

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6-メトキシ-3-(5-オキソヘキシル)シクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下、**1**と記述する）と推定された。しかしその推定は、誤った構造を仮定した場合に、実験結果と量子化学計算結果が一致しないことを根拠としている。本年度は、推定構造である**1**を仮定した場合に、実験結果と量子化学計算結果が一致することの確認を試みた。また、一昨年度の文献研究の成果を基に、既往研究で生ぐさ臭原因物質と報告されている**20**物質について、水道原水中の存在量と原因生物濃度および臭気強度との相関関係を検討した。

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⁾などが指摘されている。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り、有益である。

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

これに対してMSは、極微量物質の分析に長けている。とくに、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)法や電界イオン化(FI)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を用いて構造を推定した結果、FXは6-メトキシ-3-(5-オキソヘキシル)シクロヘキサ-2-エン-1-オン(以下、**1**と記述する)と推定された。しかしその推定は、誤った構造を仮定した場合に、実験結果と量子化学計算結果が一致しないことを根拠としている。

そこで本年度は、推定構造である**1**を仮定した場合に、実験結果と量子化学計算結果が一致することの確認を試みた。さらに、一昨年度の文献研究の成果を基に、既往研究で生ぐさ臭原因物質と報告されている**20**物質³⁾について、水道原水中の存在量と原因生物濃度およびTONとの相関関係を検討した。

B. 研究方法

1. 原因物質の推定構造の確認

FXの推定構造である**1**の立体配座を基に量子化学計算を実施した。計算は、計算プログラ

△ GRRM17 用いて単分子人工力誘起反応法 (SC-AFIR) 法⁴⁾を用いて 1,476 時間実施した。探索における計算レベルを HF/6-31+G(d)とし、エネルギー、勾配、二次微分行列は Gaussian 16 (Revision C.02, CT, USA)で求めた。量子化学計算により発見されたフラグメンテーション反応の生成物の m/z 値を、EI を備えた GC-TOFMS (JMS-T200GC AccuTOF GCx-plus, JEOL, Tokyo)の測定結果と対比することにより構造を確認した。

3. 既往研究で生ぐさ臭原因物質とされている物質の検討

これまでに採取した水道原水 (6 検体) を固相抽出法で精製・濃縮し、FI を備えた GC-TOFMS で網羅分析した。既往研究で生ぐさ臭原因物質と報告されている 20 物質³⁾について、分子式から分子イオンの m/z 値を算出した。算出された m/z 値を持つ物質が検出された場合は、その物質を生ぐさ臭原因物質と仮定して、そのピーク面積値を求めた。

C. 結果および D. 考察

1. 量子化学計算による生ぐさ臭原因物質の構造推定

計算を実行した結果、変角反応、転位反応、開環反応による生成物が 976 個発見され、その中には 16 個の開環構造が含まれていた。それらの開環構造の中には、逐次的に起こるフラグメンテーション反応により $C_8H_{12}O^+$ (m/z 124.088)を生じると考えられる構造が含まれていた。このため、FX のマススペクトルを確認したところ、当該イオンが再現性よく記録されていた。さらに、抽出イオンクロマトグラムを確認したところ、FX の基準ピークと同一のカラム保持時間、ピーク形状で $C_8H_{12}O^+$ (m/z 124.088)が検出された。このことから、FX は1と考えられる。

2. 既往研究で生ぐさ臭原因物質とされている物質の検討

既往研究で生ぐさ臭原因物質とされている 20 物質のうち 10 物質の分子イオンは、すべての検体から検出されなかった。残りの 10 物質のそれは、すべての検体から検出された。検出された物質のピーク面積値と試料水の TON との関係の例を図 1 に、原因生物である *Uroglena americana* の細胞濃度との関係の例を図 2 に示す。図 1 の上段に例を示したように、10 物質中 7 物質の決定係数は 0.00~0.11 であり、相関関係が認められなかった。一方、下段に示した 1-オクテン-3-オン、本研究で発見し構造を推定した FX およびヘプタジエナールの 3 物質については、決定係数が 0.65~0.84 であり、相関関係が認められた。図 2 に示したウログレナアメリカナの細胞濃度との関係についても、同様の関係が示された。これらのことから、水道水生ぐさ臭原因物質は、これらの 3 物質の混合臭気の可能性がある。

