

シナリオについて
http://www.mext.go.jp/b_menu/houdou/26/03/attach/1346369.htm. (2016/02/29 確認)

- [27] 森澤眞輔 (2004) 地下水・土壌 In 土木学会環境工学委員会環境工学に関わる準備小委員会 編, 環境工学公式・モデル・数値集, 土木学会/丸善, 東京, 727pp.
- [28] 福本昌人, 小川茂男 (1996) 各種の裸地土壌におけるアルベドと分光反射率の土壌水分依存性. 水文・水資源学会誌 9(1): p. 92-95.

J. 謝辞

一部の取水口位置、及び用水供給事業—上水道事業の供給・受水状況の確認において、水道事業者の方から情報をいただきました。相模ダム流入量ならびに道志第1発電所の流入水量は神奈川県企業局利水電気部利水課にご提供いただきました。記して謝意を表します。

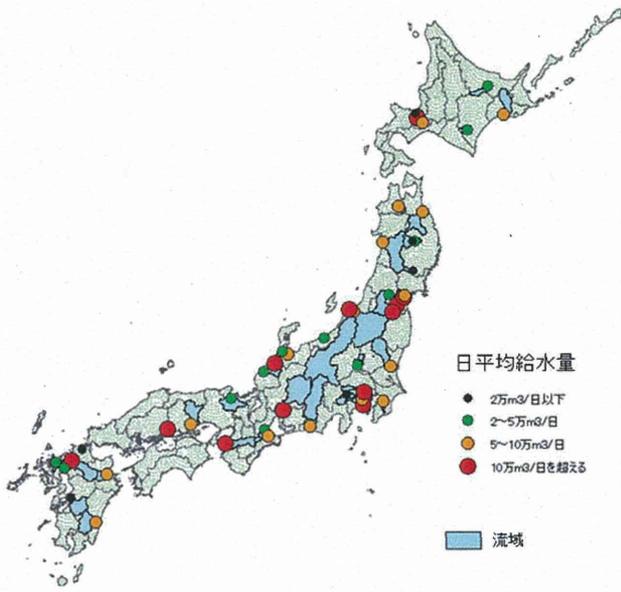


図 1 検討対象浄水場とその流域
(給水量は文献[9,10]による)

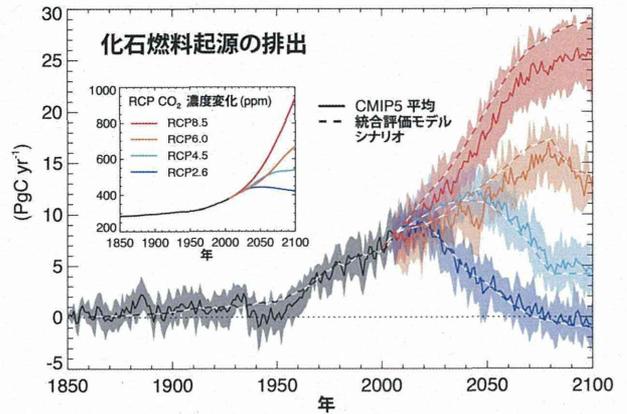


図 2 RCP (代表的濃度経路) シナリオ
(出典：文部科学省 HP[26])



