

障害生物発生時における分析方法の開発

研究代表者	秋葉 道宏
研究分担者	高梨 啓和
研究協力者	藤原俊一郎
研究協力者	北村 壽朗

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
分担研究報告書

研究課題：障害生物発生時における分析方法の開発

研究代表者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院	生活環境研究部	主任研究官
研究分担者	高梨 啓和	鹿児島大学大学院	理工学研究科	准教授
研究協力者	藤原俊一郎	京都市上下水道局	水質管理センター	担当係長
研究協力者	北村 壽朗	神奈川県企業庁	水道水質センター	所長

研究要旨

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

A. 研究目的

水道水の異臭被害の中で2番目に被害件数が多い生ぐさ臭¹⁾は、原因物質として1-ヘプタナール、(2E,4E)-ヘプタジエナール、(2E,4Z)-ヘプタジエナール、(2E,4Z)-デカジエナール、(2E,4E,7Z)-ジエナール²⁾が指摘されている。しかし、浄水場では、これらの物質から生ぐさ臭を感知することができないという意見があり、原因物質が他に存在することが示唆されている。このように、生ぐさ臭については十分な知見が集積されておらず、現在、日本の水道法において、物質の濃度ではなく臭気強度(TON)を基にした官能試験による管理に留まっている。生ぐさ臭の原因物質(以下、Fishy Smell X, FX)が明らかになれば、発生機構の詳細検討や発生予測、物性に基づいた除去技術の開発、水質検査の簡易化・高精度化・迅速化などに繋がる可能性があり、有益である。

以上のように、FXの同定は意義深いだが、環境中の微量有機物質の同定には困難を伴う。未知物質の同定には、一般的にフーリエ変換赤外分光光度計(FTIR)による官能基推定、核磁気共鳴(NMR)装置による構造解析、質量分析計(MS)による分子式推定などにより行われる。しかし、FTIRやNMRでの測定を行うためには、夾雑物を除去したサンプルが数百 μg ~数mg必要になる。揮発性物質と考えられるFXを、精製した上で数百 μg 程度得ることは相当な労力が必要で困難と予想されるため、検討の初期段階からこれらの手法を用いることは得策ではない。

これに対してMSは、極微量物質の分析に長けている。とくに、クロマトグラフとのハイブリッドであるガスクロマトグラフ-質量分析計

(GC-MS)や液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)は、分離を伴う分析を実施可能なので、夾雑物の中に含まれる極微量の物質の分析に長けている。このため、検討の初期段階から用いることができる。一方、質量分析により物質を同定するためには、標準物質との比較が必須であり、そのためには、どのような化学構造の物質なのかを事前に構造推定が必要となる。構造推定には、分析種の分子量情報を保存した状態で精密質量を測定して分子式を推定することから始める必要がある。分子量情報を保存した状態で測定するためには、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法などのソフトイオン化法でイオン化可能な質量分析計が適している。分子量情報を得た後に、電子イオン化(EI)法などのハードイオン化法でFXに過剰なエネルギーを与えてイオン化し、イオン化と同時に分解(結合開裂)させて構造情報を取得する必要がある。

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

そこで本年度は、昨年度推定した14種類の候補構造について量子化学計算に基づいた絞り込みを試みた。さらに、構造が確定しない状況でも、広く普及しているGC-MSを用いて原因物質を分析するための条件を明らかにすること

を目的とした。

B. 研究方法

1. 試料水前処理条件の検討

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

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

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

2. 生ぐさ臭原因物質の自動探索条件の検討

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

3. 濃縮・精製試料の分析

濃縮・精製した試料を、高分解能GC-MS(JMS-T200GC AccuTOF GCx-plus、JEOL)を用いてプリカーサーイオン分析した。イオン源にはEIを、分離カラムにはDB-5MS(膜厚0.25 µm、内径0.25 mm、長さ60 m、Agilent Technologies)を用いた。分離カラムの昇温プログラムは、50 °C(1.5 min)→5 °C/min→200 °C(3 min)とした。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速は1.0 mL/min(線速度33.95 mm/sec)とした。注入溶媒はアセトニトリル、注入液量は1 µLとした。得られたデータに3種類の解析ソフトウェア(msFineAnalysis、JEOL、AnalyzerPro、Spectral Works、AMDIS、NIST)を用いてピークデコンボリューション処理を実施し、夾雑物由来のイオンを除去してFXのマススペクトルを抽出した。

4. 生ぐさ臭原因物質の構造推定

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

C. 結果およびD. 考察

1. 試料水前処理条件の検討

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

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

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

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

2. 生ぐさ臭原因物質の自動探索条件の検討

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

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

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

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

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

3. 生ぐさ臭原因物質の構造推定

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

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

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表 1. 論文発表 該当なし

2. 学会発表

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

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

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

I. 謝辞

本研究を実施するにあたり, 京都市上下水道

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

J. 参考文献

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

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

3) 秋葉道宏, 高梨啓和, 小倉明生, 北村壽朗 (2019) 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける生物障害対策の強化に関する研究 令和元年度分担研究報告書

