

令和3年度 水質保全研究助成 成果報告会

発表者資料

〔令和4年3月4日〕



公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構

目 次

| | | 頁 |
|---|---------------------------|------------|
| 1 .琵琶湖淀川水系上流域と周辺地域土壌ならびに雨水における抗菌薬耐性菌・耐性遺伝子の検出調査 | 京都大学大学院医学研究科 徳野 治 准教授 | 1- 1 10 |
| 2 .高解像度の遺伝子解析手法を用いた琵琶湖・淀川水系における病原細菌の一斉検出 | 京都大学大学院工学研究科 中西 智宏 助教 | 2- 1 14 |
| 3 .琵琶湖・淀川水系における超親水性溶存有機物の化学的描像 | 京都大学大学院地球環境学堂 越後 信哉 教授 | 3- 1 13 |

琵琶湖淀川水系上流域と周辺地域土壌ならびに
雨水における抗菌薬耐性菌・耐性遺伝子の検出調査

京都大学大学院医学研究科
徳野 治 准教授

公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構
令和3年度水質保全研究助成
成果報告会

琵琶湖淀川水系上流域と周辺地域土壌 ならびに雨水における抗菌薬耐性菌・ 耐性遺伝子の検出調査

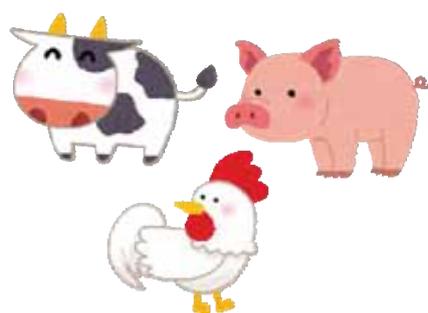
京都大学大学院医学研究科
人間健康科学系専攻
徳野 治

2022年3月4日

抗菌薬（抗生物質）を使う事業所



医療機関



畜産業

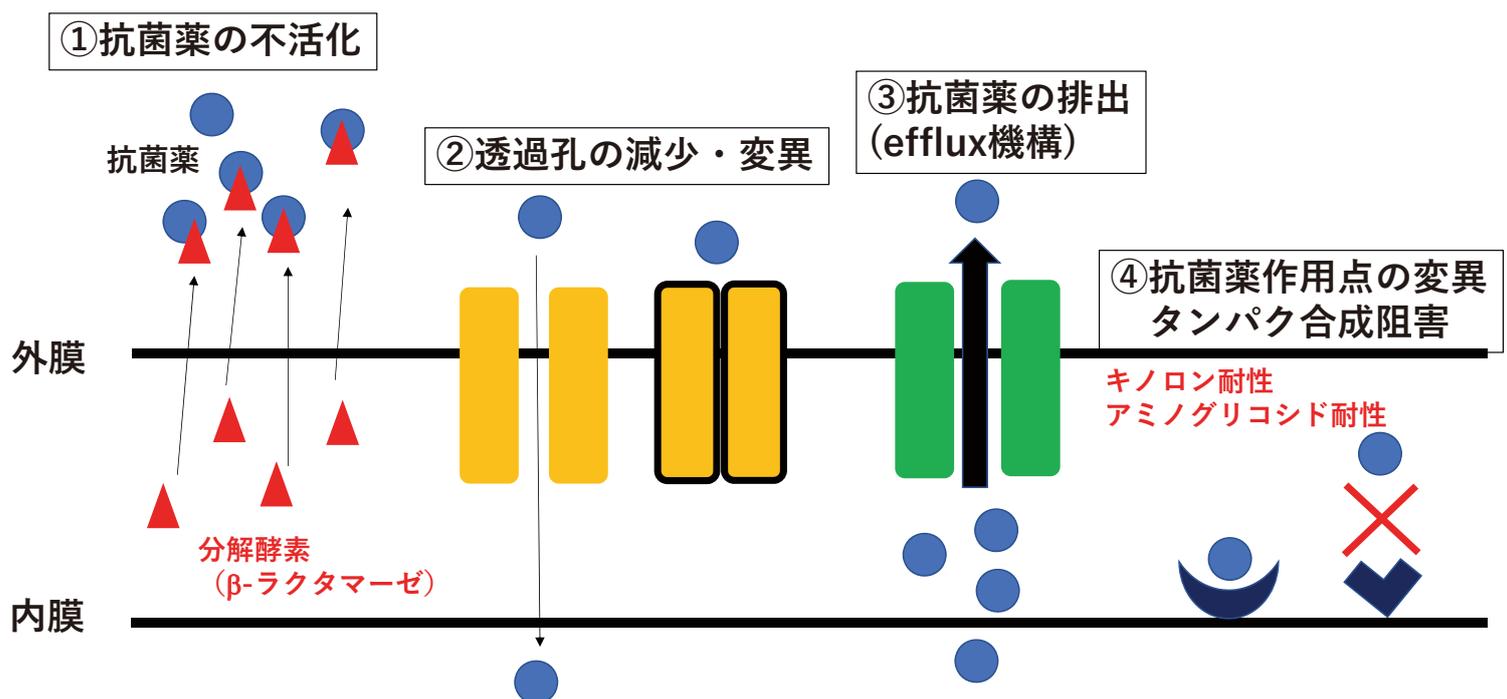
「耐性菌」が発生しやすい場所でもある

臨床分野で重視されている耐性菌

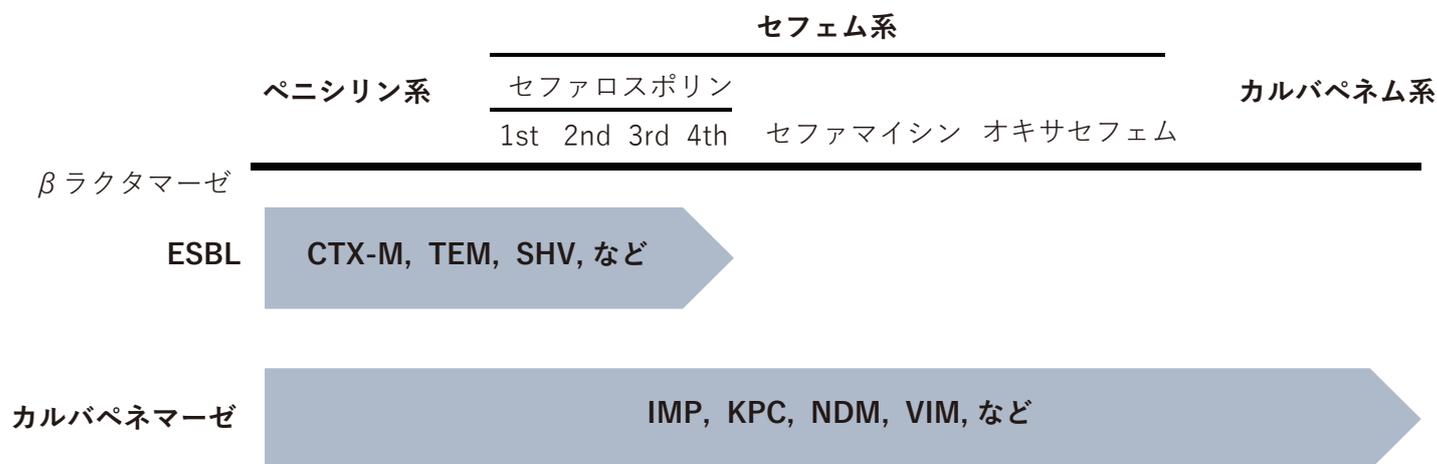
- メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)
- ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)
- バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)
- 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌 (ESBL)
- カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)
- 多剤耐性アシネトバクター (MDRA)
- 多剤耐性緑膿菌 (MDRP)
- フルオロキノロン耐性大腸菌 (FQREC)

グラム陰性菌が席捲

抗菌薬耐性機構の概要



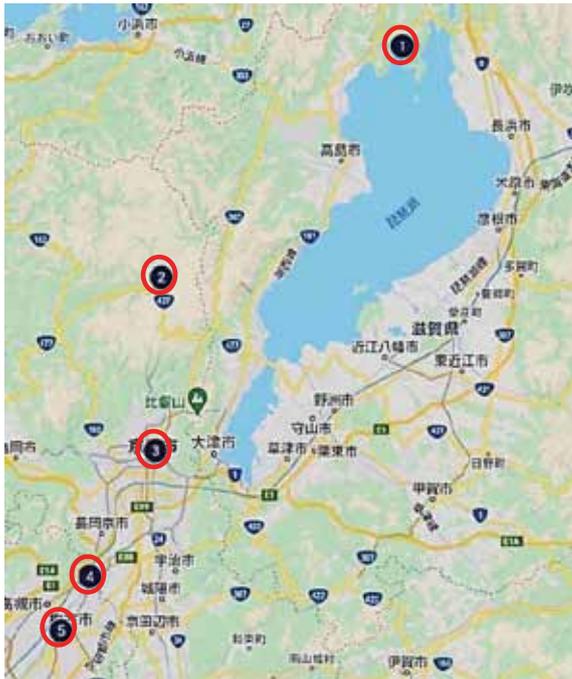
耐性菌が産生する β -ラクタマーゼと その基質



耐性菌・耐性遺伝子の環境への拡散 — 水循環関与の可能性



河川湖沼水と雨水のサンプリング



- ①琵琶湖北部（滋賀県長浜市西浅井町 赤崎丸子舟パーキング）
- ②桂川上流（京都市左京区花脊 山村都市交流の森付近）
- ③鴨川（京都市左京区 荒神橋付近）
- ④桂川・宇治川・木津川合流域（京都府八幡市橋本）
- ⑤淀川中流（大阪府枚方市 淀川河川公園枚方地区）



雨水

京都大学医学部構内で
随時採取（7月～10月）

図：Googleマップ



琵琶湖北部



左の採取地点近隣斜面

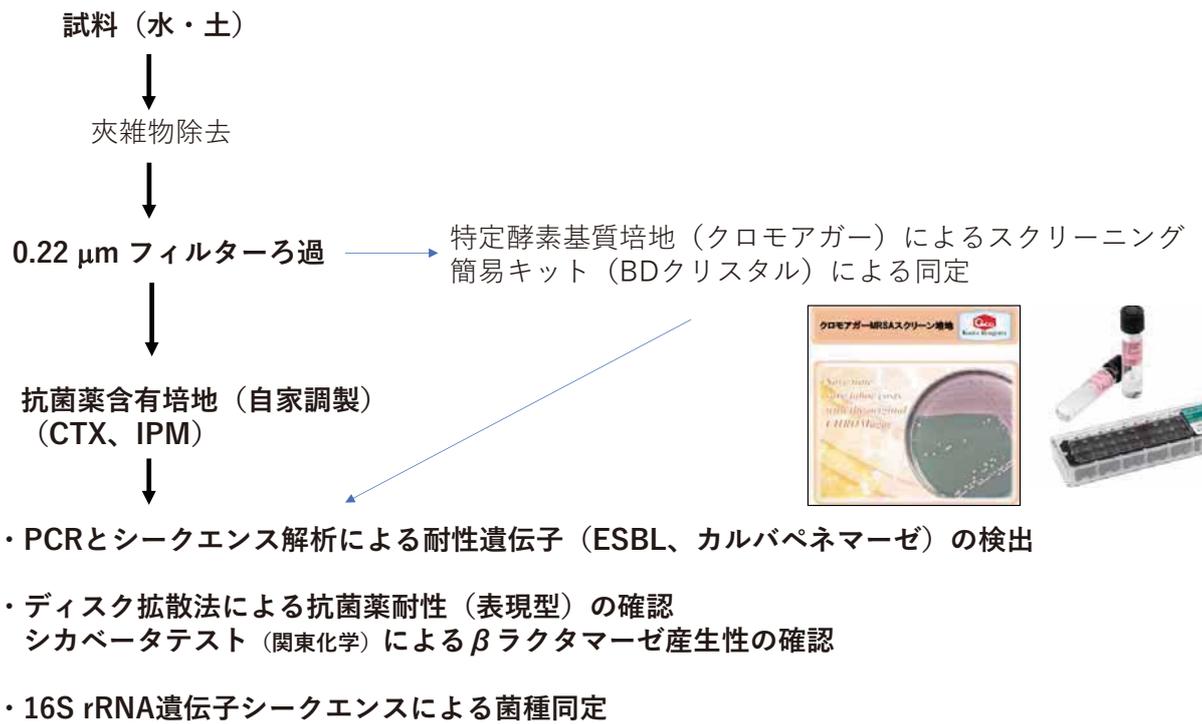


3 河川合流域



ろ過器

実験フローチャート



琵琶湖北部（2021年6月17日採取）

同定はBDクリスタル（キット）による

| | G染色 | カタラーゼ | オキシダーゼ | コロニー色 | 菌種 | 同定確率 |
|---------|-----|-------|--------|-------|-------------------------------------|----------|
| MDRA1 | P/R | - | + | 赤 | | |
| MDRA2 | N/R | - | + | 赤 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.81618 |
| MDRA3 | P/R | - | + | 赤 | | |
| MDRA4 | N/R | + | +(弱) | 赤 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 0.99919 |
| MDRA5 | N/R | - | + | 赤 | | |
| MDRA6 | N/R | - | + | 赤 | | |
| MDRA7 | N/R | - | +(弱) | 赤 | | |
| MDRA8 | N/R | + | - | 赤 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | >0.99999 |
| ESBL1 | N/R | + | + | 白 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0.83834 |
| ESBL2 | N/R | + | + | 白 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.49565 |
| ESBL3 | N/R | + | + | 白 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.59093 |
| ESBL4 | N/R | + | - | 白 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | >0.99999 |
| ESBL5 | N/R | - | + | 青 | | |
| ESBL6 | N/R | + | - | 紫 | <i>Hafnia alvei</i> | 0.99989 |
| ESBL7 | N/R | | | 青 | | |
| CARBA1 | N/R | + | + | 白 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 0.99569 |
| CARBA2 | N/R | + | + | 白 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0.9206 |
| CARBA3 | N/R | + | + | 白 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.62874 |
| CARBA4 | N/R | + | + | 白 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.40723 |
| CARBA5 | N/R | + | + | 白 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.58522 |
| CARBA6 | N/R | + | + | 白 | | |
| CARBA7 | P/R | + | + | 白 | | |
| CARBA8 | N/R | + | + | 白 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.63134 |
| CARBA9 | N/R | + | + | 白 | <i>Brevudimonas diminuta</i> | 0.71121 |
| CARBA10 | N/R | + | + | 白 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.59093 |