図 3 相模ダム流域

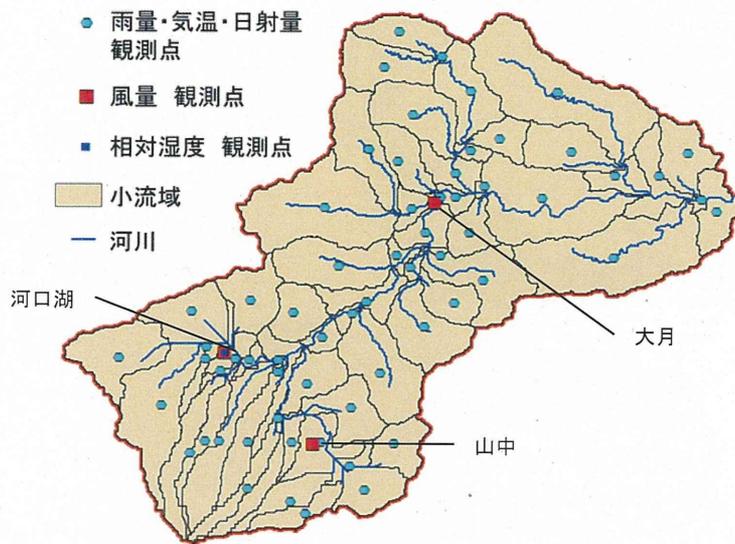


図 4 小流域と観測点の分布

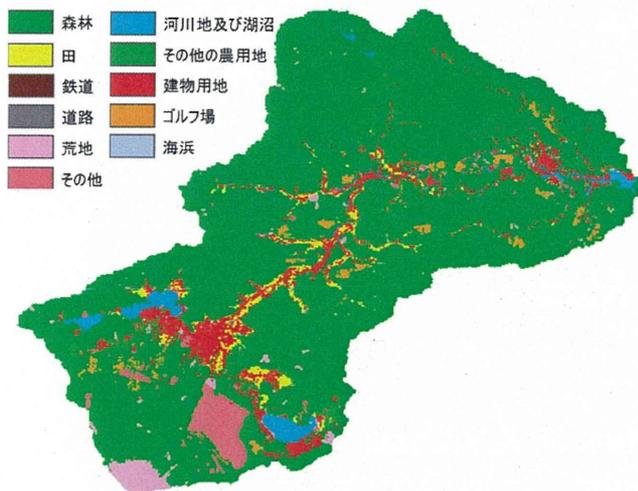


図 5 相模ダム流域における土地利用種別

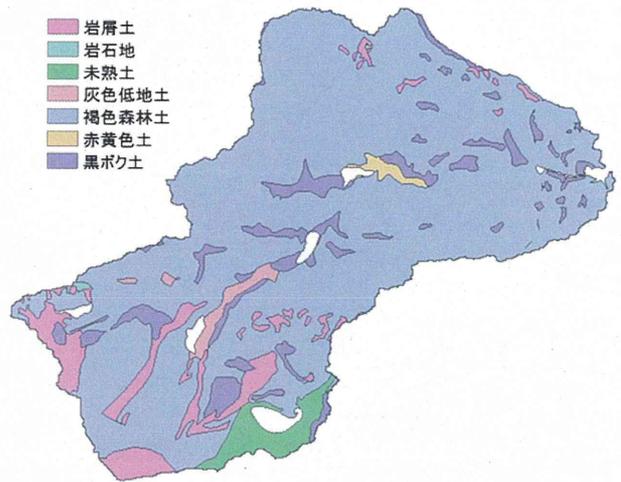


図 6 相模ダム流域における土壌分類

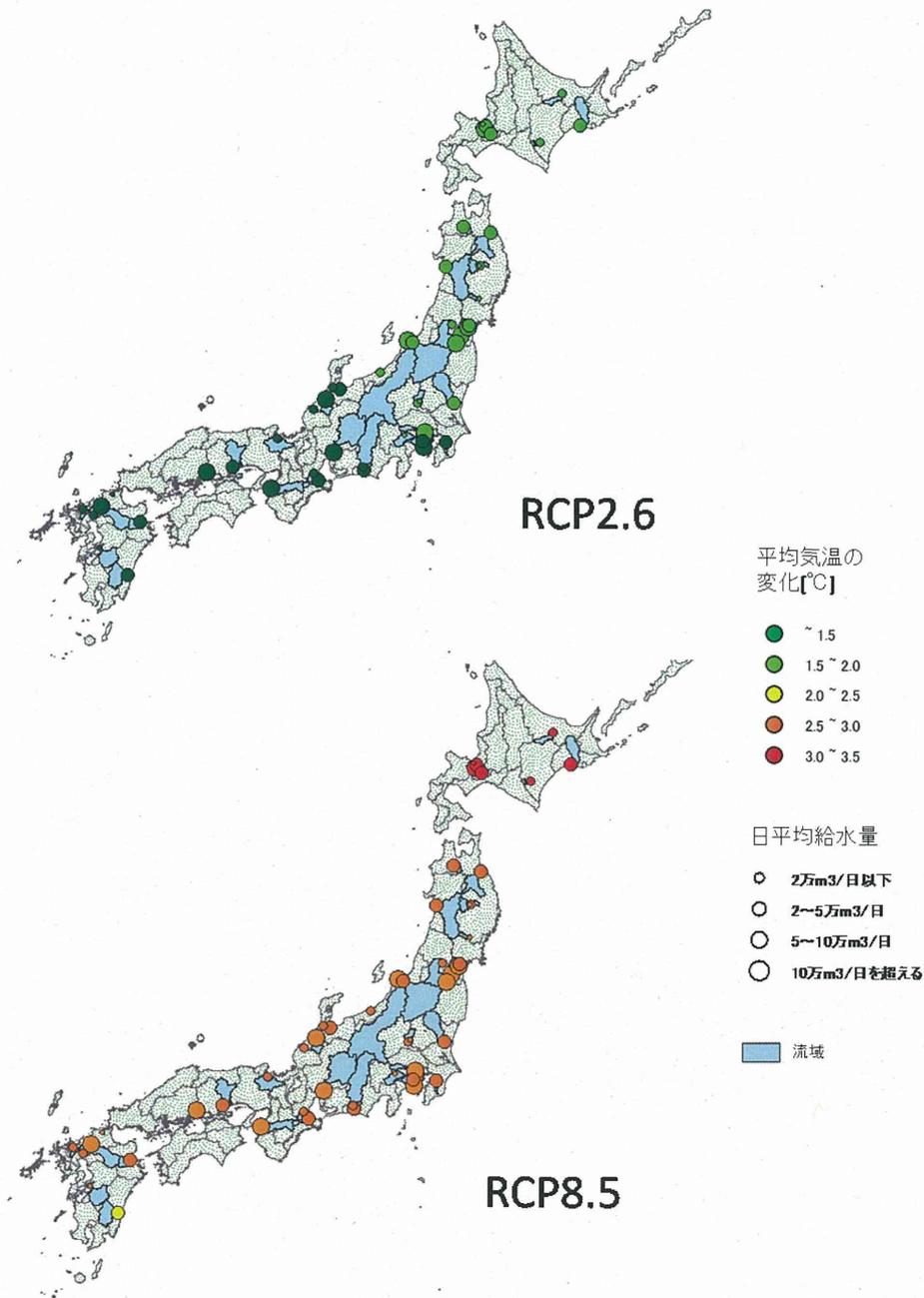


図 7 各浄水場の流域における平均気温変化（2081~2100年と1981~2000年の差）の予測
 (※凡例中、「○~△」は「○を超え、△以下」を意味する)

