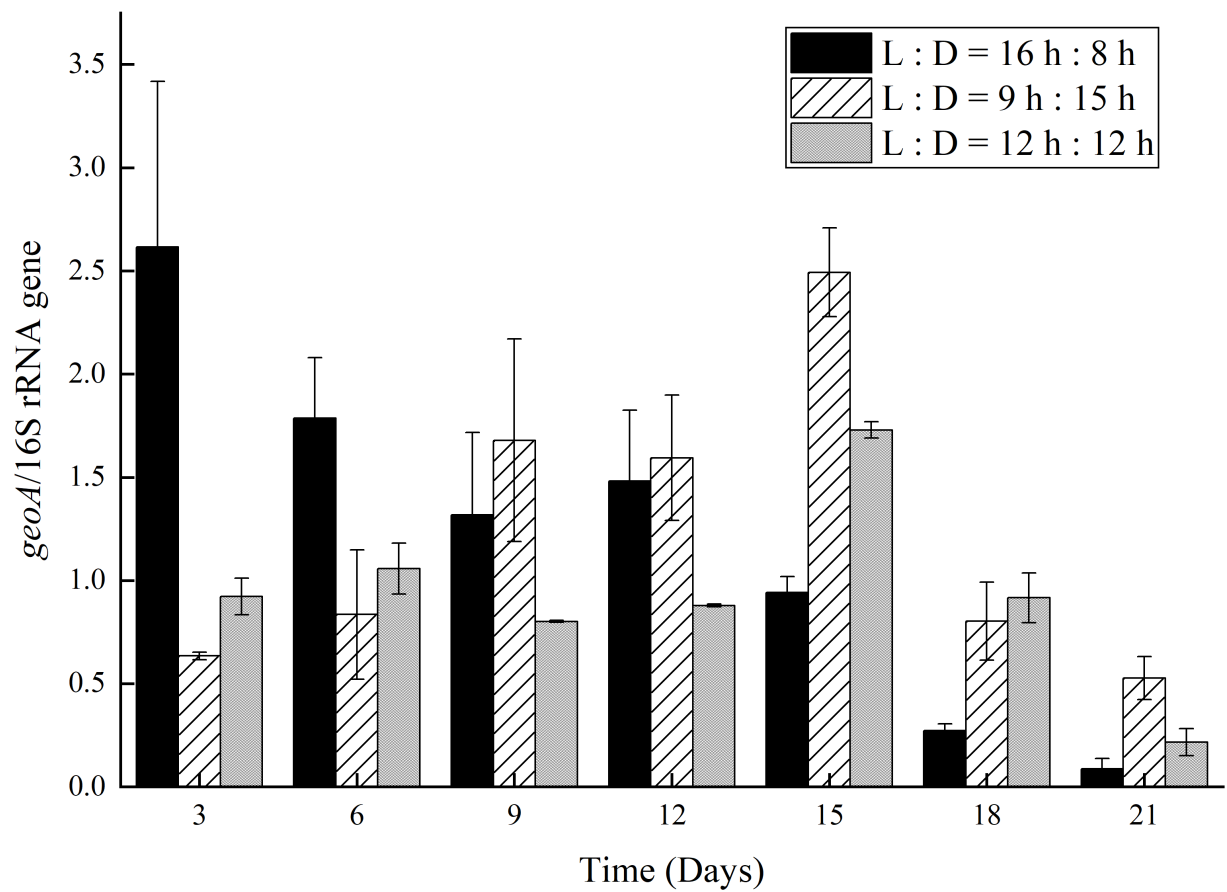


図 24 異なる日長条件における *geoA* 遺伝子発現量の変化

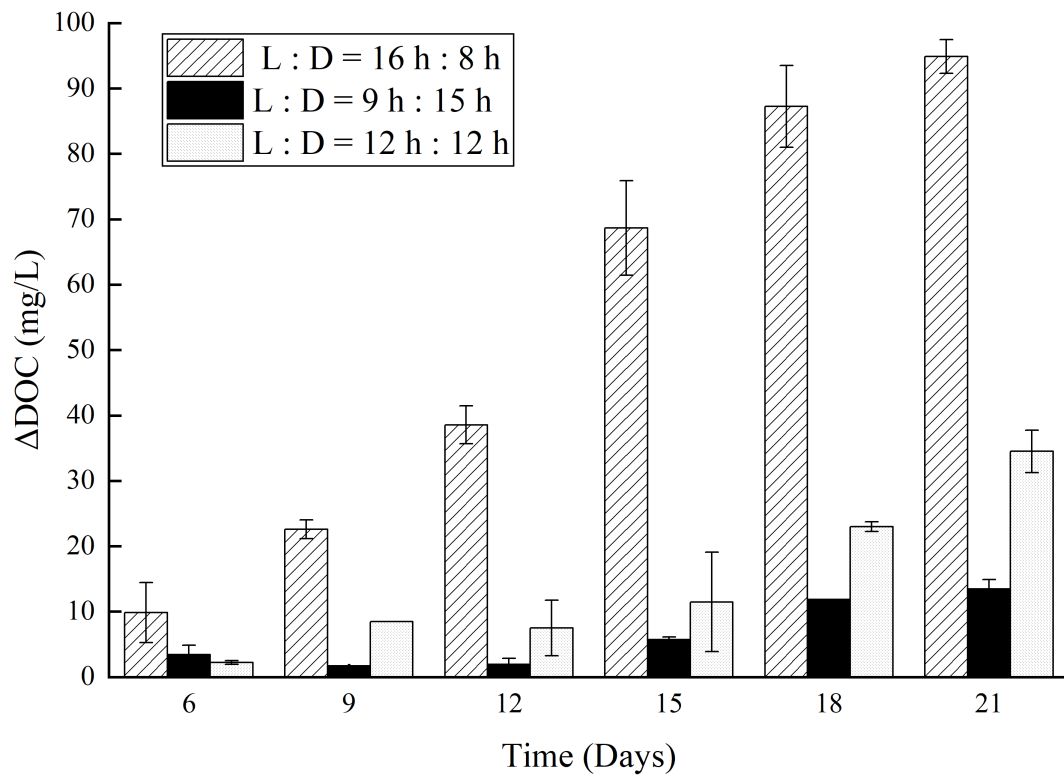


図 25 異なる日長条件における DOC の変化

衛星データと機械学習アルゴリズムを活用した ダム湖の藻類異常発生予測モデルの構築

研究分担者	西村	修
研究協力者	佐野	大輔
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：衛星データと機械学習アルゴリズムを活用したダム湖の藻類異常発生予測モデルの構築

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 三浦 耀平 東北大学大学院 工学研究科 大学院生

研究要旨

水道水源で異常発生する浮遊性藻類が原因で浄水場において生物障害が確認されている。短期間先の障害生物の発生を予測することができれば、ダム湖の水質担当者や浄水場の技術者による事前対応が可能となり、安心・安全な水道供給の確保につながるだろう。藻類異常発生の既往の検知・予測技術の開発において、様々な種類の地球観測衛星により取得された情報が使用されてきたが、その技術開発の多くは海域や大規模な湖沼を対象とした研究であり、日本のダム湖のような比較的小規模な水域を対象とした生物発生予測モデルの構築は進んでいない。

本研究では日本国内の4つのダム湖を対象とし、代表的な浮遊藻類である *Dolichospermum* spp. の異常発生予測モデルを構築した。各ダム湖で定期的に計測された栄養塩データ、水理データ、最寄りのアメダス観測所の気象データ、及び空間解像度・回帰日数が異なる2つの衛星から取得されたデータを説明変数とし、automatic relevance determinationにより対象藻類の異常発生に関連のある要因の特定を行なった。各ダム湖で関連があると推定された変数を用いて、複数の機械学習アルゴリズムによる予測モデルの構築及び比較を行なった。室生ダムの2値分類における最良モデルは、正解率91.7%、精度100%、再現率83.3%であった一方で、回帰モデルでは精度の良いモデルを構築することができなかった。ARDにより選択された衛星データの種類から、小規模水域における藻類異常発生予測において、衛星センサーの空間解像度より衛星の回帰日数(時間解像度)が重要であることが示された。引き続き、様々な種類の衛星データの活用方法を探る予定である。

A. 研究目的

水道水源において藻類が異常発生する現象は、その水域から取水する浄水場の処理能力の低下を引き起こす。実際に日本全国の浄水施設でろ過閉塞障害、凝集沈澱処理障害等の生物障害が確認されている¹⁾。水道利用者に対して安定した水道供給を実現するためには、藻類異常発生への早急な対応が求められる。早期警報システムとしての短期間先の藻類発生予測技術は有望な解決策の一つである。ダム湖において藻類を含む植物プランクトンを予測する手法としては、これまで数多くのモデルが提案されており、短期間先の藻類発生予測を行うため多様な機械学習アルゴリズムが適用されてきた²⁾。藻類の発生には様々な要因が影響し、その関係は複雑であることが知られており、これまでの藻類発生予測モデル構築においては、水質要因、水理的要因、気象的要因等が考慮されてきた。一方で、これらのデータを高頻度で取得することは人的・金銭的資源の制約から全ての水道水源で実施することは現実的ではない。そこで、近年藻類異常発生の検出及び予測において衛星データが大きな注目を集めている。地球観測衛星が定期的に取得する地表面の光や電波の反射の情報が大いに活用されている。各々の衛星は、観測する光の波長、空間解像度、回帰日数等の観点から異なる特徴を有している。藻類の異常発生を検出する際には、関心のある狭い水域のみの情報を取得するため、高い空間解像度の衛星センサーにより得られたデータが頻繁に使われて

きた。一方で、藻類異常発生の予測には、回帰日数が短い、即ち、時間解像度の高い衛星が用いられてきた。時間解像度の高い衛星は一般的に空間解像度が劣る。そこで、時間解像度の高い衛星データが適用されてきたのは海域や広大な湖沼等の広い水域のみであった。異なる空間・時間解像度を有する衛星データを用いた比較的小規模な水域における藻類異常発生予測モデルの構築が進んでいないのが現状である。日本では、入り組んだ地形で比較的小規模なダム湖が多く存在しており、これらの水域における藻類発生予測モデルの構築が求められている。

本研究では、日本国内の4つのダム湖を対象とし、*Dolichospermum* spp. の異常発生を予測するモデルを構築した。藻類濃度を目的変数とし、栄養塩データ、水理データ、気象データ、衛星データを説明変数とし、automatic relevance determination (ARD)による関連のある説明変数の特定を行なった。関連があると推定された変数のみを用いて、5つの機械学習アルゴリズムによる藻類発生・非発生の2値分類モデル及び回帰モデルを構築した。

B. 研究方法

本研究の全体の流れは、データ収集、変数選択、及び予測モデル構築の3段階に大きく分けられる。奈良県宇陀市の室生ダム(室生湖)、岐阜県恵那市の阿木川ダム(阿木川湖)、兵庫県川西市の一庫ダム(知明湖)、福岡県朝倉氏の寺内ダム(美奈宜湖)の各3~5地点(図1, S1~S14)において観測さ

れた、2013年から2017年までの *Dolichospermum* spp. の濃度を目的変数として用いた。本研究では7日後の藻類異常発生予測を想定している。説明変数として、月1回の頻度で測定された全窒素濃度及び全リン濃度の過去2ヶ月間の平均値 (TN2m, TP2m), ダム湖水の流入量及び流出量の過去7日間の平均値 (Inflow7d, Discharge7d), 最高気温及び風速の過去7日間の平均値 (AveMaxTemp7d, AveWind7d), 日射量及び降水量の過去7日間の合計値 (Sun7d, Rain7d) を用いた。衛星データとして、Landsat-8により測定された地表面温度及び2つの濁度指標の31日前から1週間前までの平均値 (L8_LST, NDTI, red660nm), MODIS センサーによる地表面温度の日別データ及び8日間のコンポジットデータの最大39日前から1週間前までの平均値 (MOD_LST_daily, MOD_LST_8-day composite) を使用した。コンポジットデータとは、雲の影響を最小限にするために、ある一定期間の中で最も品質の良いデータをその期間の代表値としたデータである。衛星データの取得には Google Earth Engine を使用した。

変数選択の段階においては、スパース推定の一つのARDを用いて、各説明変数の目的変数に対する関連度(係数)を算出した。係数が0となった変数をデータセットから除外し、残りの変数を用いて、藻類異常発生予測の2値分類モデル及び回帰モデルを構築した。機械学習アルゴリズムとして、サポートベクターマシン(SVM), 人工ニューラルネットワーク(ANN), ランダムフォレスト(RF), extreme gradient boosting (XGBoost), light gradient boosting machine (LightGBM) の5つのアルゴリズムをデータセットに適用し、2値分類モデル及び回帰モデルの性能を比較した。2値分類モデル構築の際には、*Dolichospermum* spp. の異常発生の濃度の閾値を100 cells/mlと定義し、これらの値以上である場合に1(発生), 下回った場合に0(日発生)とした。2値分類のモデル性能の評価には、テストデータに対する正解率(正解数/データ数), 精度(発生予測における正解数/発生予測のデータ数), 再現率(発生予測における正解数/実際の正解が発生のデータ数)を用いた。回帰モデルに関しては、訓練データとテストデータの正解値と予測値の平均二乗誤差(MSE)を評価指標として採用した。Python 3.8.8のscikit-learnライブラリーを用いてARD及び機械学習アルゴリズムをデータセットに適用した。

C. 研究結果及びD. 考察

表1にARDによる説明変数の回帰係数の推定結果を示す。全窒素濃度, 風速, 日射量, 降水量, MODISの地表面温度が3つのダム湖で*Dolichospermum* spp.の異常発生に関連のある変数であると推定された。一方で, Landsat-8の濁度指標の一つ(red660nm)は全てのダム湖で関連がないと推定された。

SVM, ANN, RF, XGBoost, LightGBMの5つの機械学習アルゴリズムにより構築した2値分類モデルの性能を表2に示す。各ダム湖のデータ数は, 室生ダム57, 阿木川ダム11, 一庫ダム23, 寺内ダム41であった。阿木川ダム及び一庫ダム

のデータを訓練データとテストデータに分割した際に十分にモデルを構築・評価可能なデータ量を確保できなかったため, これら2つのダム湖の結果は参考程度にされたい。室生ダムは, 4つのダム湖の中で最もデータ数が多く十分に学習をすることができたため, 最も良いモデル性能となったと考える。5つのアルゴリズムで同じデータセットを使用して構築した回帰モデルの性能を表3に示す。テストデータMSEの比較から各ダム湖の回帰モデルの最良アルゴリズムは, 室生, 阿木川, 一庫, 寺内の順番に, ANN, ANN, SVM, SVMであった。藻類濃度を予測する回帰モデルに関しては, ANNとSVMの2つのアルゴリズムが有力な候補となることが示された。

室生ダムに関して正解率91.7%のモデルを構築できたが, 他のダム湖についてはデータ数の不足から十分な性能のモデルを構築できたとは言い難い。Landsat-8のセンサーは空間解像度が30mであり, MODISセンサーは1kmである。対象ダム湖の形状から1km四方の解像度では, 対象水域以外の森林や道路等の要素が含まれるため, Landsat-8の高解像度データも使用した。しかし, 観測頻度の低いLandsat-8のデータを含めたことで, 使用できるデータ数が大幅に減少してしまった。十分な精度の予測モデル構築には, 高解像度の衛星データを使用することだけでなく, 十分な訓練データを確保できるように高いデータ頻度も求められる。本研究では, 衛星データを含めた2値分類モデル及び回帰モデルに関して, データが少ないこともあり, 有用な予測モデル構築ができたとは言えない。今後は, 日本のような比較的小さなダム湖における藻類異常発生を予測するために, 高頻度の衛星データ及び高解像度の衛星データの両方を活用できるように, データ処理や扱い方の工夫をしていく必要があるだろう。

E. 結論

日本国内の4つのダム湖を対象とし, 現場(水質, 水理, 気象)データ, 複数の衛星から取得されたデータを用いて, ARDによる関連のある変数選択及び機械学習アルゴリズムによる藻類異常発生の予測モデルを構築した。衛星データが藻類発生予測に有用であり, 特に時間解像度の高い(観測頻度が高い)衛星データがより重要であることが示された。今後も異なる種類の衛星データによる予測モデル性能の比較を行い, 藻類発生予測に有用な衛星データの活用方法の探索を行う。

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

三浦耀平, 今本博臣, 峠嘉哉, 浅田安廣, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏, 西村修, 佐野大輔. 衛星データを活用した水道水源における藻類異常発生予測モデルの開発. 第57回日本水環境学会年会, 2023.3, 松山市.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

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

I. 参考文献

1) 秋葉道宏, 高梨啓和. 水道における異臭味問題の最新動向. J. Japan Association on Odor

Environment 49, 101-108 (2018).

2) Rousso BZ, Bertone E, Stewart R, Hamilton DP,: A systematic literature review of forecasting and predictive models for cyanobacteria blooms in freshwater lakes, Water Res., Vol.182, 115959, 2020.