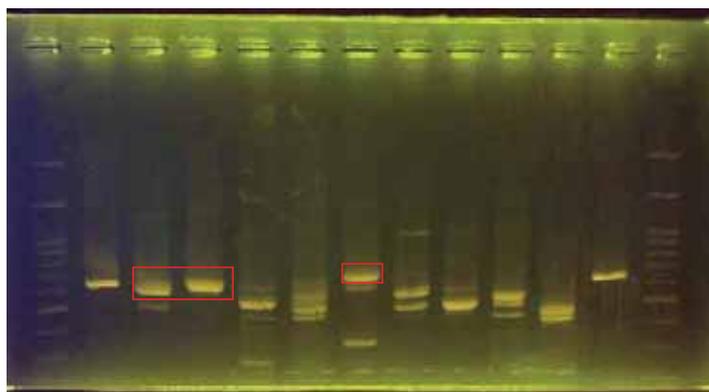
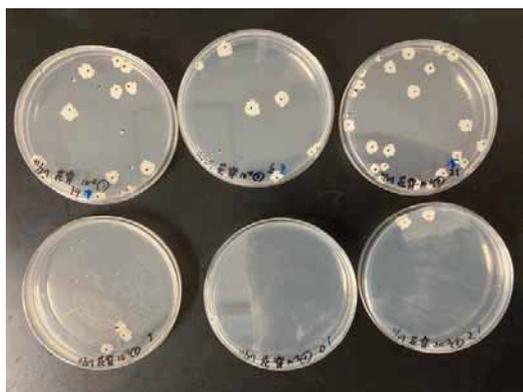
MDRA No. 4



*S. maltophilia*はイミペネムに自然耐性

日和見感染菌がほとんどであった

桂川（大堰川）上流（2021年11月27日採取）



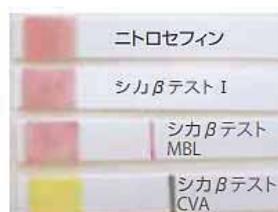
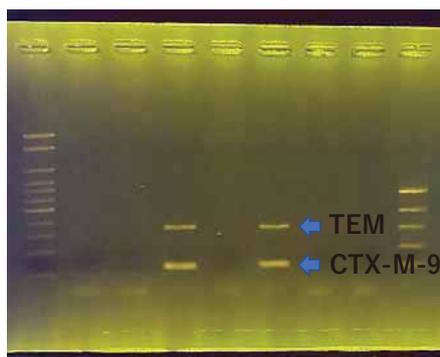
IMP group 1 PCR

- シーケンス解析では耐性遺伝子は確認できなかった
- Stenotrophomonas sp.* *Serratia sp.* *Hafnia alvei* *Bacillus cereus*
Pseudomonas sp. など

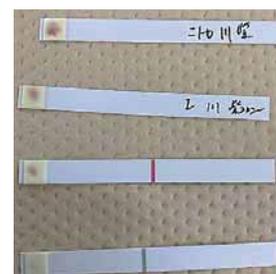
鴨川（2021年5月31日採取）



| | スクリーニング培地 | サンプル | コロニー色(スクリーニング培地) | 菌種 | 同定確率 |
|----|-----------|------|------------------|--------------------------------|---------|
| 5 | MDRP | 水 | 紫 | <i>E.coli</i> | 0.9939 |
| 6 | MDRA | 水 | 赤 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0.95648 |
| 7 | ESBL | 水 | 紫 | <i>E.coli</i> | 0.85433 |
| 8 | ESBL | 水 | 白 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 0.95055 |
| 9 | CPE | 水 | 紫 | 判定不可 | |
| 10 | CPE | 水 | 白 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | >0.9999 |



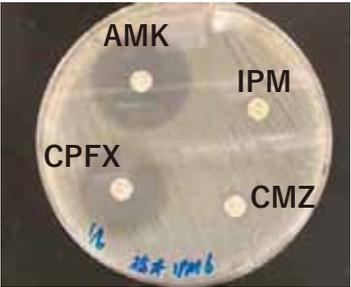
ESBL産生菌
シカベータテスト説明書より

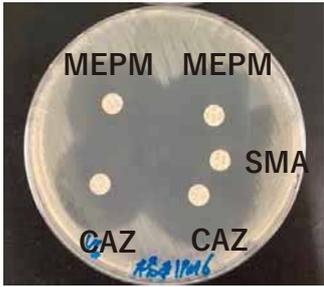


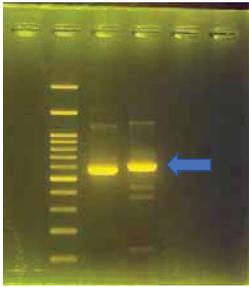
CTX-MとTEMをもつESBL産生大腸菌を検出

3 河川合流域・淀川中流 (2021年10月26日採取)

合流域





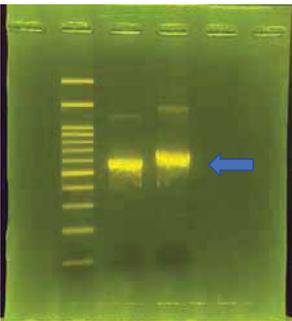


耐性遺伝子：IMP-7
菌種：*Stenotrophomonas sp.*

淀川中流



メタロ-β-ラクタマーゼ産生



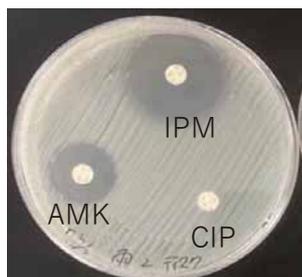
耐性遺伝子：IMP-7
菌種：*Acinetobacter sp.*

雨水 (2021年7月14日採取)

同定はBDクリスタル (キット) による

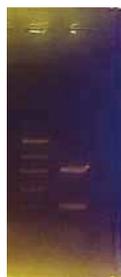
| | 培地 | コロニー色 | カタラーゼ | オキシダーゼ | G染色 | 菌種 | 同定確率 |
|---|------|-------|-------|--------|-----|-------------------------------------|----------|
| 1 | MRSA | 紫 | + | + | P/R | | |
| 2 | MDRP | 紫 | + | - | N/R | <i>Escherichia coli</i> | 0.99561 |
| 3 | MDRA | 赤 | + | - | N/R | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | >0.99999 |
| 4 | ESBL | 白 | + | - | N/R | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 0.99955 |
| 5 | ESBL | 白 | + | - | N/R | <i>Acinetobacter baumannii</i> | >0.99999 |
| 6 | ESBL | 紫 | + | - | N/R | <i>Citrobacter freundii</i> | 0.85048 |
| 7 | CPE | 白 | + | - | N/R | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 0.99986 |
| 8 | CPE | 白もや | + | + | N/R | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.65222 |

No. 2



シプロフロキサシン耐性大腸菌

No. 6

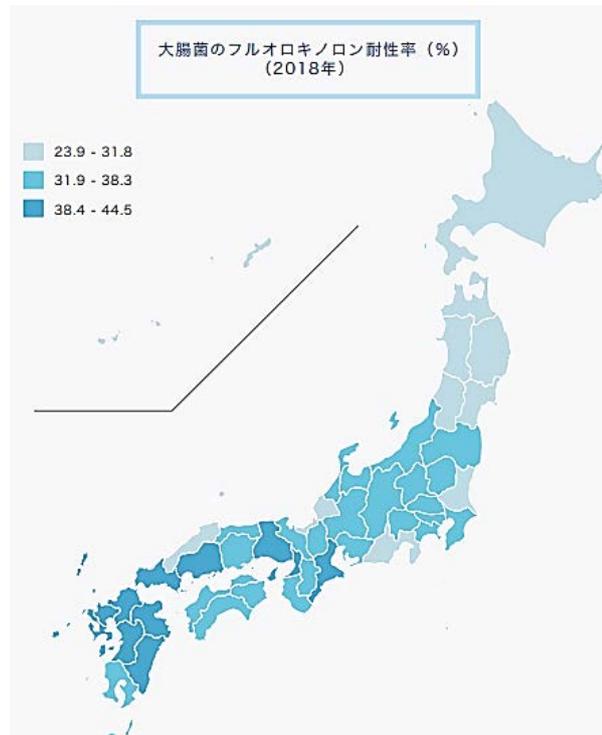
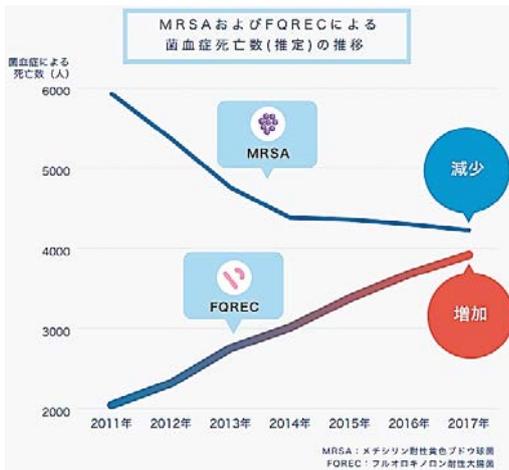


ESBL遺伝子を検出



表現型 (耐性) は陰性

地理的分布について



データで振り返る薬剤耐性の現状2019
AMR臨床リファレンスセンター (2020年3月)

地理的分布について

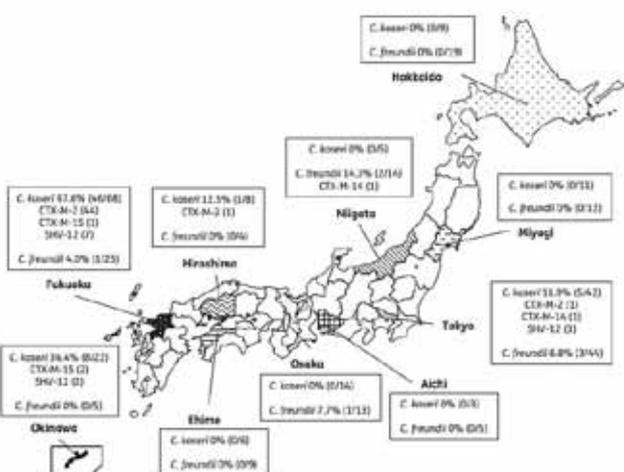


Table 1. Profiles of isolates taken from six patients in the intensive care unit (ICU) and high care unit (HCU) of a Japanese critical care center

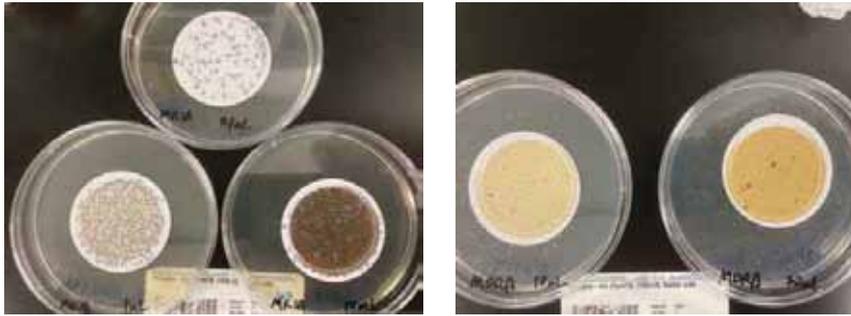
| Isolated by | Lane | Patient | Age, year/ Sex | Organism | Admission | Underlying disease | Date | Source | PFGE g*AP | ESBL | | | | AmpC-βL |
|---------------------|------|---------|-------------------|-------------|-----------|-----------------------------|------|---------|--------------|------|--------|--------|--------|---------|
| | | | | | | | | | | TEM | CTX-M1 | CTX-M2 | CTX-M9 | |
| Clinical specimen | 1 | I | 80M | C. freundii | ICU | Burn | X | Abscess | - | - | - | - | - | (+) |
| | 2 | I | 79M | C. freundii | ICU | Acute subdural hematoma | X+1 | Sputum | A | - | - | - | - | (+) |
| | 3 | II | 80M | C. freundii | ICU | Traumatic pancreatic injury | X+2 | Abscess | - | - | - | - | - | (+) |
| Active surveillance | 4 | IV | 50M | C. freundii | ICU | Meningioma | X+5 | Stool | - | - | - | - | - | (+) |
| | 5 | II | 80M | C. freundii | ICU | Traumatic pancreatic injury | X+5 | Sputum | B | (+) | - | - | (+) | - |
| | 6 | II | 80M | C. freundii | ICU | Traumatic pancreatic injury | X+5 | Stool | B | (+) | - | - | (+) | - |
| | 7 | I | 79M | C. freundii | ICU | Acute subdural hematoma | X+5 | Sputum | A | - | - | - | - | (+) |
| | 8 | I | 79M | C. freundii | ICU | Acute subdural hematoma | X+5 | Stool | A | - | - | - | - | (+) |
| | 9 | V | 83F | E. coli | ICU | Sick sinus syndrome | X+5 | Urine | - | - | - | - | (+) | - |
| | 10 | VI | 64F | E. coli | ICU | Meningioma | X+5 | Stool | - | - | - | - | (+) | - |

Lane numbers taken from the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis. All the isolates were revealed to be resistant to third-generation cephalosporins. The present study revealed that various kinds of highly resistant Enterobacteriaceae (*Clostridium freundii* and *Escherichia coli*) existed at the critical care center simultaneously (+). Positive result; -, not present; X, date when C. freundii with the same antibiotic susceptible pattern.