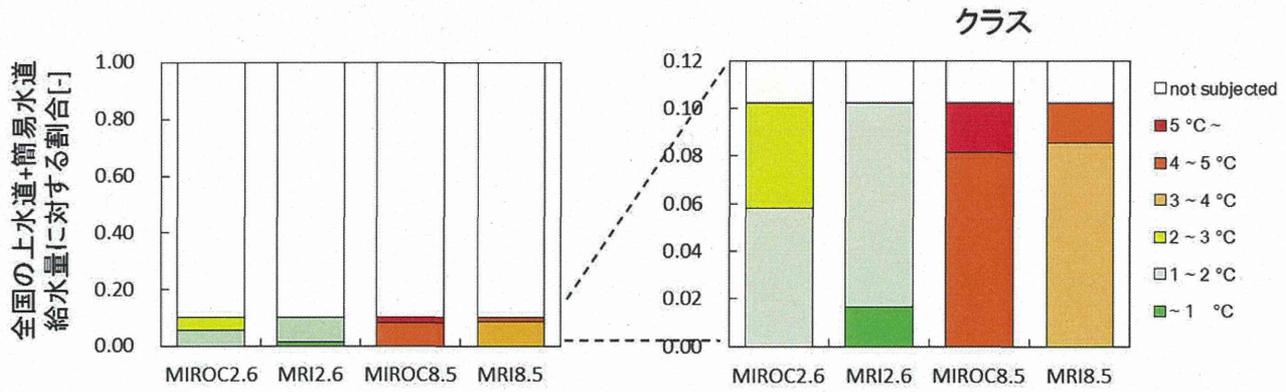


図 8 全国の浄水場流域での平均気温変化の予測

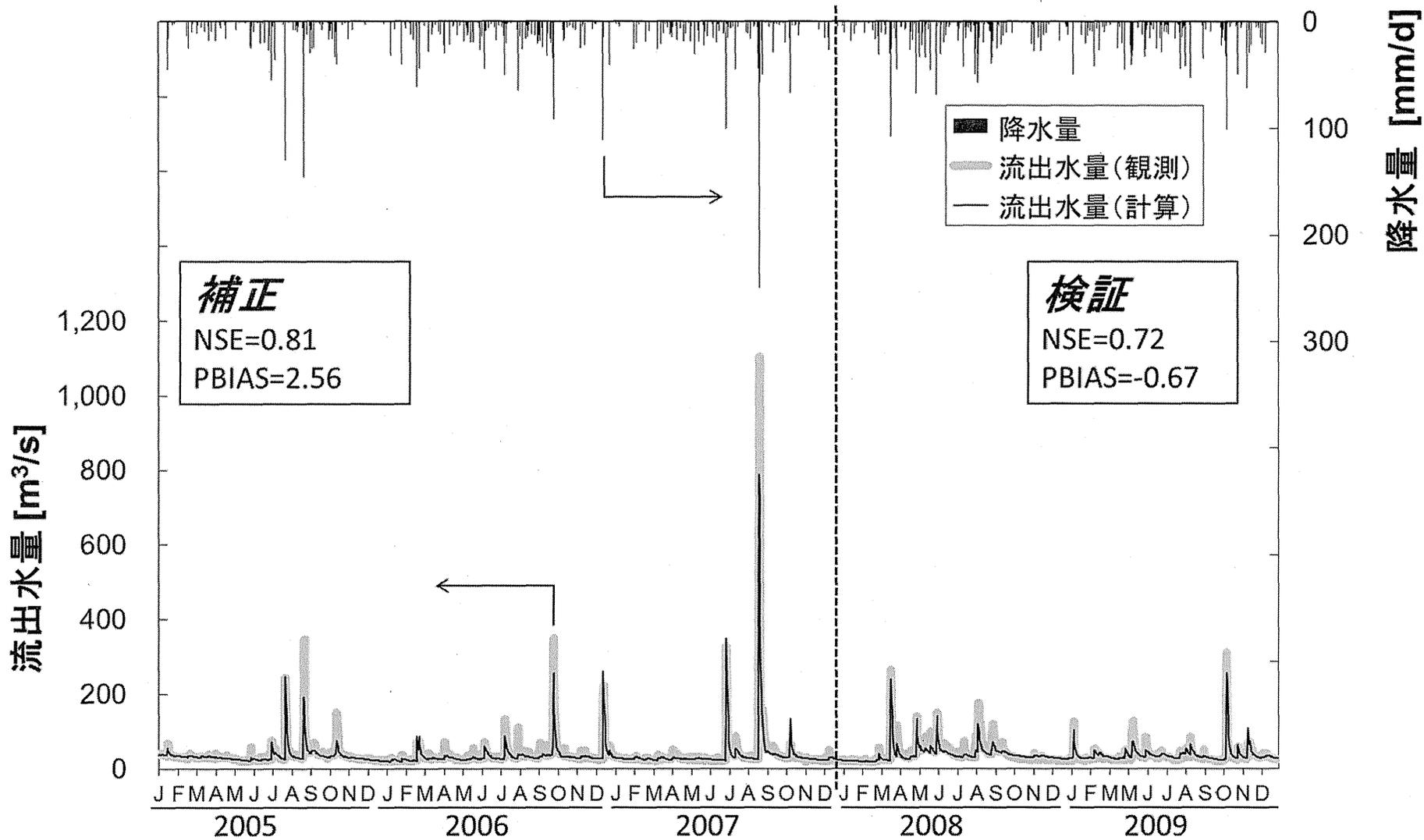


図 9 相模ダム流域流出解析の結果

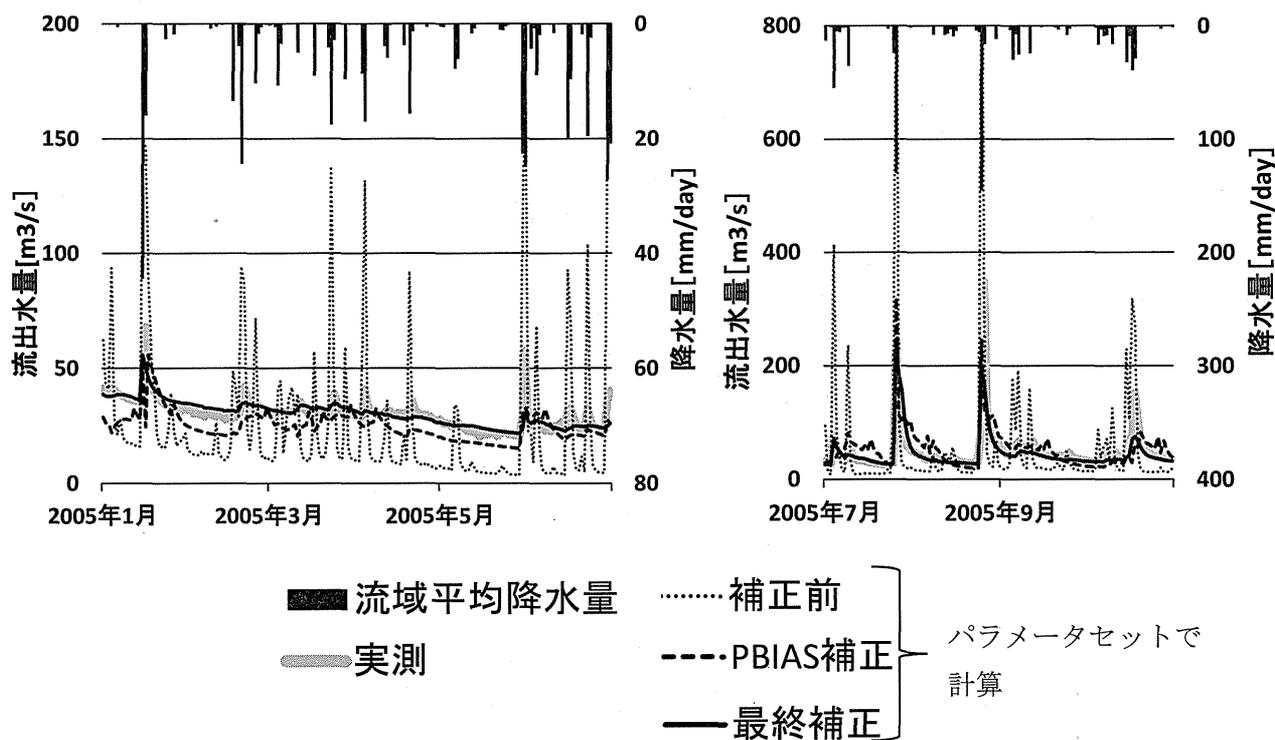


図 10 パラメータ補正と流出解析結果の変化例 (左：基底流量時 右：ピーク流量時)

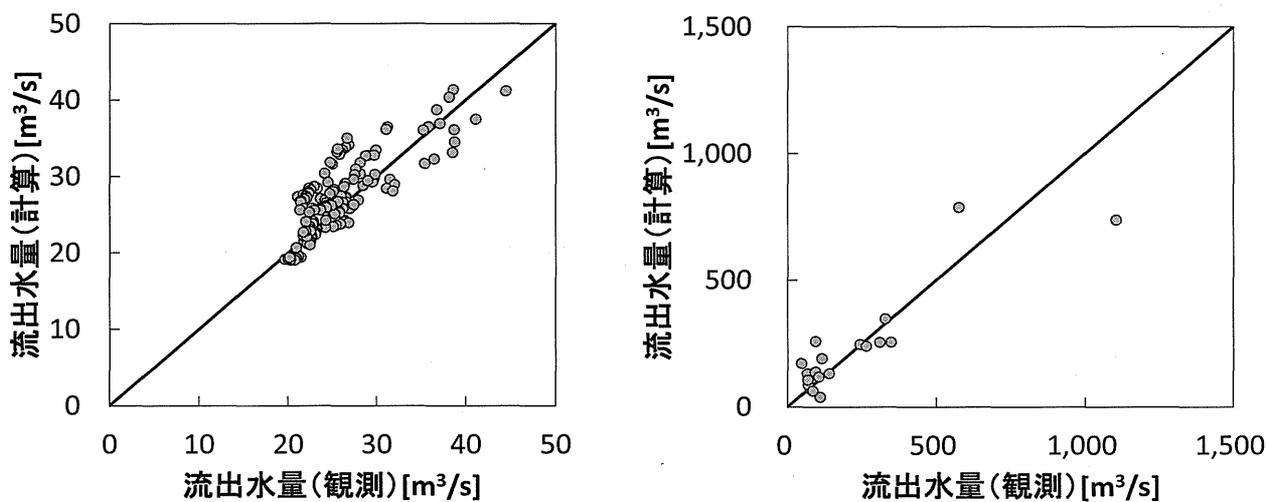


図 11 ピーク時と基底流量時の再現性の比較 (左：基底流量時 右：ピーク流量時)

表 1 本研究での SWAT における初期値入力のための土地利用種別分類

国土交通省土地利用種別	SWAT に入力した土地利用種別
田	Water
その他農用地	Alfalfa
森林	Forest-mixed
荒地	Wetlands
建物用地	Residential-Med/Low Density
道路	Transportation
鉄道	Transportation
その他用地	Industrial
河川及び湖沼	Water
海浜	Wetland
ゴルフ場	Pasture

表 2 土壌データに関するパラメータとその暫定初期値（補正前の値）の設定手法
（表中、2段の数値は、上が土壌上層、下が土壌下層を示す）

	パラメータ名	パラメータの内容	値	入手先・設定手法
1	NLAYERS	土壌の層数	2	土壌断面データベース中、旧神奈川県津久井郡（現在の相模原市内）で観測された断面のデータ（※1）により設定。
2	HYDGRP	水はけのよさに関する土壌のグループ分け（A～D）	A	他のパラメータを初期値で固定し、4つのパターンで計算した場合にもっともNSEによる判定が良かったものを使用。
3	SOL_ZMX	土壌深さ [mm]	1000	※1により設定。（断面調査が1,000 mm）
4	SOL_CRK	土壌の空隙率	0.7	※1により設定。
5	SOL_Z	土層毎の厚さ [mm]	310 690	※1により設定。
6	SOL_BD	土層毎の湿潤密度	0.659 0.853	※1により設定。
7	SOL_AWC	土層毎の有効水分	0.074 0.074	作土層の理化学性データベース中、中粗粒褐色森林土の1999-2003作土層の理化学性の平均値表中、土地利用全体の平均値を使用。
8	SOL_CBN	土層毎の有機炭素量	4.22 2.64	※1のうち、腐植を有機炭素と読み替えて使用。
9	SOL_K	土層毎の透水係数	220 220	細砂～砂で $5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ m/s} = 180 \sim 3,600 \text{ mm/hr}$ [27]。SWATのデータベースも参考とし、初期暫定値として220 mm/hrを使用。
10	CLAY	土層毎の粘土率	21.8 22.2	※1により設定。
11	SILT	土層毎のシルト率	30.1 27.9	※1により設定。