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

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

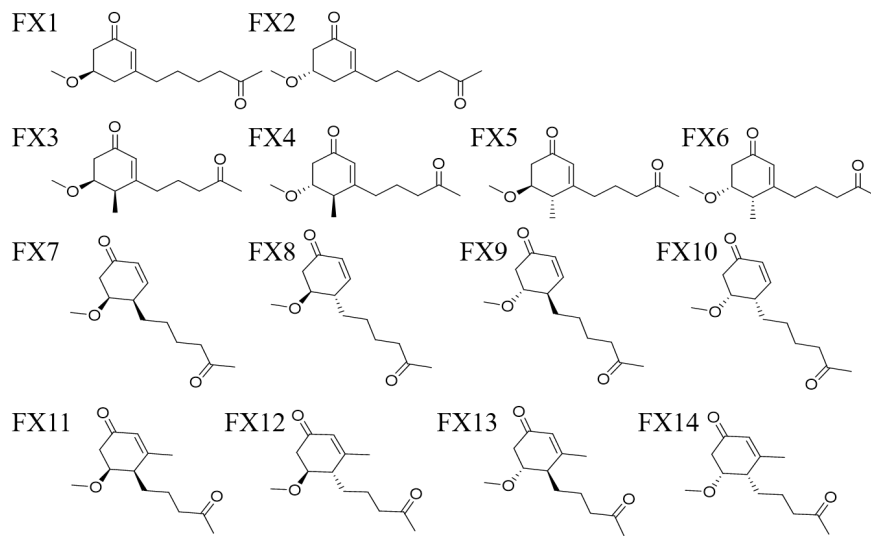


図 1 推定される FX の候補構造

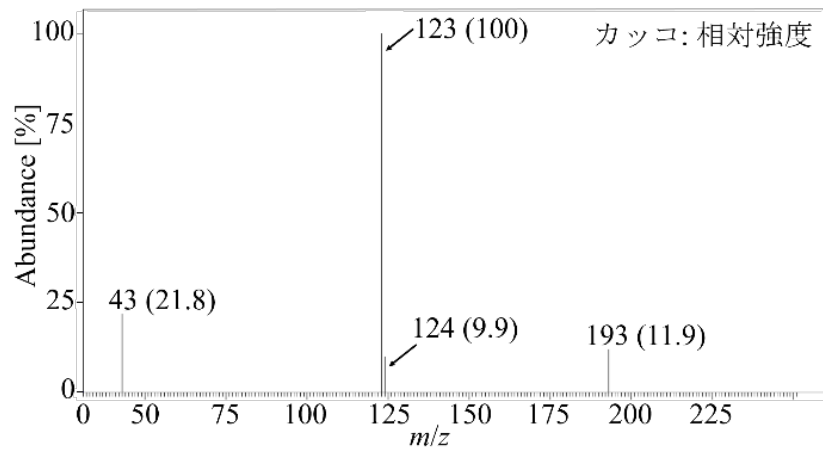


図 2 生ぐさ臭原因物質のマススペクトル

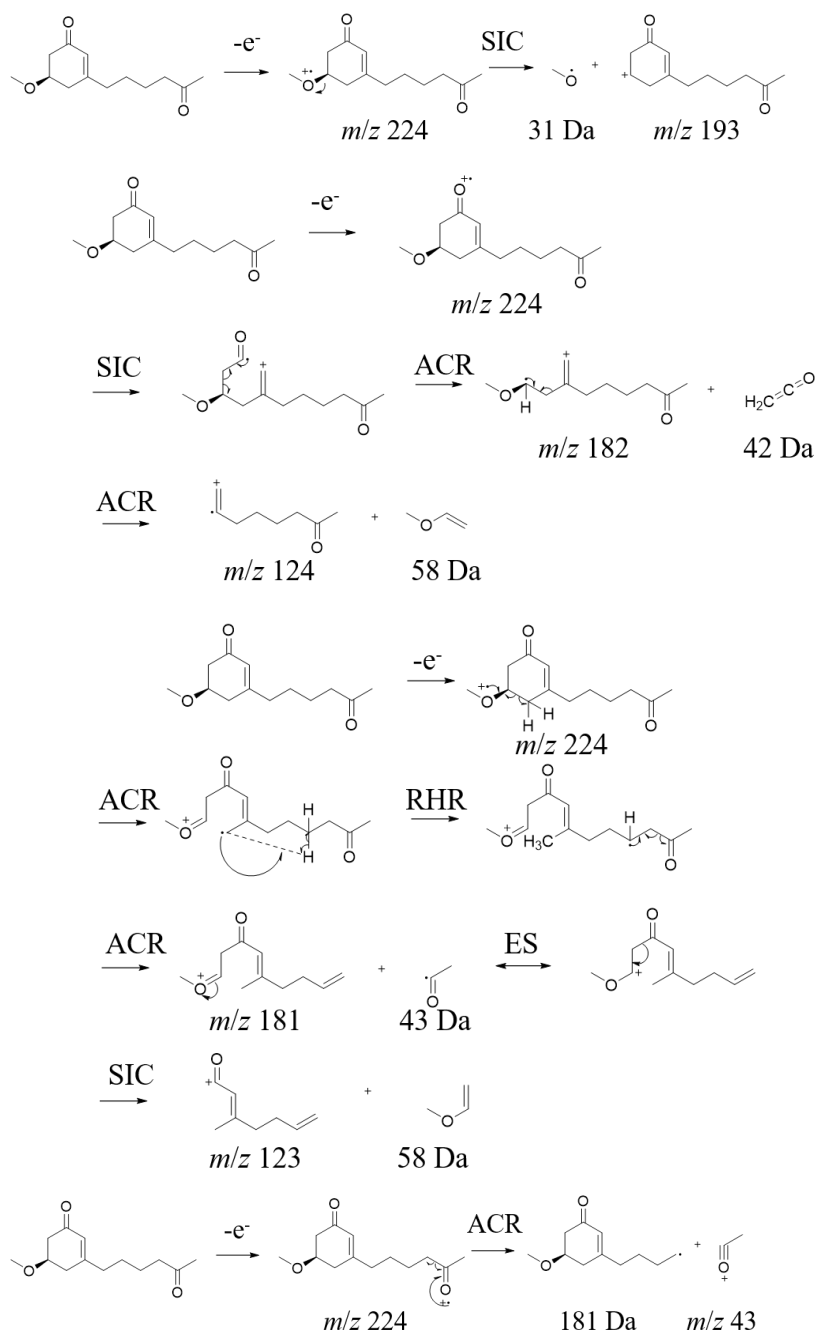


図3 生ぐさ臭原因物質の候補構造からのプロダクトイオン生成機構解析例

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

探索依頼 探索結果一覧

探索結果詳細

メタデータDL 測定データDL 判定結果データDL

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

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

原因物質を指す ↑
ダミー番号