J. 謝辞

本研究を進めるに当たり, 水資源機構及び京都大学防災研究所水資源環境研究センター峠嘉哉特定准教授の協力を得ました。記して謝意を表します。

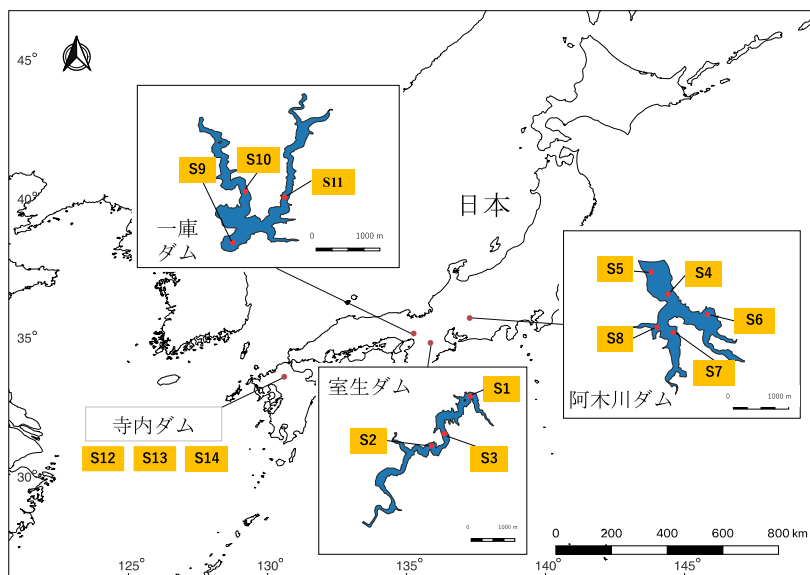


図 1 対象ダム湖及びサンプリング地点

表 1 ARD による説明変数の回帰係数の推定結果

	L8_LST	L8_NDTI	L8_red	MOD_LST_daily	MOD_LST_8-daycomposite	TN2m	TP2m
室生	0	0	0	0	-0.22	0.09	-0.11
阿木川	0	0.06	0	0	-0.15	0.04	0
一庫	0	0	0	0	0.07	0	0
寺内	0.09	-0.002	0	0.21	0	-0.05	0
	Inflow7d	Discharge7d	AveMaxTemp7d	Sun7d	AveWind7d	Rain7d	
室生	0	0	0.27	0	-0.03	-0.05	
阿木川	0	-0.10	0	-0.14	0	-0.07	
一庫	-0.97	0	0	-0.17	0.40	0.50	
寺内	0	0	0	0.32	0.26	0	

表2 各ダム湖における機械学習アルゴリズムによる2値分類モデルの予測結果

	機械学習アルゴリズム	カーネル	正解率 (%)	精度 (%)	再現率 (%)
室生ダム	SVM	linear	75	100	50
		poly	75	80	66.7
		RBF	66.7	100	33.3
		sigmoid	75	100	50
	ANN	-	91.7	100	83.3
	RF	-	83.3	100	66.7
	XGBoost	-	75	80	66.7
LightGBM	-	50	0	0	
阿木川ダム	SVM	linear	×	×	×
		poly	×	×	×
		RBF	×	×	×
		sigmoid	×	×	×
	ANN	-	×	×	×
	RF	-	×	×	×
	XGBoost	-	×	×	×
LightGBM	-	×	×	×	
一庫ダム	SVM	linear	60	0	0
		poly	80	0	0
		RBF	80	0	0
		sigmoid	80	0	0
	ANN	-	60	0	0
	RF	-	80	0	0
	XGBoost	-	60	0	0
LightGBM	-	80	0	0	
寺内ダム	SVM	linear	55.6	50	25
		poly	44	0	0
		RBF	55.6	50	50
		sigmoid	55.6	50	25
	ANN	-	66.7	66.7	50
	RF	-	55.6	50	25
	XGBoost	-	33.3	0	0
LightGBM	-	55.6	0	0	

表3 各ダム湖における機械学習アルゴリズムによる2値分類モデルの予測結果

	機械学習アルゴリズム	カーネル関数	訓練データMSE	テストデータMSE
室生ダム	SVM	linear	0.287	0.384
		poly	0.228	0.310
		RBF	0.009	0.289
		sigmoid	0.290	0.374
	ANN	-	0.253	0.277
	RF	-	0.049	0.344
	XGBoost	-	0.067	0.694
LightGBM	-	0.342	0.424	
阿木川ダム	SVM	linear	0.030	0.447
		poly	0.044	0.498
		RBF	0.044	0.496
		sigmoid	0.044	0.497
	ANN	-	0	0.316
	RF	-	0.012	0.450
	XGBoost	-	0.038	0.513
LightGBM	-	0.044	0.487	
一庫ダム	SVM	linear	0.492	0.050
		poly	0.576	0.063
		RBF	0.177	0.028
		sigmoid	0.492	0.047
	ANN	-	1.017	0.366
	RF	-	0.055	0.050
	XGBoost	-	0.104	0.136
LightGBM	-	0.503	0.096	
寺内ダム	SVM	linear	0.891	0.572
		poly	0.906	0.608
		RBF	0.847	0.563
		sigmoid	0.892	0.571
	ANN	-	1.065	0.683
	RF	-	0.265	0.803
	XGBoost	-	0.295	0.998
LightGBM	-	1.08	0.747	

藻類増殖に影響を与える環境因子サブモデルに関する研究

研究代表者	秋葉 道宏
研究分担者	下ヶ橋雅樹
研究分担者	西村 修
研究分担者	浅田 安廣
研究協力者	佐野 大輔

厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)
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：藻類増殖に影響を与える環境因子サブモデルに関する研究

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 特任研究官
研究分担者 下ヶ橋雅樹 叡啓大学 ソーシャルシステムデザイン学部 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 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 佐野 大輔 東北大学大学院 工学研究科 教授

研究要旨

水道水源における藍藻類個体数予測モデルを構築するために必要となる水源での河川流量や水温、栄養塩等のミクロな環境変化を予測する数理モデルの構築を、奈良県の室生ダム貯水池流域を対象として、準分布型水文水質モデル Soil and Water Assessment Tool (SWAT) のうちの SWAT+、ならびに QSWAT+を用いて行った。特に本年度は同貯水池の流入河川流量予測手法を確立するとともに、水温および栄養塩の予測についても予備的な検討を行った。地形や土地利用に関しては国土数値情報、局所的な気候や土壌に関しては農研機構の情報をもとに動力学的パラメータや計算の環境条件を決定した。室生ダム貯水池への流入水量（独）水資源機構）に対する予測性を、3つのモデル性能指標（Nash-Sutcliffe efficiency、RSR、および PBIAS）を用いて評価しつつ、地下水と表流水の交換にかかわる2つのパラメータの補正を行った。結果として、室生ダム貯水池への流入量の基底流量に関しては良好な予測を与えるシミュレーションを行うことができた。一方ピーク流量については過小評価傾向にあった。河川水温については夏期に過小評価する結果となり、より詳細な水温予測手法の導入の必要性がうかがえた。室生ダムへの流入河川の栄養塩（各態の窒素及びリン）濃度について、特に各態窒素濃度予測に関しては施肥や植生等を考慮した抜本的な検討を行う必要があることがわかった。

A. 研究目的

水道水源で発生する藍藻は異臭味等の生物障害の原因となり、数理モデルを用いた発生量予測が水道運用上重要となる。一方、水道水源における藍藻類個体数予測モデルを構築するためには、その水源将来の気候変動のもとでの藻類増殖に影響を与える河川流量や水温、栄養塩等の環境因子の予測が必要である。本研究では気候モデル MIROC5 等による気象予測から、水源での河川流量や水温、栄養塩等のミクロな環境変化を予測する数理モデル手法を開発し、将来的な気候変動に伴う水源での藍藻類の発生予測に資する情報を与えることを目的とする。本年度は奈良県の室生ダム貯水池流域を対象とし、準分布型水文水質モデルを用いて同貯水池の流入河川流量予測手法を確立するとともに、水温および栄養塩の予測についても予備的な検討を行い、今後の展望を考察した。

B. 研究方法

研究の対象とした室生ダムは北緯 34 度 33 分 19 秒、東経 136 度 00 分 25 秒に位置するダムであり、流域面積は 169 km² (直接: 136 km², 間接: 33 km²) である [1]。今回の水文水質モデルは、室生ダム貯水池（室生湖）に流入する宇陀川、天満川、宮川、及び深谷川（図 1）本川とその支流、およびそれ

ぞれの流域を対象とした。

水文水質モデルは、テキサス農工大及び米国農務省の開発した Soil and Water Assessment Tool (SWAT) [2]のうちの SWAT+ [3]、ならびに QGIS 用インターフェースである QSWAT+ [4]を使用した。SWAT+は SWAT [5]の revise 版である。

SWAT+の計算で必要となる標高データ（50m メッシュ標高）は日本地図センター [6]から購入した。土地利用に関する情報は国土数値情報 [7]から「土地利用細分メッシュ」（平成 28 年、世界測地系、メッシュコード 5135 及び 5136）（識別子 L03）を入手して使用した（図 2）。土壌に関する情報として、まず縮尺 20 万分の 1 土壌図 [8,9]を用いて土壌の水平分布を決定した（図 3）。ついで、それらの土壌に近いものを土壌断面 DB [10]及び国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）のデータベース SolphyJ [11]から選択し、それらの値を参照しながら、SWAT+で用いられるパラメータ（SCS Curve Number にて参照される土壌の水文グループ、各層の土壌のかさ密度、利用可能水分量（AWC）、飽和透水係数、有機炭素含量、粘土・シルト・砂・岩の存在比）を決定した。決定に際してはできるだけ流域内の土壌に近

いものを選択して使用した。根圏深 (root zone depth) は流域内で一律 1,500 mm とし、それ以上深い層を deeper zone とした。上記データベースで入手できなかった値は、SWAT+に具備されている例 (エチオピアの Robit) の値を暫定的に用いた。その他のパラメータは SWAT+で初期に入力されているパラメータを用いた。

気候データは農研機構のメッシュ気象データ [12]から、流域内の代表的な 5 地点 (

図 4) の 2012 年 1 月 1 日~2017 年 12 月 31 日の期間の日々の日最高気温、日最低気温、降水量、相対湿度、日射量、風速のデータを入手して使用した。流域と河川流路はそれぞれ国土数値情報 [7]の「河川」(識別子 W05)、「流域界・非集水域」(識別子 W12)を使用した。地理情報システムの解析は Arc GIS Pro Ver. 3 (ESRI ジャパン) ならびに QGIS Ver 3.22 [13]を使用した。

SWAT+の計算結果の検証は室生湖の流入水量 (独) 水資源機構提供) を使用した。モデルの予測性評価には、Nash-Sutcliffe efficiency (NSE) (式 (1))、RSR (式(2))、および PBIAS (式(3)) のモデル性能指標を用いた [14]。

$$NSE = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{obs} - Y_i^{sim})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i^{obs} - Y^{mean})^2} \quad (1)$$

$$RSR = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i^{obs} - Y_i^{sim})^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i^{obs} - Y^{mean})^2}} \quad (2)$$

$$PBIAS = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{obs} - Y_i^{sim}) \times 100}{\sum_{i=1}^n (Y_i^{obs})} \right) \quad (3)$$

ここで、 Y_i^{obs} は i における観測値、 Y_i^{sim} は i における計算値、 Y^{mean} は観測値の平均値、 n は観測数を示す。NSE は残差の分散 (ノイズ) と測定データの分散 (情報) の相対的な大きさを示す正規化された統計指標であり、観測値と計算値のプロットが 1:1 の直線にどれだけフィットするかを示す [14]。RSR は、一般に使用される誤差指標 2 乗平均平方根誤差 (Root Mean Squared Error, RMSE) と観測値の標準偏差の比である [14]。PBIAS は計算値が観測値より大きいか小さいかの平均的な傾向を示す [14]。なお、これらの値に関しての予測性評価基準は表 1 [14]の通りである。モデル予測性において表流水と地下水の交換は重要な役割を担う。SWAT+における地下水の動きに関するいくつかの式は以下のとおりである [5]。

$$aq_{sh,i} = aq_{sh,i-1} + w_{rchrg,sh} - Q_{gw} - w_{revap} - w_{pump,sh} \quad (4)$$

$$w_{deep} = \beta_{deep} \cdot w_{rchrg} \quad (5)$$

$$w_{rchrg,sh} = w_{rchrg} - w_{deep} \quad (6)$$

$$Q_{gw} = \frac{8000 \cdot K_{sat}}{L_{gw}^2} \cdot h_{wtbl} \quad (7)$$

$$\frac{dh_{wtbl}}{dt} = \frac{w_{rchrg,sh} - Q_{gw}}{800 \cdot \mu} \quad (8)$$

$$\frac{dQ_{gw}}{dt} = 10 \cdot \frac{K_{sat}}{\mu \cdot L_{gw}^2} \cdot (w_{rchrg,sh} - Q_{gw}) = \alpha_{gw} \cdot (w_{rchrg,sh} - Q_{gw}) \quad (9)$$

ここで、 $aq_{sh,i}$ は i 日に浅い帯水層 (shallow aquifer) に蓄えられている地下水 [mm H₂O]、 $w_{rchrg,sh}$ は i 日に浅い帯水層に再充填される地下水 [mm H₂O]、 w_{rchrg} は浅い帯水層と深い帯水層 (deep aquifer) の両方に再充填される地下水 [mm H₂O]、 Q_{gw} [mm H₂O] は地下水から河川への再流入、 w_{revap} は水不足に起因して土壌ゾーンに戻る水 [mm H₂O]、 $w_{pump,sh}$ は i 日にポンプアップにより浅い帯水層から採取される水、 w_{deep} は i 日に深い帯水層に移動する水 [mm H₂O]、 β_{deep} は帯水層の浸透に関する係数、 K_{sat} は帯水層の透水係数 [mm/day]、 L_{gw} は地下水系の尾根や小流域の分水嶺から本流までの距離 [m]、 h_{wtbl} は地下水位の高さ [m]、 μ は浅い帯水層の比収率 [m/m]、 α_{gw} は基底流の後退係数 [1/day] である。

本研究ではモデル予測性向上のために、上記の β_{deep} および α_{gw} の補正を行った。なおこの 2 パラメータについては SWAT+では双方ともに初期値として 0.05 が与えられている。

また、SWAT+では、水温や各態窒素、リンの流出量が計算される。今回の検討では水温や各態窒素、リンについては補正を行わなかったが、水温については出力結果を高倉橋及び室生路橋 (

図 4) の水温と比較した。各態窒素やリンの流出量 [kg/day] は、その河川の流量で除することで濃度に換算し、国土交通省水文水質データベース [15]から入手した水質データと比較し、予測の程度を確認した。

C. 研究結果

SWAT による河道と流域作成

SWAT+で、まずデジタル標高 (本研究では 50 m メッシュ標高) を入力して河川及び流域を計算した。図 5 は SWAT+での計算の結果得られた流域、及び河川国土数値情報から描画した流域及び河川を示す。図より、今回 SWAT+で作成した室生ダム流域の支流と河川は国土数値情報のそれとほぼ一致し、その妥当性が確認された。また SWAT+では同流域内に 18 の支流が設定されたが、それぞれの番号を図 5 に示している。

河川流量

前述「B. 研究方法」に記載の手順によって決定されたパラメータならびに SWAT+の初期パラメータを用いた際の河川流量の計算結果を図 5 に示す。まず、PBIAS が負であることから、全体として過大評価の傾向にあった。また日々の計算結果から、流出ピーク位置についてはある程度予測

されているが、ピーク高さは過小評価となった。河川流量のシミュレーション予測性を向上させるため、前述の地表流と地下との交換に係るパラメータ β_{deep} および α_{gw} の補正を行った。まず β_{deep} を初期値の 0.05 から 0.1、0.2、0.5 と変化させた場合の計算結果を図 7 に示す。図より、 β_{deep} が 0.5 となった場合に基底流量が十分に再現される結果となった。 α_{gw} を初期値の 0.05 から 0.1、0.2、0.5 と変化させた場合の計算結果を図 8 に示す。ピーク流量の予測性が若干向上したが、基底流量の予測性は向上しなかった。日々計算に関する各モデル性能指標とパラメータ値の関係を図 9 に示す。 β_{deep} に関しては、NSE および RSR は 0.5 までの範囲で一樣に増加あるいは減少しているが、PBIAS は 0.5 では 0 を超えていた。以上より、今回行ったパラメータ調整の範囲では、 $\beta_{deep}=0.5$ で最もよい予測を与えるものと判断した。なお、そのときのモデル性能指標とその評価 (表 1 参照) は、NSE は日々予測で 0.705 (Good)、月平均予測で 0.606 (Satisfactory)、RSR は日々予測で 0.543 (Good)、月平均予測で 0.628 (Satisfactory)、PBIAS は日々予測で 17.1 (Satisfactory)、月平均予測で 0.561 (Very Good) であった。

水温

SWAT+では、以下の単純な線形式により水温を計算している。

$$T_{water} = 5.0 + 0.75T_{av} \quad (10)$$

ここで、 T_{water} は水温[°C]、 T_{av} は平均気温[°C]である。図 10 は今回の SWAT+ の出力値 (=式(10)による計算値) である。図より、冬期の低水温の予測は十分であると判断できるが、夏期の予測性が低い。特に 2014 年、2016 年の夏期水温が過小評価となった。