E. 結論

量子化学計算と高分解能 GC/MS を用いて水道水生ぐさ臭原因物質の構造を推定したところ、

同物質は 6-メトキシ-3-(5-オキソヘキシル) シクロヘキサ-2-エン-1-オンと考えられることが明らかとなった。同物質を含む 20 物質を対象に、これまでに採取した 6 検体の水道原水における存在状況と水道原水の TON、*Uroglena americana* の細胞濃度との相関関係を調査したところ、水道水生ぐさ臭は 1-オクテン-3-オン、6-メトキシ-3-(5-オキソヘキシル) シクロヘキサ-2-エン-1-オン、ヘプタジエナールの 3 物質の混合臭気である可能性を示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 高梨啓和, 高岩凜太郎, 小田伊吹, 中島常憲, 新福優太, 栗栖 太, 春日郁朗, 秋葉道宏, 量子化学計算と機器分析による水道水生ぐさ臭原因物質の構造推定, 第 58 日本水環境学会年会, 2024 年 3 月 6 日, 福岡.
- 2) 高梨啓和, 山下優輝, 新福優太, 中島常憲, 秋葉道宏, 質量分析, 非調和下方歪追跡-超球面探索と誘導体化反応による水道水生ぐさ臭原因, 第 71 回質量分析総合討論会, 2023 年 5 月 15 日, 大阪.

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) 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.
- 4) Maeda S, Harabuchi Y, Takagi M, Taketsugu T, Morokuma K. (2016) Artificial Force Induced

Reaction (AFIR) Method for Exploring Quantum Chemical Potential Energy Surfaces. *Chem Rec.*, **16**(5), 2232-2248.

- 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.

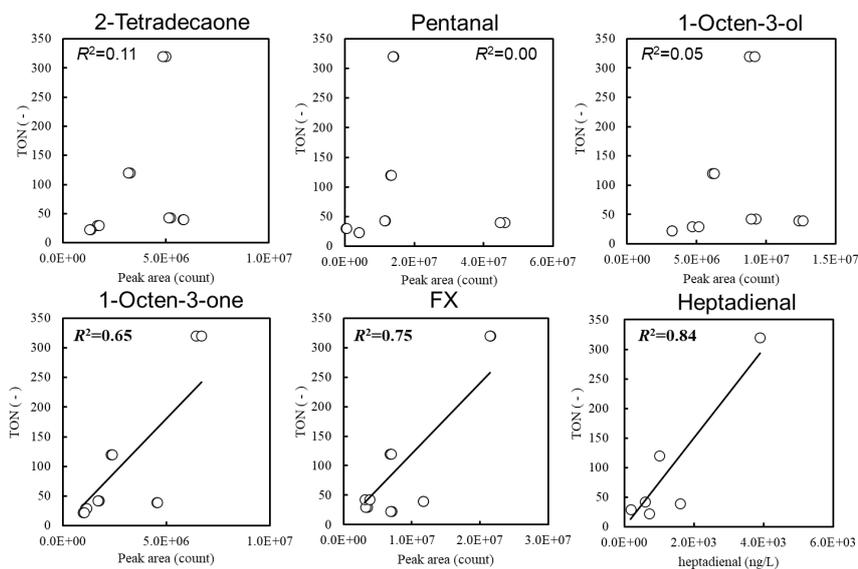


図 1 生ぐさ臭原因物質と報告されている物質のピーク面積と臭気強度 (TON) の相関関係の例

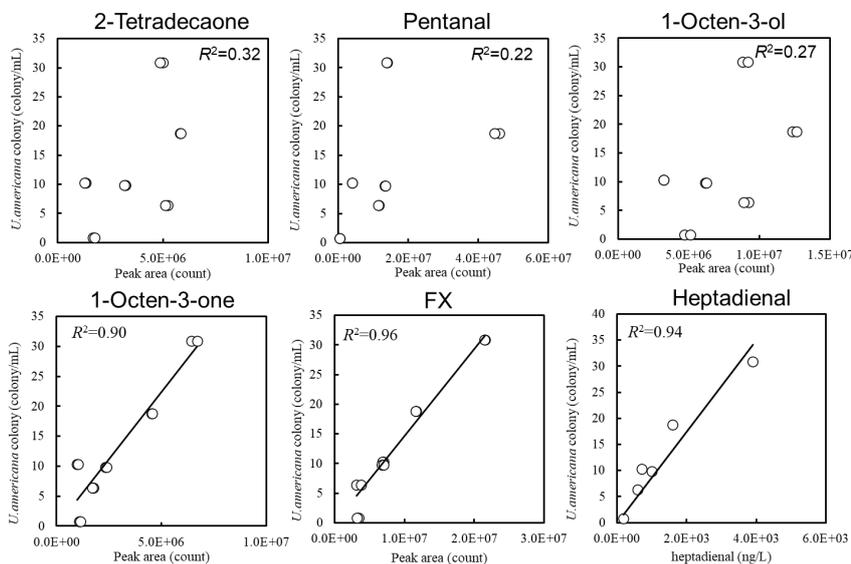


図 2 生ぐさ臭原因物質と報告されている物質のピーク面積と *Uroglena americana* 細胞濃度との相関関係の例