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

ピーク面積 →

硝化阻害発生時の応急処置 二次元構造

ChemSpider Explore Chemistry

その他情報

生物毒性	PRTR対象	化審法
-	-	-

図 4 化学物質探索システムを用いた生ぐさ臭原因物質の半自動検出例

表 1 計算時間と発見された EQ/TS/DC の数

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

EQ: 安定構造, TS: 遷移状態構造, DC: 分解物の構造

表 2 発見された開裂反応経路

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

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

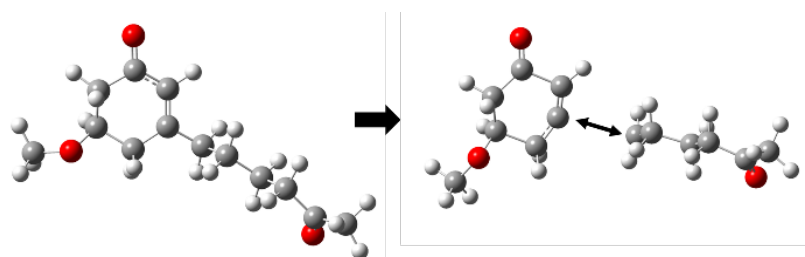


図 5 #14 の反応経路の例 (FX1)

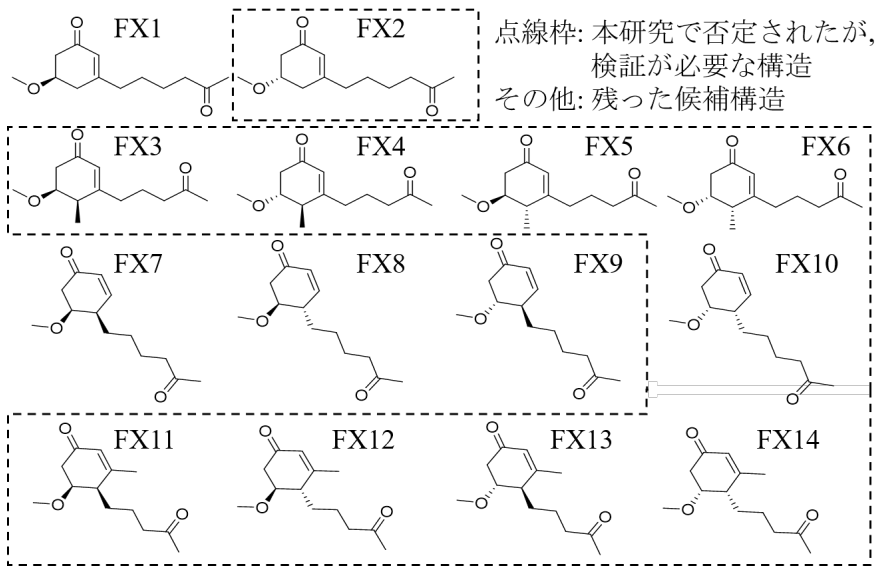


図6 暫定的な絞り込み結果