窒素、リン

今回のシミュレーションでは、栄養塩 (窒素、リン) に直接的に関係するパラメータの設定は行っておらず、SWAT+ の初期値 (あるいは Robit の値) を用いて各態窒素 (有機態窒素、硝酸態窒素、亜硝酸態窒素、アンモニア態窒素)、および各態リン (有機態リン、溶存態リン) の流出量を計算した。流域 10 (図 5) の流出 (高倉橋付近) において、各態窒素、リンの合計流出量をその日の流出流量で除して求めた、各態窒素濃度を図 11、各態リン濃度を図 12 にそれぞれ示す。また、室生路橋および高倉橋の水質測定データ [15] を表 2 に示す。窒素に関しては実測値と比較して、2~4 桁低い計算結果 (平均値として有機態 N は 23.2 $\mu\text{g/L}$ 、 $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ は 0.09 $\mu\text{g/L}$ 、 $\text{NH}_3\text{-N}$ は 0.07 $\mu\text{g/L}$) となった。各態リンに関しては 3 倍程度の過大評価であった (平均値として有機態 P は 11.9 $\mu\text{g/L}$ 、溶存態リンは 9.3 $\mu\text{g/L}$)。

D. 考察

河川流量について、今回行ったパラメータ補

正では、基底流量が十分に再現されたといえる。しかしながらピーク流量の再現は十分とはいえず、今後その予測性を改善する必要がある。今回のパラメータ補正では、表流水と地下水の交換にかかわる 2 つのパラメータである β_{deep} 、あるいは α_{gw} をすべて流域全体で一括して変更し、表流水に与える影響をみた。より詳細なパラメータ補正には、各小流域のパラメータを個別に調整する必要や、これら以外のパラメータについても検討する必要がある。また土地利用は、河川流量のみならず窒素・リンの収支や水温にも影響を与える因子である。今回は SWAT に具備される土地利用パラメータを使用した。特に独特な水収支を行う水田や、森林植生の特徴を踏まえて、より詳細に検討する必要がある。

水温に関しては前述のとおり気温との簡単な線形関係式で求めている。結果として冬期の水温はある程度予測できたが、藻類増殖において重要な夏期水温に関して十分な予測は得られていない。SWAT における水温モデルの構築 (Ficklin et al. [16]) やそのパラメータ決定手法の検討 (Barnhart et al. [17]) 等を参考に、水温予測性の向上を図る必要がある。水田水収支に関しては SWAT-PADDY モデル [18, 19] 等を参考にモデルでの表現を検討する必要がある。

栄養塩について、リンに関してはある程度オーダーの予測が可能であったが、窒素については全く予測できていない状況であり、抜本的なパラメータ設定が必要である。Jung et al. [20] は窒素降下物の影響も含めて窒素動態を SWAT で検討したが、このような例を参考にしながら、今後窒素予測を可能とさせる必要がある。

E. 結論

SWAT+を用いて、室生ダム流域の水文水質シミュレーションを実施した。室生湖への流入水について、基底流量に関しては良好な予測を与えるシミュレーションを行うことができた。一方、ピーク流量については過小評価傾向にあった。同流入河川の水温、栄養塩についても予備的に検討を行った。水温については、気温からの簡単な線形式による推算では、冬期の水温はある程度予測できたが夏期に過小評価する結果となり、より詳細な水温予測手法の導入が望まれる。各態窒素及びリン濃度については SWAT+での予測を確認したが、特に各態窒素濃度予測に関しては、施肥や植生等を考慮した抜本的な検討を行う必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表
該当なし

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]一般財団法人日本ダム協会, ダム便覧2021 室生ダム [奈良県] (むろろ) . Available from: <http://damnet.or.jp/cgi-bin/binranA/All.cgi?db4=1568>
- [2] Texas A&M University, Texas A&M Agrilife Research, and USDA Agricultural Research Service. The Soil & Water Assessment Tool. Available from: <https://swat.tamu.edu/>.
- [3] Texas A&M University, Texas A&M Agrilife Research, and USDA Agricultural Research Service. SWAT+. Available from: <https://swat.tamu.edu/software/plus/>.
- [4] Dile, Y., R. Srinivasan, and C. George, QGIS Interface for QSWAT+. 2022.
- [5] Neitsch, S.L., et al., SOIL & WATER ASSESSMENT TOOL Theoretical Documentation Version 2009. 2011.
- [6] 地図センター Net Shopping. 数値地図 (国土基本情報) オンライン . Available from: https://net.jmc.or.jp/mapdata/gsi_online/dkg.html.
- [7] 国土交通省. 国土数値情報ダウンロードサイト. Available from: <https://nlftp.mlit.go.jp/ksj/>.
- [8] 農研機構, 縮尺 20 万分の 1 土壌図. Available from: <https://soil-inventory.rad.naro.go.jp/download20.html>
- [9] 小原洋他, 包括的土壌分類第 1 次試案に基づいた 1/20 万日本土壌図. 農環研報, 2016. **37**: p. 133-148.
- [10] 農研機構, 日本土壌インベントリー 土壌断面 DB. Available from: <https://soil-inventory.rad.naro.go.jp/danmen.html>
- [11] 江口定夫, 青木和博, and 神山和則. 日本の農地土壌の物理的性質データベース SolphyJ. in H23 農業農村工学会大会講演会講演要旨集. 2011. 福岡県福岡市九州大学 50 周年記念講堂及び箱崎キャンパス.
- [12] 農業・食品産業技術総合研究機構. 農研機構 メッシュ農業気象データシステム. 2022. Available from: <https://amu.rd.naro.go.jp/>.
- [13] QGIS Association, QGIS Geographic Information System (Ver 3.22). Available from: <http://www.qgis.org>
- [14] Moriasi, D.N., et al., Model Evaluation Guidelines for Systematic Quantification of Accuracy in Watershed Simulations. Transactions of the ASABE, 2007. **50**(3): p. 885-900.
- [15] 国土交通省. 水文水質データベース. Available from: <http://www1.river.go.jp/>.
- [16] Ficklin, D.L., et al., Development and application of a hydroclimatological stream temperature model within the Soil and Water Assessment Tool. Water Resources Research. **48**(1): p. W01511.
- [17] Barnhart, B.L., G. Whittaker, and D. Ficklin, Improved stream temperature simulations in swat using NSGA-II for automatic multi-site calibration, Transactions of the ASABE (American Society of Agricultural and Biological Engineers), 2014. **57**(2): p. 517-530.
- [18] 土屋遼太, 加藤亮, ジェハクジオン. 持続的なコメ生産のための SWAT 水田モデルの改良と検証. in H28 農業農村工学会大会講演会. 2016. 仙台市.
- [19] Tsuchiya, R., et al., Development of SWAT-Paddy for Simulating Lowland Paddy Fields. Sustainability, 2018. **10**(9): p. 3246.
- [20] Jung, C.-G. and S.-J. Kim, SWAT Modeling of Nitrogen Dynamics Considering Atmospheric Deposition and Nitrogen Fixation in a Watershed Scale. Agricultural Sciences, 2017. **8**: p. 326-340.

J. 謝辞

本研究の遂行にあたり情報提供にご協力いただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構様ならびに独立行政法人水資源機構様に、記して謝意を表します。

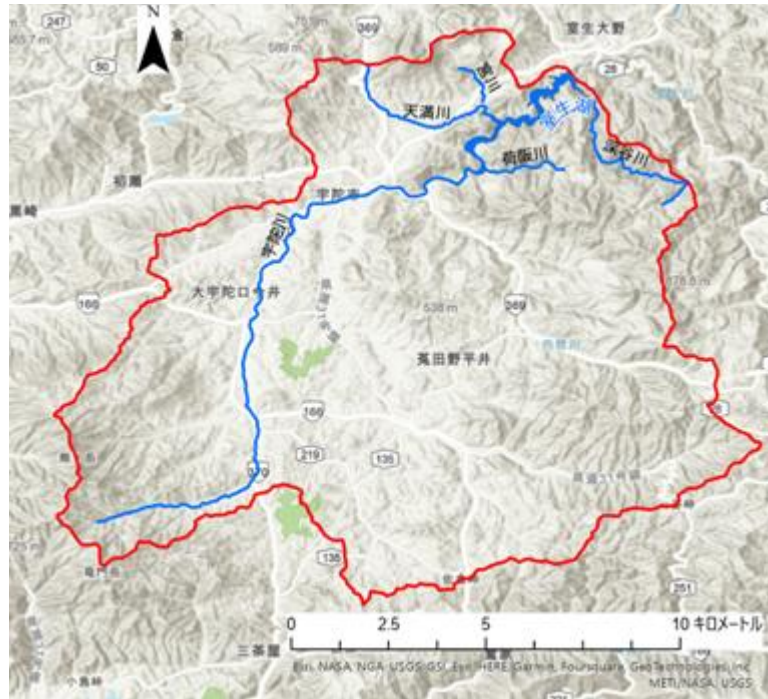


図 1 室生ダム（室生湖）流域と流入河川

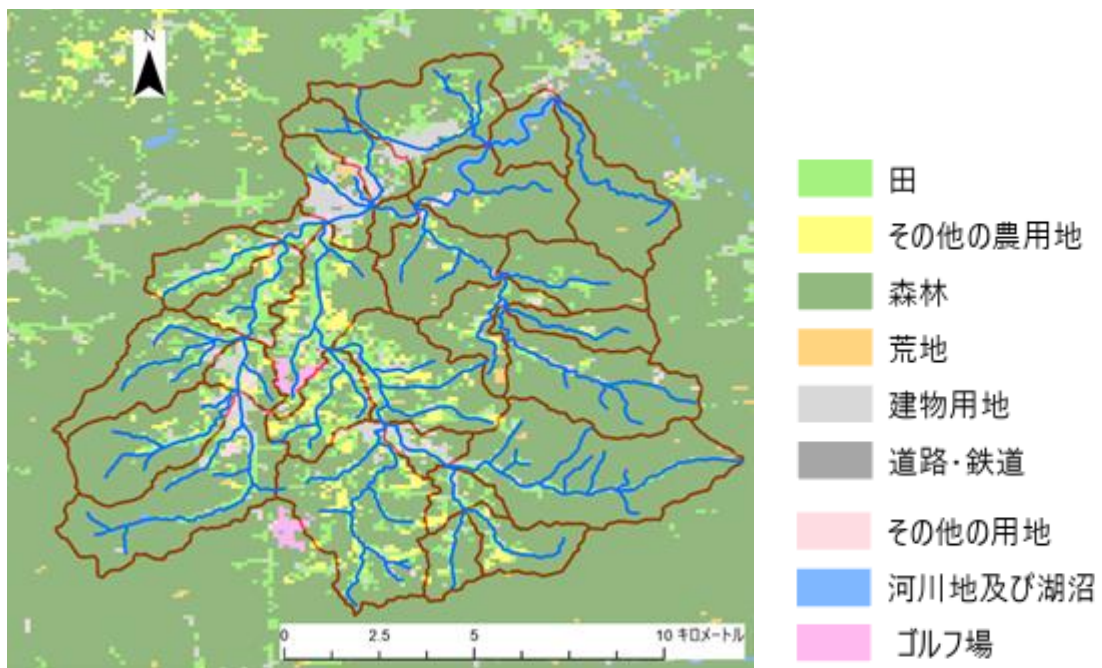


図 2 室生ダム流域の土地利用 [7]

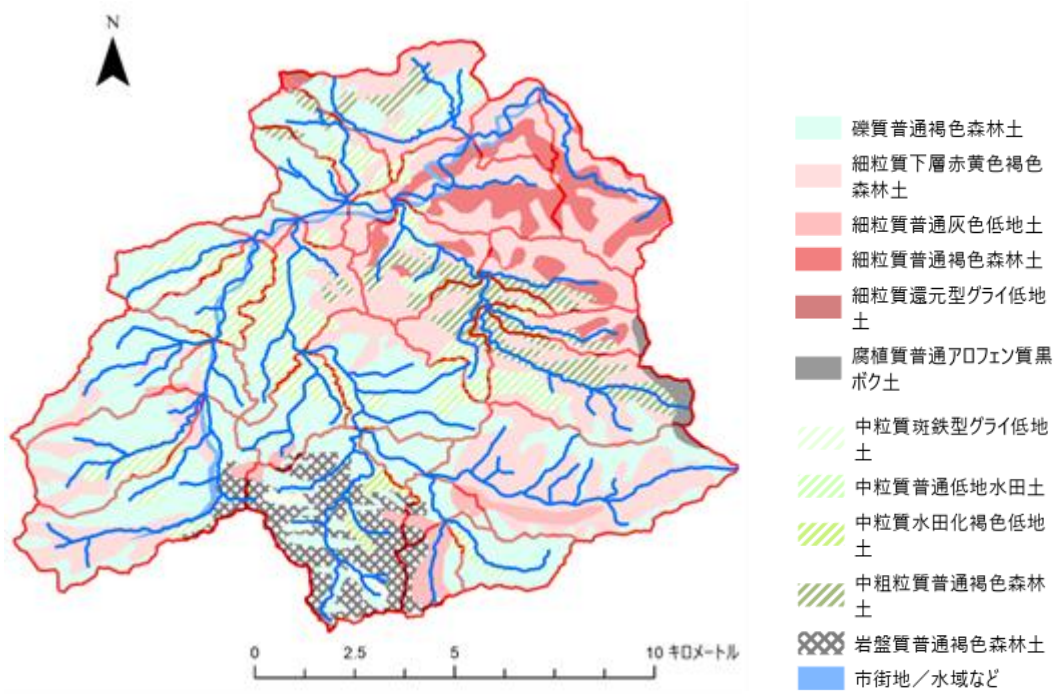


図 3 室生ダム流域内の土壌分布 [8]



図 4 入手した気象データ (a~e) と水質データ観測所 (室生路橋、高倉橋) の位置

表 1 RSR、NSE、PBIAS によるモデルパフォーマンス評価

Performance Rating	RSR	NSE	PBIAS (%)		
			Streamflow	Sediment	N, P
Very good	$0.00 \leq \text{RSR} \leq 0.50$	$0.75 < \text{NSE} \leq 1.00$	$\text{PBIAS} < \pm 10$	$\text{PBIAS} < \pm 15$	$\text{PBIAS} < \pm 25$
Good	$0.50 < \text{RSR} \leq 0.60$	$0.65 < \text{NSE} \leq 0.75$	$\pm 10 \leq \text{PBIAS} < \pm 15$	$\pm 15 \leq \text{PBIAS} < \pm 30$	$\pm 25 \leq \text{PBIAS} < \pm 40$
Satisfactory	$0.60 < \text{RSR} \leq 0.70$	$0.50 < \text{NSE} \leq 0.65$	$\pm 15 \leq \text{PBIAS} < \pm 25$	$\pm 30 \leq \text{PBIAS} < \pm 55$	$\pm 40 \leq \text{PBIAS} < \pm 70$
Unsatisfactory	$\text{RSR} > 0.70$	$\text{NSE} \leq 0.50$	$\text{PBIAS} \geq \pm 25$	$\text{PBIAS} \geq \pm 55$	$\text{PBIAS} \geq \pm 70$

