

# 博士論文(要約)

循環的な水利用における溶存有機物の起源と消長の  
ハンターゲットスクリーニング分析による評価

石井 淑大

## 第1章 序論

### 1-1 研究の背景

河川水は、多くの国において最も重要な水道水源となっている。日本ではダム貯留水を含めると、水道水の 70 %以上が河川水を水源としている。河川水中には多種多様な溶存有機物 (Dissolved Organic Matter; DOM) が存在しており、浄水処理へ様々な悪影響を及ぼすことが知られている。DOM の存在は、凝集剤や消毒剤の消費量増加を引き起こすほか、異味異臭の原因となる場合もある。また、水道管内での微生物の再増殖を引き起こしたり、塩素と反応することで消毒副生成物 (Disinfection By-Product; DBP) の前駆物質となったりすることも懸念されている。DOM は、特に低分子である場合、日本で一般的な浄水処理である凝集沈殿及び砂ろ過処理では効率よく除去できていない現状である。

河川水中の DOM は、多種多様な有機化合物の混合体として存在しており、それらは自然由来のものと人為由来のものに大別することができる。自然由来の DOM はフミン酸やフルボ酸などに代表されるような有機物で、土壤中の成分が溶解したものや、動植物が腐食したものなどが含まれる。自然由来の DOM 組成は季節や地域によって大きく変化することが知られており、一地点から数千種類検出されるという報告もあるが、その実態は未解明の部分が多い。

人為由来の DOM には、下水処理水や工業排水、農業排水などに含まれる、人工的に製造された有機化合物が含まれる。人工の化合物数は年々増加しており、化学物質データベース CAS にはすでに 1 億種類以上の登録がある。また、一般家庭での生活に使われる化学物質数は 7 万種と言われており、それらが下水処理水等を通じて河川へ流入し、水環境中に存在している可能性がある。河川水中に存在し得る人為由来の DOM はより多種多様になっており、その中にはヒトの健康や環境へ毒性を示すものも含まれる。DOM は河川水中で、太陽光や微生物の影響により分解、変性することがある。これにより DOM 組成の複雑性がさらに増すほか、毒性が上昇する場合もある。多様な DOM が含まれる河川水を水道水源として用いるために、DOM 組成を明らかにし、それらの浄水処理による消長を理解することが必要不可欠となっている。

日本における水道水は、水道水質基準 51 項目をはじめとして、水質管理目標設定項目 27 項目 (農薬類の中には約 110 種類が含まれる)、要検討項目 45 項目を定めて、それらを日々監視することで安全性を確保している。これらの中で DOM に分類されるものは、農薬類を含めても 200 項目以下である。河川水中に多種多様な DOM が存在しており、規制がなされていない DOM の中にもヒトの健康や環境へ悪影響を及ぼすものがあり得ることを考えると、現行の基準は十分であるとは言えない。例えば 2012 年に発生した利根川水系ホルムアルデヒド事故など、発生当時規制がない有機物が原因物質となる水質事故も発生している。河川水中に存在する DOM すべてに規制を設けるのは現実的ではないが、現行の特定物質のみを監視する体制は見直す必要があると考える。河川水中の DOM をより網羅的に分析し、

その中から重要な DOM を常にスクリーニングしていく方法が、より高度な安全管理のために求められる。

河川水中の DOM 組成が複雑であるために、個々の物質を対象とした分析はコストがかかり困難であった。しかし近年では、高分解能質量分析計（High-Resolution Mass Spectrometry; HRMS）を用いた分析手法が水環境分野に応用されたことで、水中の DOM を分子レベルで一斉に分析することができるようになった。これを活用し、特定の対象物質を定めずに DOM を網羅的に分析するノンターゲットスクリーニング（Non-Targeted Screening; NTS）分析の可能性が広がっている。NTS 分析により河川水や浄水中の DOM 組成を把握することで、規制のない物質も含めて監視することができ、それらの情報から注視すべき対象を絞り込むことも可能となる。より高度な水道水質管理のために、HRMS を用いた NTS 分析手法の確立と、それによる新たな DOM 監視と規制の体制が求められている。

## 1-2 研究の目的

本研究では、HRMS を用いて河川水や浄水場工程水中の DOM を NTS 分析することにより、河川水中に存在する未規制の汚染物質をスクリーニングし、それらの浄水場における消長を評価する。さらに、水中に存在する DOM のデータベースを蓄積するとともに、HRMS を用いた DOM 監視の方法を提案することで、より高度な水道水の安全管理に資する情報を提供することを目的とする。

より具体的には、以下に挙げる 4 点を個別目的とする。

- A) 河川の複数地点で DOM を NTS 分析することにより、河川の流下過程における DOM 組成の変化を明らかにする。採水日や採水地点による DOM 組成を比較することで、人為的な DOM をスクリーニングし、その中から今後注視して監視すべき未規制の汚染物質を探索する。
- B) 河川水に加えて下水処理水の分析も行うことで、未規制の汚染物質の中でも、特に排出源が下水処理水であるものを探索する。非意図的な下水処理水の再利用を行っている浄水場の工程水中 DOM を分析することで、下水処理水由来の DOM の排出から浄水処理までの消長を追跡する。
- C) 複数箇所の浄水場工程水を分析することで、浄水処理により除去しにくい DOM をスクリーニングし、その共通性や特徴を解明する。また、河川水の分析結果と比較することで、浄水中に残存している DOM の起源を明らかにするとともに、注視すべき物質のスクリーニングを行う。
- D) 本研究の分析で検出された DOM の情報をまとめ、河川水や浄水から検出される DOM データベースの基盤を作成する。今後注視すべき物質をリストアップするとともに、平常時に検出される DOM のデータベースを作成することにより、異常時に原因物質の特定を速やかに行えるようにする。

### 1-3 論文の構成

博士論文の構成を Figure 1.1 に示す。第 1 章では序論として、本研究の背景と目的、そして論文の構成を示した。第 2 章では、本研究に関連する先行研究の知見をまとめた。第 3 章では、本研究で用いた DOM の分析手法やデータの解析手法についてまとめた。第 4 章では、荒川を対象として河川水中の DOM 組成を分析し、未規制の汚染物質をスクリーニングした結果をまとめた。第 5 章では、入間川と流域の浄水場を対象として、下水処理水由来の DOM の河川での挙動と浄水処理による消長を追跡した結果をまとめた。第 6 章では、荒川流域の 6 ヶ所の浄水場を対象として、河川水中 DOM の浄水処理による除去状況を評価した結果をまとめた。第 7 章では、第 4 章から第 6 章までで得られた結果をまとめ直し、DOM のデータベース作成を行った結果を記した。なお、第 4 章から第 7 章の内容は、それぞれ 1-2 で示した A~D の 4 つの個別目的に対応した内容となっている。最後に、第 8 章では本研究の成果と課題をまとめ、今後の展望について記した。

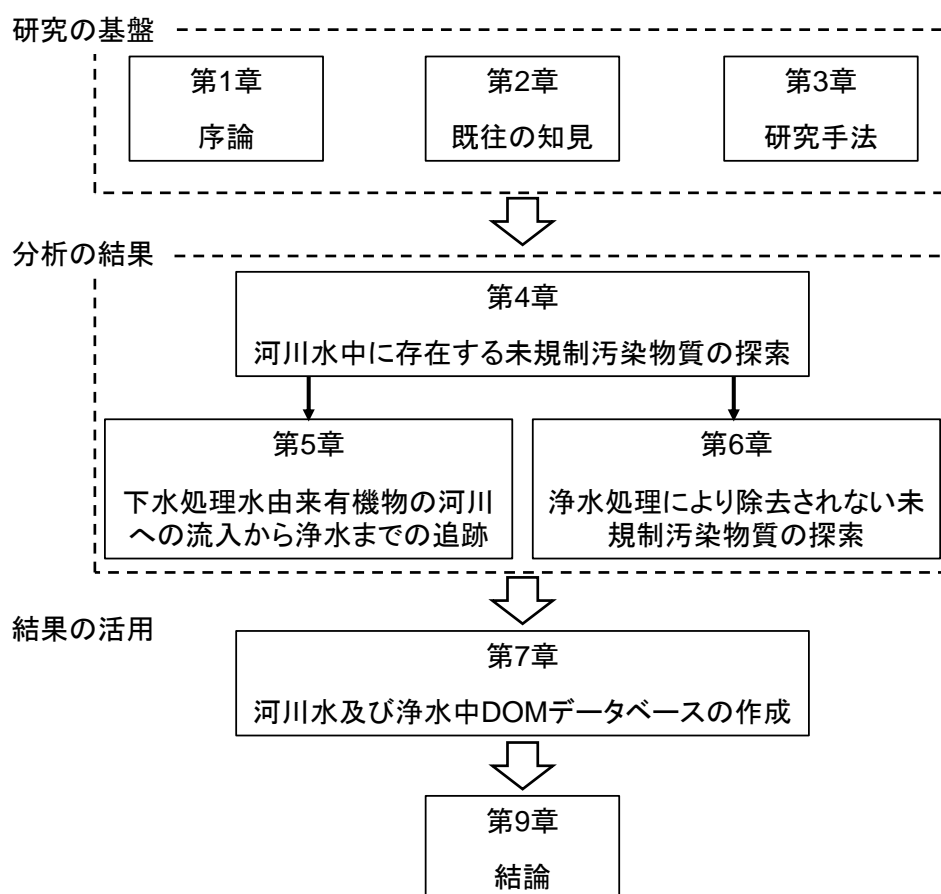


Figure 1.1 博士論文の構成

## 第2章 既往の知見

### 2-1 溶存有機物の管理体制

日本における溶存有機物の管理について、環境水及び水道水についてまとめ、今後の管理体制についての先行研究をまとめる

#### 2-1-1 河川等公共用水域における溶存有機物管理

河川を含む公共用水域に対しては、ひとの健康の保護及び生活環境の保全を目的として、水質汚濁に係る環境基準が設定されている。ひとの健康の保護に関する環境基準では20項目が設定されており、その中にはベンゼンなど複数の有機物の項目が含まれている。生活環境の保全に関する環境基準では、溶存有機物に関連する項目はない。

また、上記の環境基準に加えて、ひとの健康の保護または水生生物の保全に関連する物質ではあるが、公共用水域等における検出状況からみて、直ちに環境基準とはせず、引き続き知見の集積に努めるべきものとして、要監視項目が設定されている。人の健康の保護に係る項目として、公共用水域を対象として27項目、地下水を対象として25項目が指針値とともに設定されている。これらの内半数以上が有機物に関する項目である。

さらに、個別物質ごとの水環境リスクは比較的大きくないか不明なものの、環境中での検出状況や複合影響等の観点からみて、水環境リスクに関する知見の集積が必要な物質として、208項目の要調査項目が設定されている。これらの内の多くが溶存有機物に関連する項目であり、後述する Orbitrap 型質量分析計を用いた一斉分析の手法が提案されている (Li et al. 2020)。

水環境の保全を目的として、水質汚濁防止法が制定されている。本法では、事業者が河川等の公共用水域へ排水を行う場合、一律排水基準に従って排水を行うことが義務付けられている。一律排水基準には、人体に健康被害を及ぼす恐れがあるとされる28種類の化学物質が有害物質として定められており、その内の約10種類が溶存有機物に関連する物質である。また、公共用水域へ多量に排出されることで生活環境に被害を及ぼす恐れがある物質として、55種類の化学物質が指定物質として定められている (環境省)。