表 2 土壌データに関するパラメータとその暫定初期値（補正前の値）の設定手法（続き）

	パラメータ名	パラメータの内容	値	入手先・設定手法
12	SAND	土層毎の砂率	48.1 49.9	※1により設定。
13	ROCK	土層毎の岩石率	38.9 37.2	※1により設定。
14	SOL_ALB	土層毎の湿潤アルベド	0.12 0.12	福本ら[28]により、沖積土、洪積土、火山性土の分類で湿潤アルベドが計測されているが、褐色森林土を洪積土と仮定し、値を入力した。

表 3 Moriasi ら[25]による水文流出モデルの精度に関する分類

Performance Rating	NSE	PBIAS[%]
Very Good	$0.75 < \text{NSE} \leq 1.0$	$\text{PBIAS} < \pm 10$
Good	$0.65 < \text{NSE} \leq 0.75$	$\pm 10 \leq \text{PBIAS} < \pm 15$
Satisfactory	$0.5 < \text{NSE} \leq 0.65$	$\pm 15 \leq \text{PBIAS} < \pm 25$
Unsatisfactory	$\text{NSE} \leq 0.5$	$\text{PBIAS} \geq \pm 25$

表 4 補正したパラメータの一覧と補正結果

	パラメータ名	説明	最低値	最高値	補正前	補正後	備考
1	EPCO	植物による地中水の吸い上げに関する係数(※1)	0	1	1	0.8817	
2	ESCO	土壌からの蒸発に関する係数(※2)	0	1	0.95	0.9908	
3	ALPHA_BF	基底流出逓減係数	0 (0)	1 (0.5)	0.048	0.9856	※3
4	GW_DEREY	土中水が土壌から帯水層へ移動するのに要する日数	0	500	31	201.125	
5	GW_REVAP	帯水層からその上部への逆浸透に関する係数	0.02	0.2	0.02	0.0527	
6	GWQMN	帯水層から基底流出が起こる条件となる帯水層の水位[mm]	0	5000	0	128.75	
7	RCHRG_DP	帯水層へ浸透する水量のうち被圧水層へ浸透する割合	0	1	0.05	0.9937	
8	REVAPMN	帯水層からその上部への逆浸透する条件となる帯水層の水位[mm]	0	500	1	442.125	
9	CANMX	降雨により樹幹に蓄えられる水量の最大値[mm]	0	100	0	5.875	
10	LAT_TTIME	側方流出に要する日数	0	180	0	147.645	
11	CN2	SCS-CN法による, 表面流出と降雨の関係を表す係数	35 (35)	98 (65)	31~92 (※4)	59.85	※3
12	CH_K2	河川部の有効透水係数[mm/hr]	0 (250)	500 (500)	0	460.438	※3
13	CH_N2	河川部におけるマンニングの粗度係数	0 (0)	0.3 (0.1)	0.014	0.0293	※3
14	SOL_ALB	土層の湿潤アルベド	0	0.25	0.12	0.1781	※5
15	SOL_AWC	土層の有効水分[%]	0	1	0.074	0.0342	※5
16	SOL_K	土層の透水係数	0	2,000	220	1,269.5	※5

※1 植物が地中水を吸い上げる場合、通常根の密度が高い、浅い部分から吸い上げるが、浅い層に十分な水分が無い場合に、深い層からの吸い上げをどの程度許すかを表す係数。EPCO=1は浅い層で足りない水分をすべて深い層が受け持つことができることを意味する。

※2 土壌からの蒸発について、通常浅い部分ほど蒸発が起こりやすいが、深い層からの蒸発をどの程度許すかを表すための係数。ESCO=0は深い層からの蒸発を許すことを意味する。

※3 PBIASを用いて補正した後、NSEを用いて補正したパラメータ。NSEを用いた際に変域を変更しているため、最低値、最大値欄の括弧内に示した。

※4 土地利用ごとに異なる。

※5 補正前の数値は、表2に示す土壌パラメータ設定時に入力した値。なお、この他のパラメータの補正前の数値(暫定値)は、SWATデータベース中の数値を使用した。

分担研究報告書 2

高分解能質量分析計を用いた
水道水生ぐさ臭臭気原因物質の探索

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	高梨	啓和
研究分担者	岸田	直裕
研究協力者	小倉	明生

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)
「大規模災害および気候変動に伴う利水障害に対応した環境調和型
水道システムの構築に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：高分解能質量分析計を用いた水道水生ぐさ臭臭気原因物質の探索

研究代表者	秋葉道宏	国立保健医療科学院 統括研究官
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
研究分担者	岸田直裕	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	小倉明生	京都市上下水道局水質管理センター 担当課長補佐

研究要旨

水道水の異臭味障害の中で2番目の発生頻度となっている生ぐさ臭については、その臭気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、浄水現場では、機器分析ではなく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、水道水生ぐさ臭の臭気原因物質を同定することにより、現在の官能試験による水質管理に代えて、機器分析による水質管理に道を開くことを目的とした。

臭気原因物質は、予想される物理化学的性質から GC/MS による分析が適していると考えられるが、未知物質の構造推定には、ソフトなイオン化である electrospray ionization、および、構造推定に有効な linear ion trap を備えた高分解能・高質量精度 LC/MS が適しているため、LC/MS で被検物質を測定できるようにするための誘導体化処理方法を検討し、これを確立した。確立に際し、臭気物質の一般的な構造に鑑み、臭気原因物質を、アミン類、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物と仮定した。確立した方法を用いて、生ぐさ臭の原因生物である黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* が発生した際に採取した表流水および水道原水の誘導体化処理を行い、高分解能・高質量精度 LC/MS を用いて生ぐさ臭原因物質を探索した。探索の結果、原因物質の候補物質として6個を発見した。

A. 研究目的

水道水の異臭味障害の中で2番目の発生頻度となっている生ぐさ臭¹⁾については、原因物質として 1-heptanal、(2E,4E)-heptadienal、(2E,4Z)-heptadienal、(2E,4Z)-decadienal、(2E,4E,7Z)-decatrienal²⁾が指摘されている。しかし、浄水現場では、これらの物質からは生ぐさ臭とは異なる臭気を感じるとの意見があり、他に原因物質が存在する可能性がある。このように、十分な知見が集積されていないことなどから、生ぐさ臭については、水道法において、物質の濃度ではなく臭気強度で項目化されている。生ぐさ臭の臭気原因物質(以下、原因物質)が明らかになれば、詳細な実態調査、物性値に基づいた効率的な浄水処理技術の開発などに繋がる可能性があり、有益である。

以上のように、原因物質の同定は意義深い、環境中の微量有機物の同定には困難を伴う。未知有機物の同定は、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

装置 (NMR) による構造解析、質量分析 (MS) による分子量測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 程度必要になる。揮発性物質と考えられる原因物質を、精製した上で数百 μg 程度得ることは困難と予想される。

そこで本研究では、近年の質量分析の進歩を活用し、高分解能・高質量精度の LC/MS を用いて原因物質の構造を推定することとした。推定された構造の物質を合成できれば、原因物質の同定が可能である。