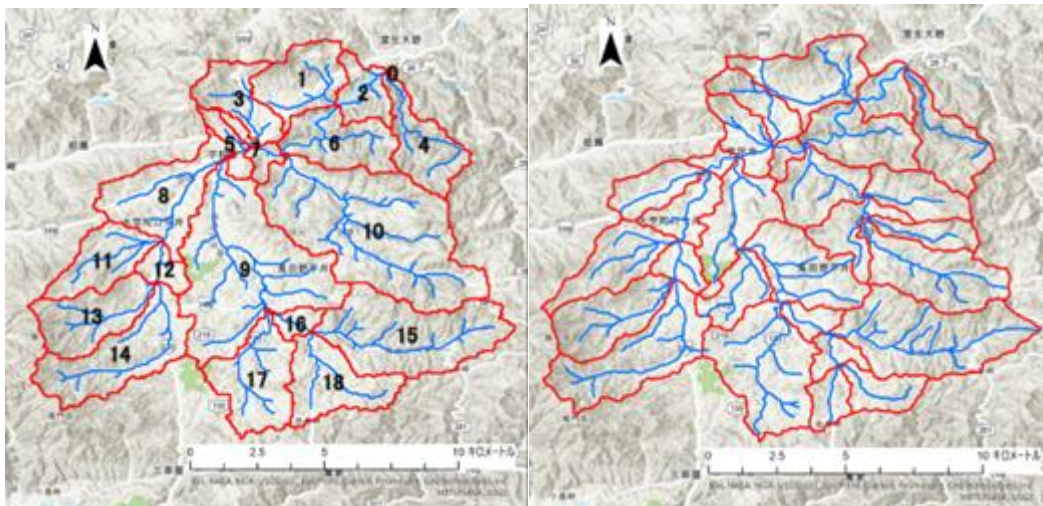


図 5 SWAT+で算出された流域と河川（左）と国土数値情報のデータで描画した流域と河川（右）

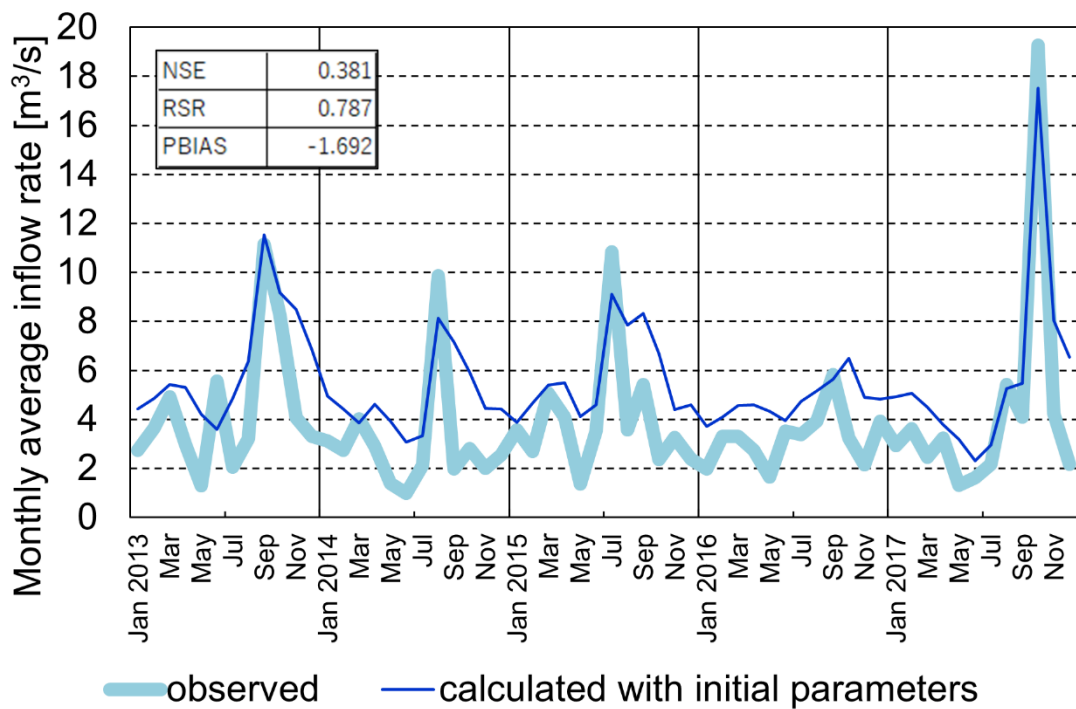
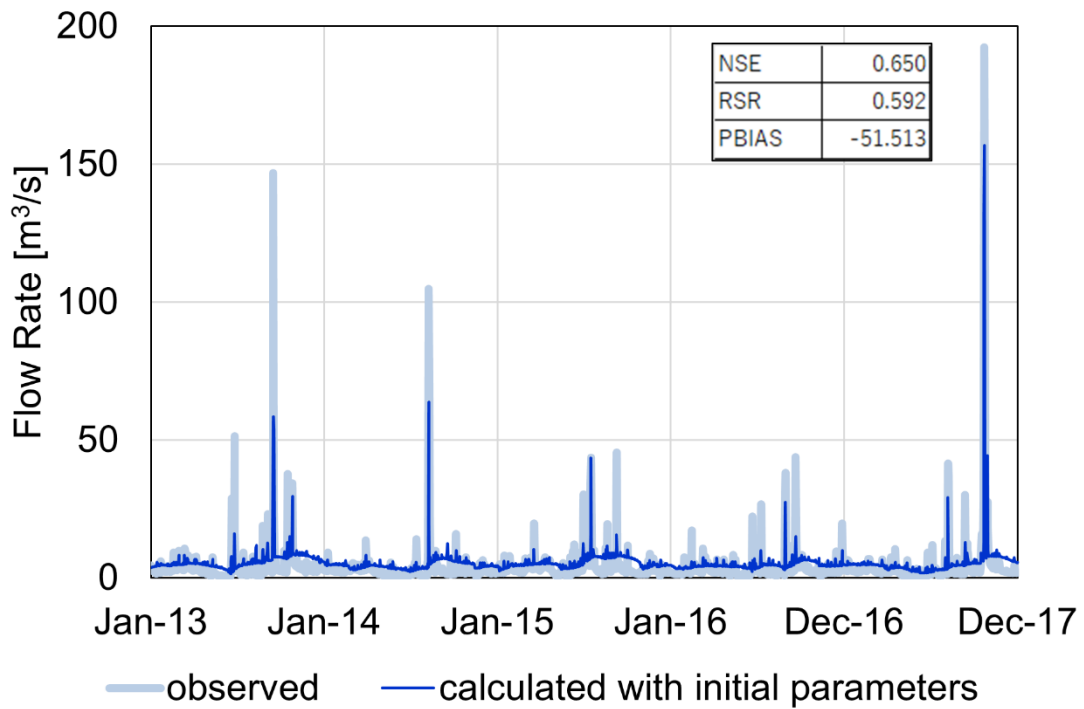


図 6 補正前のパラメータを用いた流入水量シミュレーション
(上：日々の流量、月平均をとった日々の流量)

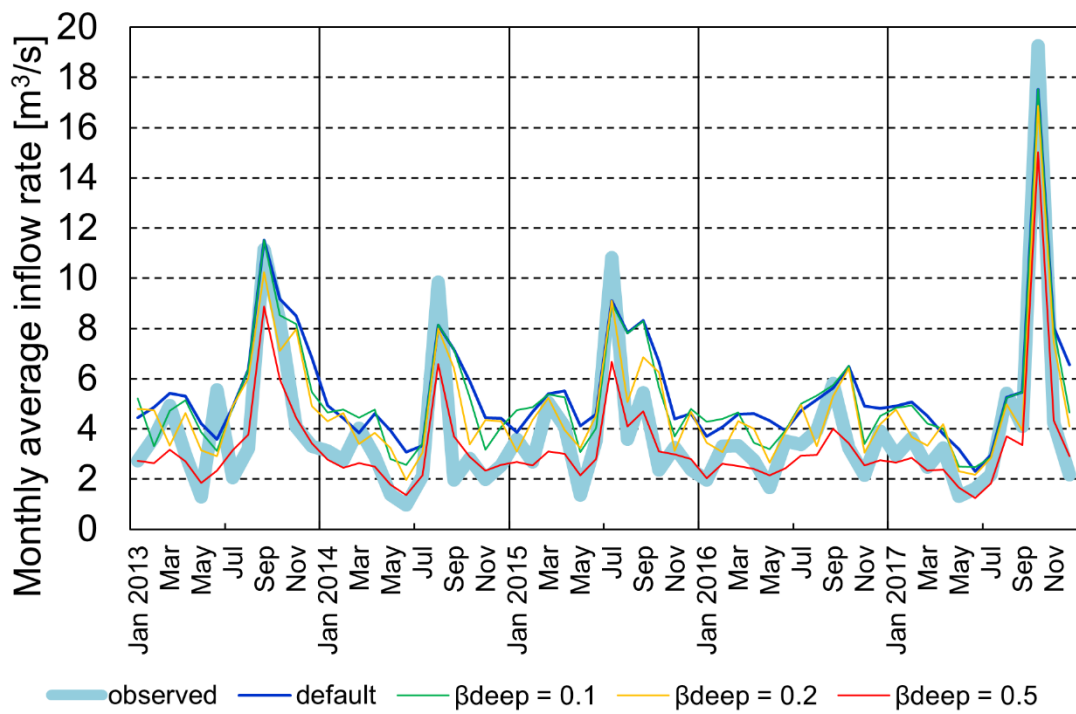
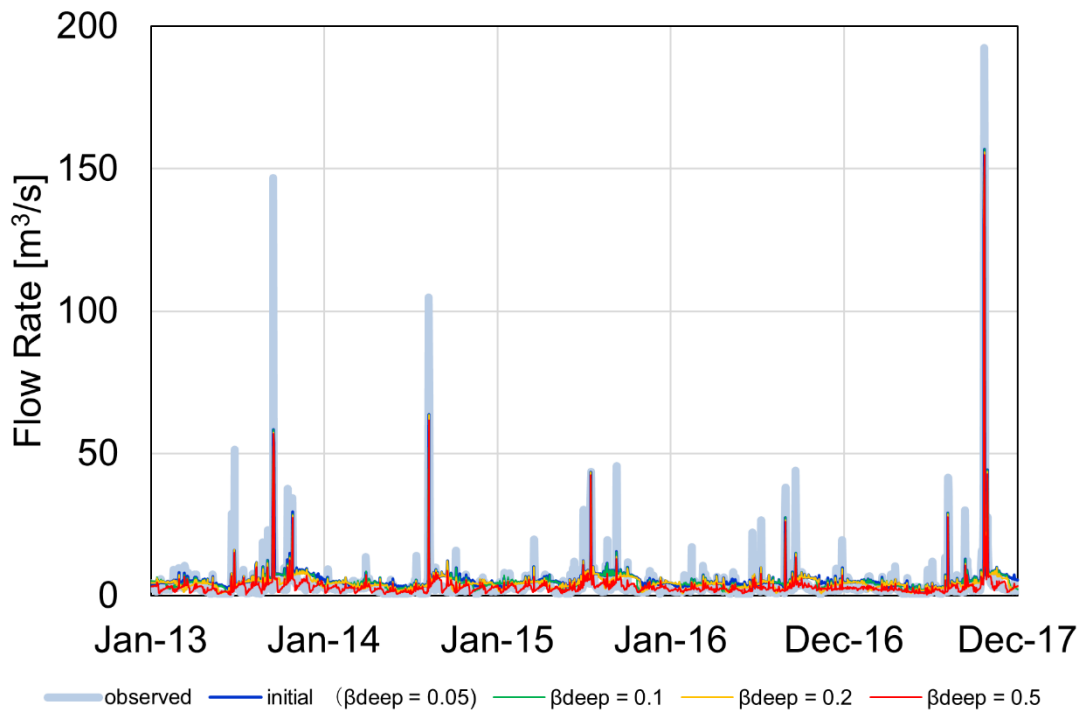


図 7 β_{deep} を変化させた場合のシミュレーション結果
 (上：日々の流量、月平均をとった日々の流量)

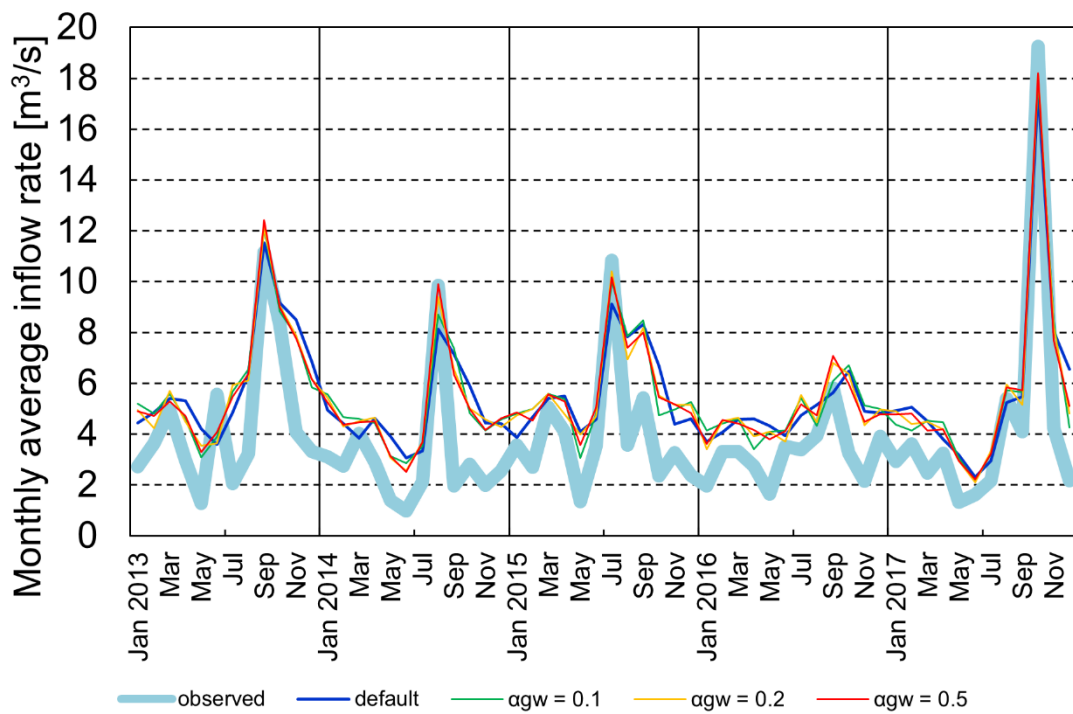
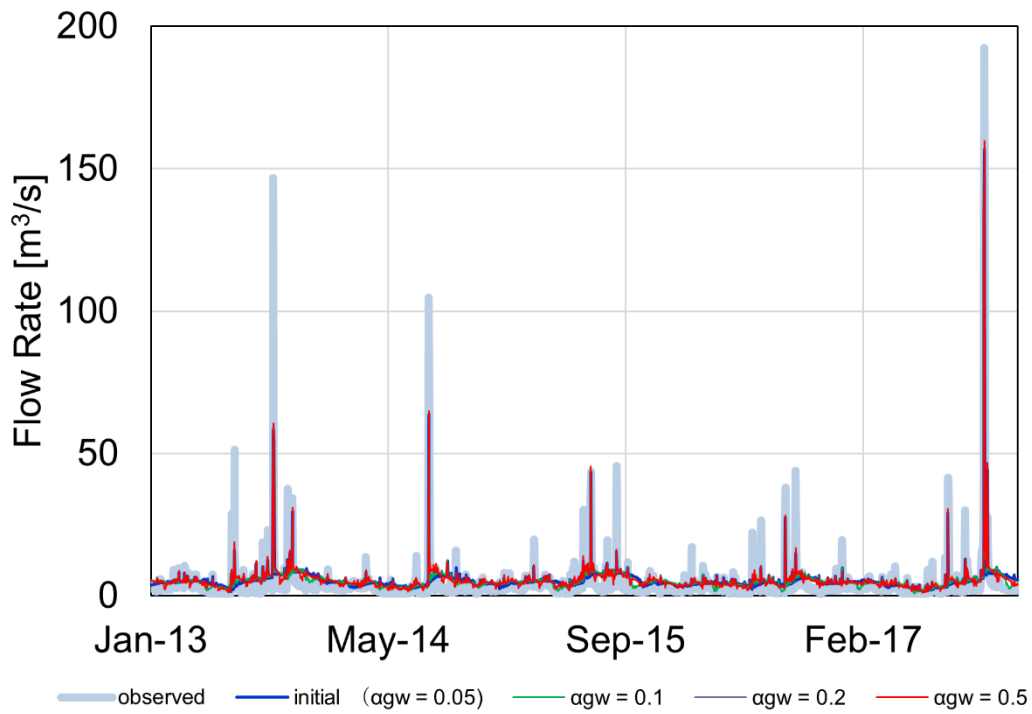


図 8 α_{gw} を変化させた場合のシミュレーション結果
(上：日々の流量、月平均をとった日々の流量)