H Hagiya et al.
Acute Medicine & Surgery 2014; 1: 256-258

H Kanamori et al.
J Antimicrob Chemother 2011; 66: 2255-2262

土壌(琵琶湖北部)



微粒子の除去が困難であった

| スクリーニング培地 | G染色 | オキシダーゼ | カタラーゼ | 菌種 | 同定確率 |
|-----------|-----|--------|-------|--|---------|
| MDRA1 | P/R | + | + | <i>Corynebacterium pseudodiphtheriolum</i> | 0.97495 |
| MDRA2 | P/R | + | + | <i>Corynebacterium genitalium</i> | 0.99033 |
| ESBL1 | P/R | - | - | 判定不可 | |
| ESBL2 | P/R | + | + | <i>Corynebacterium renale</i> group | 0.98612 |
| CARBA1 | P/R | + | + | <i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> | 0.99693 |
| CARBA2 | P/R | + | + | <i>Bacillus badius</i> | 0.49294 |

土壌については方法の再検討が必要

まとめと今後の課題

- 鴨川でESBL産生大腸菌、合流域と淀川でIMP型カルバペネマーゼ遺伝子保有菌が検出された
- 雨水からキノロン耐性大腸菌ならびにESBL遺伝子保有シトロバクター属が検出された ⇒ 降雨（雨水）を介した拡散の可能性
- 耐性菌/耐性遺伝子の捕獲・解析方法の改良が必要
- 分子疫学的解析：「いつどこで発生したものか？」という起源の問題
- 継続的な調査研究が必要

謝辞

本研究は、公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構の
「令和 3 年度水質保全研究助成」を受け、行いました。

ここに記し、感謝の意を表します。

高解像度の遺伝子解析手法を用いた
琵琶湖・淀川水系における病原細菌の一斉検出

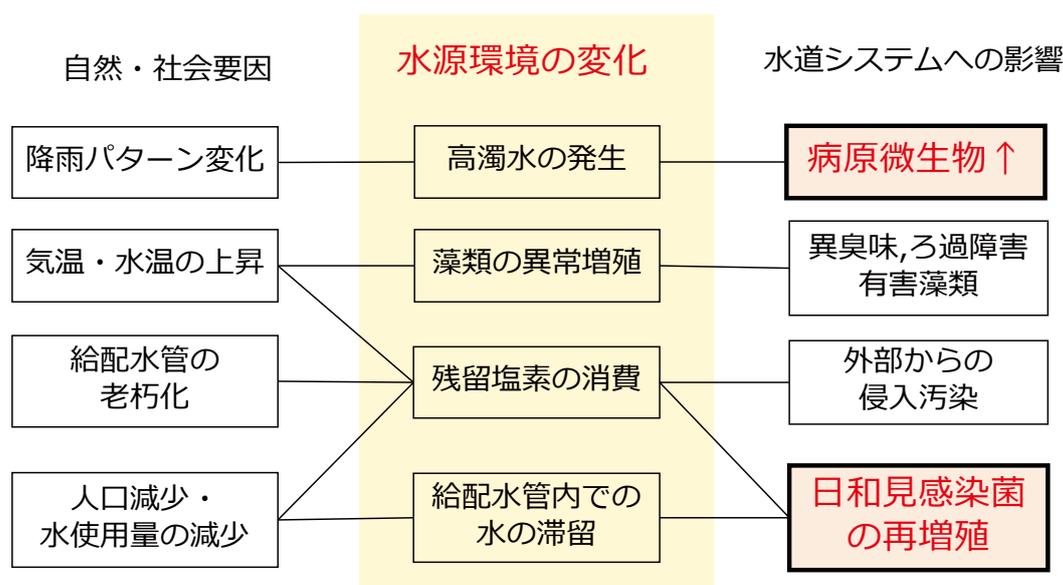
京都大学大学院工学研究科
中西 智宏 助教

琵琶湖・淀川水質保全機構
令和3年度 水質保全研究助成 成果報告会

高解像度の遺伝子解析手法を用いた 琵琶湖・淀川水系における病原細菌の一斉検出

京都大学大学院 工学研究科
中西 智宏、曾 潔

背景 | 水道水の微生物問題



水源における病原微生物の存在実態を把握することが重要

背景 | 細菌の一斉検出における分類解像度

| 分類階級 | 分類名 |
|-------|-------------------------|
| 界 | <i>Bacteria</i> |
| 門 | <i>Proteobacteria</i> |
| 綱 | <i>γ-Proteobacteria</i> |
| 目 | <i>Legionellales</i> |
| 科 | <i>Legionellaceae</i> |
| 属 | <i>Legionella</i> |
| 種 | <i>L. pneumophila</i> |
| 血清型など | (SG1) |

病原体の検出には最低でも
「種」レベル
までの同定が必要

既存の超並列DNAシーケンサーで
は分類解像度に限界がある
(良くて**属レベル**まで)

細菌の一斉検出・分類群同定をより
高解像度で行う必要あり

背景 | ロングリードによる分類解像度の向上

従来型HTS (Illumina社Miseq)

ショートリード (従来法)

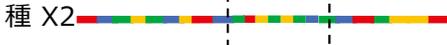
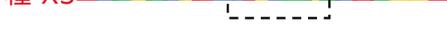
塩基長 : ~500 bp (16S rRNA遺伝子のV3-V4領域など)

種 X1  全ての種で同じ配列が検出
種 X2 
種 X3  病原種の識別が困難



ロングリード (本研究で用いる手法)

塩基長 : 1500 bp (16S rRNA遺伝子全長)

種 X1  可変
種 X2 
種 X3  種によって異なる配列を検出
高い精度で病原種の検出が可能

ロングリード型HTS



技術的な課題 :

- 塩基配列の解読エラーが多い
- 解析パイプラインが未確立

本研究の目的

- 16S rDNA全長を解読対象とした細菌一斉検出手法における検出感度・精度のチェック
- 上記手法の適用により、桂川～淀川水系における病原細菌群の分布や季節性を把握すること

16S rDNA全長を解読対象とした
細菌の一斉検出手法における
検出感度・精度のチェック

方法 | 標準DNA試料

既知の細菌種由来のDNAが既知の濃度
で混合された標準試料

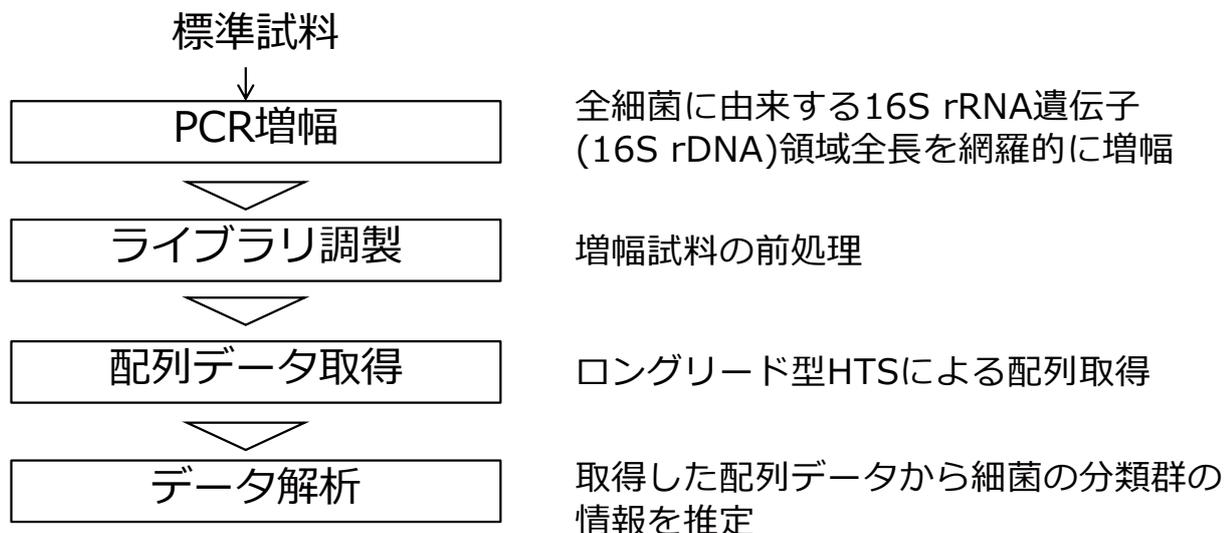
使用製品：

NBRC Microbial DNA Cocktail

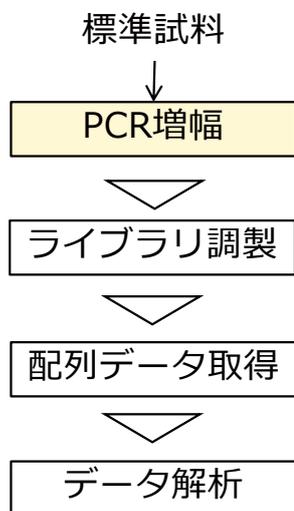
(独立行政法人 製品評価技術基盤機構)

| 学名 | 16S rDNAの存在割合 (理論値) (%) |
|---|-------------------------|
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> | 6.3 |
| <i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> | 10.5 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 4.2 |
| <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> | 5.3 |
| <i>Clostridium butyricum</i> | 11.6 |
| <i>Comamonas terrigena</i> | 7.4 |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | 4.2 |
| <i>Cutibacterium acnes subsp. acnes</i> | 3.2 |
| <i>Enterocloster clostridioformis</i> | 5.3 |
| <i>Escherichia coli</i> (K-12株) | 7.4 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> | 8.4 |
| <i>Parabacteroides distasonis</i> | 7.4 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | 7.4 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 6.3 |
| <i>Streptococcus mutans</i> | 5.3 |

方法 | 分析フローの概要



方法 | PCR増幅



増幅対象：16S rRNA遺伝子全長

プライマー対
使用キット

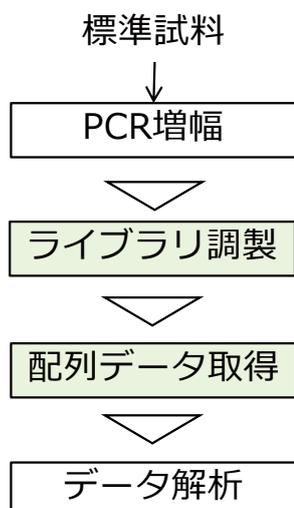
27F/1492R
16S Barcoding kit
(Oxford Nanopore Technologies社)

PCR条件：

| | 温度 | 時間 | |
|--------|--------|-------|---------------|
| 初期変性 | 95℃ | 60秒 | ← X25 サイクル |
| 変性 | 95℃ | 20秒 | |
| アニーリング | 50~60℃ | 30秒 | |
| 伸長 | 65℃ | 1分~3分 | |
| 最終伸長 | 65℃ | 5分 | |