臭気原因物質は、予想される物理化学的性質から、GC/MS による分析が適していると考えられる。しかし、未知物質の構造推定には分子量関連イオンの検出確率が高いソフトなイオン化である Electrospray Ionization (ESI) を備え、構造推定に有効な linear ion trap を備えた高分解能・高質量精度 LC/MS が適している。このため、LC/MS で被検物質を測定するに必要な誘導体化処理方法を検討

し、これを確立した。確立に際し、臭気物質の一般的な構造に鑑み³⁾、臭気原因物質を、アミン類、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物と仮定した。確立した方法を用いて、生ぐさ臭の原因生物である黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* (ウログレナ) が発生した際に採取した表流水および水道原水の誘導体化処理を行い、高分解能・高質量精度 LC/MS を用いて原因物質を探索した。

B. 研究方法

1. 試薬

原因物質のモデル物質として、hexyl alcohol (和光純薬工業、大阪)、1-butanethiol (東京化成工業、東京)、(2E,4E)-heptadienal、4-methyl-2-pentanone (関東化学、東京)、propionic acid (和光純薬工業、大阪) を用いた。

京都市上下水道局蹴上浄水場第 2 取水口で、2015 年 12 月 3 日 11:00 (以下、試料水①) と 12 月 17 日 11:00 (以下、試料水②) に採水した水を試料水として用いた。採水は、ガロン瓶の口いっぱいまで行い、速やかに試験に供した。

2. ダンシルクロリドを用いた誘導体化処理方法の確立

水酸化ナトリウムで pH を 10.5 に調整した炭酸水素ナトリウム水溶液にサンプルとダンシルクロリド (以下、DNS-Cl) のアセトン溶液を加え、60°C の恒温振盪器を用いて遮光下で振盪した。その後、トルエンを加えて 10 分間振盪、10 分間放置し、分相させた。分相したトルエン相を別容器に移し、純水を加えて 10 分間振盪、10 分間放置し、再度分相させた。この操作を 2 回繰り返した。トルエン相を採取し、ロータリーエバポレーターを用いて 100°C でトルエンを留去し、乾固物をアセトニトリルで溶解した。その後、アセトニトリル耐性を有する 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過した。

3. 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いた誘導体化処理方法の確立

3.1 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンのジクロロメタン溶液の調製

ジクロロメタンに 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (以下、DNPH) および濃硫酸を混合し、90 分間反応させた。分相した硫酸相を除去し、純水を加えて 10 分間振盪、10 分間放置し、分相させた。

この操作を 2 回繰り返した。その後、ジクロロメタン相を別容器に移した。

3.2 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体化方法

3.1 で調製した DNPH ジクロロメタン溶液に無水硫酸ナトリウム、サンプルを加え、5 分間振盪した。その後、混合溶液をナス型フラスコに一定量移し、ロータリーエバポレーターを用いて 30°C でジクロロメタンを留去した。乾固物をアセトニトリルで溶解し、アセトニトリル耐性を有する 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過した。

4. 試料水中の生ぐさ臭臭気原因物質の回収

採取した水道原水にウログレナが浮遊していたため、スポイトを用いてウログレナを採取し、共栓付き容器に移した。この容器を 60°C の湯浴に入れて 1 時間静置した後、容器内のウログレナ含有水を自然ろ過した。また、ウログレナを採取した残りの水道原水も同様に自然ろ過した。これら 2 つのサンプルを、タンデム接続した 2 種類の固相抽出カラム (日本 Waters 製 Sep-Pak Plus PS-2 および Sep-Pak Plus AC-2) に上向流、流量 20 mL/min で通水して原因物質を吸着した。試料水の通水後にカラム内を純水で洗浄し、アセトニトリルとジクロロメタンでカラム吸着物を脱離した。このとき、上向流、流速 0.5 mL/min、バックフラッシュ法で脱離を行い、3 分間の soak time を設けた。

5. 高分解能・高質量精度 LC/MS を用いた生ぐさ臭臭気原因物質の測定

回収された原因物質および誘導体化された原因物質は、L-column 2 ODS (2.1 x 75 mm、2 μm、化学物質評価研究機構、東京) を備えた高分解能・高質量精度 LC/MS (UltiMate 3400SD-LTQ Orbitrap XL、Thermo Fisher Scientific、MA、USA) を用いて測定された。分離カラムの温度は 40°C、インジェクションボリュームは 1 μL とした。イオン源として ESI を用いて、ポジティブイオンモードとネガティブイオンモードの両モードで測定した。ポジティブイオンモードの測定における移動相 A は 0.05 v/v% のギ酸を含む水、移動相 B は 0.05 v/v% のギ酸を含むアセトニトリルとした。Binary program は、B%=10 (0-0.5 min)、100 (13-17 min) とした。流速は、両モードにおいて 0.5 mL/min とした。ネガティブイオンモードの測定における移動相 A は 1 mM 酢酸と 1 mM 酢酸アンモニウムを含む水、移動相 B は 1 mM 酢酸、1 mM 酢酸アンモ

ニウムおよび水を5 v/v%含むアセトニトリルとした。Binary program は、B%=30 (0-0.5 min)、100 (13-17 min)とした。イオン源における spray voltage は 2.5 kV、vaporizer temp.は 400°C、capillary temp.は 380°C、sheath gas flow rate は 60 arb.、auxiliary gas flow rate は 20 arb.、sweep gas flow rate は 0 arb.とした。質量分解能を最低の 7,500 FWHM に設定して、クロマトグラムピークのデータポイント数が多く得られるようにした。

得られたデータの解析は、LC/MS データ統合解析ソフト (Progenesis Q1、Nonlinear Dynamics、Newcastle upon Tyne、UK) を用いて、サンプルの測定に先だてて測定されたブランクサンプルの測定結果との差異解析によって行われた。

C. 結果及び考察

1. 誘導体化処理方法の確立

本研究で仮定した原因物質であるアミン類、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物の多くは、ESI でイオン化可能な物質が多いと予想される。しかし、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物については、分子量が小さい場合などにはイオン化効率が低下すると予想される。そこで、モデル化合物として hexyl alcohol、1-butanethiol、(2E,4E)-heptadienal、4-methyl-2-pentanone および propionic acid に着目し、DNS-Cl または DNPH を用いて誘導体化した。誘導体化物が得られたか否かの確認は、MS を用いて行った。

また、誘導体化の際に用いた酸、不揮発性の塩、誘導体化試薬がサンプル中に残存していると、LC/MS で測定した際に LC/MS の腐食や検出器の過剰なエッチングが起こる。このため、固相抽出脱離、液液抽出、結晶化によりこれらの不要成分を除去する方法を検討した。その結果、ESI キャピラリーチューブやイオントランスファーチューブ付近における不揮発性物質と思われる物質の堆積、金属の腐食は認められなかった。また、誘導体化試薬やその加水分解物のピークが認められたが、検出器の過度なエッチングが起きる信号強度ではなかった。これらのことから、不要成分の除去に成功したと判断した。

次に、モデル物質誘導体化物の精密質量を測定した結果、いずれのモデル物質についても、図1 および2に示すように、想定される誘導体化物の分子式の精密質量および天然同位体パターンの