日本では、有害な恐れのある化学物質の事業所からの排出を管理するために、PRTR 制度の導入も行っている。この制度は河川に限らず、大気や土壌への排出も対象となっている。PRTR 制度の対象となる化学物質は、第一種指定化学物質と定義され、ひとや生態系へ有害であり環境中に広く存在すると認められる物質として462種類が指定されている。これらの化学物質を環境中へ排出する事業所は、その排出量を国へ届け出ることが義務付けられ、国が届け出データに基づき環境中における存在量や移動量を水系し公表する制度となっている (経済産業省)。

### 2-1-2 水道水中の溶存有機物管理

日本においては、水道水は水道水質基準 51 項目を測定することで水道水の安全性を担保している。この 51 項目の中には、異味異臭がないなどの指標が含まれるほか、有機物の要素としてジクロロメタンやベンゼンなどが含まれる。これらの有機物項目は、工業的によく利用されるものや、微量であっても人体に影響が大きいものなどが選定されている。

また、水質管理目標設定項目が 27 項目、目標値とともに設定されている。これらは、水道水中から検出される可能性が考えられる項目であり、水道水質管理上留意すべき項目とされている。この中には、トルエンなど複数の有機物項目が設定されている。また、農薬類として、114 種類の農薬が設定されている。

さらに、要検討項目が 45 項目、目標値とともに設定されている。これらは、毒性評価が定まっていないことや、水道水中における存在量が未知であることから、基準値としては設定できないが、留意すべき項目として検討されるべき項目である。この中には、スチレンなど、複数の有機物項目が含まれている。

2-1-3 でまとめる浄水場における水質事故等に対応する形で、浄水処理対応困難物質が設定された。これは、通常の浄水処理により水質基準項目を高い比率で生成する物質が、浄水処理では対応が困難な物質として定められ、20 種類が情報収集の対象物質となっている。

### 2-1-3 未規制の溶存有機物による事故例

日本において、浄水場における水質事故は年間 100 件程度起きており、その中には事故発生当時規制対象ではない物質が原因であるものもある（浅見、小坂 2019）。

2012 年 5 月に、利根川を水道水源とする埼玉県や千葉県浄水場において、水道水質基準に設定されているホルムアルデヒドが基準値以上に検出され、一部地域で給水停止措置が取られる水質事故が発生した（金見 2013）。その後の調査により、上流の事業所から排出されたヘキサメチレンテトラミンが原因物質であり、浄水場における塩素処理で反応しホルムアルデヒドが生成されていたことが分かった（小林ら 2012）。

2006 年から 2013 年にかけて、発がん性の物質であり、クロラミンによる消毒副生成物として知られる N-ニトロソジメチルアミン（NDMA）が大阪市の淀川水系から取水する浄水場生成されることが報告されていた。調査の結果、上流の化学工場から排出されていた 1,1,5,5-テトラメチルカルボヒドラジドが NDMA の前駆物質となっていることが推定された（Kosaka et al. 2014）。

2016 年 1 月には、新潟市などの阿賀野川を水道水源とする浄水場の水道水から異臭被害が発生した。その後の調査で、上流の福島県にある工場の排水中に含まれる 2-メトキシ-3,5-ジメチルピラジンが原因物質として特定された（赤石ら 2017）。

上記の水質事故はいずれも発生当時規制がなされていない物質であった。特定の化学物質のみを管理するだけでなく、より網羅的な水質管理が求められるようになってきている（浅見ら 2013）。

## 2-2 高分解能質量分析計を用いた溶存有機物の分析

### 2-2-1 FT-ICR MS を用いた DOM 分析

FT-ICR MS は 1974 年に実用化され、有機化学や生物化学の分野で様々な化合物やタンパク質などの高精度な分析に活用されてきた (Marshall *et al.*, 1998)。FT-ICR MS は、分子をイオン化して強力な磁場中へ放出すると回転運動することを利用し、その振動数からイオンの質量電荷比 ( $m/z$ ) を測定している。イオンが複数種類あり波形が複雑化した場合でも、フーリエ変換することにより各イオンの精密な  $m/z$  を測定することができる (Comisarow and Marshall, 1974)。測定対象のイオンが低分子 (本研究では  $m/z < 600$  程度) である場合には、測定により得られた精密質量数から分子式を推定することが可能である (Koch *et al.* 2007)。FT-ICR MS の分解能は、2000 年ごろは 80,000 ( $m/z$  300) 程度であり (Kujawinski *et al.*, 2001)、近年ではさらに高分解能となっている。

これらの FT-ICR MS の特徴は、多様な有機物の混合体である水中の DOM を個別に分析したいという目的によく合致し、水環境分野への応用が行われ、2000 年ごろから多く論文が投稿されている。

Kujawinski *et al.* (2001) では、自然由来の DOM として代表的なフミン酸やフルボ酸の混合体を FT-ICR MS で分析し、一種類ずつの分子レベルでの解析を可能とした。それまではフミン酸やフルボ酸といったまとまりでしか分析ができなかったものを、それを構成する個別の化合物として分析できるようになり、DOM 組成の分析が大きく進展した。さらに Kujawinski *et al.* (2004) では、水中の DOM 組成が光化学的な分解と微生物による分解を受けるとどう変化するのかということを FT-ICR MS により分析している。それまでは DOM 全体としての特性の変化を見るにとどまっていたが、FT-ICR MS を用いることで、水中の DOM 組成が何らかの処理や分解によりどう変化するのかということを分子レベルで明らかにすることが可能であるということを示した。Koch *et al.* (2005) では、南極域の海水と熱帯域のマングローブ林付近の海水中の DOM を FT-ICR MS で分析し、両者の組成を比較しており、検出される各分子の特徴を明らかにすることで DOM 組成の特徴付けを行う意義を示している。これらの研究成果により、FT-ICR MS の活用が水中の DOM 組成の分析に大いに役立つことが示された。

### 2-2-2 Orbitrap MS の開発と応用

FT-ICR MS は DOM 分析にとっても有用な分析機器であるものの、非常に強力な磁石を必要とするために、大型で高価な装置となっており、所有可能な研究機関は限られ、水環境分野での応用は限定的となっていた。そのため、FT-ICR MS よりも低価格でありながら、同等の高分解能を保持する Orbitrap MS が広く導入され、水環境分野でも活用されるようになった。

Orbitrap MS はその開発者である Thermo Fisher Scientific 社の商品名であり、学術名称は Kingdon Trap 型質量分析計であるが、公開されている多くの論文が Orbitrap MS の名を使い投稿され、研究者間にも浸透していることを考え、本研究でも Orbitrap MS と呼称すること

とする。Orbitrap MS は 1999 年にプロトタイプが公表され、その後 2005 年に上市された (Hu *et al.*, 2005)。FT-ICR MS と異なり、巨大な磁石を必要とせず代わりに電場を用いたため、分解能は多少劣るものの、比較的安価で販売されたため、多くの研究室で導入されることとなった。

Orbitrap MS の分解能は 2005 年当時で 60,000 とされ (Hu *et al.*, 2005), 2018 年には 500,000 にまで向上しており、2000 年ごろの FT-ICR MS の分解能を超えている。Orbitrap MS の持つ分解能は、水中の DOM を分子レベルで分析するためには十分な分解能となっている。Olsen *et al.* (2005) による検証では、Orbitrap MS は条件が整えば質量誤差 2 ppm 以内で対象とするイオンを検出可能であることを示している。この条件とは、測定前のキャリブレーションがなされていることと、測定中にも既知の物質を用いて内部的にキャリブレーションを行うことというものであり、容易に整えることができる。Hawkes *et al.*, (2016) による FT-ICR MS と Orbitrap MS の比較分析では、 $m/z$  600 までであれば、Orbitrap MS を用いることで FT-ICR MS を用いた場合と同様な、十分に分解能の高い分析が可能であるということを示している。また、質量誤差も 1 ppm 以内に収めることができるとしている。

Orbitrap MS は FT-ICR MS と比較すると、一回のスキャンに必要な時間が短く多くのスキャンを行うことができるため、液体クロマトグラフィー (Liquid Chromatography; LC) と接続して LC/MS 分析を行うのに適しているとされる (Krauss *et al.*, 2010)。また、四重極型質量分析計などと接続することで、MS/MS 分析を可能とする。

これらの特徴により、Orbitrap MS による DOM 分析は 2010 年ごろから特に増加し、多くの研究がなされてきた。それらの研究は 2-2 にまとめた。

### 2-2-3 DOM 分析のためのイオン化手法

FT-ICR MS や Orbitrap MS が水環境分野への応用に適した技術であるもう一つの理由は、分子を大きく破壊せずにイオン化できるソフトなイオン化法を用いることができるからである。従来のイオン化法は、分子を破壊しイオン化する電気イオン化法などのハードなイオン化法が主流であったが、分子を破壊してしまうと親分子の推定が難しくなり、特に多様な分子の混合体である環境水等の DOM を分析するのは不可能であった。しかし、ソフトなイオン化法を用いることで、親分子の構造を保持したままのイオンが生成され検出されるので、水中 DOM の組成を容易に解析することが可能となる。

ソフトなイオン化法として、エレクトロスプレーイオン化 (ElectroSpray Ionization; ESI) 法、大気圧光イオン化法、大気圧化学イオン化法などが用いられる。それぞれのイオン化法でイオン化効率が異なるため、分析対象とする DOM の特徴に合わせてイオン化法を決定する必要があるが (Keski-Hynnila *et al.*, 2002), 環境水中に存在する DOM を最も網羅的にイオン化できる手法は ESI とされており (Hertkorn *et al.*, 2008), 実際に ESI を用いた分析結果が多く公表されている。ESI は極性のない分子も効率的にイオン化でき、主にプロトンの付加及び脱離による 1 価のイオンを生成するとされる (Koch *et al.*, 2005)。ESI はポジティブイ



オン化とネガティブイオン化の両方を行うことができるが、ポジティブイオン化ではプロトン付加だけでなくナトリウム付加によるイオン化が行われるなどの影響で分子式推定が困難になるとされ、あまり用いられていない。

#### 2-2-4 DOM 分析のための試料の前処理方法

特に汚染の少ない河川水や水道水など、水中に含まれる DOM の濃度は必ずしも高くなく、HRMS の分析精度を向上させるために DOM の濃縮が必要となる。また、水中の無機イオンは分析対象の有機物のイオン化を妨げるなど感度を低くするほか、分析機器内部に析出して感度を低下させるなどの悪影響をもたらすため、可能な限り除去する必要がある。DOM の濃縮と脱塩を同時に比較的簡便に行う手法として、固相抽出処理がよく用いられる。固相抽出に用いる充填剤は多くの種類があるが、Dittmar *et al.* (2008) や Li *et al.* (2017) では、スチレンジビニルベンゼンポリマーを用いた Bond Elut PPL を用いることで、DOM を効率よく回収できている。この充填剤を用いた分析として、例えば Phungsai *et al.* (2016) では、下水処理水中の DOM の回収率は 60 %程度であった。

固相抽出処理では水中の DOM を 100 %回収することはできないので、より網羅的に DOM を分析するため、前処理を行わず環境水を直接分析する手法が用いられることもある。

#### 2-2-5 HRMS データの解析方法の確立

HRMS による分析で得られたデータは、多種類の分子に由来する膨大なピークのデータとなるため、その取扱い方法も議論されてきた。得られた精密  $m/z$  からの分子式推定は、特にその後の解析に影響が大きく表れるため、より正確になされるべきである。分析対象の DOM が全て、炭素、水素、酸素のみから構成される分子である場合には、その精密質量数から連立方程式を解くことにより、容易に分子式を推定することができる (Stenson *et al.*, 2002, 2003)。しかし、実際の分子式には窒素や硫黄、さらには塩素や臭素、リン、ナトリウムなども含まれる可能性があり、分子式推定は複雑になる。そこで、同位体イオンピークを確認して分子式推定を行う方法がある (Koch *et al.*, 2007)。同位体イオンピークが鮮明でない場合など、ある精密質量数に対して当てはまる可能性のある分子式が複数種類考えられる場合は、どの分子式をどういった理由で採用するのかということを決める必要がある。例えば、Kind and Fiehn (2007) では、環境水中に存在し得る DOM の特性として、7つのルールを提案している。また、対象とする DOM を別の手法を用いて分析し、その情報から DOM 特性を推測し、それに合致する分子式を優先的に推定する方法もある (Kujawinski *et al.*, 2009)。