適切なアニーリング温度・伸長時間について検討

方法 | ライブラリ調製～シーケンシング



ライブラリ調製：

- PCR産物のビーズ精製
- 増幅断片のサイズ確認
- dsDNA濃度定量



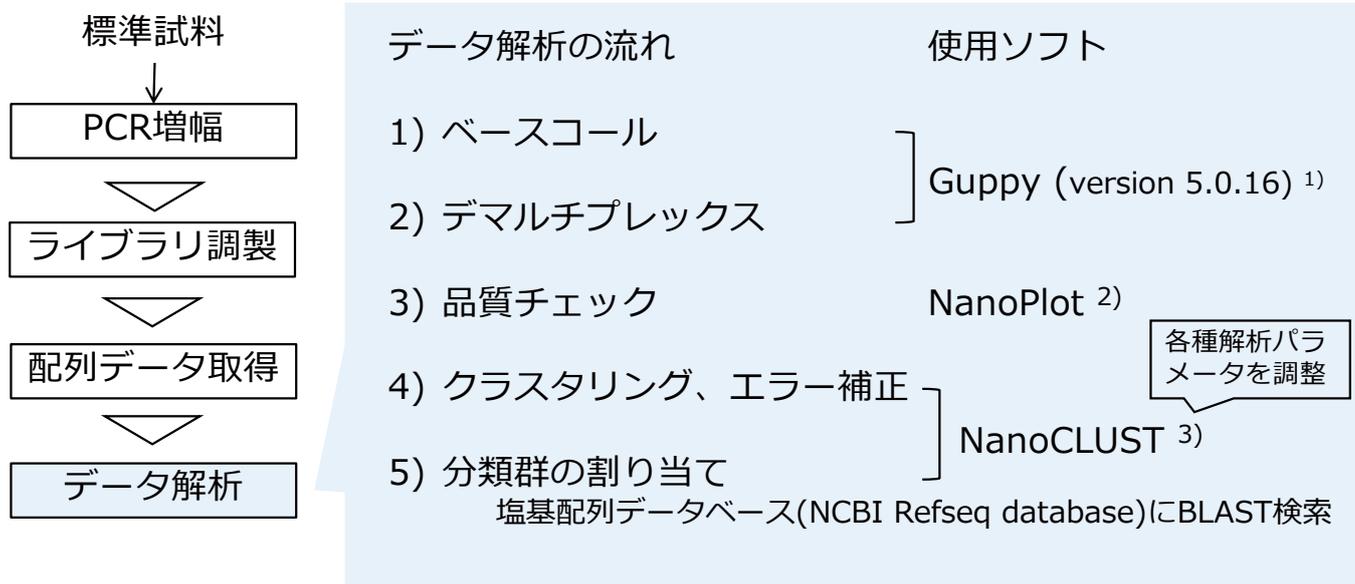
使用したMinIONと解析用PC

シーケンシング：

- 使用機種 MinION MK1B (Oxford Nanopore Tech.社)
- 取得リード数 約45万~60万リード/サンプル

→ 塩基配列データを取得

方法 | データ解析



1) Oxford Nanopore Tech.社 2)Coster et al.(2018) *Bioinformatics* 34(15),1666-1669. 3) Rodríguez-Pérez et al. (2020) *Bioinformatics* 37(11), 1600-1601.

方法 | 評価指標

◆細菌種の検出精度・感度

- 適合率 $TP/(TP+FP)$
- 再現率 $TP/(TP+FN)$
- F値 適合率と再現率の調和平均

| | | |
|------|------|-----------------------|
| TP : | 真陽性数 | 検出された種のうち、実際に存在する種の数 |
| FP : | 偽陽性数 | 検出された種のうち、実際に存在しない種の数 |
| FN : | 偽陰性数 | 存在しているにも関わらず検出されない種数 |

◆相対存在割合

結果 | 標準DNA試料に対する検出結果 (例)

| 真の細菌種 | 検出された細菌種 | 真の配列に対する類似性 (%) |
|--|---------------------------------------|-----------------|
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> | <i>Acinetobacter radioresistens</i> | 99.8 |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | 100 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | <i>Bacteroides uniformis</i> | 99.8~99.9 |
| <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> | 不検出 | - |
| <i>Clostridium butyricum</i> | <i>Clostridium butyricum</i> | 100 |
| <i>Comamonas terrigena</i> | <i>Comamonas terrigena</i> | 100 |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | <i>Corynebacterium striatum</i> | 99.5 |
| <i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i> | <i>Cutibacterium acnes</i> | 100 |
| <i>Enterocloster clostridioformis</i> | <i>Enterocloster clostridioformis</i> | 99.0 |
| <i>Escherichia coli</i> (K-12株) | <i>Escherichia fergusonii</i> | - |
| | <i>Escherichia marmotae</i> | 誤検出 |
| | <i>Shigella boydii</i> | - |
| | <i>Shigella flexneri</i> | - |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 99.9 |
| | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | 99.9 |
| <i>Parabacteroides distasonis</i> | <i>Parabacteroides distasonis</i> | 97.9~99.4 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | <i>Pseudomonas putida</i> | 99.9 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | <i>Staphylococcus caprae</i> | 誤検出 |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 99.9 |
| <i>Streptococcus mutans</i> | <i>Streptococcus mutans</i> | 100 |

PCR条件：
アニーリング50℃
伸長反応2分

赤字：
種レベルまで正しく同定
できた種

• 種レベルまでの同定精度は概ね良好

• *Escherichia*属のような16S rDNAの相同性が高い菌種は検出が難しい

結果 | 属レベルでの検出精度/感度

| アニーリング 温度(℃) | 伸長時間 (min) | 検出された/されなかった属の数 | | | 適合率 (-) | 再現率 (-) | F値 (-) |
|-----------------|---------------|-----------------|----------|----------|-------------|-------------|-------------|
| | | 真陽性数 | 偽陽性数 | 偽陰性数 | | | |
| 55 | 1 | 13 | 2 | 2 | 0.87 | 0.87 | 0.87 |
| 55 | 2 | 12 | 2 | 3 | 0.86 | 0.80 | 0.83 |
| 55 | 3 | 13 | 2 | 2 | 0.87 | 0.87 | 0.87 |
| 50 | 2 | 14 | 1 | 1 | 0.93 | 0.93 | 0.93 |
| 60 | 2 | 12 | 1 | 3 | 0.92 | 0.80 | 0.86 |

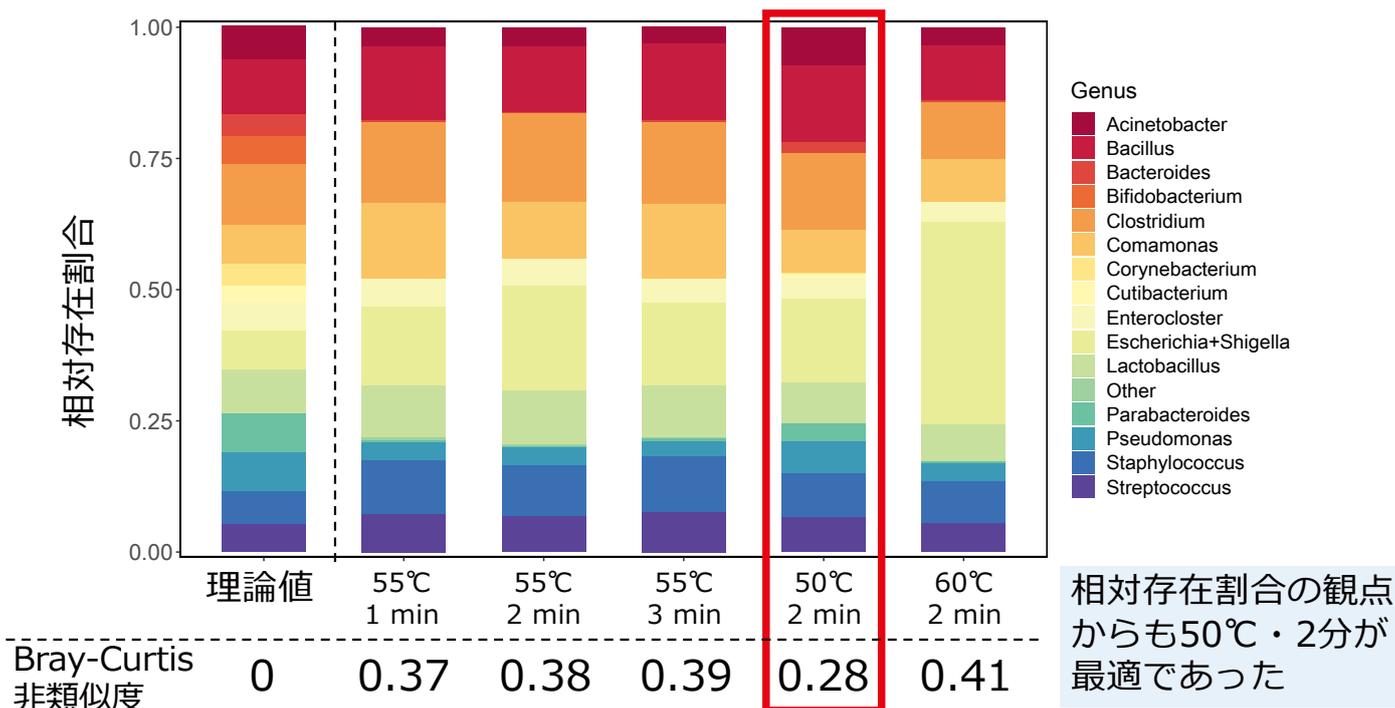
属レベルでは
検出精度・感度ともに最も大きい → 採用

結果 | 種レベルでの検出精度/感度

| アニーリング 温度(°C) | 伸長時間 (min) | 検出された/されなかった種の数 | | | 適合率 (-) | 再現率 (-) | F値 (-) |
|------------------|---------------|-----------------|----------|----------|-------------|-------------|-------------|
| | | 真陽性数 | 偽陽性数 | 偽陰性数 | | | |
| 55 | 1 | 12 | 5 | 3 | 0.71 | 0.80 | 0.75 |
| 55 | 2 | 11 | 5 | 4 | 0.69 | 0.73 | 0.71 |
| 55 | 3 | 13 | 6 | 2 | 0.68 | 0.87 | 0.76 |
| 50 | 2 | 13 | 6 | 2 | 0.68 | 0.87 | 0.76 |
| 60 | 2 | 11 | 4 | 4 | 0.73 | 0.73 | 0.73 |