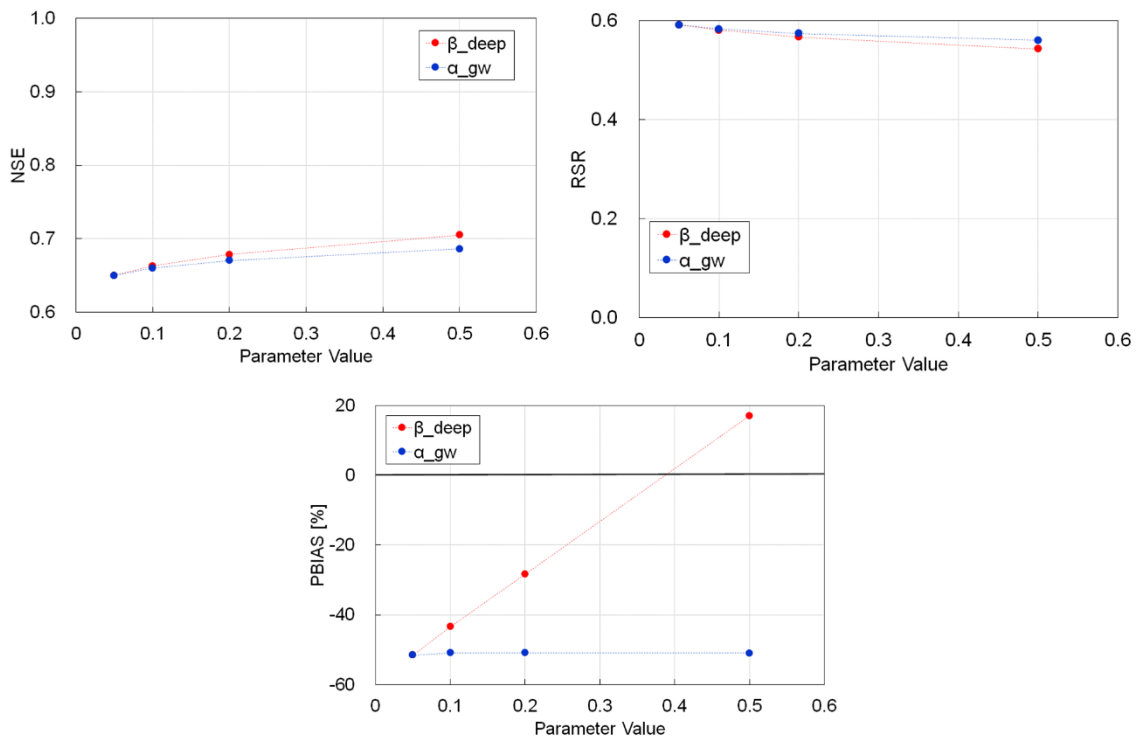


図 9 パラメータ値変動に伴う各モデル性能指標の変化

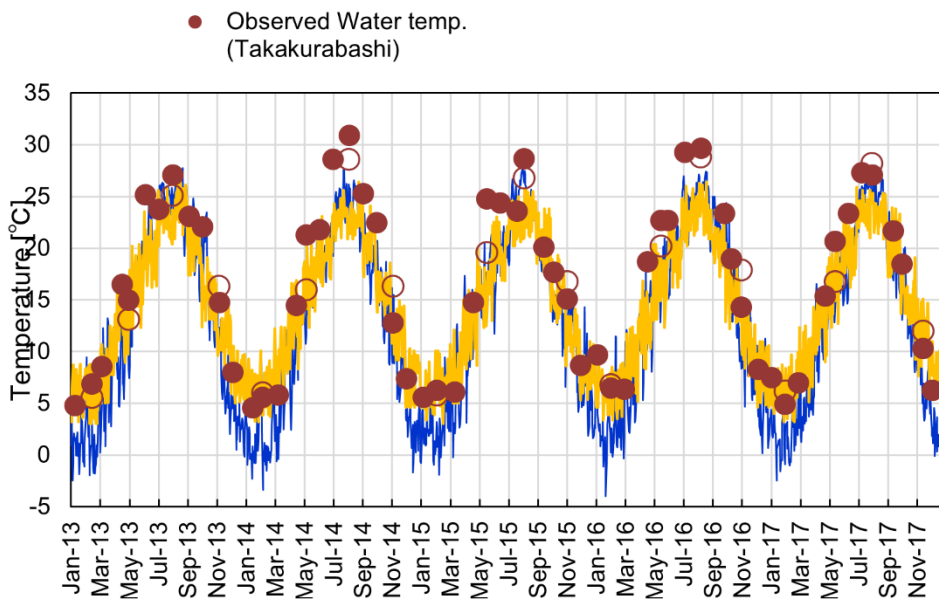


図 10 気温（モデル入力）と水温（実測値と計算値）

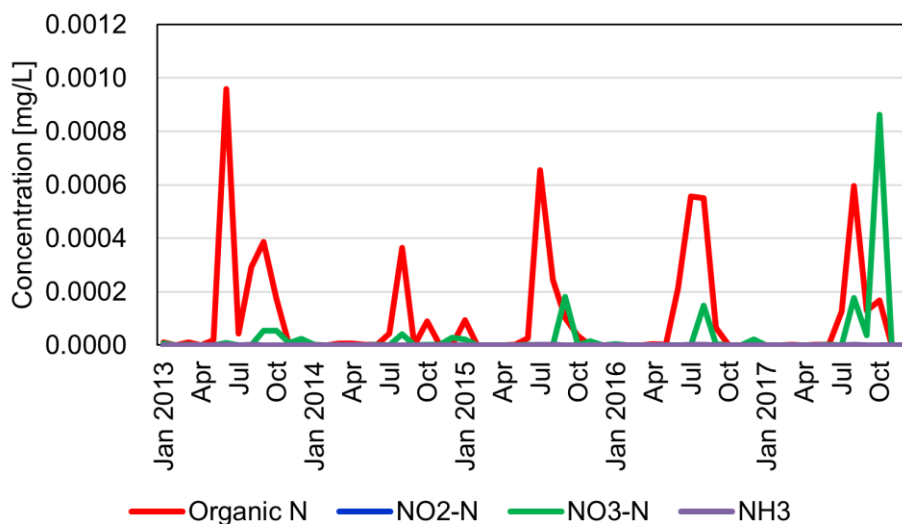


図 11 支流域 10 流出河川における各態窒素の計算結果

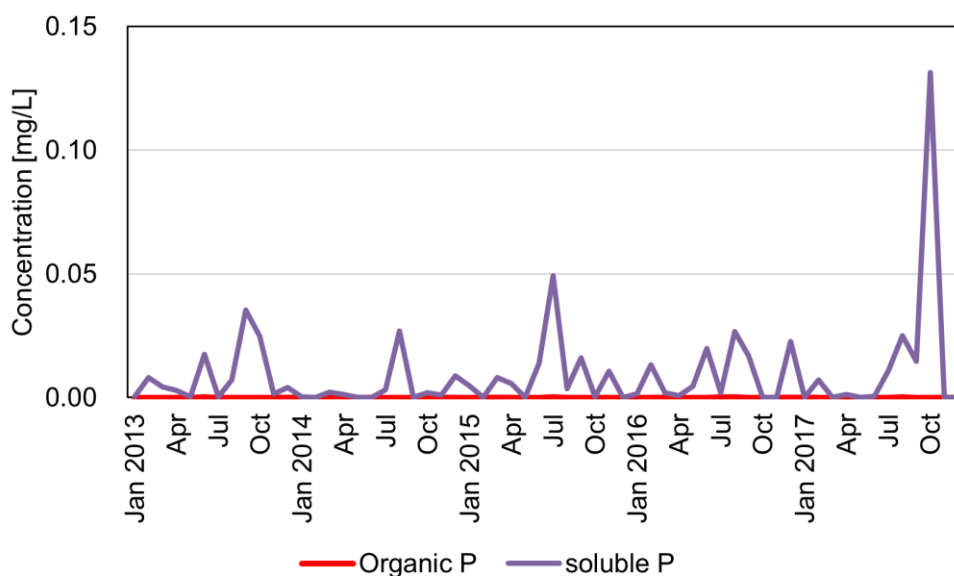


図 12 支流域 10 流出河川における各態リン濃度計算結果

表 2 室生路橋、高倉橋の水質データ (単位: mg/L) [15]

	高倉橋		室生路橋	
	2013年	2017年	2013年	2017年
硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素	0.8	0.73	0.56	0.5
アンモニウム態窒素	0.03	0.02	0.02	0.02
亜硝酸態窒素	0.008	0.006	0.012	0.005
硝酸態窒素	0.8	0.73	0.55	0.5
総窒素	1.1	0.9	0.71	0.71
オルトリン酸態リン	0.03	0.031	0.031	0.019
総リン	0.047	0.04	0.044	0.028

去率

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

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と効率的な浄水処理システムの提案

研究代表者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院	生活環境研究部	特任研究官
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の原因物質は、十分に解明され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、官能試験によって管理されている。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、原因物質は、分子式が $C_{13}H_{20}O_3$ 、3~4位にヘキシル-2-オンが置換され、5~6位に CH_3O が置換された2-シクロヘキセン-1-オンと推定され、12種類の構造異性体（48立体異性体）のいずれかと予測されているが、さらなる構造推定が必要である。そこで本年度は、質量分析、選択的誘導體と量子化学計算を用いて構造推定を進めることとした。検討の結果、1種類（2立体異性体）まで候補構造を絞り込むことに成功した。また、試料大容量注入型のガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）を用いることにより、水道原水中の原因物質が分析可能なことを示した。

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、および生ぐさ臭が複合臭であ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る、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、どのような構造の物質なのかを事前に推定する必要がある。構造の推定には、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させ、イオン化とほぼ同時に分解（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-ESI-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またはその異性体を1個、炭素鎖長6のアルキルケトン（ヘキシル-2-オン）を1個有するシクロヘキセノン（2-シクロヘキセン-1-オン）と推定された。昨年度末の時点では、メトキシ基またはその異性体1個について、官能基の構造および置換位置に見落としがあった。これを見直した結果、FXの推定構造の全体構造は、図1に示す12種類の構造異性体（48立体異性体）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、12種類の構造異性体（48立体異性体）について、選択的誘導體化反応と量子化学計算に基づいた絞り込みを実施した。さらに、構造が確定しない状況でも、広く普及し

ている GC-EI-MS を用いて原因物質を分析するための検討を実施した。

B. 研究方法

1. 選択的誘導体化反応による生ぐさ臭原因物質の構造推定

図 1 に示した 12 種類の構造異性体 (48 立体異性体) のうち、シクロヘキセノンの 5 位および 6 位に置換している官能基の構造を推定する目的で、選択的誘導体化を実施した。2018 年 4 月 13 日に生ぐさ臭が発生した際に採取・濃縮したサンプル 300 μL にモレキュラーシーブ (3A) を添加した後、無水ピリジン 50 μL を混合して室温下で 1 時間放置した。その後、試料に TMS-imidazole (東京化成, >98.0%) 600 μL を添加し、室温下で 1 時間放置した。最後に、孔径 0.22 μm の疎水性 PTFE メンブレンフィルター (島津ジーエルシー, 東京) により濾過し、その濾液を GC-FI-HRMS (7890B-JMS-T200GC AccuTOF GCx-plus, Agilent Technologies, CA, JEOL, 東京) での分析に供した。

2. 量子化学計算による生ぐさ臭原因物質の構造推定

図 1 に示した検討対象の構造のうち、メトキシ基 (CH_3O) が 5 位に置換した構造を対象に量子化学計算を実施して、FX の構造を推定した。計算は、計算プログラム GRRM17 用いて非調和下方歪追跡-超球面探索法 (ADDF-SHS) 法^{3,4)}を用いて 5,400 時間、すなわち 225 日間実施した。計算レベルは PM6-D3 とした。エネルギー、勾配、二次微分行列は、Gaussian16 を用いて算出した。

3. 生ぐさ臭原因物質の分析方法の検討

TON=5 の水道原水に含まれる FX を濃縮倍率 1,000 倍の条件で検出することを目標として、試料大容量注入型 GC-MS を用いて分析するための試料注入条件を検討した。GC-MS は、7890B-JMS-T200GC AccuTOF GCx-plus を用い、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、30 $^\circ\text{C}$ (1.5 min) \rightarrow 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 200 $^\circ\text{C}$ (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。注入溶媒はジクロロメタン、注入液量は 50 μL とした。

C. 結果および D. 考察

1. 選択的誘導体化反応による生ぐさ臭原因物質の構造推定

本研究で用いた TMS-imidazole は、様々なシリル化剤と比較してヒドロキシ基との反応性が高く、アミン類とは反応しない⁵⁾ことが知られる。このため、FX のシクロヘキセノンの 5 位または 6 位に置換している CH_3O がメトキシ基ではなく、ヒドロキシ基と他の官能基の組み合わせなど ($-\text{OH}$ と $-\text{CH}_3$ の組み合わせ、または $-\text{H}$ と $-\text{CH}_2\text{OH}$ の組み合わせ) であれば、図 2 のように

m/z 296.180 の誘導体化物が生成すると考え、水道原水の濃縮試料を TMS-imidazole で誘導体化して GC-FI-HRMS で分析した。分析で用いた FI は、代表的なソフトイオン化法であり誘導体化物の分子イオン (m/z 296.180) を検出可能と考えられる。

実験に先立ち、誘導体化処理を施していない試料を測定したところ、FX の分子イオンである m/z 224.141 のピークが複数観察され、保持係数とマススペクトルから 14.53 min のピークが FX と確認され、試料中に FX が含まれていることが確認された。

次に、誘導体化処理を施した試料を測定した。その結果、図 3 上段に示すトータルイオンクロマトグラムのように、19.03, 22.39, 23.97 min など複数のピークで $\text{C}_{16}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$, $\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_3\text{Si}$, $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4\text{Si}$ のような O-Si を有する TMS 誘導体化物が検出された。これらは誘導体化処理を施していない試料からは検出されなかったことから、試料に含まれるヒドロキシ化合物が TMS 化されて検出されたと考えられる。

このように、誘導体化反応が起きていることを確認できたので、FX の誘導体化物の分子イオン (m/z 296.180) を探索したところ、図 3 下段に示す抽出イオンクロマトグラムのように検出されなかった。このため、FX の CH_3O はヒドロキシ基を含まず、メトキシ基と考えられる。メトキシ基を仮定すると、FX の候補構造は図 4 に示す 4 種類の構造異性体 (12 立体異性体) となる。

2. 量子化学計算による生ぐさ臭原因物質の構造推定

図 4 に示した構造のうち、メトキシ基が 5 位に置換した 6 種類の立体異性体を対象に量子化学計算を実施した。6 種類のうち、1 種類については計算することができなかった。残りの 5 種類を対象に計算した結果、21,348 個の安定構造 (EQ), 38,031 個の遷移状態構造 (TS), 2,094 個の TS を経ない開裂構造 (UpDC), 6,521 個の TS を経る開裂構造 (DownDC), 合計 67,994 個の構造が発見された。これらの構造のうち、UpDC と DownDC に着目して開裂反応の種類を検討した結果、同一 m/z のプロダクトイオンを生成する反応が数多く発見され、異なるプロダクトイオンを生成する反応は 31 種類であった。

発見された開裂反応のうち、FX のシクロヘキセノンに置換しているヘキシル-2-オンの置換位置の判別に有効な開環反応を検討したところ、ヘキシル-2-オン 3 位置換体と 4 位置換体の両方から図 5 に例を示すような 27 種類の開環反応が発見された。シクロヘキセノン環の開環位置を検討したところ、シクロヘキセン環のすべての環結合での開環反応が進行していた。そこで、ヘキシル-2-オン 3 位置換体と 4 位置換体の両方で、シクロヘキセン環の 3 位の炭素原子と 4 位の炭素原子の間の結合が開裂した開環構造に着目した。着目した開環構造から逐次的に進行する開裂反応を予測した結果、図 6 に例を示す開環反応が予想された。予測された開環反応で生成するプロダクトイオンの抽出イオンクロマト

グラム (EIC) を、生ぐさ臭を呈したサンプルの測定結果に対して描いた。その結果、図 7 に例を示すように、FX の基準ピークである 33.47 分にピークが観察されたのは、ヘキシル-2-オン 3 位置換体から生成すると予想された m/z 124.0883 であり、ヘキシル-2-オン 4 位置換体から生成すると予想された m/z 111.0441 は観察されなかった。今後、量子化学計算を進めて、ヘキシル-2-オン 3 位置換体から m/z 124.0883 となる開裂反応が発見されることを確認する必要があるが、ヘキシル-2-オン 4 位置換体から m/z 124.0883 の生成は考えにくいので、ヘキシル-2-オン 3 位置換体が推定される。

同様の検討をメトキシ基の置換位置についても実施したところ、メトキシ基はシクロヘキセン環の 6 位に置換していると予想された。以上を総合すると、図 8 に示す 1 種類 (2 立体異性体) まで候補構造を絞り込むことに成功した。

3. 生ぐさ臭原因物質の分析方法の検討

本年度は、検討に適した臭気強度の水道原水を入手できなかった。このため、2017~2022 年に採水した水道原水を Sep-Pak PS2 (日本ウォーターズ) を用いて 3,000~6,500 倍に濃縮し、溶媒で希釈して模擬サンプルを得て試料注入条件を検討した。試料注入条件として、注入口温度の検討、試料注入速度、ベントガス流量および時間、溶媒待ち時間を検討した。その結果、図 9 に示すように、検討に用いた 3 検体すべてで、高感度化の目標である破線より低濃縮倍率での FX 検出を確認することに成功し、高感度化を達成した。今後、検討に適した臭気強度の水道原水を入手して確認する必要がある。

E. 結論

選択的誘導体化反応と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 1 種類 (2 立体異性体) まで絞り込むことに成功した。立体配置が異なると臭気の有無が異なる可能性があるため、本来は立体異性体を区別する必要がある。しかし、日常業務において立体異性体を区別して分析するのは困難と考えられ、両者の総濃度として管理する可能性を検討する必要がある。

また、本研究で推定した物質は、多変量解析で TON および原因生物濃度と相関する物質を抽出した結果、得られた物質である。その物質の構造も、質量分析、選択的誘導体化反応と量子化学計算を用いて推定した構造である。今後は、推定された物質を入手し、生ぐさ臭と関係するか否か、管理指標として適切か否かを検証する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Ikuro Kasuga,

Michihiro Akiba (2022) The Status Quo of Causal Substance Exploration for Fishy Odor in Raw Water for Taps. *J. Water and Environment Technology*, 20(2), 29-44.

2. 学会発表

高岩 凜太郎, 山下 優輝, 新福 優太, 中島 常憲, 高梨 啓和, 秋葉 道宏, 試料大容量注入型 GC/MS による水道水生ぐさ臭の未知原因物質の相対定量法の開発, 第 57 回日本水環境学会年会, 2023 年 3 月 15 日-17 日, 松山.

山下優輝, 新福優太, 山田奈瑠実, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, フラグメンテーション反応の全経路探索による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 第 57 回日本水環境学会年会, 2023 年 3 月 15 日-17 日, 松山.

山下優輝, 新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 超球面探索/非調和下方歪追跡法による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 第 70 回質量分析総合討論会, 2022 年 6 月 22 日-24 日, 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 謝辞

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

4) 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.
 5) Horning, M. G., Moss, A. M., Horning, E. C. (1967) A new method for the separation of the catecholamines by gas-liquid chromatography. *Biochem. Biophys. Acta*, **148**, 597.