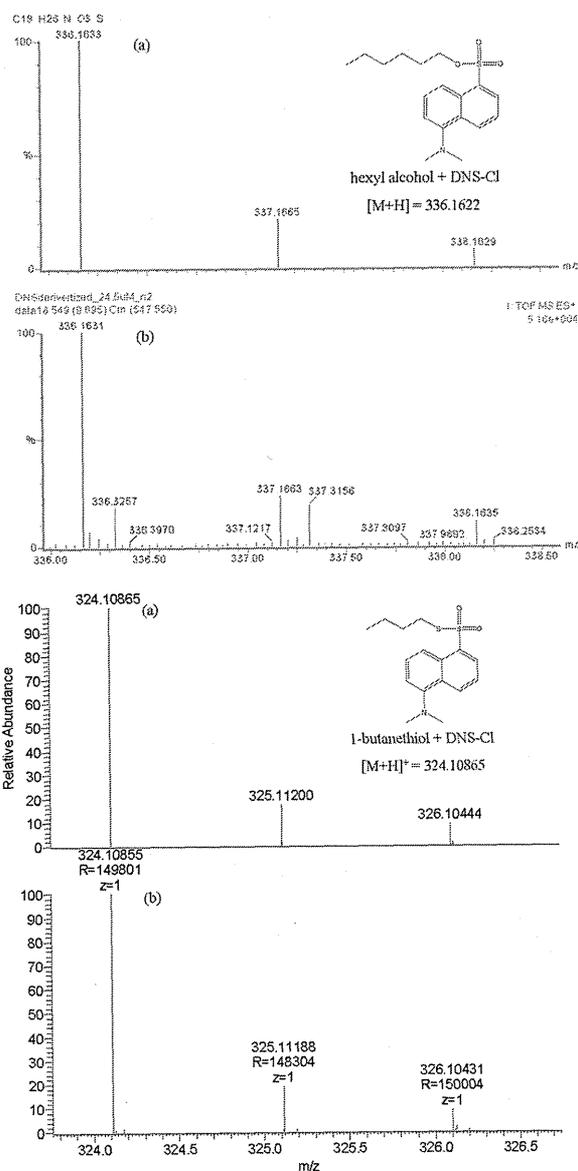


図1 ダンシルクロリドによるモデル物質の誘導体化(a: シミュレーション結果、b: 実測結果)

シミュレーション結果と実測結果が一致した。

以上より、検討したすべてのモデル物質の誘導体化および LC/MS を用いた検出に成功した。

2. 高分解能・高質量精度 LC/MS を用いた生ぐさ臭気原因物質の測定

モデル物質の誘導体化、LC/MS による検出に成功したため、実サンプルの誘導体化処理を実施し、得られた誘導体化サンプルを LC/MS で分析した。希釈した実サンプルを用いた予備測定において、界面活性剤と考えられる高強度ピークが観察されたため、一部のカラム保持時間の測定において移動相の MS への供給を停止した。また、誘導体化処理を施さないサンプルについても同様に測定した。さらに、純水を用いて一連の濃縮・誘導体化処理を実施したサンプル (ブランクサンプル)

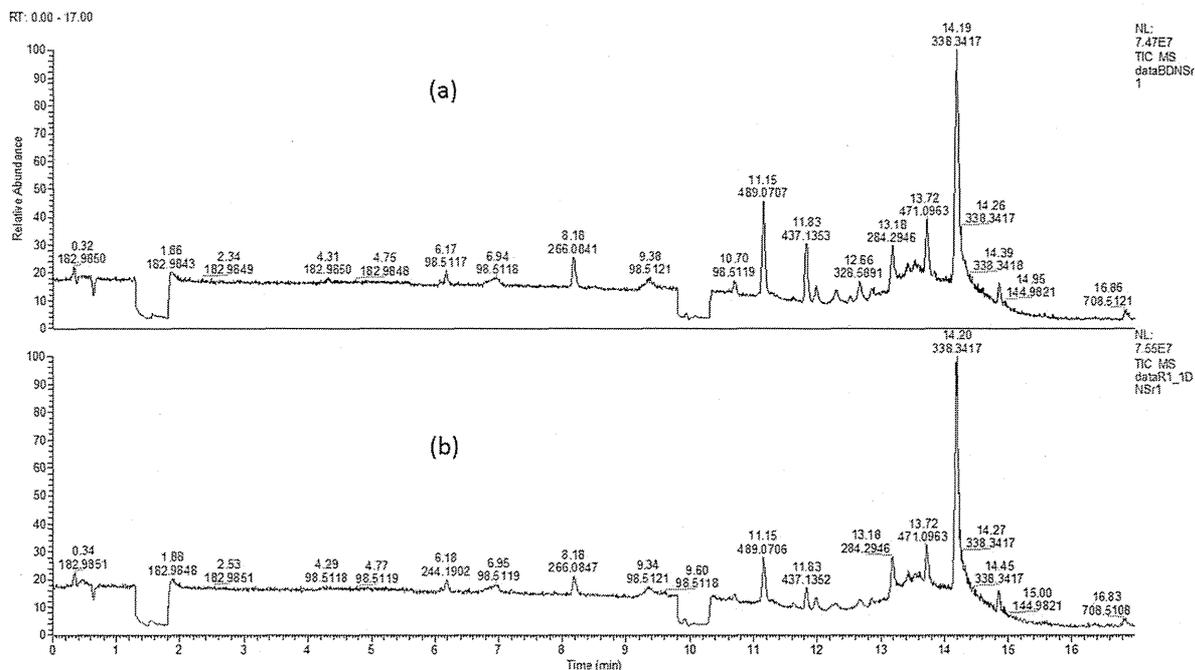


図3 LC/MSによる測定結果の例(a: ブランクサンプルのTIC、b: 水道原水サンプルのTIC)

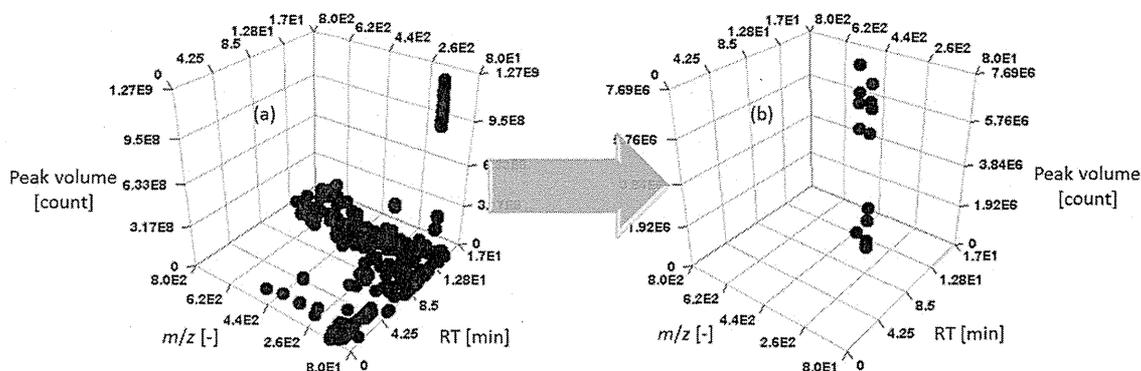


図4 検出された全イオンからサンプル固有イオンの抽出結果(a: 全イオン、b: サンプル固有イオン)

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。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) 特許庁 (2007) 標準技術集-香料(https://www.jpo.go.jp/shiryousonota/hyoujun_gijutsukouryou/2-3-2.pdf#1) (2016年2月時点) .