属レベルよりはやや検出精度/感度は下がるものの、種レベルでも良好な検出結果が得られた

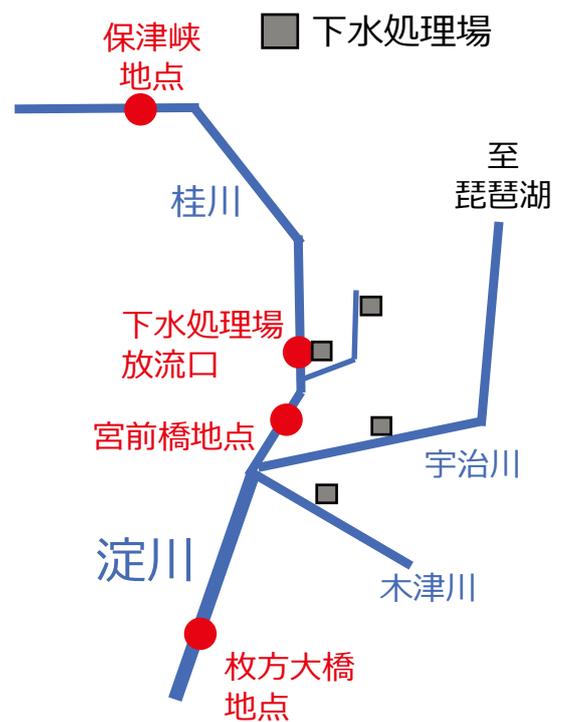
結果 | 各細菌種の相対存在割合



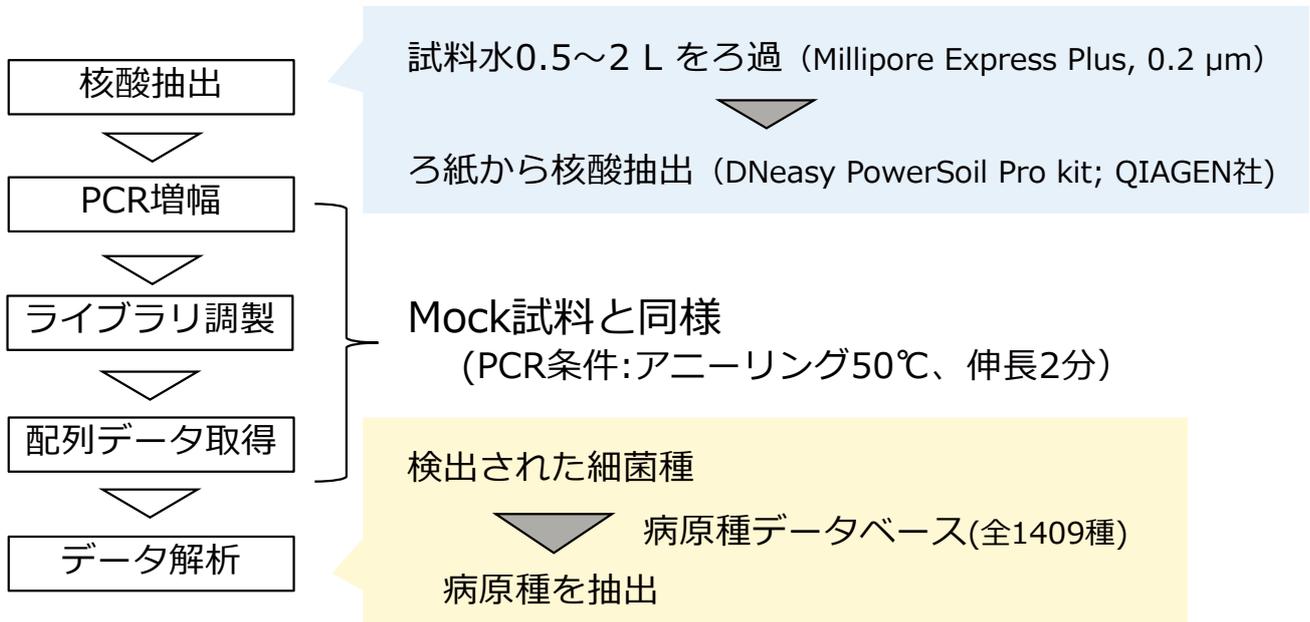
桂川～淀川水系における病原細菌の一斉検出

方法 | 調査地点

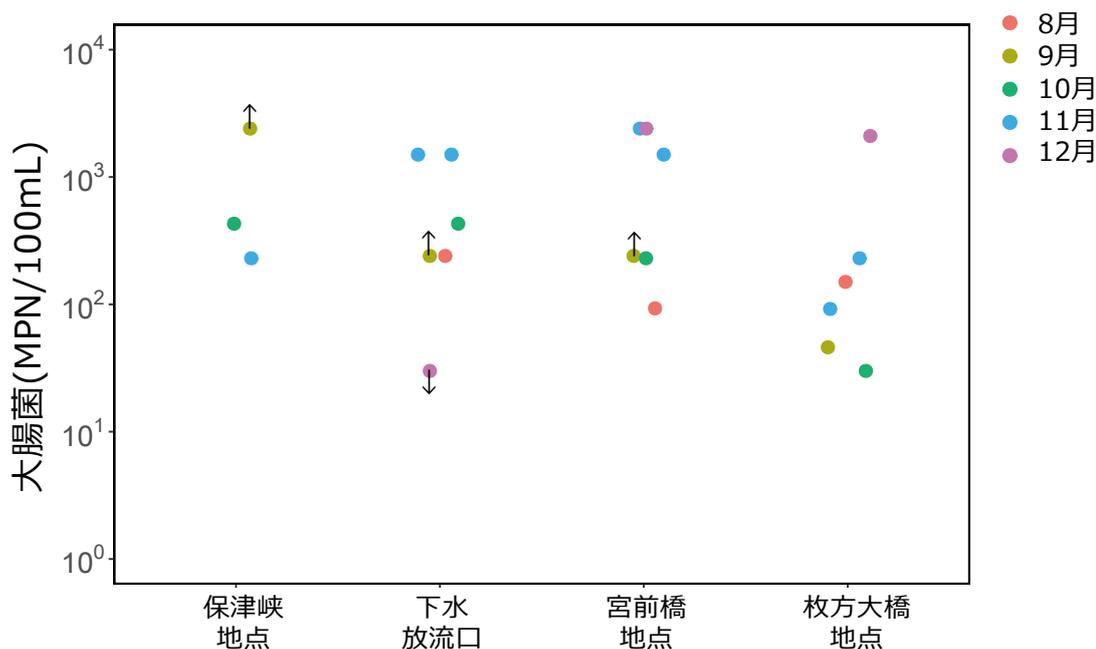
- 保津峡地点
- 下水処理場 放流水
- 宮前橋地点
- 枚方大橋地点



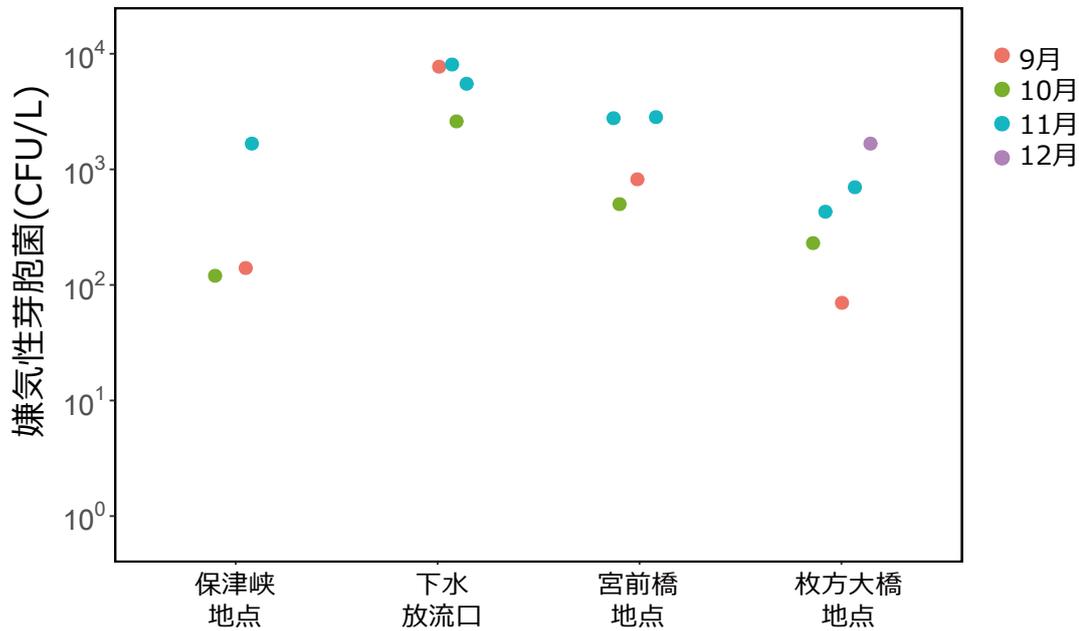
分析方法 | メタバーコーディング



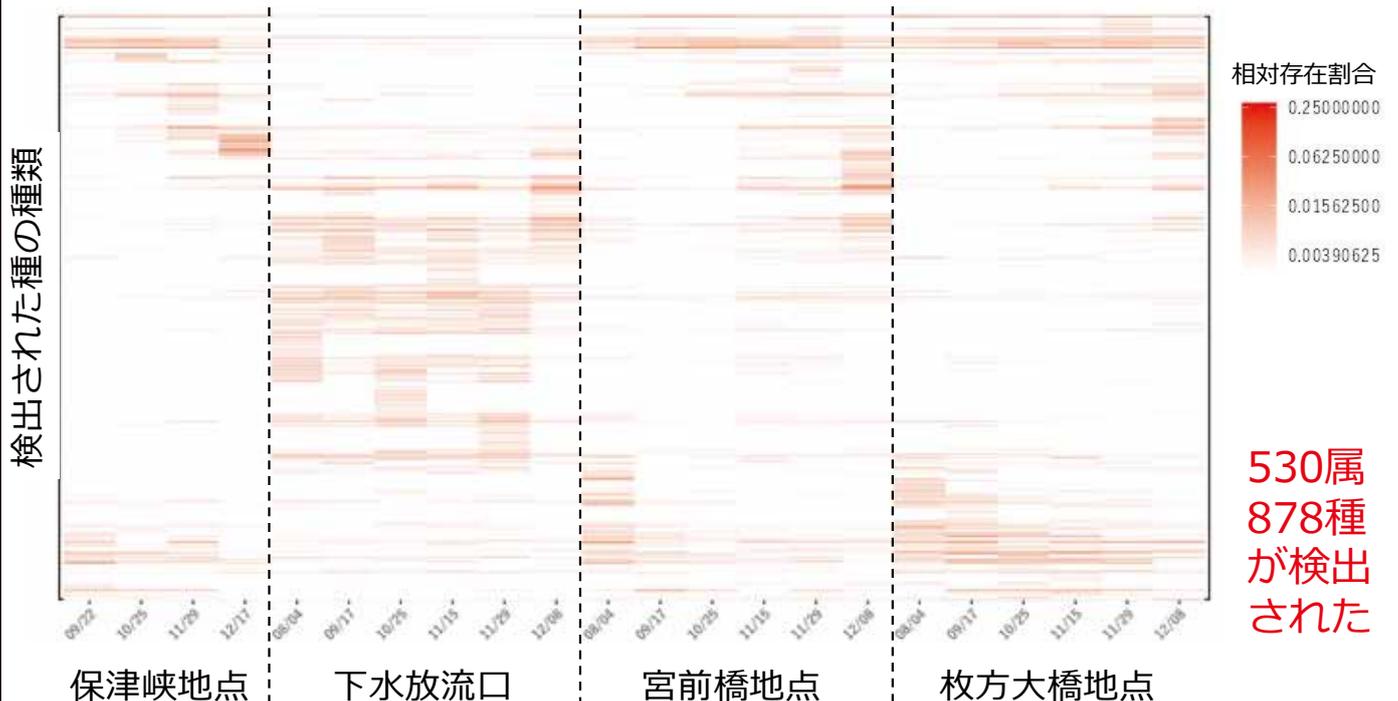
結果 | 大腸菌の検出結果



結果 | 嫌気性芽胞菌の検出結果

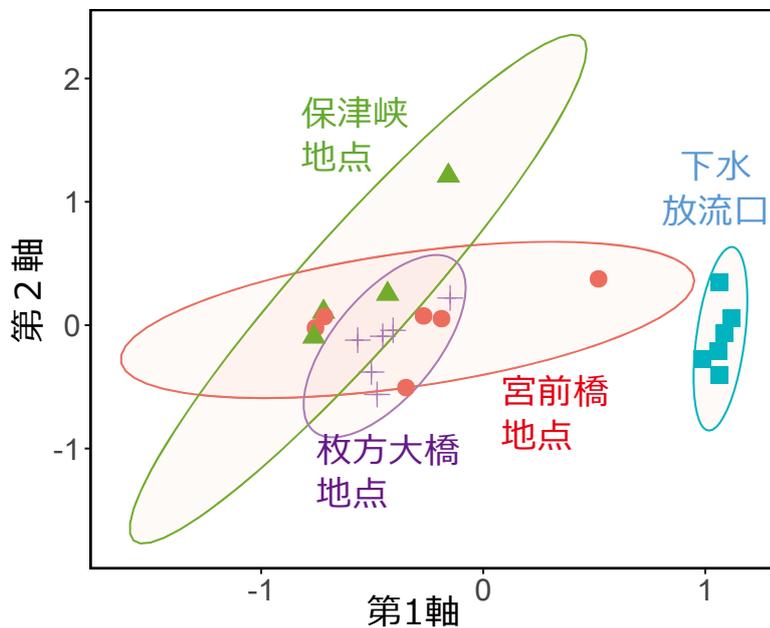


結果 | 全細菌種の検出ヒートマップ



結果 | 各地点における群集組成の違い

非計量多次元尺度法(NMDS)による次元圧縮



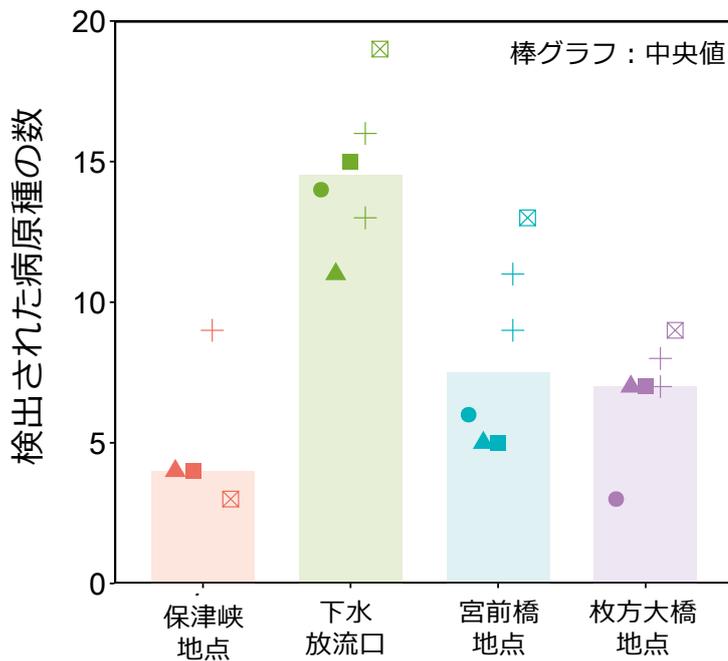
- 下水放流口で特有の群集組成が安定的に確認された
- その他の地点では明確な違いは見られず

結果 | 病原種の検出結果 (属レベルで表示)

31属78種の病原種が検出された



結果：各地点での病原種の検出数



- 下水放流口で病原種の検出数が大きい
- 放流水の流入前後で病原種の種数が増加

- 8月
- ▲ 9月
- 10月
- 十 11月
- ☒ 12月

まとめ

- ロングリード型HTSを用いて、種レベルでの解像度を向上させた細菌一斉検出手法を整備できた。
- 桂川～淀川において、下水処理水の合流によって病原細菌の種数が増加することが確認できた。
- 下水処理水には*Clostridium*や*Streptococcus*等の糞便由来の病原種が見られた一方で、上流（保津峡地点）でも*Aeromonas*や*Acinetobacter*等の日和見感染菌が検出された。
- 三川合流前後では検出される病原種に顕著な違いはなかった。