分子式を自動で推定するプログラムも開発されている。Kujawinski *et al.* (2006) では、環境水中に存在する DOM は微生物による分解の影響を受けているため、分子同士は何かしら関係性を持っていると考えられ、それをもとに分子式推定アルゴリズムが開発されている。このアルゴリズムは、Phungsai *et al.* (2016) などで活用されている。

分子式推定が行われた DOM は、様々なパラメータによる特徴づけ方法が提案されている。分子の特徴を示すパラメータとして最も頻繁に用いられるものは、分子式中の炭素原子数と水素原子数の比率 (H/C) と、炭素原子数と酸素原子数の比率 (O/C) である。この 2 つのパラメータによって、分子のある程度の特徴を推測することができるとされており、横軸に O/C を、縦軸に H/C を置いてプロットしたグラフは Van Krevelen プロットと呼ばれ、多くの研究で用いられている (Kim *et al.*, 2003)。そのほか、分子中に含まれる炭素の不飽和度や酸化度数を表すパラメータが用いられることもある (Phungsai *et al.*, 2018)。

また、環境水中から検出される分子は独立して存在しているのではなく、グループとして存在しており、そのグループを見つけ出す手法も提案されている。ここで言うグループとは、ヘテロ原子数や不飽和度は同じであるが、炭素鎖の長さのみ異なる (分子式中の CH<sub>2</sub> の数だけが異なる) 分子群のことを言う。これは、環境水中の DOM は微生物や太陽光の影響による分解を受けており、その結果似た構造の分子群が存在するであろうという仮定から考えられている。そこで、CH<sub>2</sub> の精密質量数を 1 単位としたグループ分けがなされ、Kendrick mass と呼ばれている (Hughey *et al.*, 2001)。

#### 2-3-6 HRMS によるノンターゲットスクリーニング分析

HRMS を用いることにより、対象とする化合物を定めずに、水中の DOM を網羅的に分析し、分析結果から今後の研究対象とする物質を探索するという、ノンターゲットスクリーニング (NTS) 分析が可能となってきた (Schymanski *et al.*, 2015)。Orbitrap MS を用いることでも NTS 分析を行うことが可能とされており、特に 2015 年以降から Orbitrap MS を用いた NTS 分析の報告が増加している (Hollender *et al.*, 2017, Petras *et al.*, 2017)。また、NTS 分析の結果が研究室ごとに同じであることの確認も行われている (Hawkes *et al.*, 2020)。

## 2-3 ノンターゲットスクリーニング分析による DOM 分析の事例

河川水中には、多種多様な DOM が存在しており、それらの組成を分析する研究が進んでいる。河川水中に存在する微量汚染物質の種類数は年々増加しており、それにより水道水の安全性も脅かされている (Petrie *et al.*, 2014; Schwarzenbach *et al.*, 2006)。こういった汚染物質は主に、医薬品や農薬と、それらの分解物で構成されており、非常に複雑であり且つ毒性を持つ可能性もある (Fenner *et al.*, 2013, Helbling *et al.*, 2010)。

Orbitrap MS を用いた DOM 分析により、環境水中の DOM や微量汚染物質を明らかにしようとする研究が行われている。Urai *et al.* (2014) では、河川水や地下水、下水再生水、雨水中の DOM を Orbitrap MS で分析することにより、各水ごとの DOM の特性を明らかにしている。Hawkes *et al.* (2018) では、土壌から河川へ溶出する DOM が地域ごとにどのように異なるのかを分析している。Hogenboom *et al.* (2009) では、河川水中の DOM を Orbitrap MS で分析することにより、河川水中の微量汚染物質の探索を行う分析をまとめている。Krauss *et al.* (2010) でも、決められた対象物質だけでなく、DOM を網羅的に分析し、その中から汚染物質がないかを評価する方法を提案している。Carpenter *et al.* (2019) では、河川水中の DOM を定期的に Orbitrap MS で分析することで、検出頻度が高い DOM などのスクリーニングを行っている。

流入下水中の DOM が下水処理の工程でどう変化するのかということが、FT-ICR MS や Orbitrap MS を用いて分析されている (Gonsior *et al.*, 2011, 2014; Theng *et al.*, 2013)。また、下水再生水の処理工程での DOM 分析も行われている (Phungsai *et al.*, 2016)。

DOM は浄水処理に対して様々な悪影響を及ぼすので、浄水工程水中の DOM 組成に関して多くの研究がなされている。DOM は浄水処理のための凝集剤や酸化剤、消毒剤の消費量を増加させることや (Fabris *et al.*, 2008) や (Fabris *et al.*, 2008), 水道管内での微生物の再増殖を引き起こすこと (Park *et al.*, 2016), 消毒副生成物の前駆体となること (Williams *et al.*, 2019) が知られており、それらの問題と DOM 組成との関係を明らかにしようとする研究が行われている。

浄水処理は河川水中の DOM を完全には除去できず、逆にオゾン処理や塩素処理などによる変性により、毒性が高くなる場合もある (Matsushita *et al.*, 2018; Negreira *et al.*, 2015)。微量汚染物質を規制がなされていないものに対しても監視することが重要である (Schmidt, 2018)。

浄水場工程水を分析することで、処理による DOM 組成の変化を追跡する研究もあり、各処理によって除去される DOM の特性が明らかになっている (Phungsai *et al.*, 2018, 2019; Scholl *et al.*, 2018)。浄水処理により毒性のある物質が生成されるという報告もある (Brunner *et al.*, 2020; Williams *et al.*, 2019)。また、消毒副生成物の特定も試みられている (Gonsior *et al.*, 2019; Goslan *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2018)。

## **第 3 章 研究手法**

### **3-1 研究全体の戦略**

本研究では、1-2 で述べた目的を達成するための戦略として、河川水や浄水場工程水中に含まれる溶存有機物（DOM）を、Orbitrap 型質量分析計（Orbitrap MS）により分析し比較するという方法を用いた。河川水を複数地点から採取し DOM を分析することで、河川の流下過程における汚染 DOM の挙動を評価した。河川水だけでなく、そこへ流入する下水処理水や、河川から取水している浄水場の工程水も採取し DOM を分析することで、汚染 DOM の発生から浄水処理による除去、もしくは水道水までの残存を調査し、その行方を追跡した。DOM 分析には Orbitrap MS を用いることで、DOM を分子レベルで分析し、個別の汚染物質の動態を評価した。さらに、MS/MS 分析を行うことで未知の汚染物質の構造を推定した。これらの研究データを蓄積することで、平常時に河川や浄水から検出される DOM コンポーネントや、注視すべき DOM のデータベースを作成した。

## 3-2 試料の採水と前処理

### 3-2-1 対象とする試料

本研究では、埼玉県を流れる一級河川荒川とその支流入間川の河川水、さらに荒川やその支流から取水する浄水場 7 ヶ所の浄水場工程水を対象とした。第 4 章では荒川、第 5 章では入間川及びそこから取水する浄水場、第 6 章では荒川から取水する浄水場の試料を用いて研究を行った。各試料の採水地点の詳細などは、各章で記述する。

### 3-2-2 試料の採水

河川水試料の採水は、レンタカーで現地へ行き、橋上からバケツ付きロープを落とす方法で行った。バケツはステンレス製の 2 L バケツを用い、採水前に Milli-Q 水で洗った後に河川水で共洗いしてから用いた。ただし、第 5 章で示す入間川の最上流地点 (R1) では、川幅が狭く水深が浅いため、河川中央付近から直接採水瓶に採水する方法で採水した。採水瓶は、2 L の広口ガラス瓶を加熱処理 (550 °C, 6 時間) により有機物除去してから用いた。採水はいずれの試料も 2 L 瓶で 2 個分を行った。2 L 瓶は満杯に注ぐと約 2.3 L の容量があるので、一つの試料につき約 4.6 L 採水したことになる。採水後はガラス蓋をして密閉し、蓋が外れないようにガムテープで固定した後、クーラーバッグに入れて冷暗状態で実験室まで速やかに運んだ。採水時にはろ過等の処理はしなかった。

入間川における採水では、採水日当日の朝に大学を出発し最上流地点へ向かい、上流地点から河川に沿って下流地点へ順番に採水を行った。荒川における採水では、採水日の前日に最上流地点付近まで行き前泊し、採水当日の朝から採水を開始した。入間川同様に、上流地点から順に採水を行った。すべての採水は当日中に行った。最上流地点の採水が終わってから実験室に到着し前処理を始めるまでに、最大で 9 時間かかった。

浄水場工程水の採水は、筆者が浄水場へ行き採水する場合と、浄水場の担当者が採水したものを郵送してもらう場合とがあった。前者の場合、河川水を採水したものと同様のガラス瓶を浄水場へ持参し、工程水を直接汲むことで採水した。試料の採水から実験室へ戻るまで最大で 4 時間かかった。後者の場合、事前に同様のガラス瓶を浄水場へ郵送し、採水日当日の朝に担当者に採水をしていただき、その日の内に実験室への郵送手続きを行っていた。採水日翌日の午前中から昼過ぎに実験室へ到着し、試料の採水から前処理の開始まで最大で 30 時間かかった。浄水場の工程水も河川水同様、1 試料につき 2 L 瓶 2 個分採水した。

### 3-2-3 試料の前処理

採水した試料は、実験室に到着後速やかに有効孔径 0.3  $\mu\text{m}$  のガラス繊維ろ紙 (GF/75, Advantec) を用いて吸引ろ過した。ろ過に必要なガラス器具及びガラス繊維ろ紙は全て加熱処理 (550 °C, 6 時間) してから用いた。

その後 24 時間以内に、DOM の濃縮と脱塩のために固相抽出処理を行った。固相抽出カ

ートリッジは Bond Elut PPL (1 g, 6 mL, Agilent) を用いた。自動固相抽出器 Auto Trace (Thermo) を使用し、Table 3.1 に示す手順で固相抽出を行った。すなわち、最初に固相抽出カートリッジのコンディショニングのために、メタノール (LC/MS 用、富士フィルム和光純薬) を 20 mL 通水し、次に塩酸 (試薬特級、富士フィルム和光純薬) を用いて pH を 2.00 に調整した超純水 (LC/MS 用、富士フィルム和光純薬) を 20 mL 通水した。続いて、試料 1 L をカートリッジに流速 20 mL/min で通水した。試料は、カルボキシル基の解離を抑制し固相抽出による回収率を高めるために、事前に塩酸を用いて pH を 2.00 に厳密に調整した。試料の通水後、再度 pH を 2.00 に調整した Milli-Q 水を 10 mL 通水して洗浄し、窒素ガスを 30 分通風することでカートリッジを乾燥させた。最後に、10 mL のメタノールを流速 10 mL/min で通液することでカートリッジに捉えられた DOM を回収した。この処理により、DOM を 100 倍濃縮したことになる。固相抽出処理は、各試料につき 3 連で行った。ただし、荒川河川水のみ 1 連ずつで行った。

本手法による DOC の回収率は、本研究では直接測定していないが、60 %程度とされている。より回収率を高めるために他の方法も検討したが、Bond Elut PPL を用いた本手法がもっとも適しているという結論に至った。詳細については付録に示す (※この付録は予備審査版には記載していない)。