分担研究報告書 3

ろ過漏出障害原因微生物の同定技術の開発と存在実態調査

研究分担者 藤本 尚志
研究分担者 岸田 直裕

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)
「大規模災害および気候変動に伴う利水障害に対応した環境調和型水道システムの構築に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：ろ過漏出障害原因微生物の同定技術の開発と存在実態調査

研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科 教授

研究分担者 岸田 直裕 国立保健医療科学院 主任研究官

研究要旨

近年、浄水場においてピコ植物プランクトンによるろ過漏出障害が発生し問題となっている。原因となる生物種は明らかとなっていないことから、浄水場の各処理工程水について、次世代シーケンサーを用いて微生物相の調査を行った。その結果、川崎市上下水道局長沢浄水場のろ過水において Alphaproteobacteria 綱、Betaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱が主に検出され、主要な綱は時期によって異なった。また沈澱処理水とろ過水の微生物相を比較したところ、多くの月で主要となる綱は大きく異なった。リード数が多く検出頻度の高い微生物は、5 門 17 属に分類された。これらの中には原水、沈澱処理水におけるリード数は少なく、ろ過水において 5%以上に高まるものもあった。さらに相同性が低く未培養の系統と考えられる微生物も検出され、次世代シーケンサーによる評価の有用性が示された。千葉県水道局栗山浄水場のろ過水においても長沢浄水場と同様に Proteobacteria 門の割合が大きく、Proteobacteria 門に占める Alphaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱の割合はそれぞれ、60%、34%であった。従属栄養細菌による濁度への影響が大きいことが示唆されたため、水道水源である草木湖において次世代シーケンサーによる真正細菌の群集構造解析を行った。その結果、表層、中層、底層ともに Proteobacteria 門、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門で微生物群集が構成され、その構造は水深、時期により異なることが明らかとなった。草木湖を水源とする浄水場においてろ過漏出障害を引き起こす真核ピコ植物プランクトンの生物相を明らかにすることを目的として緑藻綱の 18S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーを用いて草木湖の生物相を解析した。これまで用いてきたプライマーでは、従属栄養性の真核生物も検出され、緑藻綱が検出できないこともあったが、年間を通して緑藻綱 *Mychonastes* 属を検出することができ、緑藻綱の生物相を評価する上で有用な手法であることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、湖沼・貯水池を水源とする浄水場においてピコ植物プランクトンによるろ過漏出障害が発生し問題となっている¹⁾。これまでクローニング法により浄水場処理工程水の生物相を解析し、ろ過水中から緑藻綱の *Mychonastes* 属や藍藻綱の *Synechococcus* 属が検出され^{2),3)}、ろ過水の濁度上昇に関与すると考えられた。さらに次世代シーケンサーによる真正細菌をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析において、Cyanobacteria 門のリード数は最大 2 割程度であり、従属栄養細菌も濁度への影響が大きいことが示唆された³⁾。しかしこれらの知見は 6 ヶ月程度の結果であり、更なるデータの集積が必要である。そこで本研究では、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングにより各工程における細菌相とその変化、ろ過水に含まれる主要な細菌を属レベルで評価した。また、従属栄養細菌のろ過漏出障害への関与が示唆されたため、水道水源における化学合成生物の群集構造解析を行った。さらに従来真核ピコ植物プランクトンの生物相解析に

用いられてきたプライマーは原生動物といった従属栄養生物の 18S rRNA 遺伝子も増幅し⁴⁾、真核ピコ植物プランクトンの生物相を正確に評価することが困難であることから緑藻綱の 18S rRNA 遺伝子を増幅させるプライマー⁵⁾を用いて生物相解析を行った。

B. 研究方法

B-1 浄水場処理工程水の生物相評価

1) 川崎市上下水道局長沢浄水場

2013 年、2014 年において、月 1 回の頻度で着水井、沈澱池の出口、ろ過池の出口よりそれぞれ採水した原水、沈澱処理水、ろ過水を用いた。沈澱処理水、ろ過水は流達時間を考慮して採水した。この期間におけるろ過水の濁度は 0.00~0.03 度で推移し、浄水の水質に問題はなかった。

ナノプランクトンを除去するために孔径 3 μm もしくは 5 μm のメンブレンフィルターにより吸引ろ過を行い、そのろ液を孔径 0.2 μm のポリカーボネート製メンブレンフィルターによりろ過し集菌を行った。次に CTAB 法によりゲノム DNA の抽出を行い、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を増

幅させるプライマー515F, 806R を用いて Tailed PCR を行った。増幅産物を精製後、Illumina 社の MiSeq によりアンプリコンシーケンシングを行い、QIIME を利用して解析を行った。

2) 千葉県水道局栗山浄水場

2014年8月7日に採水した濁度上昇の起きた試料について、次世代シーケンサーによる解析を行った。試料は矢切取水場より採水した原水、栗山浄水場より採水した沈澱水、ろ過水を用いた。この時のろ過水の濁度は0.05度であった。長沢浄水場の試料と同様に次世代シーケンサーによる解析を行った。

B-2 草木湖の微生物群集構造解析

2015年4月～9月の各月において群馬県草木ダム堰堤200m沖で採水した表層水(水深0.5m)、中層水(水深40m)、底層水(水深60～80m)を用いた。試料約2Lを孔径0.2 μ mのポリカーボネート製メンブレンフィルターにより吸引濾過し集菌した。集菌したフィルターを回収し、PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)を用いてゲノムDNAの抽出を行った。真正細菌の16S rRNA 遺伝子を増幅させるプライマー(515F, 806R)を使用し、PCRを行った。増幅産物を確認後、AMPure XP kit (Beckman Coulter, Inc.)により精製した。その後、NEBNext® UltraTM DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England BioLabs Inc.)を用いてライブラリーを作成し、Illumina社のMiSeqによりアンプリコンシーケンシングを行った。各試料について、得られた10万リードについてQIIMEを利用して解析を行った。

B-3 真核ピコ植物プランクトンの生物相解析

群馬県草木湖から2015年1月～12月に採水した表層水を用いた。試料1Lを孔径3 μ mのメンブレンフィルターで吸引ろ過し、そのろ液を孔径0.2 μ mのポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いてろ過し集菌した。その後CTAB法によりゲノムDNAを抽出し、緑藻綱の18S rRNA 遺伝子の特異的に増幅させるプライマーchloroF, chloroR⁵⁾を用いてPCRに供した。このPCR産物を精製した後、TOPO TA クローニングキットによりクローニングを行った。得られた約50クローンについて制限酵素を用いてRFLP法によるグルーピングを行った。各グループから選別したクローンについて塩基配列の解析を行った。1年間得られた塩基配列について塩基配列間の相同性が97%以上の場合同一のOTU (Operational Taxonomic Unit) とした。

C. 研究結果およびD. 考察

C-1 浄水場処理工程水の生物相評価

1) 川崎市上下水道局長沢浄水場

1試料あたりの総リード数は15万～42万リードであった。原水においてActinobacteria綱、

Betaproteobacteria綱が多く検出された(図1)。沈澱処理水においてはBetaproteobacteria綱が主要となることが多かったが、Gammaproteobacteria綱が多く検出される月もあった。ろ過水においてはAlphaproteobacteria綱、Betaproteobacteria綱、Gammaproteobacteria綱が主に検出され、主要な綱は時期によって異なった。また沈澱処理水とろ過水の微生物相を比較したところ、2013年9月、11月、2014年1月、5月、7月、8月、10月、11月において主要となる綱は大きく異なった。とくに沈澱処理水より検出される割合の低かったAlphaproteobacteria綱が、ろ過水において主要となることがあった。

総リード数の5%以上を占めたOTU (Operational Taxonomic Unit) を主要な微生物としたところ、5門17属に分類された(表1)。これらのうち*Pseudarcicella*属、*Sphingomonas*属、*Moraxella*属は、検出された回数が6～8回と多かった。*Synechococcus*属、*Methylobacterium*属、*Rhizobium*属、*Azorhizobium*属、*Janthinobacterium*属、*Undibacterium*属、*Ralstonia*属、*Acinetobacter*属、*Moraxella*属、*Deinococcus*属等10属の原水、沈澱処理水におけるリード数は少なく、ろ過水において5%以上に高まった。また*Candidatus Planktophilia limnetica*、*Pseudarcicella*属および*Rhizobium*属等については、既知種との相同性が低く未培養の系統と考えられ、次世代シーケンサーによる評価の有用性が示された。