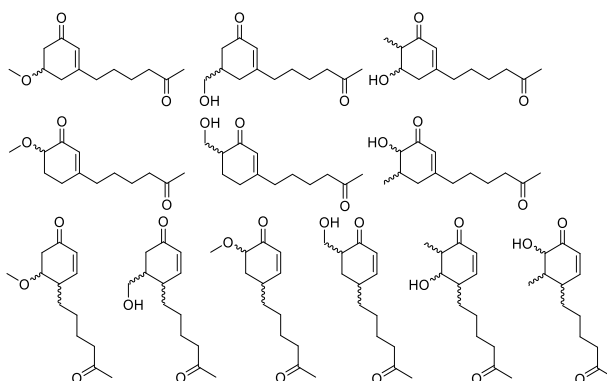


図 1 検討対象の構造

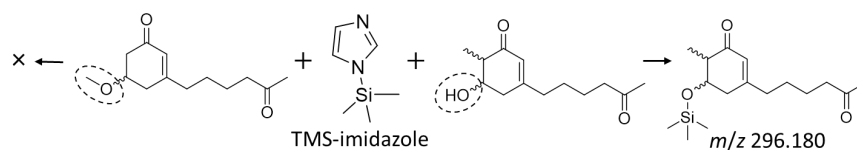


図 2 TMS-imidazole によるヒドロキシ基の選択的誘導体化と想定される誘導体化物の m/z 値

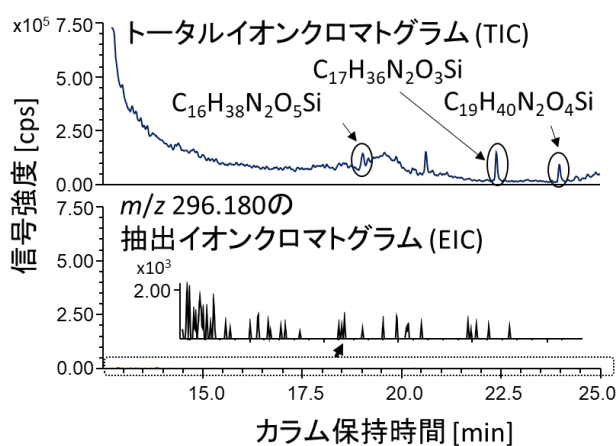


図 3 選択的誘導体化による CH_3O の構造推定

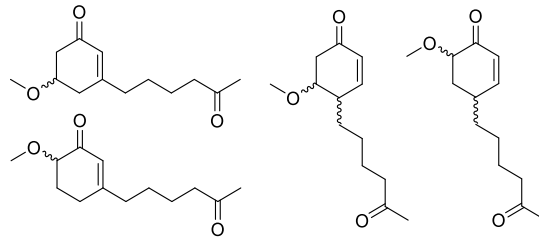


図4 選択的誘導体化で否定されなかった構造

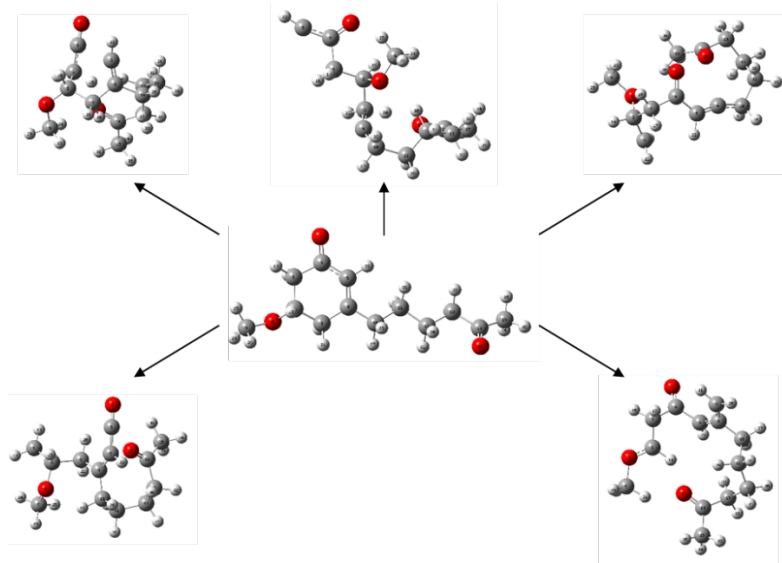


図5 ヘキシル-2-オン 3 位置換体から発見された開裂構造の例

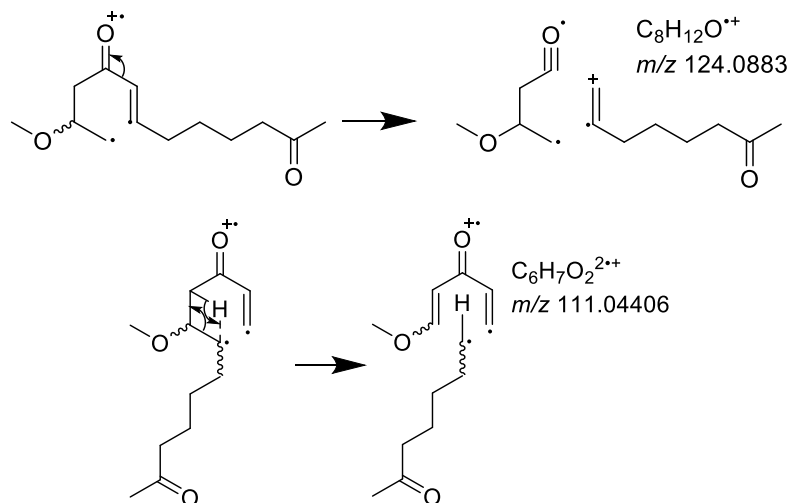


図6 ヘキシル-2-オン 3 位置換体の開環構造からの逐次開裂反応の例

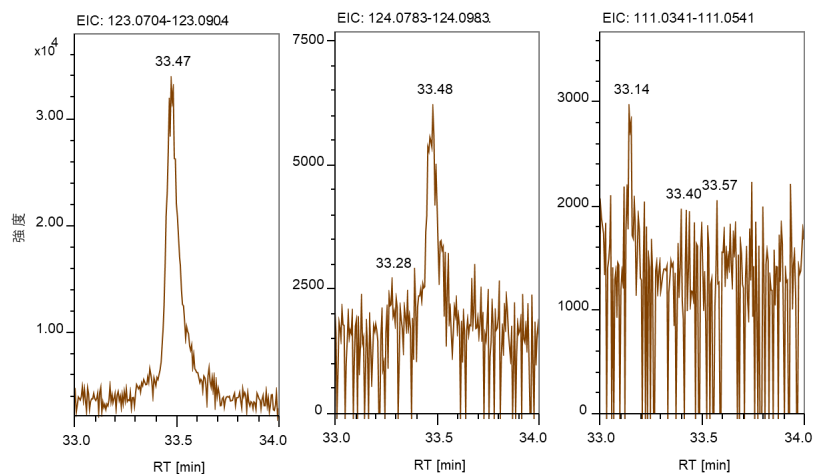


図7 ヘキシル-2-オンのシクロヘキセン環置換位置の検討例

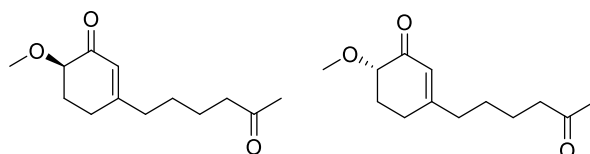


図8 選択的誘導体化反応と量子化学計算による生ぐさ臭原因物質の構造推定結果

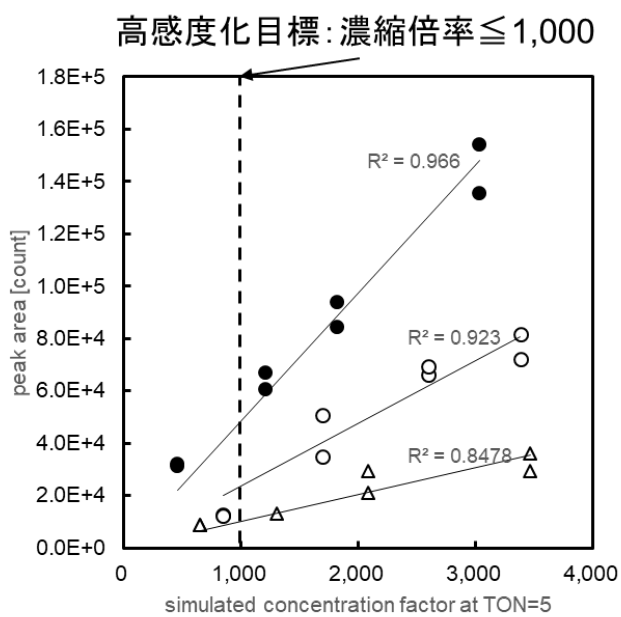


図9 試料大容量注入型 GC/MS による水道水生ぐさ臭の未知原因物質の相対定量

精密質量分析による藻類由来有機物の検知に関する検討

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： 精密質量分析による藻類由来有機物の検知に関する検討

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 特任研究官

研究分担者 越後 信哉 京都大学大学院 地球環境学 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。培養した *Microcystis aeruginosa* Lemmermann (NIES-87 および NIES-2604 株) に由来する有機物の検知を精密質量スペクトルの差異解析により試みた。その結果，固相抽出による試料濃縮を用いれば，環境水中でも藻類増殖に由来する有機物を分別可能であることを示した。今回の調査では，藻類が異常増殖した際の藻類細胞密度に対応する範囲での検知であったが，ろ過濃縮等を組み合わせれば，より低濃度でも検知可能であると考えられた。

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。

今年度は，藻類増殖時の溶存有機物の変化の精密質量分析を用いた検知を目的に，培養した藻類に由来する溶存有機物の検知感度についての基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1. 藻類の培養

国立環境研究所より分譲された二種類の藻類 (*Microcystis aeruginosa* Lemmermann (NIES-87) 及び *Microcystis aeruginosa* Lemmermann (NIES-2604)，以下それぞれ NIES-87, NIES-2604 とする) を M-11 培地を用いて培養した。M-11 培地の構成成分と濃度は以下の通りである：NaNO₃, 10 mg/100 mL；K₂HPO₄, 1 mg/100 mL；MgSO₄・7H₂O, 7.5 mg/100 mL；CaCl₂・2H₂O, 4 mg/100 mL；Na₂CO₃, 3 mg/100 mL；FeSO₄・7H₂O, 0.1 mg/100 mL；有機物の添加，なし。

また，培養に際しては，2000 lux で 12 時間ごとに明暗サイクルを繰り返した。温度は 20±1 °C に制御して培養を行った。培養の後の NIES-87 と NIES-2604 の細胞数はそれぞれ 1.6×10⁸ および，1.3×10⁹ cell/mL となった。

なお，試薬は特に断りのない場合には，富士フィルム和光純薬製の特級試薬を用いた。また，水溶液の調製や希釈等に，Millipore 社 Milli-Q Academic A1 で精製した超純水(以下 MQW)を用いた。

2. 分析に用いた試料と解析法

琵琶湖南湖水を用いて NIES-87 および NIES-2604 培養液(ろ過後)それぞれを，バックグラウンドである湖水の TOC およびそれぞれの藻類由来の TOC の合計値が 3.0 mgC/L となるように希

釈を行った(数倍程度，以下ではこの希釈倍率は考慮しない)。試料の容量は 1 L とした。この後，3. で述べる固相抽出法により通水倍率 100 倍で濃縮した。これらの試料について，精密質量分析を行い，対象試料との比較を行った。また，検出下限値の検討のために，上記の TOC が 3.0 mgC/L となるように希釈を行ったサンプルを琵琶湖湖水で 10 倍，100 倍に希釈を行いそれらに関しても同様に精密質量分析を行いボルケーノプロットを用いてブランクサンプルとの比較を行った。また，これらの 3 段階の濃度の試料を以下では模擬藻類異常発生試料と表記する。培養後のマイクロシステイスのそれぞれの細胞密度は NIES-87 および NIES-2604 の細胞数はそれぞれ 1.6×10⁸ cell/mL と 1.3×10⁹ cell/mL であるので模擬藻類異常発生試料における基準となる細胞数は NIES-87 では 2.7×10⁷ cell/mL, 2.7×10⁶ cell/mL, 2.7×10⁵ cell/mL の 3 段階となり，NIES-2604 では 2.3×10⁸ cell/mL, 2.3×10⁷ cell/mL, 2.3×10⁶ cell/mL の 3 段階となる。また，実際の環境中で見られる *Microcystis aeruginosa* Lemmermann の濃度について，南條ら¹⁾は藻類の異常増殖が問題となっている鳥取県・小山湖における細胞濃度を 1986 年から 1995 年の間毎月調査した。それによると，小山湖におけるマイクロシステイスの細胞濃度はほぼ毎年 1.0×10⁵ から 1.0×10⁶ cell/mL となっている。このことから模擬藻類異常発生試料の濃度レンジは，実際の環境水中で藻類の異常増殖が発生した場合の濃度レンジと概ね同等と考えられる。またこの実験の流れを図 1 に示す。

なお，この実験においては培地成分の影響は厳密には考慮しなかった。これは，M-11 培地には有機物が含まれず，直接質量スペクトルに影響がないと考えたためである。ただし，一定濃度のイオ

ン性物質を含む培地であり、後述のように分離カラムによる無機成分の分離をおこなっていないことからイオン化効率等に間接的に影響した可能性は排除できない。この点については今後の検討課題としたい。

3. 試料の前処理

精密質量測定の前に、試料の濃縮を行った。濃縮には昨年度の研究でも用いた、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 カートリッジは溶存有機物の回収率が高いことが報告されており²⁾、極性物質と非極性物質の両方の保持を期待できるとされる³⁾。具体的な固相抽出の作業手順は以下の通りである。まず 10 mL のメタノールを約 1 mL/min で通液し、その後 0.01 M HCl 20 mL を約 1 mL/min で通液し固相のコンディショニングを行った。次に 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試料 1.0 L を流量 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 0.01 M HCl を約 1 mL/min で通液し、カートリッジに保持された溶存有機物を脱離するために、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、サンプル中の溶存有機物が濃縮した状態で回収される。この試料そのまま以降の分析に供した。

4. 精密質量分析とデータ解析

調製した藻類異常増殖試料の精密質量分析には Orbitrap 質量分析計 (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific) を使用した。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のネガティブモードを用いて行った。原則として昨年度までの研究成果を踏まえ、同一の条件で分析を行った。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、システム内に MQW とメタノールがそれぞれ 50% となるように 200 μ L/min にて送液している状態で 10 μ L 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測定日ごとに行った。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 $^{\circ}$ C と設定した。分析条件を表 1 にまとめる。

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。解析ソフトウェアには 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。

なお、具体的な解析および結果の可視化には、ボルケーノプロットを用いた。ボルケーノプロット

とは群間 (試料とブランク) 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判断した。

C. および D. 研究結果及び考察

NIES-87 と NIES-2604 の試料について、図 2~7 に示すように、希釈段階を問わず藻類を添加したサンプルから多くの物質が検出された。特に 1 倍 (つまり無希釈) である模擬藻類異常発生試料の分析結果においては、藻類を添付した模擬藻類異常発生試料特有の検出物質が群間比 2 倍以上を検出のしきい値とした場合、NIES-87 においては 165 物質、NIES-2604 においては 110 物質検出されており、十分に検出可能であるといえる (表 2)。また、100 倍で希釈を行った模擬藻類異常発生試料の分析結果としては、群間比が 2 倍以上を基準とした場合で NIES-87 においては 72 物質、NIES-2604 においては 35 物質検出されておりこちらも藻類由来溶存有機物を十分に捉えることが可能であったといえる。また、この 100 倍で希釈を行った模擬藻類異常発生試料は先に述べたように環境水中において藻類の異常増殖が発生した場合と同程度の細胞密度を有していることから、実際の環境水中でも同様の分析手法を用いて溶存有機物の動向を検知できる可能性を示したといえる。

一方で、この 100 倍に希釈を行った模擬藻類異常発生試料で検出された物質群の群間比の範囲は昨年度までに報告した通常的环境水の季節変動において検出された物質群の群間比の範囲と類似しており、環境水の状態によっては検出された物質が藻類由来であるのか、季節変動由来であるのかの判断が難しい可能性がある。本実験においては培養した藻類の細胞数に限度があったことがあり、高濃度の濃縮を行うことが難しかったが、実際の環境水においてはさらに高濃度の濃縮が可能である。また、さらにろ過濃縮との併用や、細胞の破碎など、試料前処理工程において、バックグラウンドに対して藻類細胞由来の有機物の濃度を高くすることは可能と考えられる。また、今回はピーク強度 500,000 をしきい値としたが、この値の最適化も高感度化に効果があると考えられる。さらに、分離カラムおよびイオン化促進剤の添加も検討されるべきである。今後はこれらの検討結果を踏まえた上で、各藻類に特徴的な質量数 (分子の指紋のようなもの) が存在するか検討を進める必要がある。

E. 結論

精密質量スペクトルの差異解析に基づき、藻類の異常増殖の検知の可能性について検討した。その結果、試料濃縮を用いれば、環境水中でも藻類増殖に由来する有機物を分別可能であることを示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

- 1.論文発表
該当なし
- 2.学会発表
該当なし

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む。）

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

I. 参考文献

- 1) 南條吉之, 福田明彦, 矢木修身, 細井由彦. (1998) 汽水湖沼におけるアオコおよび赤潮発生の制御に関する基礎的研究, 水環境学会誌, 21(8), 530-535.
- 2) 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.
- 3) 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 精密質量分析条件

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	3×10 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 各株および細胞密度における検出物質数

株	細胞密度	Log2 Fold Change			
		< -1	> 1	< -2.3	> 2.3
NIES-87	2.7×10 ⁷	32	165	14	66
	2.7×10 ⁶	5	100	1	51
	2.7×10 ⁵	5	72	3	29
NIES-2604	2.3×10 ⁸	20	110	6	79
	2.3×10 ⁷	21	94	12	63
	2.3×10 ⁶	5	35	3	17