**Table 3.1 Auto Trace による固相抽出処理のフロー**

操作順	操作	溶液	流速(mL/min)	内容
①	Wash Syringe	メタノール	-	0.2 mLで洗浄
②	Condition Cartridge	メタノール	20	10 mLを通水 ×2
④	Wash Syringe	pH2 水	-	0.2 mLで洗浄
⑤	Condition Cartridge	pH2 水	20	10 mLを通水 ×2
⑥	Load Sample	サンプル	20	1 Lのサンプルを通水
⑦	Cartridge Rinse	pH2 水	20	10 mLを通水
⑧	Wash Syringe	メタノール	-	0.2 mLで洗浄
⑨	Dry Cartridge	-	-	窒素ガスを10分間吹き付け乾燥
⑩	Pause	-	-	一時停止
⑪	Elute to Collect	メタノール	10	10 mLのメタノールでDOM回収

### 3-2-4 ブランク試料

後述する LC/MS 試験のネガティブコントロール試料として、3-2-3 で示した手法を用いて Milli-Q 水を固相抽出処理した試料を作成した。

### 3-3 LC/MS 分析

#### 3-3-1 液体クロマトグラフィー

固相抽出処理した試料を，高速液体クロマトグラフ (High Performance Liquid Chromatograph; HPLC)－四重極－Orbitrap ハイブリッド型質量分析計を用いて LC/MS 分析した。HPLC は UltiMate 3000 シリーズ (Thermo Fisher Scientific, 送液ポンプは DGP-3600SD) を用いた。LC カラムには Inert Sustain AQ-C18 ( $1.9\ \mu\text{m}$ ,  $2.1 \times 50\ \text{mm}$ , GL science) カラムを用いた。本カラムは，類似したカラム 4 種と比較して，最も分離性能が高いと評価されたため用いた。移動相はそれぞれ 0.01 % のギ酸を添加した超純水とメタノール (全て LC/MS 用, 富士フィルム和光純薬) を用いて，Figure 3.1 に示すグラジエントを作成した。すなわち，分析開始時はメタノールの割合が 5 % であり，その後メタノールの割合を 95 % まで線形的に上昇させ，その状態を 10 分間維持した。その後，メタノールの割合を減少させ，分析開始時の状態へ戻した。試料の注入量は  $20\ \mu\text{L}$ ，分析時の移動相流量は  $0.3\ \text{mL/min}$  とし，カラム温度は  $40\ ^\circ\text{C}$  を維持した。この時，ポンプへかかる圧力は  $200\sim 300\ \text{bar}$  であった。

グラジエントの作成時には，メタノールが 95 % の時に平衡状態に達するように設定している。本研究で用いた LC カラムの容量は， $1.05\ \text{mm} \times 1.05\ \text{mm} \times 3.14 \times 50\ \text{mm}$  で計算でき，約  $173\ \text{mm}^3$  ( $=0.173\ \text{mL}$ ) である。一般に，カラム容量の 6 倍以上の流量があると平衡状態に達するので，約  $1.04\ \text{mL}$  以上の流量が必要になる。本グラジエントでは， $0.3\ \text{mL/min}$  で 5 分間維持しているのので， $1.5\ \text{mL}$  の流量があることになる。したがって，本研究ではメタノールが最大割合の時に平衡状態に達しており，十分に DOM を溶出できると考えられる。

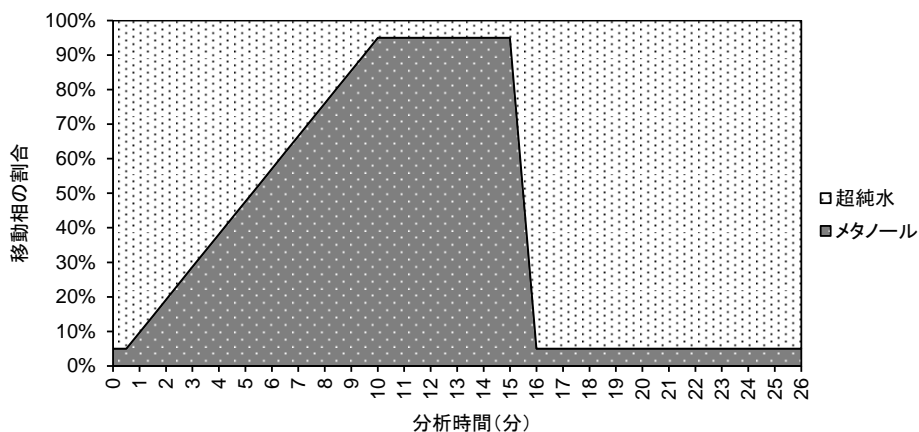


Figure 3.1 LC 分析に用いたグラジエント

#### 3-3-2 フルスキャンによる MS 分析

質量分析計には，エレクトロスプレーイオン化 (Electro Spray Ionization; ESI) ノズル付き Q Exactive focus (Thermo Fisher Scientific) を用いた。分析の際は，前日からメタノールを送液し分析を行うことで，分析部のウォームアップを行ってから分析を行った。分析を行う 2

時間ほど前に、外部キャリブレーションを行った。質量分析計のキャリブレーションは、Pierce ESI Negative Ion Calibration Solution (Thermo Fisher Scientific) を用いた。キャリブレーションの結果は、0.1~0.4 ppm であった。

質量分析計の真空状態は、Fore vacuum の値が 1.3~2.0 mBar, Ultra-High Vacuum の値が 1.5 E-11~5.0 E-10 mBar であった。

イオン化にはエレクトロスプレーイオン化法のネガティブイオン化モードを用いた。分析は対象  $m/z$  を 100-1000 とする Full MS モードで行い、水中の DOM をなるべく多く分析した。そのほかのパラメータは Table 3.2 の通りに設定した。Table 3.2 の Tune file パラメータは、Ishii\_Negative.tune に保存している。また、Tune file 情報と LC のパラメータ情報を統合した Method file は、Ishii\_Negative\_FulMS.method として保存している。この Method file を用いて、Sequence file を作成し、分析を行った。Sequence file は、分析日を含めて、yyyyymmdd\_Ishii.seq として保存している。

フルスキャン分析は、各採水の度に、前処理が完了してから概ね 1 ヶ月以内にその採水で得られた試料をまとめて分析している。各試料につき 3 連の固相抽出処理した試料があるので、それらを 1 度ずつ分析した。荒川河川水については、1 連しか固相抽出処理した試料がないので、1 つの試料を 3 度分析した。

**Table 3.2 分析時のパラメータ (Tune file)**

	パラメータ	値
Scan parameters	Scan type	Full MS
	Scan range	100 - 1,000 $m/z$
	Fragmentation	None
	Resolution	70,000*
	Polarity	Negative
	Microscans	1
	Lock masses	258.9604
	AGC target	1.00E+06
	Maximum inject time	50 ms
HESI parameters	Sheath gas flow rate	40 unit
	Aux gas flow rate	10 unit
	Sweep gas flow rate	0 unit
	Spray voltage	-2 kV
	Spray current	0.5 - 6 $\mu A^{**}$
	Capillary temperature	380 °C
	S-lens RF level	50
	Aux gas heater temp	300 °C

\* $m/z$  200 の時

\*\*分析時の値であり、設定は不可



(Method file)		
	パラメータ	値
Dionex Chromatography	Sampler tempCtrl	4 °C
	Column oven tempCtrl	40 °C
	Pump pressure upper limit	600 bar
Q Exactive Focus	Method duration	26 min
	Divert valve ON	0.1 - 23 min
	Polarity	Negative
	Scan range	100 to 1,000 <i>m/z</i>
	AGC target	1.00E+06
	Maximum inject time	50 ms
	Microscans	1
	Spectrum data type	Profile

### 3-2-3 MS/MS 分析

MS/MS 分析は、可能な限り多くの物質に対して行う **Discovery method** と、特定の物質のみを対象に分析する **Confirmation method** の 2 種類を行った。前者では、3-2-2 で述べたフルスキャンの直後に、データディペンデント MS/MS discovery モードにより、Full MS 分析での各スキャン時にピーク強度が高い上位 3 ピークを自動で選定し、MS/MS 分析を行った。フラグメント化エネルギーは **stepped CE** を用い 30, 50, 70 % に設定した。データ解析の後、より多くの MS/MS 情報が必要な物質に対しては、後者のデータディペンデント MS/MS **confirmation** モードを用いた。これにより、予めリストアップしたピークを対象に、MS/MS 分析を連続して行いより多くのフラグメントスペクトルを得た。MS/MS 分析で用いたパラメータを Table 3.3 に示す。**Discovery method** ではすべての分析で同じパラメータが使えるので、**DDDiscovery\_Ishii.method** として保存した。**Confirmation method** では、分析ごとに対象とするピークリストを **Inclusion list** として組み込む必要があるので、分析日時を含めて **yyyymmdd\_DDConfirmation\_Ishii.method** として保存した。

**Stepped CE** では、対象イオンの一部を分離し CE30 でフラグメント化した後に HCD セルに移動をまずし、次に対象イオンの一部を再度分離し、CE50 でフラグメント化した後に HCD セルに移動、最後に残りの対象イオンを CE70 でフラグメント化した後に HCD セルに移動する。その後、HCD セルに集められたフラグメントイオンを **C trap** へ移動し、Orbitrap で観測するという流れになる。すなわち、一度の MS/MS 分析で 3 パターンのフラグメントイオンを観測することができる。ただし、どのフラグメントピークがどの CE で出てきたのかを区別することはできない。

**Table 3. 3 MS/MS 分析時のパラメータ**

パラメータ	値
Resolution	17,500*
Isolation window	0.4 <i>m/z</i>
Stepped NCE	30, 50, 70
Default charge state	1
AGC target	1.00E+05
Maximum inject time	Auto
loop count	3**
Minimum AGC target	8.00E+03
intensity threshold	Auto
Dynamic exclusion	Auto
Exclusion isotope	on
Spectrum data type	Profile

\**m/z* 200 の時

\*\*data dependent Discovery の時のみ

### 3-4 マススペクトルの解析手法

#### 3-4-1 フルスキャンデータの解析

質量分析により得られたマススペクトルを，コンポーネント化ソフトウェア Compound Discoverer 3.0 (Thermo Fisher Scientific) により処理した。この処理では許容質量誤差を 3 ppm 以下，許容保持時間誤差を 0.2 分以下に設定し，同一の化合物から生成される同位体ピークやアダクトイオンピークを一つにまとめた。ここで統合されたピークを DOM コンポーネントと呼ぶ。また，Compound Discoverer 3.0 により，各コンポーネントの分子式を  $m/z$  と  $^{13}\text{C}$  や  $^{34}\text{S}$  の同位体イオンピークの検出パターンから推定するとともに，検出強度を計算した。そのほかのパラメータを Table 3.4 に示す。また，解析に用いたフロー図を Figure 3.2 に示す。本研究では，検出強度が 10,000 counts per second 以上であり，Milli-Q 水を固相抽出したブランク試料での検出強度よりも 10 倍以上高い強度で検出されたコンポーネントを，解析対象とした。表中に値のないパラメータは，デフォルト値を用いた。