琵琶湖・淀川水系における超親水性溶存有機物の化学的描像

京都大学大学院 地球環境学堂
越後 信哉 教授

琵琶湖・淀川水系における 超親水性溶存有機物の化学的描像

京都大学大学院地球環境学堂 越後信哉
国立保健医療科学院 小坂浩司
京都大学大学院工学研究科 藤川由季

背景 | 浄水処理で生成する消毒副生成物

2

● 浄水処理過程での塩素消毒



● ハロ酢酸(HAAs)

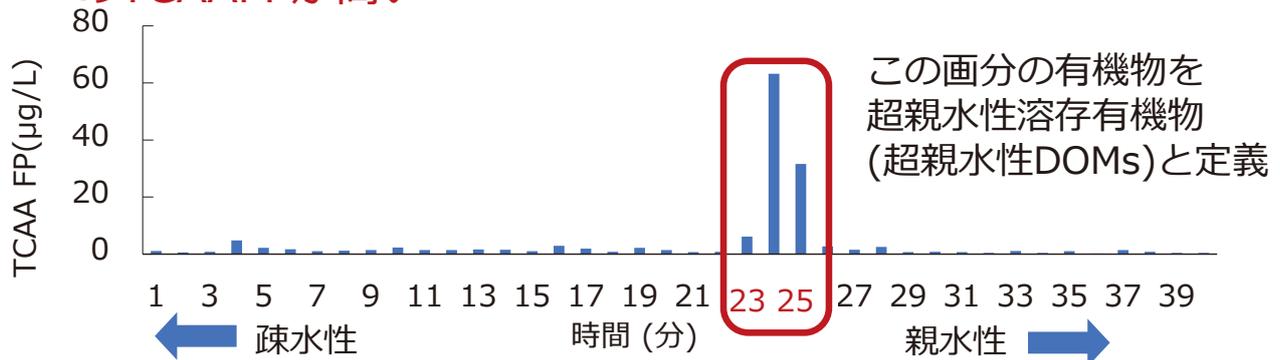
- ・ トリハロメタンに次いで, 検出頻度・濃度が高い生成機構・前駆体についての情報が不足
- ・ 水道水質基準値の引き下げによる管理の重要性

背景 | 環境水からのHAAs生成能

3

- 評価手法 | 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)
 - ・ 親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC)
 - ・ 疎水性物質は保持されず親水性物質に対して良好な保持
- トリクロロ酢酸(TCAA)の生成能 (FP) ¹⁾

23~25分の非常に親水性が高い画分 (NO₃⁻と同程度) のTCAA FPが高い



1)奥田恵理香：浄水処理過程におけるハロ酢酸の主要生成機構とその前駆体の推定, 京都大学大学院工学研究科修士論文, 2019

背景 | 超親水性DOMsの特性

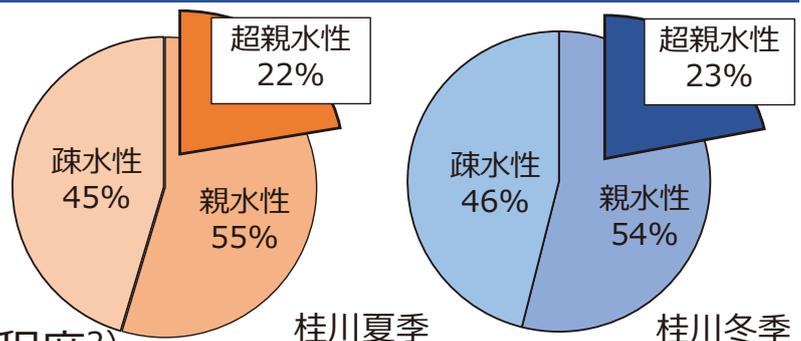
4

● 存在量 (炭素基準)

わずか20%程度²⁾

● 特性

- ・ フェノール類は30%程度²⁾
- ・ 両性物質である可能性²⁾
- ・ 窒素原子を有する可能性²⁾



存在実態や分子量, 浄水処理過程での挙動など
浄水処理のために必要な情報が不明

2)藤川 由季：親水性相互作用液体クロマトグラフィーを用いた環境水中の超親水性溶存有機物の定量と特性解析, 京都大学 工学部 地球工学科 環境工学コース 特別研究, 2020

研究目的

5

超親水性DOMsの
物理化学的特性と浄水処理過程での挙動の把握

超親水性DOMsの詳しい特性の把握
環境中での存在実態, 分子量の把握

超親水性DOMsの
浄水処理過程での挙動の把握
除去性, HAAs生成能

実験概要

6

●対象試料

- (1) 琵琶湖南湖
 - (2) 桂川下水放流口直下
 - (3) 淀川枚方大橋
- (2021/7/27, 11/16に採水)

●実験内容

- ・固相抽出 (SPE) による特性解析
- ・限外ろ過 (UF) 膜による分子量分画
- ・溶存有機窒素 (DON) の測定

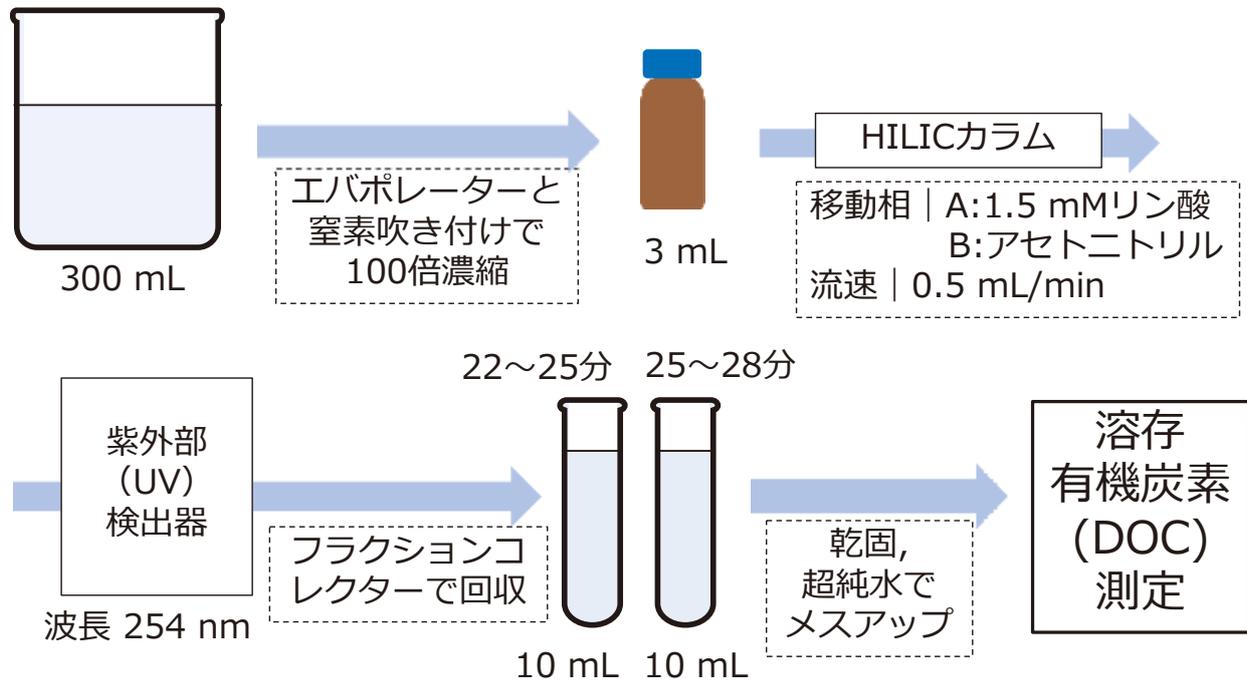


出典) 琵琶湖開発総合管理所HP

実験方法 | 超親水性DOMsの定量

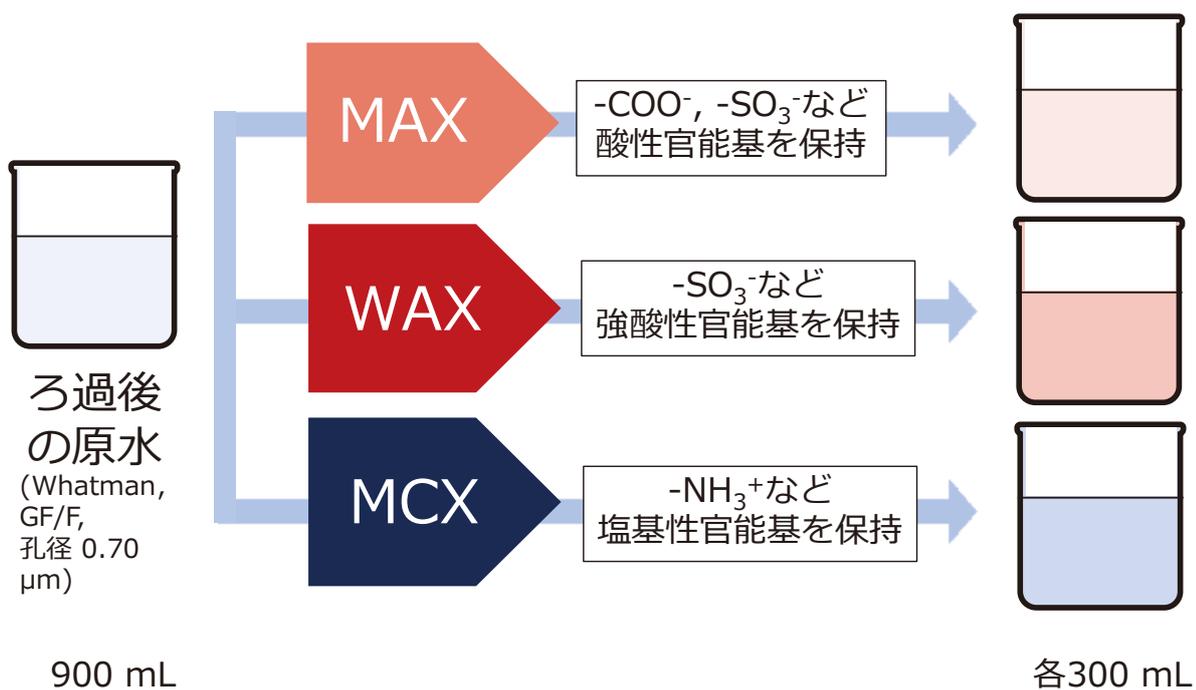
7

● 実験手順



実験方法 | SPEによる特性解析

8



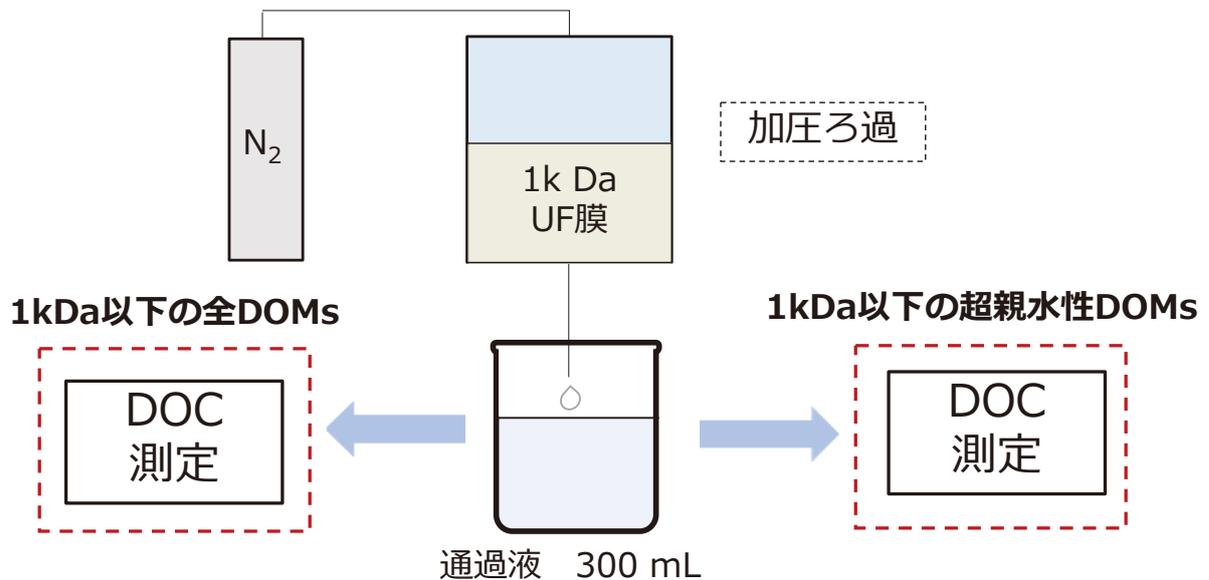
実験方法 | UF膜による分子量分画

9

●使用UF膜 | 1kDa UF膜

(UF Discs PLAC Ultracel RC 1 kDa 90 mm, Merk)