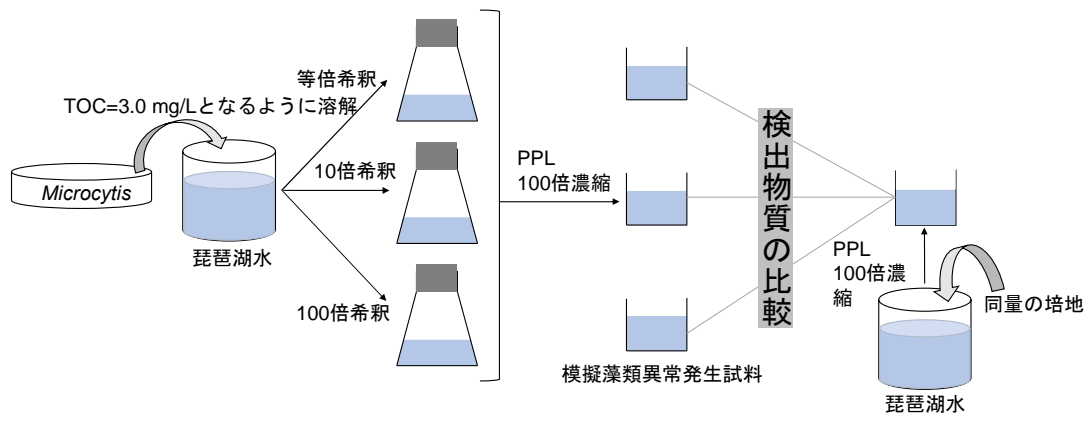


図1 精密質量分析条件

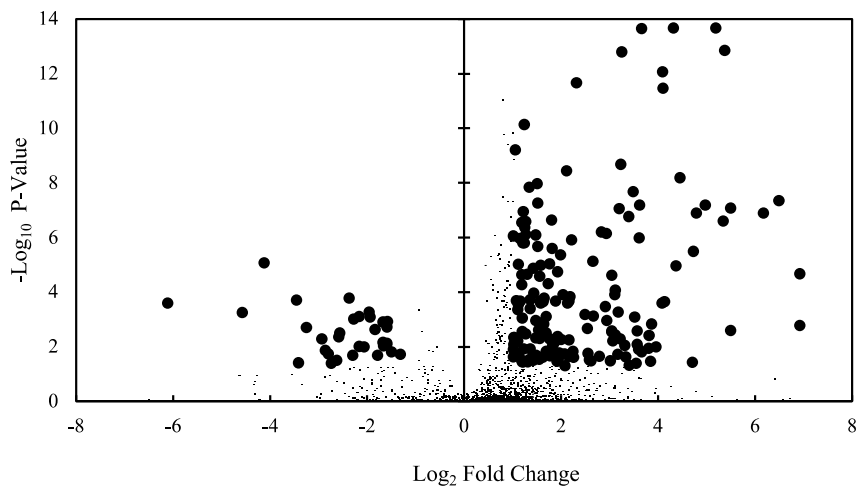


図2 *Microcystis aeruginosa* Lemmermann NIES-87 を 2.7×10^7 cell/mL 由来の有機物を添加した琵琶湖湖水とブランクサンプルでの検出物質の比較

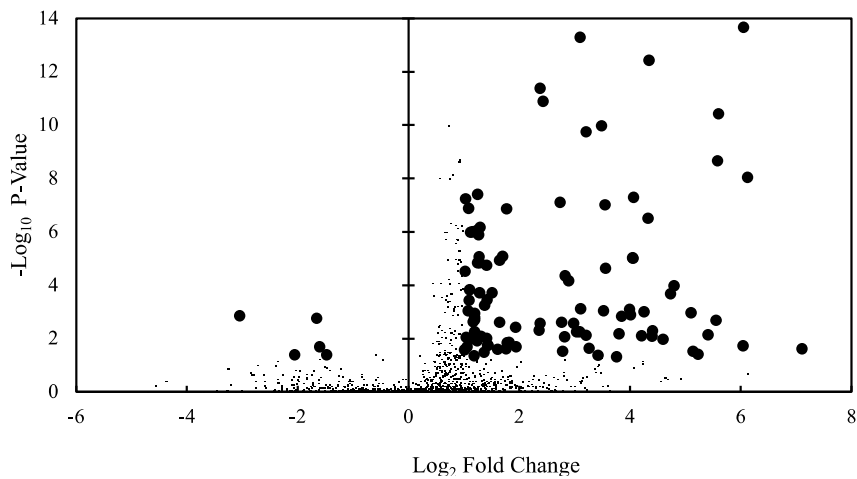


図3 *Microcystis aeruginosa* Lemmermann NIES-87 を 2.7×10^6 cell/mL 由来の有機物を添加した琵琶湖湖水とブランクサンプルでの検出物質の比較

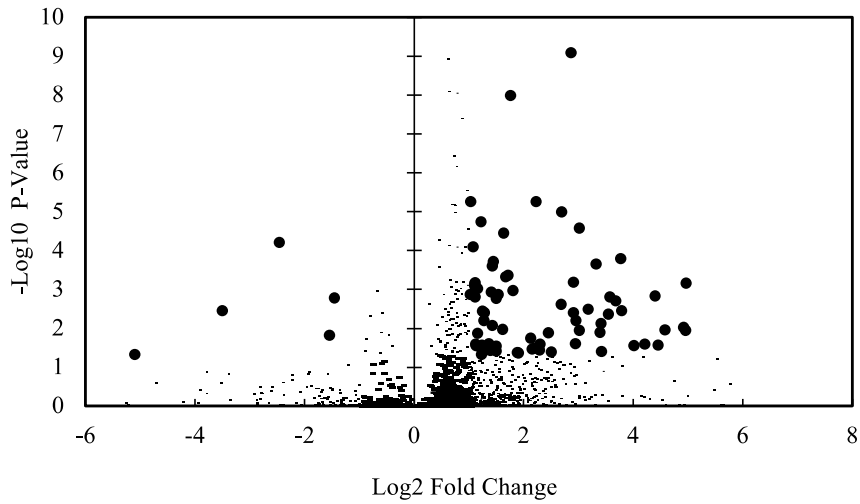


図4 *Microcystis aeruginosa* Lemmermann NIES-87 を 2.7×10^5 cell/mL 由来の有機物を添加した琵琶湖湖水とブランクサンプルでの検出物質の比較

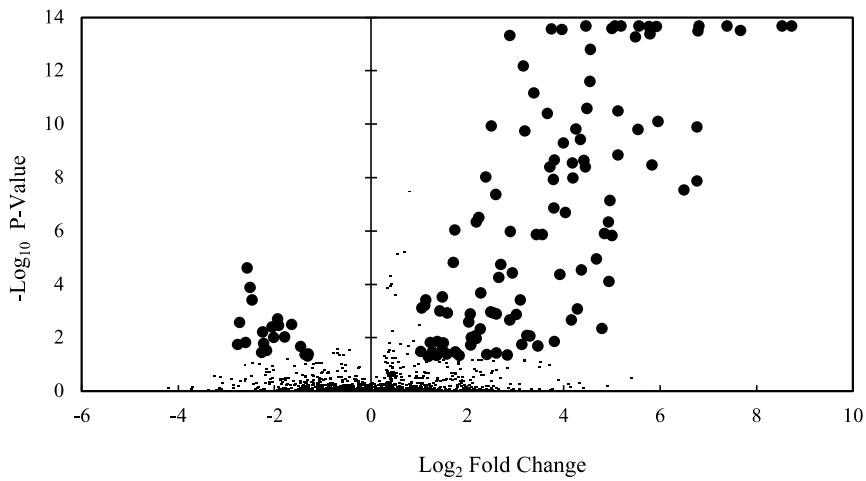


図5 *Microcystis aeruginosa* Lemmermann NIES-2604 を 2.3×10^8 cell/mL 由来の有機物を添加した琵琶湖湖水とブランクサンプルでの検出物質の比較

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。また、植物プランクトンや放線菌の増殖によるカビ臭物質濃度の増加が懸念される。前年度の研究により河川水位が水道原水の濁度と高い相関があることが判明したが、河川により長期的変動の様相は区々であった。今回、河川水位の観測値が低減傾向にある筑後川について、河床の変化等による影響を受けにくいと考えられる河川流量を解析したところ、長期的に増加傾向にあることが判明した。さらに、筑後川中下流部を水源とする水道の原水におけるジェオスミン、2-MIB について一定濃度以上が検出された週数の経年変化を整理したところ、2-MIB の検出頻度が増加していることがわかった。河川水位、河床高の変化の影響をみたところ、河川水位が高いときは、ジェオスミン、2-MIB 濃度の上昇はみられなかった。気候変動の適応策として河川水位の監視の重要性を示唆する結果となった。

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。また、植物プランクトンや放線菌の増殖によるカビ臭物質濃度の増加の懸念がある。

前年度、水道の原水濁度と水源の水位に比較的高い相関があり、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。このため、今回、降雨強度と相関が高く、また、河床の状況の影響を受けにくいと考えられる河川流量について長期的変化を解析するとともに、河川水位との関係をみた。

カビ臭物質の発生原因としては、ダム貯水池等の水温上昇、栄養塩濃度の増加等が考えられる。平成 15 年の水道水の水質基準の改正により、水道水のカビ臭原因物質であるジェオスミン、2-MIB が項目として追加され、それ以降、水道事業体において、水道水や水道原水におけるカビ臭原因物質の測定データが蓄積されてきている。このため、水道原水のジェオスミンおよび2-MIB の測定データを解析し、河川水位との関係を考察した。また、豪雨による土砂流入により河床が上昇しカビ臭物質が産生しやすい条件をつくった可能性が考

えられたため、河床上昇とカビ臭物質濃度の上昇の関係を解析した。

B. 研究方法

河川流量は河川水位から水位流量曲線式を用いて求められ、水文水質データベースで公表されている¹⁾。気候変動の影響をみることで考えられる長期間のデータが存在する九州地方の3河川(筑後川、遠賀川、大淀川)について河川水位および河川流量の変化について解析するとともに²⁾³⁾⁴⁾、年別に流量が零の時の河川水位を算出し、河床高とみなして年次推移をみた。

水道事業体における水道原水中のカビ臭物質濃度は、濃度が高くなると頻度を増やして測定が行われる。経年変化を的確にみるため、水道事業体から提供のあったカビ臭物質の濃度データについて、週内の検出最高値が一定濃度以上になった年間週数を集計した。また、河川の状況によりカビ臭物質濃度が変化するかどうかをみるため、河川水位との関係を解析した。さらに、河川水位と河川流量の関係から導いた河床高のデータを利用し、河床の上昇の程度との関係を解析した。

C. 研究結果およびD. 考察

筑後川片ノ瀬観測所の河川水位(日水位)および河川流量(日流量)の経年変化を図1および図2に示す。河川水位は1960年から2000年にかけて低減傾向にあるのに対して、河川流量は長期的に増加傾向にあることがみてとれる。

同地点の河川流量と河川水位の関係は、1960年（図3）と2020年（図4）で大きく異なる。河川流量が零の河川水位（河床高）の経年変化を図5に示す。先行研究の結果⁵⁾と同様、河床高が年々低下していると考えられた。遠賀川の河川流量は1982年以降のデータのみ公表されており、欠測年も多かった。大淀川（柏田観測所）の河川水位と河川流量の関係は、筑後川（片ノ瀬観測所）ほど年による差異はなかった。河川水位は、観測の容易さ、はん濫との直接的な関係があること、水道の原水濁度の上昇の監視指標となり得ること等の長所があり、一方、流量は降雨量との関係が高いこと等から長期的変動をみるのに適しており、両者を組み合わせて適応策を検討するべきと考えられた。

筑後川中下流から取水している水道事業者よりジェオスミンおよび2-MIB濃度の測定結果のデータの提供を受けた。週内（月曜日から日曜日）の検出最高位が5ng/L以上、3ng/L以上5ng/L未満となった週の数や年度ごとに整理したのが図6および図7である。2-MIBの検出週数が近年増加している傾向がみられた。また、ジェオスミン濃度および2-MIB濃度と検出前7日間の平均河川水位の関係を示したのが図8および図9である。河川水位が高い場合は、ジェオスミン濃度および2-MIB濃度が低くなっていることがわかった。7日間の平均水位が概ね3m以上の場合に両物質の濃度とも濃度が低かった。さらに、ジェオスミン濃度および2-MIB濃度と図5に示した河床高との相関をみたが、明確な関係はみられなかった。

E. 結論

前年度、河川水位の監視は、水道の原水濁度と比較的高い相関があることが示され、水位が一定以上になると濁度が高くなることが判明した。また、河川水位の観測値が低減傾向にある筑後川について、河川流量を解析したところ、長期的に増加傾向にあることが判明した。さらに、筑後川中下流部を水源とする水道の原水におけるジェオスミン、2-MIB濃度について一定濃度以上が検出された週数の経年変化を整理したところ、2-MIBの検出頻度が増加していることがわかった。河川水位、河床高の変化の影響をみたところ、河川水位が高い時（7日間の平均水位が3m以上の時）は、ジェオスミン、2-MIB濃度の上昇はみられなかった。以上により、気候変動の適応策として、河川

水位の監視の重要性が示唆された。

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

王静怡，柳橋泰生，原水濁度と水位の関係および河川水位の経年変化の解析．日本水道協会水道研究発表会，2022年10月19-21日，名古屋．

王静怡，柳橋泰生，水道原水濁度と河川水位・流量の関係および経年変化の解析．第57回日本水環境学会年会，2023年3月15-17日，松山．

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．水文観測データ統計処理要領，<http://www1.river.go.jp/>．

2) 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>．

3) 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>． 4) 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>．