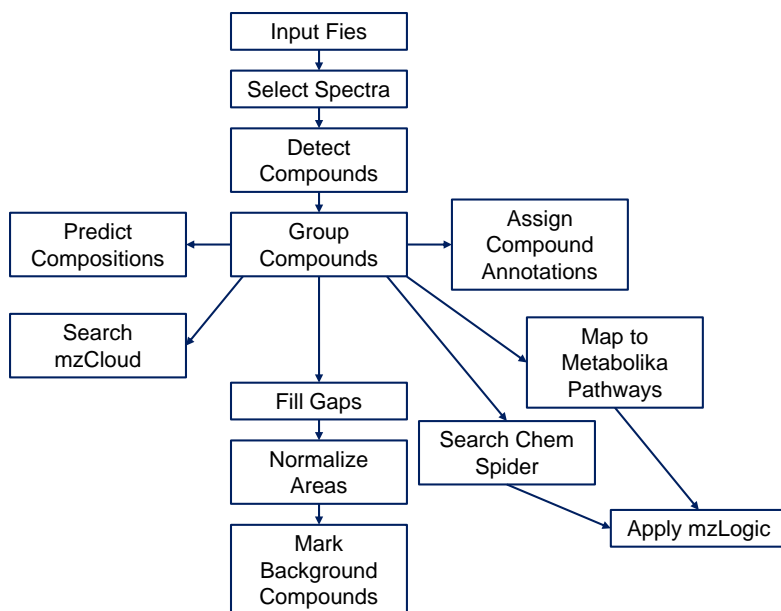


Figure 3.2 Compound Discoverer 3.0 による解析で用いたフロー図

**Table 3. 4 Compound Discoverer 3.0 のパラメータ**

ノード	パラメータ	値
Select Spectra	Lower RT limit	0.1 min
	Upper RT limit	23 min
	S/N threshold	3
	Unrecognized charge replacements	1
Detect Compounds	Mass tolerance	3 ppm
	Intensity tolerance	30%
	S/N threshold	3
	Min. peak intensity	10,000
	Ions	2M+FA-H, 2M-H, M+FA-H, M-H, M-H-H2O
	Min. element counts	C, H
	Max. element counts	C90, H190, Br1, Cl2, N4, O90, S4
Group Compounds	Mass tolerance	3 ppm
	RT tolerance	0.2 min
	Preferred ions	M-H
Predict Compositions	Mass tolerance	3 ppm
	Min. element counts	C, H
	Max. element counts	C90, H190, Br1, Cl2, N4, O90, S4
Search mzCloud	Match ion activation type	True
	Match ion activation energy	Match with Tolerance
	Ion activation energy	20
	Apply intensity threshold	True
	Match factor threshold	50
Map to Metabolika Pathways	Mass tolerance	3 ppm
Search ChemSpeder	Search mode	By Formula or Mass
	Mass tolerance	3 ppm
Apply mzLogic	Match factor threshold	30
Assign Compound Annotations	Mass tolerance	3 ppm
Fill Gaps	Mass tolerance	3 ppm
	S/N threshold	3

### 3-4-2 分子式の推定

分子式の推定方法は、DOM 組成全体を評価するための方法と、重要コンポーネントを精度高く推定するための方法の 2 種類を用いた。一つ目の方法は、分子式の構成元素は C, H, O, N, S, Cl, Br のみを考慮し、Compound Discoverer による推定と、Compound Identification Algorithm (CIA) による推定を組み合わせた方式である。まず Compound Discoverer による推定では、Table 3.4 の Predict Composition ノードに示した条件で分子式の推定を行った。ここでは、<sup>13</sup>C や <sup>34</sup>S などの同位体イオン由来のピーク強度を抽出し、その検出強度が許容範囲内であることも確認されている。同位体イオンの確認についてはデフォルト値 (質量誤差 5 ppm 以内, 検出強度誤差 30 %以内, 同位体イオンピークの検出数 1) を設定している。次に Compound Discoverer により推定された分子式を元として、CIA により近縁な分子式を推

定した。これは、環境水中に存在する DOM は微生物や太陽光による分解の影響を受けており、グループとして存在しているという仮説のもと、分子式を推定する方法である。ここで言うグループは 2 種類あり、一つ目はヘテロ原子の数や不飽和度が同じであるが、 $\text{CH}_2$  の鎖の長さが異なる分子群のグループである。二つ目は、ある分子の  $\text{CH}_4$  が  $\text{O}$  に入れ替わった形の分子群のグループである。例えば、 $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$  という分子式が得られたとする。その時に、 $\text{CH}_2$  の整数倍分質量差がある分子や、 $\text{CH}_4$  と  $\text{O}$  の差分の整数倍分質量差があるコンポーネントの分子式を、もとの分子からたどって計算するということである。その結果、 $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$  といった分子式や、 $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_3$  といった分子式が推定される可能性が高くなる。この時、質量誤差は 5 ppm 以内まで許容し、同位体イオンピークが検出されていなくても許容することとする。この方式により、ピーク強度が低いために質量誤差が大きくなってしまいうコンポーネントや、同位体イオンピークまで観測できないコンポーネントに対しても、精度高く分子式を推定することが可能である。

二つ目の方法は、本研究で重要と指定されたコンポーネントの分子式を、より精度高く推定する方法であり、元データであるマススペクトルに立ち戻り同位体イオンピークを実際に確認して推定する方法である。特に、特徴的な同位体イオンピークを持つ硫黄や塩素、臭素原子が含まれると推定された場合には、その同位体イオンピークの存在を確実に確かめた。

### 3-4-3 分子特性の計算

検出した DOM の特性を表すために、本研究ではいくつかの指標を用いる。炭素-水素比 (H/C) は、その名の通り、ある分子の分子式中に含まれる炭素原子と水素原子の数の比を取ることで計算される (式 3.1)。同様に炭素-酸素比 (O/C) は、分子式中の炭素原子と酸素原子の数の比を取ることで計算される (式 3.2)。

不飽和結合等量 (Double Bond Equivalent; DBE) は、2 重結合や環状結合の数を表す指標であり、ある分子の分子式中に含まれる炭素原子と水素原子の数から、式 3.3 のように計算される。また、DBE から分子式中に含まれる酸素原子の数を引いた値 (DBE-O) と、それを炭素原子の数で除した値 ((DBE-O)/C) は、それぞれ式 3.4, 3.5 により計算される。(DBE-O)/C は、炭素原子一つあたりの不飽和結合度を表す指標として用いられる。

炭素原子の酸化度数 (Oxygenated State of Carbons; Cos) は、ある分子式中の炭素、水素、酸素原子の数をを用いて、式 3.6 のように計算される。

ケンドリックマス (Kendrick Mass; KM) は、ある分子の精密質量と、 $\text{CH}_2$  の精密質量 (14.01565) 及びその整数質量 (14) を用いて、式 3.7 のように計算される。また、KM の差分 (Kendrick Mass Defect; KMD) は、KM と KM の整数部分を用いて式 3.8 のように計算される。KMD は、同じ骨格でヘテロ原子の数が同じ場合、同じ値を取るように計算されている。

また、各分子を構成する原子から、元素組成グループを CHO, CHON, CHOS, CHONS の 4

つに分類した。ここに挙げた以外の原子を含む DOM も検出されているが、それらは構成元素組成グループには含んでいない。

$$H/C = H \div C \quad (\text{式 3.1})$$

$$O/C = O \div C \quad (\text{式 3.2})$$

$$DBE = 1 + 0.5 \times (2C - H) \quad (\text{式 3.3})$$

$$DBE - O = 1 + 0.5 \times (2C - H) - O \quad (\text{式 3.4})$$

$$(DBE - O)/C = \{1 + 0.5 \times (2C - H) - O\} \div C \quad (\text{式 3.5})$$

$$C_{OS} = -(H - 2O) \div C \quad (\text{式 3.6})$$

$$KM = \text{IUPAC mass of a formula} \times (14 \div 14.01565) \quad (\text{式 3.7})$$

$$KMD = |\text{nominal KM} - KM| \quad (\text{式 3.8})$$

※C, H, O はそれぞれ、分子式中の炭素、水素、酸素原子の数を表す

#### 3-4-4 構造推定

MS/MS 分析の結果は、まず Compound Discoverer の Search mzCloud ノードにより、データベース mzCloud 中のデータと比較した。その結果、類似する物質が見つかった場合には、その一致度を Score 化した。また、可能な場合は標品を入手し、その分析結果と比較した。mzCloud のデータの中から類似した物質が見つからない場合は、その分子式によりデータベース ChemSpider から検索し、もっともらしい構造をもつ物質をスクリーニングした。それらの理論的な MS/MS スペクトルをシミュレーションソフトウェア MetFrag により解析し、分析結果と比較し、一致するフラグメントピーク数を数えた。また、可能な場合は、理論的にフラグメント化し得る構造を推定し、それにより元の構造推定を試みた。

## 3-5 統計解析

### 3-5-1 解析環境

得られたデータの統計解析は、Python 3 を用いて行った。Python 3 による計算は、Jupyter notebook 5.4 を用いて行った。

### 3-5-2 PCoA 分析

試料間の類似度を評価するために、主座標分析 (Principal Coordinate Analysis; PCoA) を行った。PCoA のモジュールは、Python 3 の基本ライブラリである Scikit learn 中にある Multi-Dimensional Analysis を使用した。使用したコードを Table 3.5 に示す。PCoA では、各試料から検出されたピークのピーク強度を元に計算される。各ピーク強度は、対数正規化してから使用した。Orbitrap MS の分析データに対して対数正規化を行うことが適切かどうかは、付録に示している (※この付録は予備審査版には記載していません)。

PCoA の結果は 2 次元にプロットされ、プロットされる位置に近い試料は、類似度が高い試料ということになる。試料の類似度は、相関係数をもとに計算した。

Table 3.5 PCoA 分析に用いた Python 3 のコード

```
import pandas as pd
import scipy, sklearn
from scipy.spatial.distance import pdist, squareform
from sklearn import manifold

df = pd.read_csv('source.csv', index_col=0, header=0)

df_d = pd.DataFrame(squareform(pdist(df)))
df_d.columns = df.index
df_d.index = df.index

mds = manifold.MDS(n_components=2, dissimilarity = 'precomputed')
pos = mds.fit_transform(df_d)
posdata = pd.DataFrame(pos)
posdata.index = df.index
posdata.to_excel('result.xlsx')
```

### 3-6 基本水質の測定

#### 3-6-1 採水現場で測定する項目

河川水試料の採水時に、水温と電気伝導度をポータブル EC テスター（HI 98129, Hanna Instruments）で測定した。測定の際は、試料をバケツにとり、そこにテスターの電極を入れ攪拌し、数十秒後に数値が安定したところできろくした。また、入間川では、河川の流量を数地点、採水時に川幅、および水深を 2-3 地点測定して流路断面を計測するとともに、電磁流速計（AEM1-DA, JFE アドバンテック）により流速を測定し、流量を計算した。

#### 3-6-2 DOC 濃度

実験室において、有効孔径 0.3  $\mu\text{m}$  のガラス繊維ろ紙（GF/75, Advantec）を用いてろ過した後、DOC 濃度を測定した。DOC 濃度は TOC-L CSH（Shimadzu）を用いて、不揮発性有機炭素法により測定した。

#### 3-6-3 アンモニア態窒素濃度

アンモニア態窒素濃度は、電量滴定方式アンモニア計（AT-2000, Central Kagaku）を用いて測定した。

#### 3-6-4 陰イオン類

陰イオン類は、塩化物イオン（ $\text{Cl}^-$ ）、臭化物イオン（ $\text{Br}^-$ ）硝酸態窒素（ $\text{NO}_3^-$ -N）、亜硝酸態窒素（ $\text{NO}_2^-$ -N）リン酸態リン（ $\text{PO}_4^{3-}$ -P）、硫酸イオン（ $\text{SO}_4^{2-}$ ）の濃度を、イオンクロマトグラフ（コンパクト IC 861 型, Metrohm）により測定した。カラムは TSKgel SuperIC-Anion HS（4.6 mm  $\times$  10 cm, 3.5  $\mu\text{m}$ , Tosoh Corporation）を用いた。カラムオーブンの温度は 40  $^{\circ}\text{C}$  に設定した。