2) 千葉県水道局栗山浄水場

2014年8月7日の試料採取時における濁度は原水17度、沈澱水0.86度、ろ過水0.05度であった。ピコシアノバクテリアとしてはPC-typeが主要であり、細胞数は原水93000 cells/ml 沈澱水13000 cells/mlであった。ろ過水は自家蛍光の退色により定量出来なかった。次世代シーケンサーにより解析した結果、各工程水より得られた総リード数は16万～22万リードであった。原水、沈澱処理水、ろ過水においてProteobacteria門の割合が最も大きく、特にろ過水では70%以上を占めた(図2)。このことからProteobacteria門に着目し、綱レベルでの評価を行った。原水においてはBetaproteobacteria綱がProteobacteria門に対し80%を占め、沈澱水においてはAlphaproteobacteria綱が37%、Betaproteobacteria綱が43%を占めた(図3)。ろ過水においてはAlphaproteobacteria綱が60%を占めた。ろ過水において5000リード以上が検出されたOTUについて属レベルで評価したところ、Proteobacteria門より3 OTUs、Planctomycetes門より1 OTU得られた。Proteobacteria門のうち2 OTUsは*Sphingomonas*属に、1 OTUは*Enhydrobacter*属に近縁であった。*Sphingomonas*属と*Enhydrobacter*属はろ過水において11～22%を占め、主要な微生物であることが明らかとなっ

た。各処理工程水から検出された *Synechococcus* 属は11OTUsに分けられた(表2)。原水ではPC-typeである *Synechococcus* sp. PCC9005に近縁なリード数が *Synechococcus* 属の全リード数に対して90%を占めた。落射蛍光顕微鏡観察においてPC-typeの細胞が多く観察されたため、整合性が得られた。沈澱処理水、ろ過水からは原水ではほとんど検出されなかった *Synechococcus* sp. MH305 や *Synechococcus* sp. MW6B4が検出され、ろ過漏出障害の原因の一つである可能性が示唆された。またろ過水に占める *Synechococcus* 属のリード数は総リード数の1%程度であり、栗山浄水場におけるろ過漏出障害の原因生物として、従来ピコシアノバクテリアが考えられてきたが、従属栄養細菌による影響も大きいことが示唆された。

C-2 草木湖の微生物群集構造解析

4月の表層、5月の底層はPCRの増幅がみられず、解析することが出来なかった。7月、8月、9月の表層においてCyanobacteria門が多く検出された(図4)。この時顕微鏡観察において、ピコシアノバクテリアのPE-type(7月)、*Pseudanabaena* 属(8月)、ピコシアノバクテリアのPE-typeおよび*Pseudanabaena* 属(9月)が優占していた。化学合成生物ではProteobacteria門およびActinobacteria門が多く検出された。網レベルで見ると、Proteobacteria門ではBetaproteobacteria綱、Actinobacteria門ではActinobacteria綱が主要であった。中層、底層ではCyanobacteria門の割合が低下し、化学合成生物で微生物群集が構成されていた。中層は全ての層の中で最も多様性に富んでおり(rarefaction curveによる評価)、Proteobacteria門とActinobacteria門で総リード数の55~68%を占めた。網レベルでは、Proteobacteria門ではBetaproteobacteria綱が、Actinobacteria門ではActinobacteria綱が主要であった。底層は、4~8月は中層と同様にProteobacteria門とActinobacteria門の割合が大きかったが、9月においてBacteroidetes門の割合が高まった。網レベルにおいては、中層と同様にProteobacteria門ではBetaproteobacteria綱が、Actinobacteria門ではActinobacteria綱が主要であった。9月のBacteroidetes門の中ではFlavobacteriia綱が主要であった。

UniFracにより化学合成生物の群集構造の評価を行ったところ、表層は月ごとに異なる位置にプロットされ、季節による群集構造の変化が大きいことが示唆された。中層は全ての月において近い位置にプロットされ、群集構造の変化が小さいことが明らかとなった。4~7月は中層と底層が近い位置にプロットされ、8、9月は中層と底層のプロットが離れていた。8月以降躍層が水深50m付近に形成され、中層と底層が混合していないことが群集構造の違いの一つの要因として示唆された。

草木湖の微生物群集構造が水深、時期によって異なることが明らかとなった。

C-3 真核ピコ植物プランクトンの検出技術

真核ピコ植物プランクトン(CH-type)の細胞数は春季と7月に 10^4 cells/ml程度に高まった(図5)。1~12月の試料から得られたクローンについて、塩基配列間の相同性が97%以上を同一のOTUとしたところ5 OTUsに分かれた。相同性検索を行ったところMychonastes属およびChlamydomonas属に近縁であった(表3)。過去2年間に検出された緑藻綱は、*Mychonastes homosphaera*、*Chlamydomonas noctigama*のみであったが、今年度はこれまで検出されなかった種も検出された。以上より緑藻綱の生物相を評価する上で、本年度用いたプライマーの有用性が明らかになった。また、Mychonastes属に近縁なOTUの検出頻度、検出割合が高く、今回検出された緑藻綱の中で2 μ m程度の細胞サイズのみはMychonastes属のみであった。以上の結果から草木湖における主要な緑藻綱の真核ピコ植物プランクトンはMychonastes属であることが明らかになった。

E. 結論

次世代シーケンサーにより、浄水場処理工程水の微生物相および主要な細菌を評価した。工程水間、とくに沈澱処理水とろ過水間で微生物相が異なることが明らかとなった。微生物相の異なる要因、ろ過水において主要な微生物の濁度への影響および検出されるメカニズムについて今後検討する必要がある。

次世代シーケンサーを用いて草木湖の微生物群集構造の解析を行い、水深、時期によって異なることが明らかとなった。

緑藻綱の18S rRNA遺伝子を特異的に増幅させるプライマーにより緑藻綱の生物相を評価することができた。緑藻綱Mychonastes homosphaeraに近縁なクローンの検出頻度が高く、草木湖における0.2~3 μ mのサイズの主要な真核生物であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

Fujimoto N., Mizuno K., Yokoyama T., Ohnishi A., Suzuki M., Watanabe S., Komatsu K., Sakata Y., Kishida N., Akiba M. and Matsukura S., Community analysis of picocyanobacteria in an oligotrophic lake by cloning 16S rRNA gene and 16S rRNA gene amplicon sequencing, J. Gen. Appl. Microbiol., 2015, 61, pp. 171-176.

学会発表

渡邊英梨香, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 岸田直裕, 秋葉道宏. 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水処理工程水の細菌相の評価. 平成 27 年度全国会議(水道研究発表会); 2015 年 10 月, さいたま市. 同講演集 pp. 630-631.

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) 矢澤秀行, ピコプランクトンによる浄水処理障害とその対策, 用水と廃水, 2002, 44(9), pp. 15-21.

2) 藤本尚志, 村田昌隆, 大西章博, 鈴木昌治, 矢島修, 岸田直裕, 秋葉道宏, 分子生物学的手法による浄水場における濁度障害原因生物の解明、水道協会雑誌, 2013, 82(5), pp.2-10.

3) 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 岸田直裕, 秋葉道宏. クローニング法および次世代シーケンサーによるろ過漏出障害原因生物の評価. 平成 26 年度全国会議(水道研究発表会); 2014 年 10 月; 名古屋. 同講演集 pp. 540-541.

4) Fujimoto N., Matsuo E., Murata M., Nomura K., Ohnishi A., Suzuki M., Enmoto K., Yamaguchi S., Yanagibashi Y., Kishida N. and Akiba M., Evaluation of the Small-Eukaryote Community Composition in a Mesotrophic Lake by Sequencing the 18S rRNA Genes, Japanese Journal of Water Treatment Biology, 2014, 50(2), pp. 85-94.

5) Moro C. V., Crouzet O., Rasconi S., Thouvenot A., Coffe G., Batisson I. and Bohatieret J., New Design Strategy for Development of Specific Primer Sets for PCR-Based Detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in Environmental Samples, Appl. Environ. Microbiol., 75, 5729-5733 (2009).