●実験手順



実験方法 | DONの測定

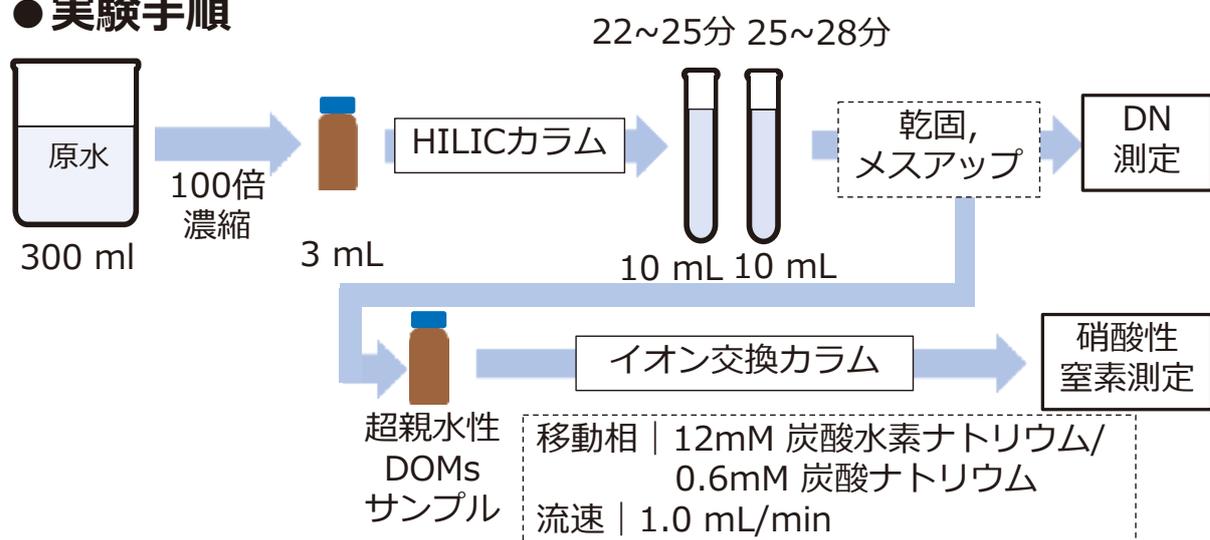
10

●DON算出方法

$\text{DON} = \text{溶存窒素} - \text{硝酸性窒素}$
(DN, TN計で測定) (HPLCで測定)

※アンモニア性窒素と
亜硝酸性窒素はほぼ0 mgN/L

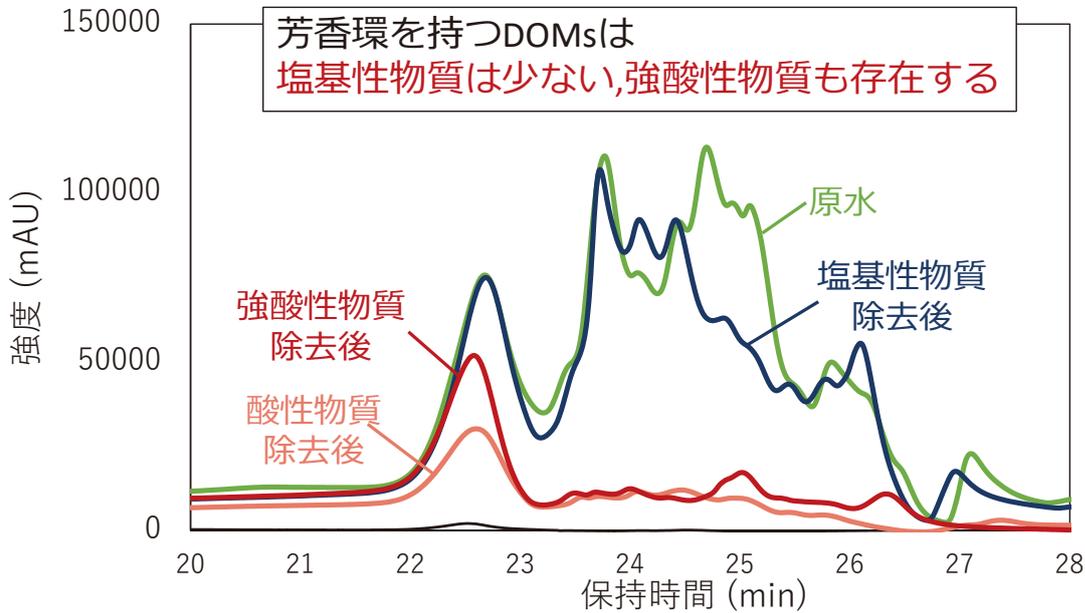
●実験手順



結果と考察 | 超親水性DOMsの特性

●夏季桂川採水試料 | 波長254 nm におけるUV吸光度

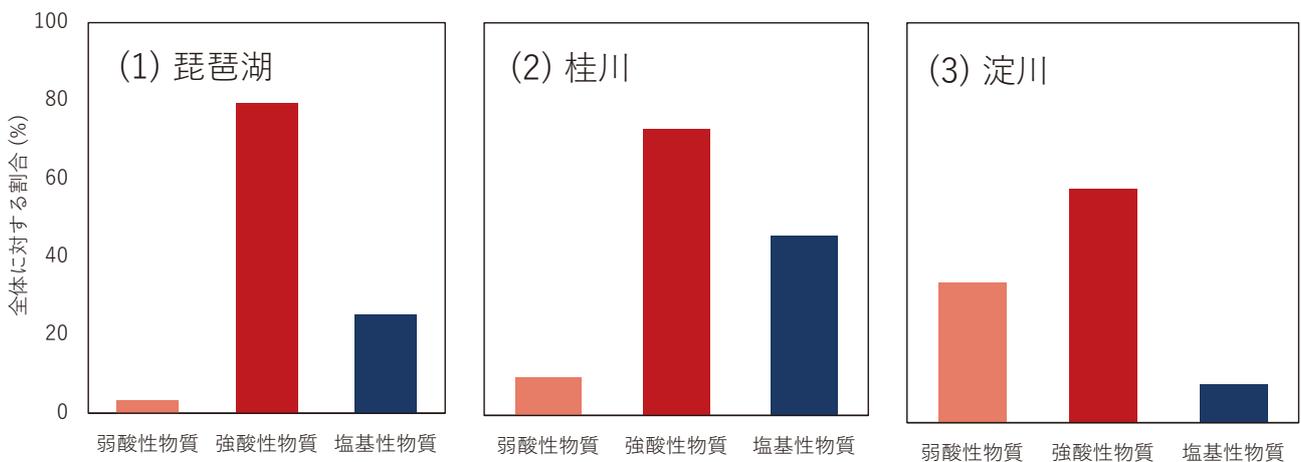
本研究では波長254 nmを芳香環を持つDOMsの存在を示す波長とした



※琵琶湖, 淀川, 冬季採水試料においても同様の傾向を示した

結果と考察 | 超親水性DOMsの特性

●夏季採水試料 | 特性ごとの存在割合 (炭素基準)



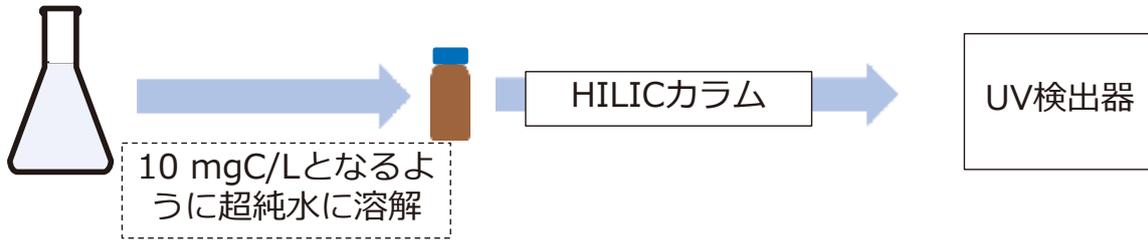
| | | |
|-------|----------|-------------------|
| 弱酸性物質 | 10~40%程度 | → フェノール類など |
| 強酸性物質 | 60~90%程度 | → 硫黄原子やリン原子を持つ化合物 |
| 塩基性物質 | 10~50%程度 | → アミノ酸やタンパク質など |

※冬季採水試料においても同様の傾向を示した

結果と考察 | HILICに対する個別物質の分離特性

13

●対象個別物質 | 硫黄原子やリン原子を持つ芳香族化合物7種

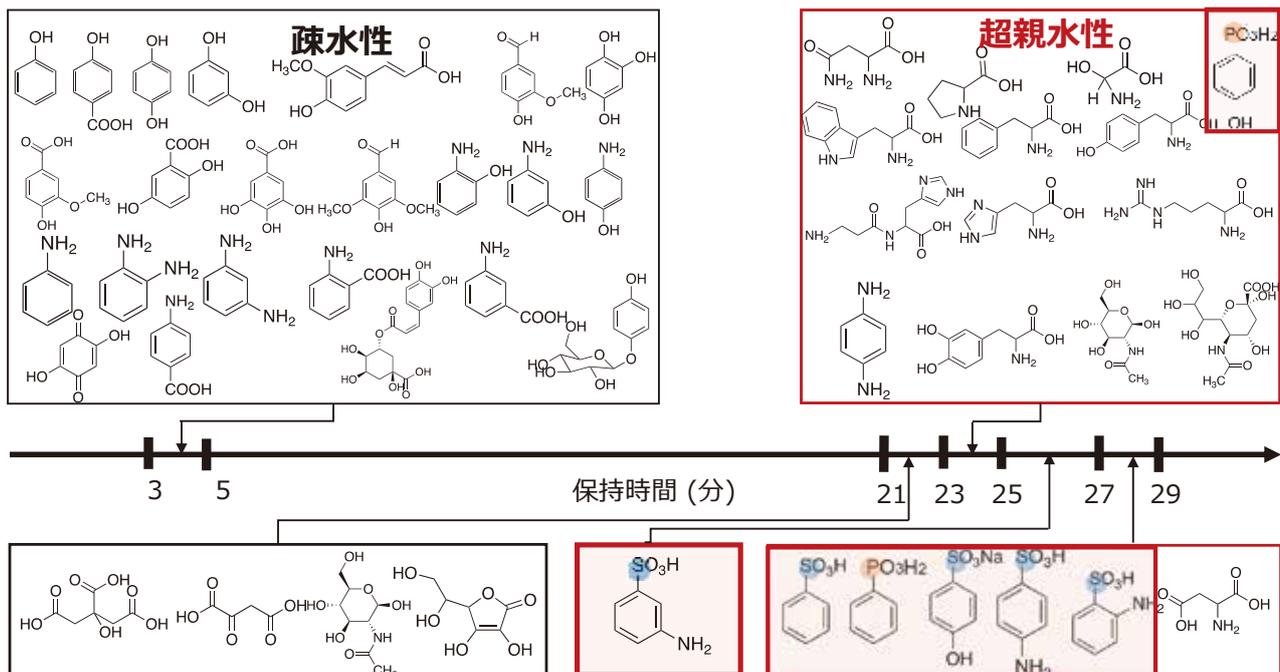


| | | | | | | | |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 対象個別物質 | | | | | | | |
| 保持時間 (min) | 28.5 | 27.6 | 29.0 | 24.9 | 28.0 | 26.6 | 28.9 |