## 第 4 章 河川水中に存在する未規制汚染物質の探索

### ※要旨のみ記載

第 4 章では、埼玉県を流れる荒川を対象とし、その上流から下流までの全 6 地点における河川水中の DOM を、HRMS の一つである Orbitrap 型質量分析計 (Orbitrap MS) で NTS 分析することにより、人為由来の DOM の河川流下過程における挙動を評価した。また、河川水中の DOM をその検出頻度によりスクリーニングし、規制対象となっていない DOM の中で今後注視すべきものを選定し、それらの構造や特性を MS/MS 分析により推測した。

分析の結果、荒川河川水からは合計で 9 千種類以上の DOM コンポーネント (同位体イオンや異なるアダクトによるイオン由来のピークをまとめたもの) が検出された。DOM の特徴を推定された分子式により評価した。荒川の上流地点と下流地点から検出される DOM コンポーネントを比較することにより、河川の流下過程で流入する汚染 DOMの中には、分子式中の炭素-水素比 (H/C) が高く炭素-酸素比 (O/C) が低いコンポーネントが含まれていることが分かった。人為的な汚染が極めて少ない、荒川の最上流地点から検出される DOM コンポーネントを自然由来、それ以外の DOM コンポーネントを人為由来と定義すると、人為由来の DOM は流下過程で種類数が増加したが、自然由来の DOM はほとんど変化しなかった。人為由来の DOM は地点間で異なったものが検出され、さらに採水日が異なるとその組成は大きく異なることが明らかとなった。人為由来の DOM コンポーネントを検出回数により順位付けし、高検出頻度のものを対象に MS/MS 分析による構造推定を行ったところ、3 種類については確度高く構造推定を行うことができた。これら 3 種類は、現時点では環境基準や水道水質基準等の規制が定められていない化学物質であるが、それらの化学的特徴と荒川から頻繁に検出されているということを考慮すると、今後注視すべき DOM であると言える。

## 第 5 章 下水処理水由来の溶存有機物の河川への流入から浄水処理後

### までの追跡

#### ※要旨のみ記載

第 5 章では、荒川の支流の一つである入間川の 4 地点と、入間川へ排出される下水処理水、さらに下水処理水の流入後に入間川から取水する K 浄水場の工程水を Orbitrap MS により NTS 分析し、それぞれの DOM 組成を明らかにして比較した。下水処理水に含まれる DOM の河川水への影響や浄水処理における消長を評価し、下水処理水由来の DOM の河川への流入から浄水処理後までの追跡を行った。

分析の結果、入間川河川水中の DOM コンポーネント数は河川の流下に従い上昇傾向にあり、特に下水処理水の流入後に大きく上昇することが明らかになった。下水処理水流入後の地点における溶存有機炭素の負荷量は約 6 割が下水処理水由来であると計算され、検出された DOM コンポーネントの 2～5 割が下水処理水由来と分類された。K 浄水場の原水からは、河川水と同様に下水処理水由来の DOM コンポーネントが検出された。K 浄水場における浄水処理により、6 回の採水中 5 回で DOC 濃度と検出コンポーネント数が減少した。浄水場原水中の自然由来の DOM コンポーネントは平均で約 2 割減少したのに対し、下水処理水由来の DOM コンポーネントは 3～5 割減少していた。浄水中に残存する DOM コンポーネントは、約半数が自然由来、約 4 割が下水処理水由来、約 1 割が浄水場で新たに生成される DOM コンポーネントであった。下水処理水由来の DOM コンポーネントは採水回ごとの変動が自然由来と比較して大きく、約半数が各採水回における固有のものであった。浄水中に存在する下水処理水由来の DOM コンポーネントの中で、複数回の採水で共通して検出されたものを重要な DOM であると指定し、それらの内 3 種類の構造推定を行うことができた。

## 第 6 章 複数の浄水場における溶存有機物除去の比較

### ※要旨のみ記載

第 6 章では、浄水場の原水に含まれる DOM が浄水処理によりどう変化するかを、荒川より取水する 6 ヶ所の浄水場を対象として分析した。原水中の DOM を自然由来と人為由来とに分類し、さらにそれらを浄水処理で除去可能かどうかで分類することで、浄水処理において重要な DOM コンポーネントのスクリーニングを行った。また、高度浄水処理の影響や、浄水場で生成されるコンポーネントについても評価した。

浄水場原水の分析結果は、第 4 章の荒川の分析結果と類似しており、荒川の下流で取水する浄水場の試料ほど検出される DOM コンポーネント数が大きくなる傾向があった。浄水の分析結果も原水の結果と似た傾向を示していた。原水中と浄水中の DOM 組成を比較することにより、浄水処理により除去される DOM コンポーネントや、除去されずに浄水まで残存する DOM コンポーネント、浄水処理により新たに生成される DOM コンポーネントに分類した。浄水処理により除去されやすい DOM コンポーネントは、O/C の値が小さく、酸化度が小さいものが多いことが示唆された。人為由来の DOM コンポーネントは浄水処理により約 50 % 除去されていたのに対し、自然由来の DOM コンポーネントの除去率は 20 % 程度であった。高度除水処理を導入している浄水場では、特に O/C の値が小さい DOM コンポーネントが多く除去されていた。浄水処理により新たに生成される DOM コンポーネントの中には、塩素原子や臭素原子を含むものも検出されたが、複数の採水で共通して検出されるものは約半数で、残りは各浄水場固有のものであった。

## 第 7 章 河川水及び浄水中溶存有機物の整理とデータベースの作成

### ※要旨のみ記載

第 7 章では、第 4 章から第 6 章までで検出された DOM コンポーネントをまとめ直し、データベースとして整理した。第 4 章と第 5 章との比較では、荒川と入間川とで検出される自然由来の DOM コンポーネントが大きく異なることが示され、流域の土壌や植生、上流のダムの有無等が影響を与えていることが推測された。また、人為由来と下水処理水由来の DOM コンポーネントの比較では、荒川で検出された人為由来の DOM コンポーネントの約 2 割は入間川において下水処理水由来と分類されていることが分かった。第 4 章と第 6 章の比較では、荒川の河川水と浄水場の原水とを比較し、両者から共通して検出される DOM コンポーネントが多く存在していることが分かった。

本研究では、第 4 章から第 6 章までの合計で 2 万種類以上の DOM コンポーネントが検出された。これらを、荒川及びその支流から検出され得る DOM コンポーネントとして、データベースとなるように整理し、インターネット上に公開した。データベースには、各コンポーネントの精密分子量、推定された分子式、検出強度、検出頻度、推定された起源、浄水処理における除去率などが記載されており、DOM 管理を行う技術者や研究者が閲覧し利用できるようにした。このデータベースは、平常時に検出される DOM の一覧として異常発生時に原因物質を特定する際に活用されたり、新たな規制物質の過去の検出状況を確認する際に用いられったりすることが期待される。

## 第 8 章 結論

### 8-1 本研究の成果

本研究では、第 4 章で大規模な河川を対象に、第 5 章ではその支流とそこへ流入する下水処理水及びそこから取水する浄水場を対象に、第 6 章では第 4 章の河川から取水する 6 ヶ所の浄水場を対象に溶存有機物（DOM）の分析を行った。Orbitrap 型質量分析計（Orbitrap MS）等を用いた分析が多く行われるようになってきているにもかかわらず、流域単位での DOM 分析はあまり例がない。本研究では汚染 DOM が河川へ流入するところから浄水処理までを一貫して分析対象とすることで、DOM の河川流下過程における挙動から浄水処理における消長までを追跡することができた。また、人為的な汚染のない地点の河川水を分析することにより、検出される DOM を自然由来のものと人為由来や下水処理水由来のものと分類することができ、これにより優先的に解析すべきコンポーネントの順位付けを行うことができた。

本研究では、高分解能質量分析計である Orbitrap MS を用いて、河川水を中心に下水処理水や浄水場工程水中の DOM を分析することで、水中の DOM 組成を明らかにし、現在規制のない物質の検出状況や特性を明らかにした。本研究で用いた LC/MS 分析により、水中に存在する DOM を述べ 2 万種類以上検出することができ、それらの半定量的な存在量と分子式推定による特性評価を行うことができた。本研究では事前に分析対象とする物質を定めないノンターゲットスクリーニング（NTS）分析を行い、水中の DOM を可能な限り網羅的に分析することで重要なコンポーネントの選定を行った。

これらの成果は、Orbitrap MS による NTS 分析が、河川水中や浄水場工程水中 DOM の監視のために有効に活用できる可能性を示唆している。現行の特定の物質のみを監視対象とする安全管理に加えて、DOM の網羅的な監視を行うことで、未知の原因物質による水質事を迅速に発見し、対応することが可能となると見込まれる。また、平常時に検出される DOM コンポーネントをデータベースとして蓄積しておくことで、水質事故等の原因物質探索や、新たな規制物質を定める際の重要な記録となる。今後のより高度な水道水質管理のために、Orbitrap MS を用いた DOM 分析が多くの河川や浄水場を対象として行われることが望まれる。

## 8-2 今後の課題

本研究の今後の課題は、大きなものとして二つある。

一つ目は、DOM の網羅分析を行っているにもかかわらず、水中の DOM すべてを分析することはできていないという点である。DOM すべてを分析できない主な原因は、固相抽出処理を行っていることにある。本研究では水中の DOM の濃縮を目的として固相抽出処理を行っているが、その回収率は 50-60 %と言われており、半分近くの DOC を分析できていないことになる。そのため、本分析手法を DOM 監視に用いることは有効であるが、それだけでは見落とししてしまう DOM が存在する可能性がある。固相抽出処理の回収率向上に向けた研究や、固相抽出処理以外の濃縮方法の開発、さらには感度の向上により濃縮処理を行わずに分析を行う方法の研究を進めていく必要がある。

二つ目の課題は、分子式推定や構造推定に多くのコストがかかるということである。分子式推定は自動化が可能となっているが、その推定の精度は筆者の推定で約 8 割程度である。DOM 組成の大枠を明らかにするためにはその程度の精度で問題はないと考えられるが、重要なコンポーネントの分子式はより精度高く推定すべきである。より精度の高い推定のためには、同位体イオン由来のピークの精査などが必要であるが、これは現時点では自動化できていない。また、構造推定に関しては、データベース mzCloud と容易に比較である場合などを除き、自動では行えず専門的な有機化学の知識を持った人が行わなくてはならない。さらに確度を高めるためには、推定した物質の標準物質を入手し分析結果の比較を行う必要がある。本研究でも、構造推定の進捗は芳しくなく、本論文執筆時も並行して行っているところである。

