

精密分析による水道水原水中溶存有機物の特性解析

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	越後	信哉

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

研究課題： 精密分析による水道水原水中溶存有機物の特性解析

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 主任研究官

研究分担者 越後 信哉 京都大学大学院 地球環境学堂 教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

1. 試料

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

2. バックグラウンドの季節変動の影響評価

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

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

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

3. 試料の前処理

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

た。

4. 精密質量分析

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

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

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

C. および D. 研究結果及び考察

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

DOM の精密質量スペクトルの差異解析から、地点間・季節間での比較が可能か、下水処理水の混入を想定した模擬汚染水を用いて検討した。その結果、季節変動は精密質量分析を用いることで観測されるが、異常が起こった際にそれらの変動の影響は、特異的なシグナルに注目することで、十分に回避可能と考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

該当なし

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む。）

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

I. 参考文献

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

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

表 1 分析条件まとめ

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

表 2 模擬汚染水由来と考えられる検出物質数

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

表 3 模擬汚染水由来と考えられる検出物質中の同一検出物質数とその割合

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

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

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

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

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

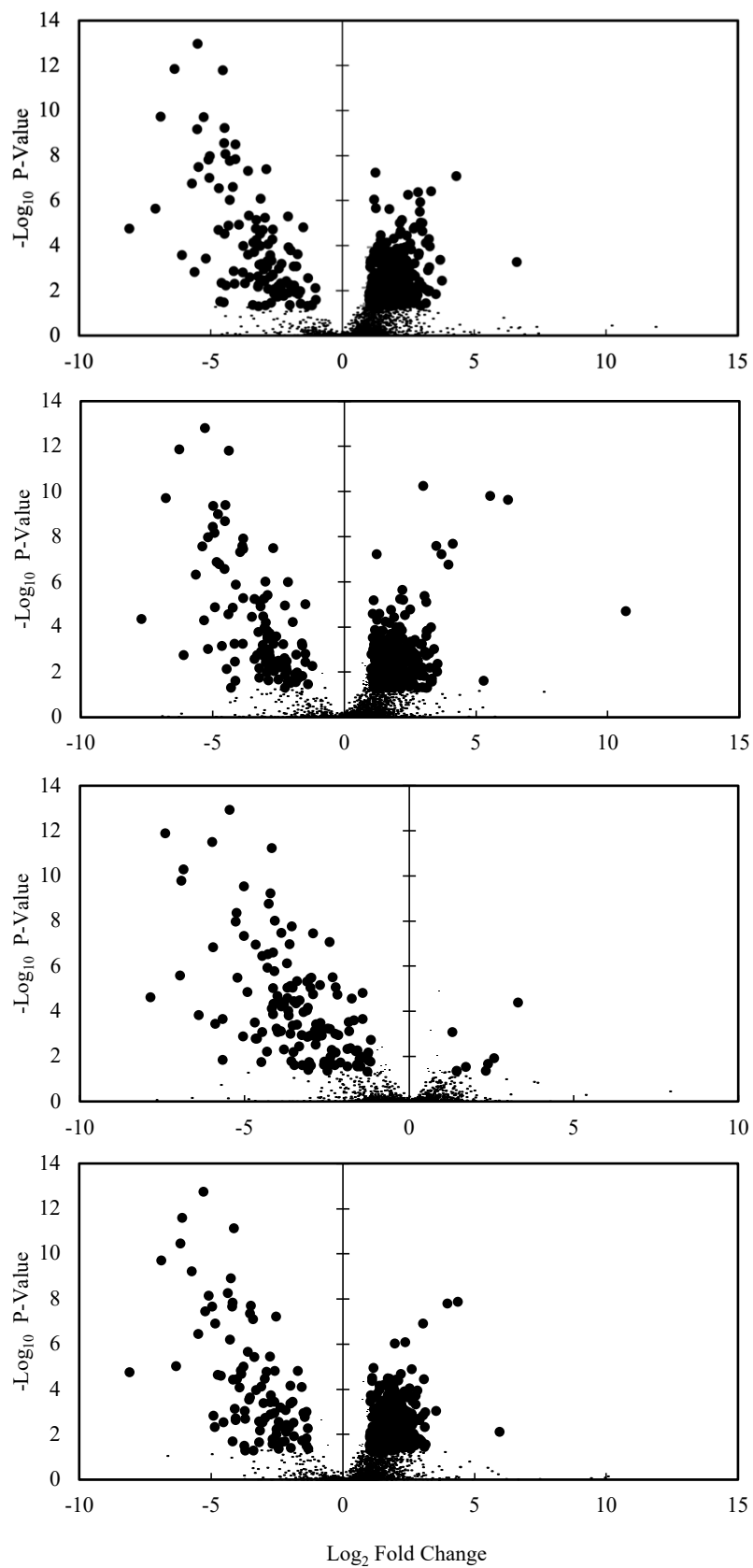


図1 下水処理水の混入の検知に対するバックグラウンドの影響（上から，2，5，10（下水処理水はこの水と混合），11月の琵琶湖湖水を基準とした解析）

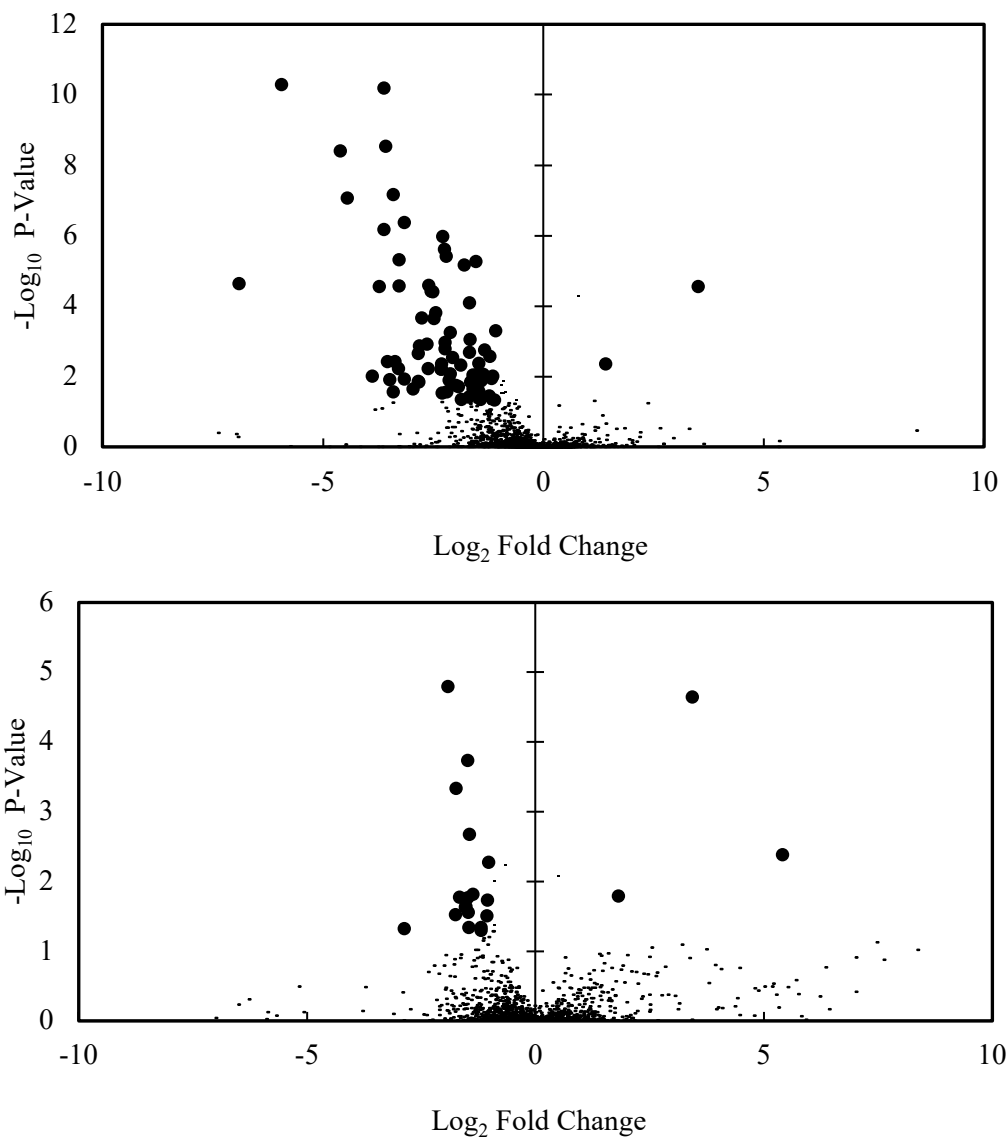


図2 下水処理水混入の検出（左上のプロットが下水処理水由来物質の検出，上段：10%，下段：1%）

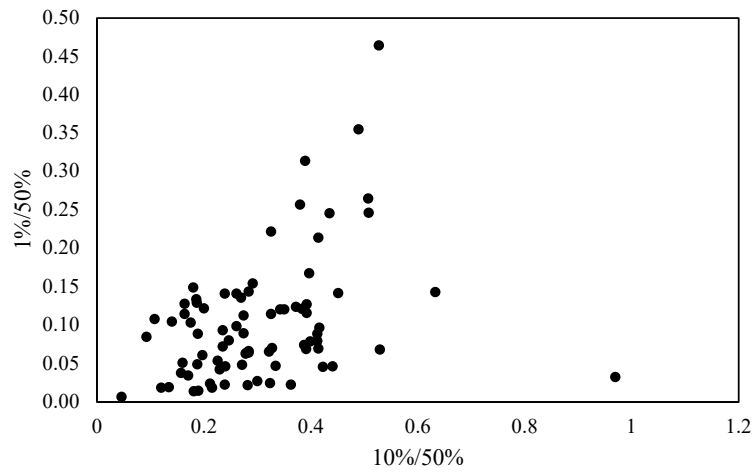


図3 50%で混合した模擬汚染水から得られた各物質のピークエリアと、10%及び1%で混合した模擬汚染水から得られた各物質のピークエリアの比率

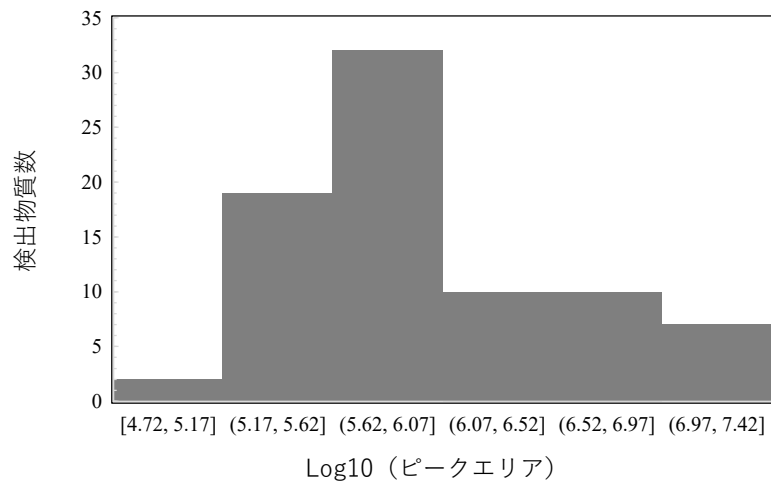


図4 琵琶湖湖水中において検出された物質のピークエリアの分布