5) 横山勝英他，筑後川の河床変動要因と土砂動態の変遷，水工学論文集，2007，51，pp997-1002．

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。

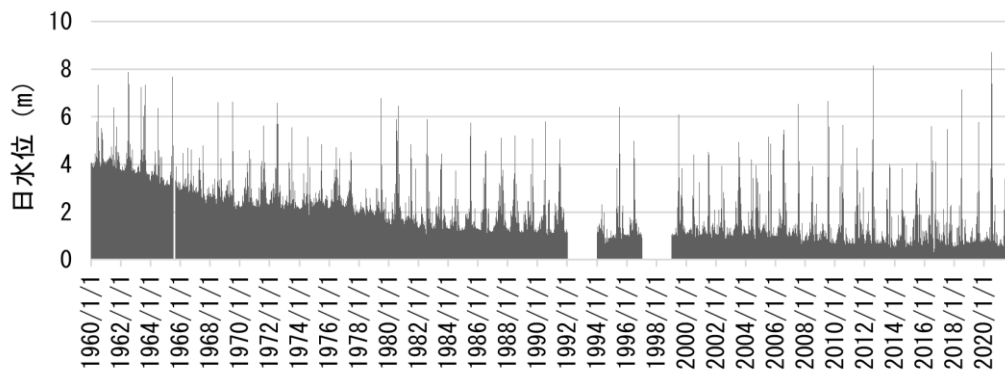


図1 筑後川（片ノ瀬観測所）の日水位の経年変化

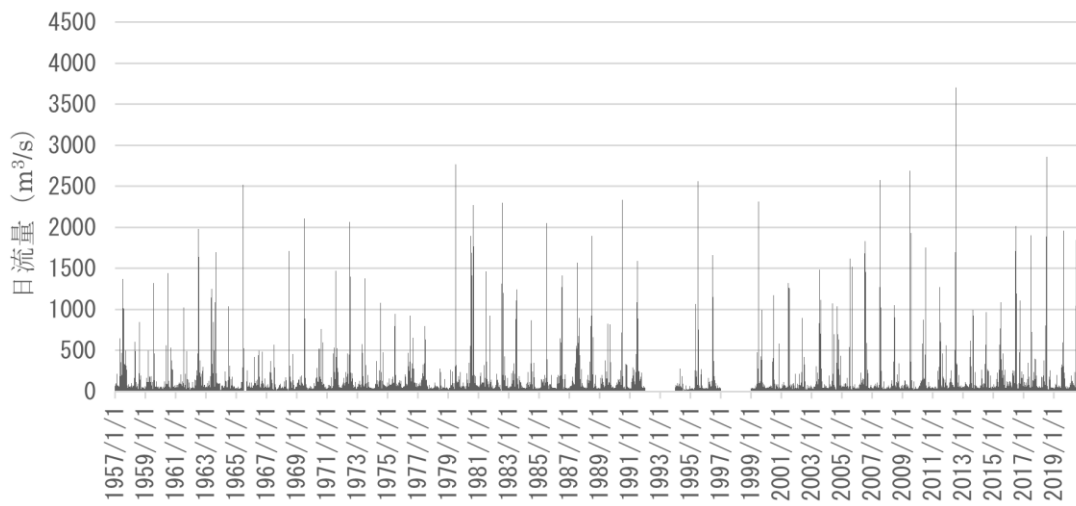


図2 筑後川（片ノ瀬観測所）の日流量の経年変化

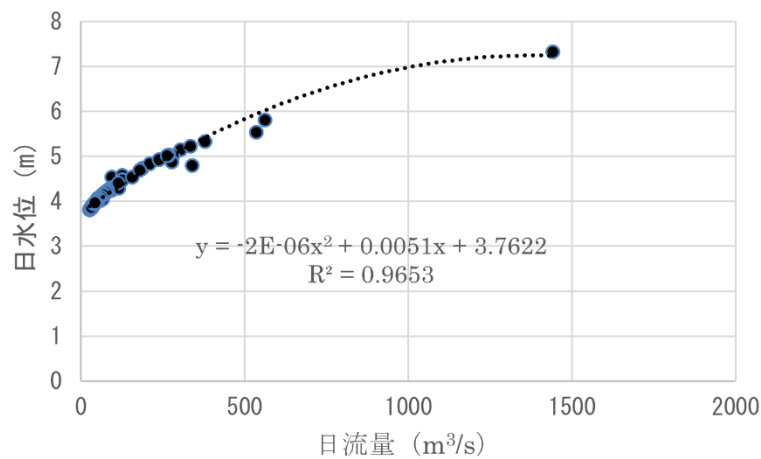


図3 筑後川（片ノ瀬観測所）の日水位と日流量の関係（1960年）

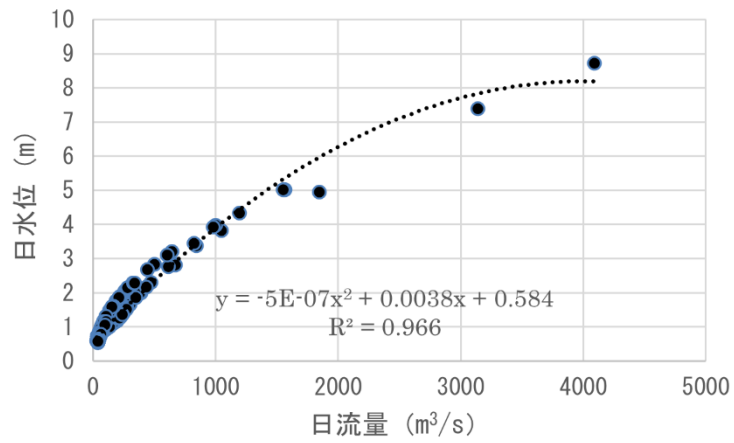


図4 筑後川（片ノ瀬観測所）の日水位と日流量の関係（2020年）

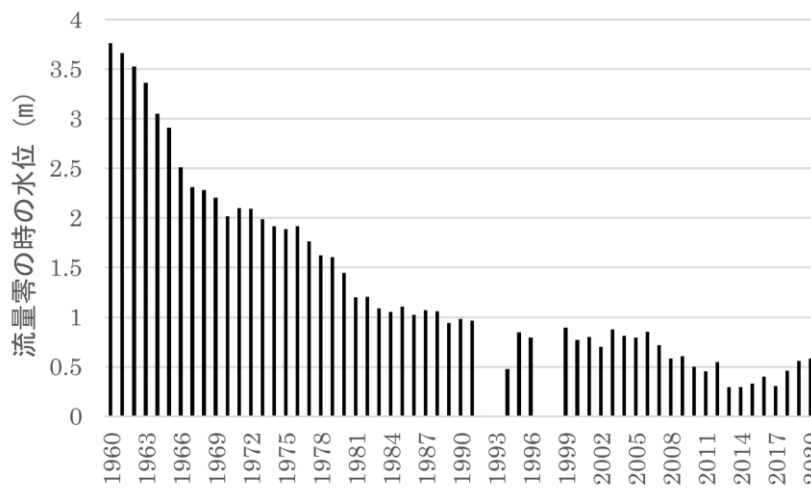


図5 筑後川（片ノ瀬観測所）における日流量零の時の日水位の経年変化

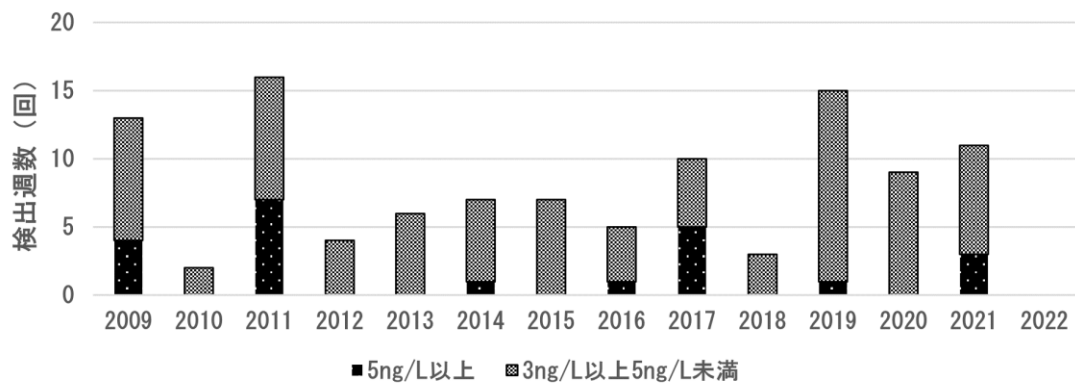


図6 F事業体の水道原水のジェオスミン検出週数の経年変化

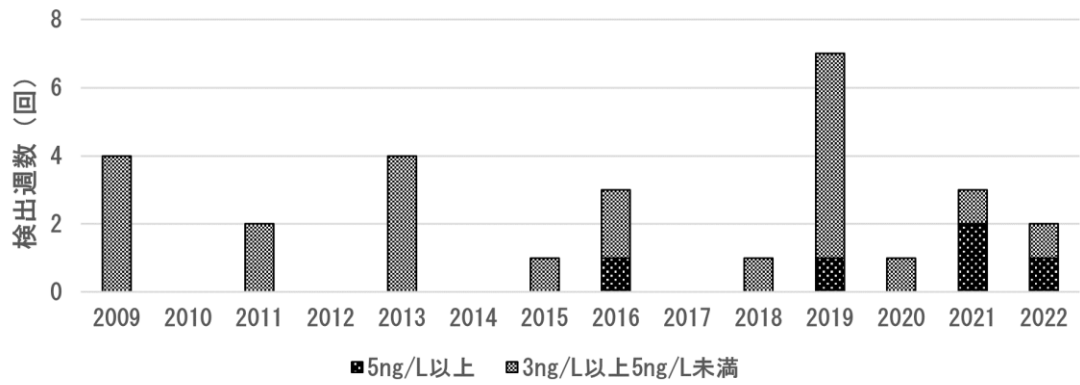


図7 F事業体の水道原水の2-MIB検出週数の経年変化

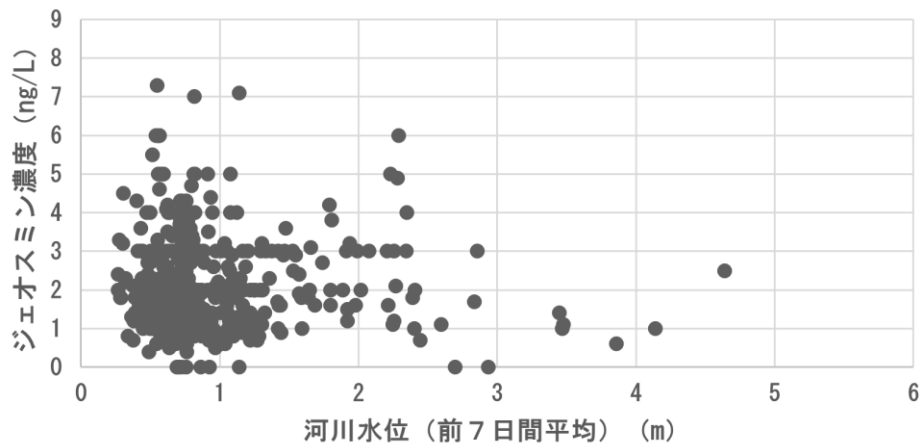


図8 筑後川（片ノ瀬観測所）の河川水位とF事業体の水道原水のジェオスミン濃度の関係

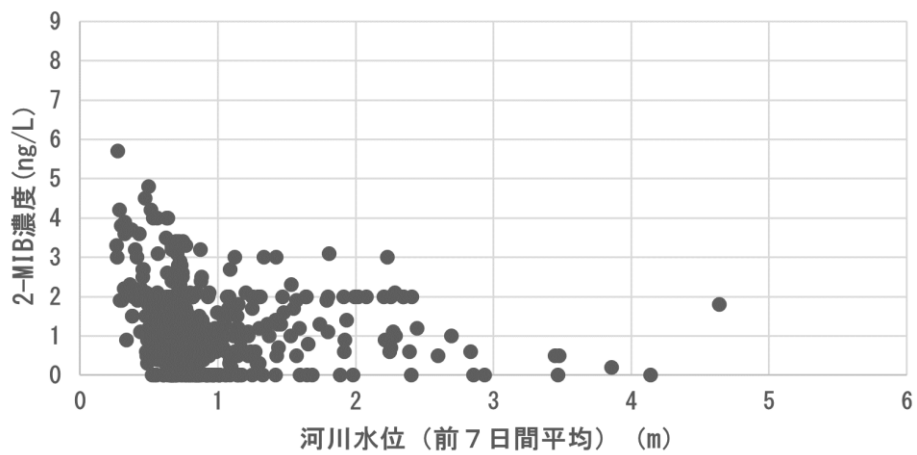


図9 筑後川（片ノ瀬観測所）の河川水位とF事業体の水道原水の2-MIB濃度の関係

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 上席主任研究官

研究要旨

全国の水道事業を対象に、水安全計画の運用、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を行い、206 水道事業から 208 浄水場の結果を得た。水安全計画の責任者は、水道事業・技術管理者、課長以上の職種が多かった。また、71%は定期的あるいは非定期に水安全計画のレビューを行っており、定期的に行っているうちの約 70%が年 1 回以上レビューしていた。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 による気候にレジリエントな水安全計画の策定に関する手引き「Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change」を翻訳し、「気候に対してレジリエントな水安全計画：気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理」を出版した。9 月に、水安全計画の運用についてのオンラインセミナーを開催した。

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⁾、アンケート調査により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、WHO の気候にレジリエントな水安全計画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. 水安全計画の運用、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

昨年度、準備したアンケート調査の内容を精査し、2022 年 8～10 月、水安全計画を策定済みの全国の 355 水道事業を対象に、①水安全計画の運用、および②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行った。206 の水道事業から 208 浄水場について回答が得られた(原水の種類:表流水 174、地下水・受水 34)。

2. WHO/IWA の手引きの翻訳

気候にレジリエントな水安全計画の策定の手引きの一つとして、2017 年、WHO/International Water Association (IWA) は「Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change」を公表した²⁾。同ガイドを翻訳し、出版することとした。

3. 水安全計画の運用に関するセミナーの開催
オンラインで、「水安全計画を活用した水質管理システムの運用」を企画し、9 月に開催した。

C. 研究結果および D. 考察

1. 水安全計画の運用、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、アンケート調査結果のうち、水安全計画の運用に関する内容を整理、解析した。

水安全計画の責任者は、206 回答のうち、水道事業・技術管理者が最も多く 31.6%であった。ただし、水道技術管理者と回答した中には、課長等の職種と併記しているものもあったため、実際の割合はより高い可能性がある。また、課長以上であったのは、67.5%であった。

水安全計画チームの人数は、208 回答のうち、5～9 人が最も多く 45.7%、続いて多かったのは 10～19 人で 27.4%あった。

水安全計画チームの構成として、施設管理の担当者、設備関係の担当者、水質関係の担当者、運転管理の責任者（委託先含む）を挙げている回答が多かった。それ以外には、総務担当、計画担当、配水・管路担当、給水・給水装置担当、広報担当、財務担当、運転管理担当、危機管理担当等挙げられた。

水安全計画の策定を自ら行っていた浄水場は164、委託で策定した浄水場は44であった。策定にあたり、厚生労働省の水安全計画策定ガイドライン、水安全計画作成支援ツール簡易版、他の水道事業体の水安全計画を参考にしているところが多かった。

水安全計画のレビューの状況は、71%が定期的（時期を設定している場合、設定していない場合あり）あるいは非定期的にレビューを行っていた。定期的にレビューを行っている浄水場のうち約70%が年1回以上レビューしていた。

レビューを行っている浄水場のうち、レビューに費やす時間は、1日（8時間）以内が50.7%であった。続いて、1～3日（8～24時間）以内が28.3%であった。

来年度は、水安全計画の運用に関する結果をより詳細に解析するとともに、豪雨による高濁度発生時の対応に関する結果の解析を進める。

2. WHO/IWA の手引きの翻訳



図1 気候に対してレジリエントな水安全計画：気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理（小坂ら、2023）

「Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change」を分担で翻訳を行い、「気候に対してレジリエントな水安全計画：気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理」として出版した（図1）

（小坂ら、2023）。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/>）、また、WHOの原本のサイト上でも公表された（<https://apps.who.int/iris/handle/10665/258722>）。

3. 水安全計画の運用に関するセミナーの開催
9月に、以下の構成で、水安全計画の運用についてのオンラインセミナーを開催した。

- ・水安全計画の現状と課題
厚生労働省 渡邊怜子
- ・水安全計画に関する海外での活用状況と国立保健医療科学院での取り組み
国立保健医療科学院 小坂浩司
- ・東京都水道局における水安全計画の運用
東京都水道局 金見拓
- ・水安全計画における濁度管理と見直し検証事例について
神奈川県企業庁 野澤泰
- ・大阪市水道局における水安全の取組み
大阪市水道局 谷屋秀一
- ・工場排水を原因とする異臭事故への対応と水安全計画への反映
新潟市水道局 川瀬悦郎

参加者は102名で、アンケート結果は、非常に良かったが47%、良かったが53%であった。具体的には、複数の参加者から、水安全計画の各事業体の運用の実態を知ることができ大変参考になった、とのコメントがあった。

E. 結論

- ・ 全国の水道事業を対象に、水安全計画の運用、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を行い、206水道事業から208浄水場の結果を得た。アンケート調査結果のうち、水安全計画の運用に関する内容を整理、解析した。
- ・ 水安全計画の責任者は、水道事業・技術管理者、課長以上の職種が多かった。また、71%は定期的あるいは非定期的に水安全計画のレビューを行っており、定期的に行っているうちの約70%が年1回以上レビューしていた。
- ・ WHO/IWAによる気候にレジリエントな水安全計画の策定に関する手引き「Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change」を翻訳し、「気候に対してレジリエントな水安全計画：気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理」を出版した。
- ・ 水安全計画の運用についてのオンラインセミナーを開催した。

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, 下ヶ橋雅樹 (訳).
気候に対してレジリエントな水安全計画：気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理
(Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change). 国立保健医療科学院, 2023.

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, IWA. Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change. WHO, 2017.

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)、下ヶ橋雅樹先生 (叡啓大学) 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, 下ヶ橋雅樹 (訳)	気候に対してレジリエントな水安全計画：気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理 (Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change)	小坂浩司	気候に対してレジリエントな水安全計画：気候の変動と変化にともなう健康リスクの管理 (Climate-resilient Water Safety Plans: Managing Health Risks Associated with Climate Variability and Change)	国立保健医療科学院	埼玉	2023	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
Asada Y, Hayasaka S, Miyoshi T, Tokuyasu M, Akiba M.	Effects of raw water quality on adsorptive removal of 2-methylisoborneol by powdered activated carbon under non-equilibrium conditions	AQUA - Water Infrastructure, Ecosystems and Society	accepted	-	2023
Zhang J, Shen Q, Miao H, Li Q, Shimada M, Yuan T, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Takahashi H, Fujimoto N, Ichise S, Asada Y, Nishimura O, Akiba M, Shimizu K	Development of a Quantification and Detection Method for 2-MIB-producing Cyanobacteria	Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences	23(4)	TRJFAS21811(Article number)	2023
Miao H, Zhang J, Shen Q, Ichise S, Asada Y, Tian Y, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Takahashi H, Fujimoto N, Nishimura O, Akiba M, Shimizu K	Development of Rapid PCR Methods for the Detection and Quantification of Geosmin - Producing <i>Dolichospermum</i> spp.	Water, Air, & Soil Pollution	233(9)	394(article number).	2022

Shinfuku Y, Takanashi H, Nakajima T, Kasuga I, Akiba M	The Status Quo of Causal Substance Exploration for Fishy Odor in Raw Water for Taps	J. Water and Environment Technology	20(2)	29-44	2022
神里良太, 浅田安廣, 小松一弘, 高篠鮎人, 浦上正, 茂田裕充, 秋葉道宏	粉末活性炭の短時間接触による2-メチルイソボルネオール除去に対する競合吸着有機物の特性評価	水道協会雑誌	91(12)	4-13	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4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・特任研究官
(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。

令和 5年 5月15日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 東北大学

所属研究機関長 職 名 総長

氏 名 大野 英男

次の職員の令和4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 checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (有の場合はその内容: 研究実施の際の留意点を示した)

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

令和 5年 3月 10日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 福岡大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 朔 啓二郎

次の職員の令和4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4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4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。

令和4年8月8日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 叡啓大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 有信睦弘

次の職員の令和4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) 叡啓大学ソーシャルシステムデザイン学部・教授
(氏名・フリガナ) 下ヶ橋雅樹・サゲハシマサキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
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

所属研究機関長 職名 大学院地球環境学堂長

氏名 勝見 武

次の職員の令和4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4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 東洋大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 矢口 悦子

次の職員の令和4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) 生命科学部・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4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) 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。