## 参考文献

### • 英語論文

- Beckers, Liza Marie, Werner Brack, Janek Paul Dann, Martin Krauss, Erik Müller, and Tobias Schulze. 2020. "Unraveling Longitudinal Pollution Patterns of Organic Micropollutants in a River by Non-Target Screening and Cluster Analysis." *Science of the Total Environment* 727:138388.
- Brunner, Andrea M., Cheryl Bertelkamp, Milou M. L. Dingemans, Annemieke Kolkman, Bas Wols, Danny Harmsen, Wolter Siegers, Bram J. Martijn, Wim A. Oorthuizen, and Thomas L. ter Laak. 2020. "Integration of Target Analyses, Non-Target Screening and Effect-Based Monitoring to Assess OMP Related Water Quality Changes in Drinking Water Treatment." *Science of the Total Environment* 705:135779.
- Carpenter, Corey M. G., Lok Yee J. Wong, Catherine A. Johnson, and Damian E. Helbling. 2019. "Fall Creek Monitoring Station: Highly Resolved Temporal Sampling to Prioritize the Identification of Nontarget Micropollutants in a Small Stream." *Environmental Science and Technology* 53(1):77–87.
- Ccancapa-Cartagena, Alexander, Yolanda Pico, Xavier Ortiz, and Eric J. Reiner. 2019. "Suspect, Non-Target and Target Screening of Emerging Pollutants Using Data Independent Acquisition: Assessment of a Mediterranean River Basin." *Science of the Total Environment* 687:355–68.
- Colman, Joan, Glenn E. Rice, J. Michael Wright, E. Sidney Hunter, Linda K. Teuschler, John C. Lipscomb, Richard C. Hertzberg, Jane Ellen Simmons, Margaret Fransen, Mark Osier, and Michael G. Narotsky. 2011. "Identification of Developmentally Toxic Drinking Water Disinfection Byproducts and Evaluation of Data Relevant to Mode of Action." *Toxicology and Applied Pharmacology* 254(2):100–126.
- Comisarow, M. B., and A. G. Marshall. 1974. "Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy." *Chem. Phys. Lett.* 25(2):282–83.
- Demarque, Daniel P., Antonio E. M. Crotti, Ricardo Vessecchi, João L. C. Lopes, and Norberto P. Lopes. 2016. "Fragmentation Reactions Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry: An Important Tool for the Structural Elucidation and Characterization of Synthetic and Natural Products." *Nat. Prod. Rep.* 33(3):432–55.
- Derrien, Morgane, Simona Retelletti Brogi, and Rafael Gonçalves-Araujo. 2019. "Characterization of Aquatic Organic Matter: Assessment, Perspectives and Research Priorities." *Water Research* 163:114908.
- Dittmar, Thorsten, Boris Koch, Norbert Hertkorn, and Gerhard Kattner. 2008. "A Simple and Efficient Method for the Solid-Phase Extraction of Dissolved Organic Matter ( SPE-DOM ) from Seawater." *Limnology and Oceanography: Methods* 6:230–35.
- Fabris, Rolando, Christopher W. K. Chow, Mary Drikas, and Bjørnar Eikebrokk. 2008. "Comparison of NOM Character in Selected Australian and Norwegian Drinking Waters." *Water Research* 42(15):4188–96.
- Fenner, Kathrin, Silvio Canonica, Lawrence P. Wackett, and Martin Elsner. 2013. "Evaluating Pesticide Degradation in the Environment: Blind Spots and Emerging Opportunities." *Science* 341(6147):752–58.
- Gonsior, Michael, Leanne C. Powers, Ernest Williams, Allen Place, Feng Chen, Alexander Ruf, Norbert Hertkorn, and Philippe Schmitt-kopplin. 2019. "The Chemodiversity of Algal Dissolved Organic Matter from Lysed Microcystis Aeruginosa Cells and Its Ability to Form Disinfection By-Products during Chlorination." *Water Research* 155:300–309.
- Gonsior, Michael, Philippe Schmitt-Kopplin, Helena Stavklint, Susan D. Richardson, Norbert Hertkorn, and David Bastviken. 2014. "Changes in Dissolved Organic Matter during the Treatment Processes of a Drinking Water Plant in Sweden and Formation of Previously Unknown Disinfection Byproducts." *Environmental Science and Technology* 48(21):12714–22.
- Gonsior, Michael, Matthew Zwartjes, William J. Cooper, Weihua Song, Kenneth P. Ishida, Linda Y. Tseng, Matthew K. Jeung, Diego Rosso, Norbert Hertkorn, and Philippe Schmitt-Kopplin. 2011. "Molecular Characterization of Effluent Organic Matter Identified by Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry." *Water Research* 45(9):2943–53.
- Goslan, Emma H., Céline Seigle, Diane Purcell, Rita Henderson, Simon A. Parsons, Bruce Jefferson, and Simon J. Judd. 2017. "Carbonaceous and Nitrogenous Disinfection By-Product Formation from Algal Organic Matter." *Chemosphere* 170:1–9.
- Hawkes, A., Thorsten Dittmar, Claudia Patriarca, Lars Tranvik, and Jonas Bergquist. 2016. "Evaluation of the Orbitrap Mass Spectrometer for the Molecular Fingerprinting Analysis of Natural Dissolved Organic Matter." *Analytical Chemistry* 88:7698–7704.
- Hawkes, Jeffrey A., Rachel L. Sleighter, Hongmei Chen, G. Patrick, Amna Ijaz, Maryam Khaksari, Simeon Schum, Lynn Mazzoleni, Rosey Chu, Nikola Tolic, William Kew, Nancy Hess, Jitao Lv, Shuzhen Zhang, Chen He, Quan Shi, Ryan

- H. S. Hutchins, Diana Catalina, Palacio Lozano, Hugh E. Jones, Mary J. Thomas, Mark P. Barrow, Helena Osterholz, Thorsten Dittmar, Gerd Gleixner, Stephanie M. Berg, Christina K. Remucal, Richard B. Cole, Beatriz Noriega-ortega, Gabriel Singer, Nikola Radoman, D. Nicholas, Aron Stubbins, Jeffrey N. Agar, Phoebe Zito, and David C. Podgorski. 2020. "An International Laboratory Comparison of Dissolved Organic Matter Composition by High Resolution Mass Spectrometry: Are We Getting the Same Answer?" *In Press* 1–40.
- Helbling, Damian E., Juliane Hollender, Hans Peter E. Kohler, Heinz Singer, and Kathrin Fenner. 2010. "High-Throughput Identification of Microbial Transformation Products of Organic Micropollutants." *Environmental Science and Technology* 44(17):6621–27.
- Hertkorn, Norbert, Moritz Frommberger, Matthias Witt, Boris P. Koch, Philippe Schmitt-Kopplin, and E. Michael Perdue. 2008. "Natural Organic Matter and the Event Horizon of Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* 80(23):8908–19.
- Hogenboom, A. C., J. A. van Leerdam, and P. de Voogt. 2009. "Accurate Mass Screening and Identification of Emerging Contaminants in Environmental Samples by Liquid Chromatography-Hybrid Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1216(3):510–19.
- Hohrenk, Lotta L., Maryam Vosough, and Torsten C. Schmidt. 2019. "Implementation of Chemometric Tools to Improve Data Mining and Prioritization in LC-HRMS for Nontarget Screening of Organic Micropollutants in Complex Water Matrixes." *Analytical Chemistry* 91(14):9213–20.
- Hollender, Juliane, Emma Louise Schymanski, Heinz Singer, and P. Lee Ferguson. 2017. "Non-Target Screening with High Resolution Mass Spectrometry in the Environment: Ready to Go?" *Environmental Science & Technology* (1):acs.est.7b02184.
- Hu, Qizhi, Robert J. Noll, Hongyan Li, Alexander Makarov, Mark Hardman, and R. Graham Cooks. 2005. "The Orbitrap: A New Mass Spectrometer." *Journal of Mass Spectrometry* 40(4):430–43.
- Huang, Rui, Zhiqi Liu, Boyin Yan, Jingjing Zhang, Dongmei Liu, Yongpeng Xu, Peng Wang, Fuyi Cui, and Zhiqian Liu. 2019. "Formation Kinetics of Disinfection Byproducts in Algal-Laden Water during Chlorination: A New Insight into Evaluating Disinfection Formation Risk." *Environmental Pollution* 245:63–70.
- Hughey, C. A., C. L. Hendrickson, R. P. Rodgers, A. G. Marshall, and K. Qian. 2001. "Kendrick Mass Defect Spectrum: A Compact Visual Analysis for Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra." *Analytical Chemistry* 73(19):4676–81.
- Kern, Susanne, Kathrin Fenner, Heinz P. Singer, René P. Schwarzenbach, and Juliane Hollender. 2009. "Identification of Transformation Products of Organic Contaminants in Natural Waters by Computer-Aided Prediction and High-Resolution Mass Spectrometry." *Environmental Science and Technology* 43(18):7039–46.
- Keski-Hyynilä, Helena, Mika Kurkela, Eivor Elovaara, Laurence Antonio, Jacques Magdalou, Leena Luukkanen, Jyrki Taskinen, and Risto Kostiainen. 2002. "Comparison of Electrospray, Atmospheric Pressure Chemical Ionization, and Atmospheric Pressure Photoionization in the Identification of Apomorphine, Dobutamine, and Entacapone Phase II Metabolites in Biological Samples." *Analytical Chemistry* 74(14):3449–57.
- Kim, Sunghwan, Robert W. Kramer, and Patrick G. Hatcher. 2003. "Graphical Method for Analysis of Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra of Natural Organic Matter, the Van Krevelen Diagram." *Analytical Chemistry* 75(20):5336–44.
- Kind, Tobias, and Oliver Fiehn. 2007. "Seven Golden Rules for Heuristic Filtering of Molecular Formulas Obtained by Accurate Mass Spectrometry." *BMC Bioinformatics* 8(1):105.
- Koch, Boris P., Thorsten Dittmar, Matthias Witt, and Gerhard Kattner. 2007. "Fundamentals of Molecular Formula Assignment to Ultrahigh Resolution Mass Data of Natural Organic Matter." *Analytical Chemistry* 79(4):1758–63.
- Koch, Boris P., Matthias Witt, Ralph Engbrodt, Thorsten Dittmar, and Gerhard Kattner. 2005. "Molecular Formulae of Marine and Terrigenous Dissolved Organic Matter Detected by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69(13):3299–3308.
- Kolkman, Annemieke, Bram J. Martijn, Dennis Vughs, Kirsten A. Baken, and Annemarie P. van Wezel. 2015. "Tracing Nitrogenous Disinfection Byproducts after Medium Pressure UV Water Treatment by Stable Isotope Labeling and High Resolution Mass Spectrometry." *Environmental Science and Technology* 49(7):4458–65.
- Krauss, Martin, Heinz Singer, and Juliane Hollender. 2010. "LC-High Resolution MS in Environmental Analysis: From Target Screening to the Identification of Unknowns." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(3):943–51.
- Kujawinski, Elizabeth B., and Mark D. Behn. 2006. "Automated Analysis of Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectra of Natural Organic Matter." *Analytical Chemistry* 78(13):4363–73.
- Kujawinski, Elizabeth B., Patrick G. Hatcher, and Michael a Freitas. 2001. "High-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Humic and Fulvic Acids: Improvements and Comparisons." *Analytical Chemistry* 74(2):413–19.
- Kujawinski, Elizabeth B., Krista Longnecker, Neil v Blough, Rossana Del, Liam Finlay, Joshua B. Kitner, and Stephen J.



- Giovannoni. 2009. "Identification of Possible Source Markers in Marine Dissolved Organic Matter Using Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73(15):4384–99.
- Kujawinski, Elizabeth B., Rossana del Vecchio, Neil v. Blough, Geoffrey C. Klein, and Alan G. Marshall. 2004. "Probing Molecular-Level Transformations of Dissolved Organic Matter: Insights on Photochemical Degradation and Protozoan Modification of DOM from Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry." *Marine Chemistry* 92(1–4 SPEC. ISS.):23–37.
- Lavonen, E. E., D. N. Kothawala, L. J. Tranvik, M. Gonsior, P. Schmitt-Kopplin, and S. J. Köhler. 2015. "Tracking Changes in the Optical Properties and Molecular Composition of Dissolved Organic Matter during Drinking Water Production." *Water Research* 85:286–94.
- Li, Yan, Mourad Harir, Jenny Uhl, Basem Kanawati, Marianna Lucio, Kirill S. Smirnov, Boris P. Koch, Philippe Schmitt-Kopplin, and Norbert Hertkorn. 2017. "How Representative Are Dissolved Organic Matter (DOM) Extracts? A Comprehensive Study of Sorbent Selectivity for DOM Isolation." *Water Research* 116:316–23.
- Liigand, Jaanus, Tingting Wang, Joshua Kellogg, Jørn Smedsgaard, Nadja Cech, and Anneli Krueve. 2020. "Quantification for Non-Targeted LC/MS Screening without Standard Substances." *Scientific Reports* 10(1):1–10.
- Liu, Chao, Mahmut S. Ersan, Michael J. Plewa, Gary Amy, and Tanju Karanfil. 2018. "Formation of Regulated and Unregulated Disinfection Byproducts during Chlorination of Algal Organic Matter Extracted from Freshwater and Marine Algae." *Water Research* 142:313–24.
- Liu, Xiaolu, Jingqi Wang, Tingting Liu, Weiwen Kong, Xiaoqing He, Yi Jin, and Bolin Zhang. 2015. "Effects of Assimilable Organic Carbon and Free Chlorine on Bacterial Growth in Drinking Water." *PLoS ONE* 10(6):1–11.
- Marshall, Alan G., Christopher L. Hendrickson, and George S. Jackson. 1998. "FOURIER TRANSFORM ION CYCLOTRON RESONANCE MASS SPECTROMETRY: A PRIMER." *Mass Spectrometry Review* 17(1):1–35.
- Matsushita, Taku, Shiho Honda, Taisuke Kuriyama, Yuki Fujita, Takashi Kondo, Yoshihiko Matsui, Nobutaka Shirasaki, Hirokazu Takanashi, and Takashi Kameya. 2018. "Identification of Mutagenic Transformation Products Generated during Oxidation of 3-Methyl-4-Nitrophenol Solutions by Orbitrap Tandem Mass Spectrometry and Quantitative Structure–Activity Relationship Analyses." *Water Research* 129:347–56.
- Matsushita, Taku, Ayako Morimoto, Taisuke Kuriyama, Eisuke Matsumoto, Yoshihiko Matsui, Nobutaka Shirasaki, Takashi Kondo, Hirokazu Takanashi, and Takashi Kameya. 2018. "Removals of Pesticides and Pesticide Transformation Products during Drinking Water Treatment Processes and Their Impact on Mutagen Formation Potential after Chlorination." *Water Research* 138:67–76.
- Meeachran, Andrew D., Kamel Mansouri, Chris Grulke, Emma L. Schymanski, Christoph Ruttkies, and Antony J. Williams. 2018. "'MS - Ready' Structures for Non - Targeted High - Resolution Mass Spectrometry Screening Studies." *Journal of Cheminformatics* 10(45):1–16.
- Mechelke, Jonas, Philipp Longrée, Heinz Singer, and Juliane Hollender. 2019. "Vacuum-Assisted Evaporative Concentration Combined with LC-HRMS/MS for Ultra-Trace-Level Screening of Organic Micropollutants in Environmental Water Samples." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2555–67.
- Negreira, Noelia, Jorge Regueiro, Miren Lopez de Alda, and Damia Barcelo. 2015. "Transformation of Tamoxifen and Its Major Metabolites during Water Chlorination: Identification and in Silico Toxicity Assessment of Their Disinfection Byproducts." *Water Research* 85:199–207.
- Olsen, J. v, L. M. de Godoy, G. Li, B. Macek, P. Mortensen, R. Pesch, A. Makarov, O. Lange, S. Horning, and M. Mann. 2005. "Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-Trap." *Mol Cell Proteomics* 4(12):2010–21.
- Pan, Qiong, Xiaocun Zhuo, Chen He, Yahe Zhang, and Quan Shi. 2020. "Validation and Evaluation of High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry on Molecular Characterization of Dissolved Organic Matter." *ACS Omega* 5(10):5372–5379.
- Park, Ji Won, Hyun Chul Kim, Anne S. Meyer, Sungpyo Kim, and Sung Kyu Maeng. 2016. "Influences of NOM Composition and Bacteriological Characteristics on Biological Stability in a Full-Scale Drinking Water Treatment Plant." *Chemosphere* 160:189–98.
- Petras, Daniel, Irina Koester, Ricardo da Silva, Brandon M. Stephens, Andreas F. Haas, Craig E. Nelson, Linda W. Kelly, Lihini I. Aluwihare, and Pieter C. Dorrestein. 2017. "High-Resolution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Enables Large Scale Molecular Characterization of Dissolved Organic Matter." *Frontiers in Marine Science* 4:405.
- Petrie, Bruce, Ruth Barden, and Barbara Kasprzyk-Hordern. 2014. "A Review on Emerging Contaminants in Wastewaters and the Environment: Current Knowledge, Understudied Areas and Recommendations for Future Monitoring." *Water Research* 72(0):3–27.

- Phungsai, Phanwatt, Futoshi Kurisu, Ikuro Kasuga, and Hiroaki Furumai. 2016. "Molecular Characterization of Low Molecular Weight Dissolved Organic Matter in Water Reclamation Processes Using Orbitrap Mass Spectrometry." *Water Research* 100:526–36.
- Phungsai, Phanwatt, Futoshi Kurisu, Ikuro Kasuga, and Hiroaki Furumai. 2018. "Changes in Dissolved Organic Matter Composition and Disinfection Byproduct Precursors in Advanced Drinking Water Treatment Processes." *Environmental Science and Technology* 52(6):3392–3401.
- Phungsai, Phanwatt, Futoshi Kurisu, Ikuro Kasuga, and Hiroaki Furumai. 2019. "Molecular Characteristics of Dissolved Organic Matter Transformed by O<sub>3</sub> and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Treatments and the Effects on Formation of Unknown Disinfection by-Products." *Water Research* 159:214–22.
- Piper, Thomas, U. Mareck, Hans Geyer, Ulrich Flenker, Mario Thevis, P. Platen, and W. Schanzer. 2008. "Determination of 13C/12C Ratios of Endogenous Urinary Steroids: Method Validation, Reference Population and Application to Doping Control Purposes." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* : RCM 22:2161–75.
- Samanipour, Saer, Sarit Kaserzon, Soumini Vijayasathiy, Hui Jiang, Phil Choi, Malcolm J. Reid, Jochen F. Mueller, and Kevin v. Thomas. 2019. "Machine Learning Combined with Non-Targeted LC-HRMS Analysis for a Risk Warning System of Chemical Hazards in Drinking Water: A Proof of Concept." *Talanta* 195(September 2018):426–32.
- Schmidt, Torsten C. 2018. "Recent Trends in Water Analysis Triggering Future Monitoring of Organic Micropollutants." 3933–41.
- Scholl, Jennifer E., Marc Bourgin, Urs von Gunten, Christa S. Mcardell, and Juliane Hollender. 2018. "Non-Target Screening to Trace Ozonation Transformation Products in a Wastewater Treatment Train Including Different Post-Treatments." *Water Research* 142:267–78.
- Schwarzenbach, René P., Beate I. Escher, Kathrin Fenner, Thomas B. Hofstetter, C. Annette Johnson, Urs von Gunten, and Bernhard Wehrli. 2006. "The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems." *Science* 313:1072–77.
- Schymanski, Emma L., Heinz P. Singer, Jaroslav Slobodnik, Ildiko M. Ipolyi, Peter Oswald, Martin Krauss, Tobias Schulze, Peter Haglund, Thomas Letzel, Sylvia Grosse, Nikolaos S. Thomaidis, Anna Bletsou, Christian Zwiener, María Ibáñez, Tania Portolés, Ronald de Boer, Malcolm J. Reid, Matthias Onghena, Uwe Kunkel, Wolfgang Schulz, Amélie Guillon, Naïke Noyon, Gaëla Leroy, Philippe Bados, Sara Bogialli, Draženka Stipančević, Pawel Rostkowski, and Juliane Hollender. 2015. "Non-Target Screening with High-Resolution Mass Spectrometry: Critical Review Using a Collaborative Trial on Water Analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(21):6237–55.
- Stenson, A. C., A. G. Marshall, and W. T. Cooper. 2003. "Exact Masses and Chemical Formulas of Individual Suwannee River Fulvic Acids from Ultrahigh Resolution Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectra." *Analytical Chemistry* 75(6):1275–84.
- Stenson, Alexandra C., William M. Landing, Alan G. Marshall, and William T. Cooper. 2002. "Ionization and Fragmentation of Humic Substances in Electrospray Ionization Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry." 74(17):4397–4409.
- Tak, Surbhi, and Bhanu Prakash Vellanki. 2018. "Natural Organic Matter as Precursor to Disinfection Byproducts and Its Removal Using Conventional and Advanced Processes: State of the Art Review." *Journal of Water and Health* 16(5):681–703.
- Thi, Hong, Cam Chau, Kiwao Kadokami, Tomomi Ifuku, and Yusuke Yoshida. 2017. "Development of a Comprehensive Screening Method for More than 300 Organic Chemicals in Water Samples Using a Combination of Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Time-of-Flight-Mass Spectrometry."
- Tseng, Linda Y., Michael Gonsior, Philippe Schmitt-kopplin, William J. Cooper, Paul Pitt, and Diego Rosso. 2013. "Molecular Characteristics and Differences of Effluent Organic Matter from Parallel Activated Sludge and Integrated Fixed-Film Activated Sludge (IFAS) Processes."
- Urai, Makoto., Ikuro. Kasuga, Futoshi. Kurisu, and Hiroaki. Furumai. 2014. "Molecular Characterization of Dissolved Organic Matter in Various Urban Water Resources Using Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometry." *Water Science & Technology: Water Supply* 14(4):547–53.
- Wang, Shu, Shuhui Sun, Chao Shan, and Bingcai Pan. 2019. "Analysis of Trace Phosphonates in Authentic Water Samples by 2 Pre-Methylation and LC-Orbitrap MS/MS." *Water Research* 161(15):78–88.
- Williams, Clayton J., Dan Conrad, Dolly N. Kothawala, and Helen M. Baulch. 2019. "Selective Removal of Dissolved Organic Matter Affects the Production and Speciation of Disinfection Byproducts." *Science of the Total Environment* 652:75–84.

・和文論文

浅見真理, 小坂浩司「水道に関連する化学物質の環境汚染とその対応」環境化学 Vol.29, No.3, pp.107-115, 2019

赤石智美, 村山等, 松谷亮, 高橋司, 庭野健太, 旗本尚樹「阿賀野川で発生した異臭事案とその原因物質について」環境化学 Vol.27, No.2, pp.29-34, 2017

小林憲弘, 杉本直樹, 久保田領志, 野本雅彦, 五十嵐良明「ホルムアルデヒド水質汚染の原因物質の特定に至る経緯と水道水中の未規制物質の管理における今後の課題」日本リスク研究学会誌 23(2), 65 – 70, 2013

金見拓「利根川水系ホルムアルデヒド水質事故の概要と提起された課題」日本リスク研究学会誌 23(2), 57 – 64, 2013

浅見真理, 小坂浩司, 大野浩一「水道側から見たホルムアルデヒド水質事故関連のリスク管理制度とその課題」日本リスク研究学会誌 23(2), 71 – 76, 2013

・その他 (HP は全て 2020/12/1 に最終閲覧)

経済産業省 HP PRTR 法

[https://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/law/prtr/index.html](https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/index.html)

環境省 HP 一律排水基準

<https://www.env.go.jp/water/impure/haisui.html>

環境省 HP 水質汚濁に係る環境基準

<https://www.env.go.jp/kijun/mizu.html>

環境省 HP 要監視項目

<https://www.env.go.jp/water/impure/kanshi.html>

環境省 HP 要調査項目

<https://www.env.go.jp/water/chosa/>

厚生労働省 HP 水道水質基準

<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/kijunchi.html>

厚生労働省 HP 浄水処理対応困難物質

<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000079943.html>