超親水性DOMsとして硫黄原子やリン原子を持つ化合物も構成物質の一つである可能性が高い

結果と考察 | HILICに対する個別物質の分離特性

14

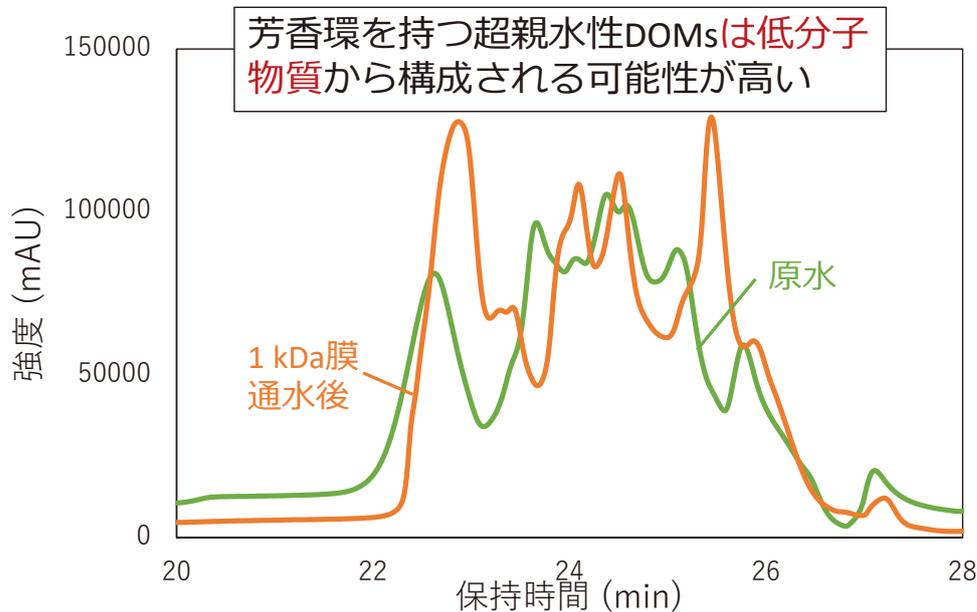


超親水性DOMsとして硫黄原子やリン原子を持つ化合物も構成物質の一つである可能性が高い

結果と考察 | 超親水性DOMsの分子量分画

15

●夏季桂川採水試料 | 波長254 nm におけるUV吸光度

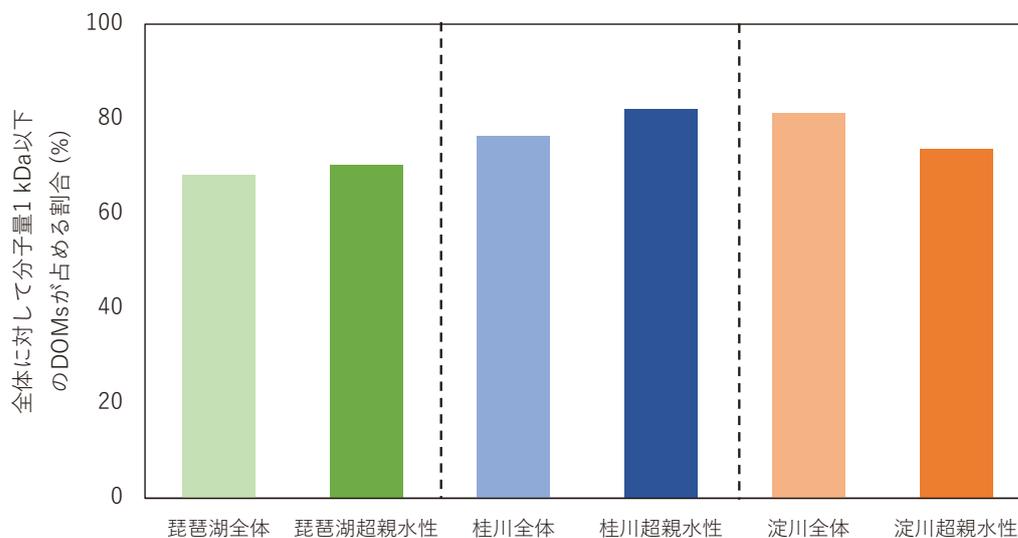


※琵琶湖, 淀川, 冬季採水試料においても同様の傾向を示した

結果と考察 | 超親水性DOMsの分子量分画

16

●夏季採水試料 | 低分子物質の存在割合 (炭素基準)



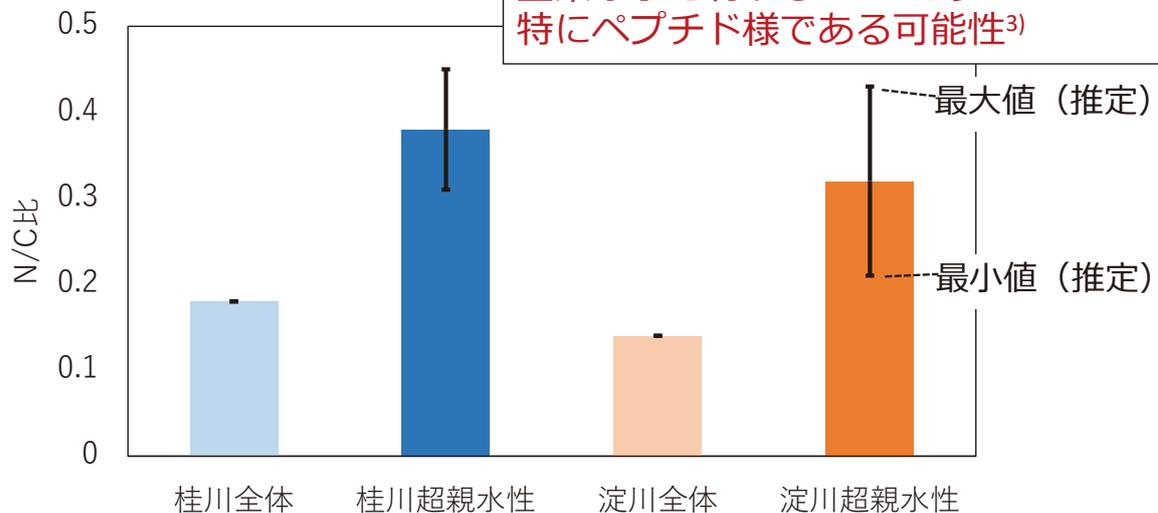
超親水性DOMsは主に低分子物質から構成される

※冬季採水試料においても同様の傾向を示した

結果と考察 | 超親水性DOMs中のDON

17

● 夏季採水試料N/C比



超親水性DOMsには全DOMsと比べて窒素原子を有するDOMsが多い特にペプチド様である可能性³⁾

※琵琶湖は低濃度であったため考察対象から除外した
また, 冬季採水試料においても同様の傾向を示した

3) Guo, L., White, D. M., Xu, C. and Santschi, P. H. : Chemical and isotopic composition of high molecular weight dissolved organic matter from the Mississippi River plume, *Marine Chemistry*, 2009.

このセクションのまとめ

18

超親水性DOMsの物理化学的特性

- ・ 単なるフェノール類でなくアミノ酸や特に硫黄原子やリン原子など含む化合物
- ・ 低分子物質から構成される
- ・ 窒素原子を有し, その含有量は総DOMsと比べて相対的に多い

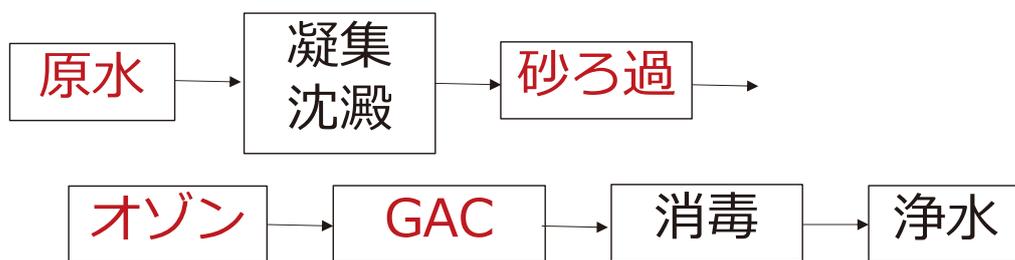
対象試料

19

●実際の工程水 | 関西圏の浄水場

原水, ろ過水, オゾン処理水, 活性炭 (GAC) 処理水
(2021/10/6, 12/8に採水)

●浄水フロー



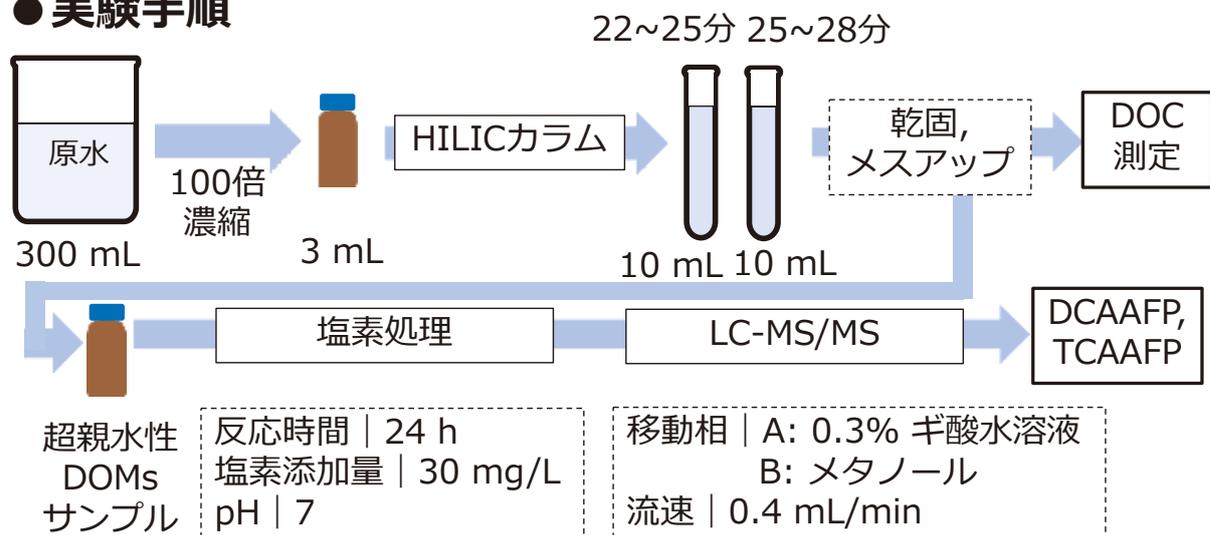
実験方法

20

●測定項目

- ・ DOC
- ・ ジクロロ酢酸 (DCAA) FP, TCAA FP

●実験手順



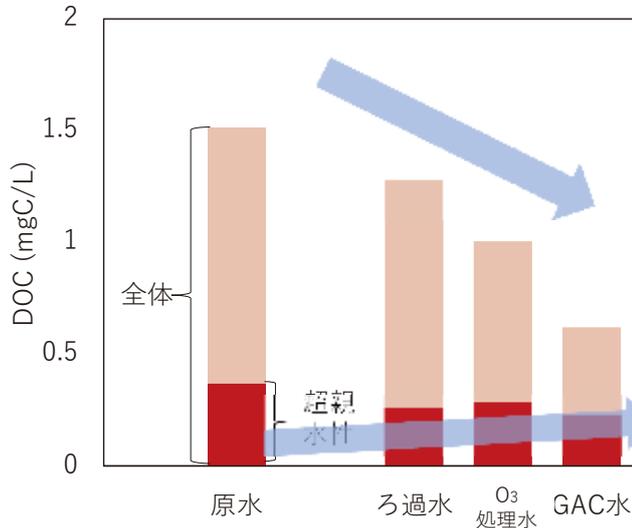
結果と考察 | DOCの推移

21

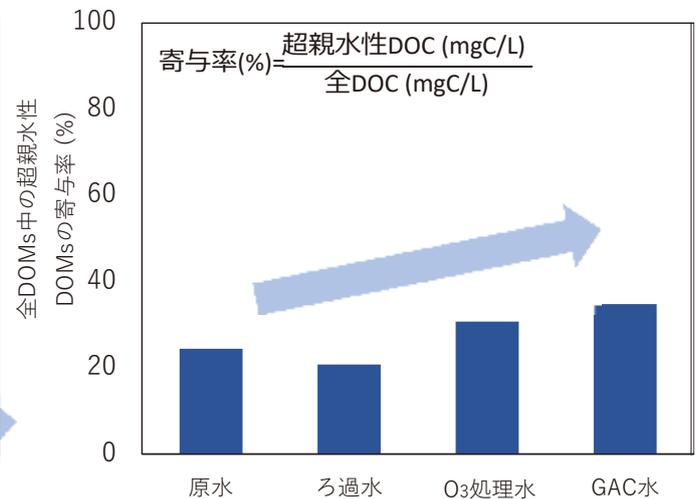
10月採水試料

※12月採水試料についても同様の傾向を示したため、以下10月採水試料のみ結果を示す

● DOC



● 超親水性DOMsの寄与率

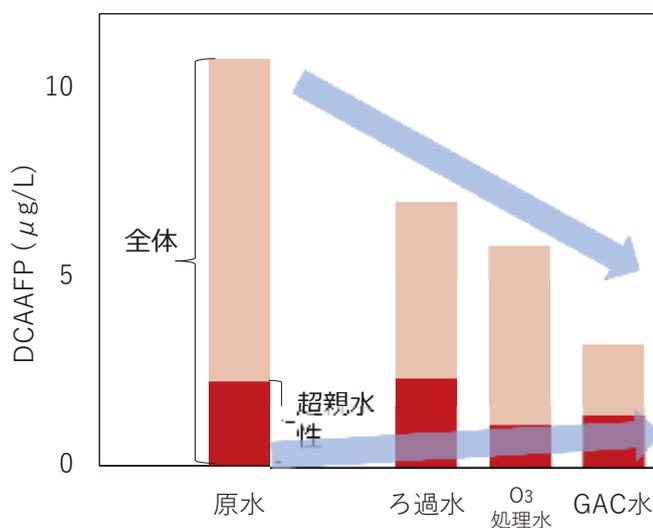


総DOMsと比べて超親水性DOMsは除去されにくい

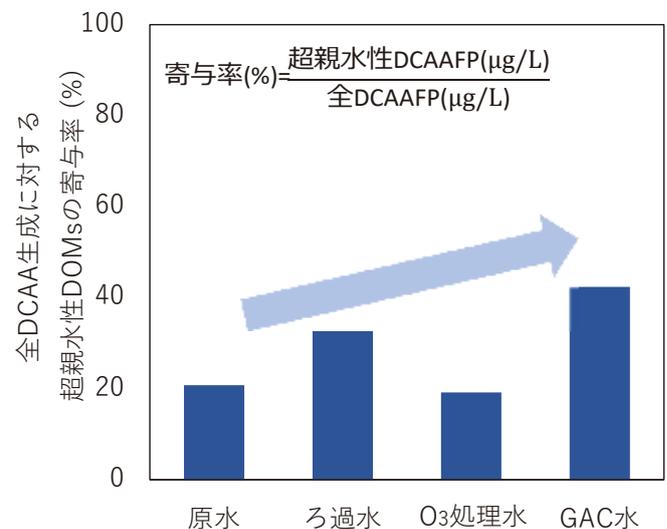
結果と考察 | DCAAFFP

22

● DCAAFFP



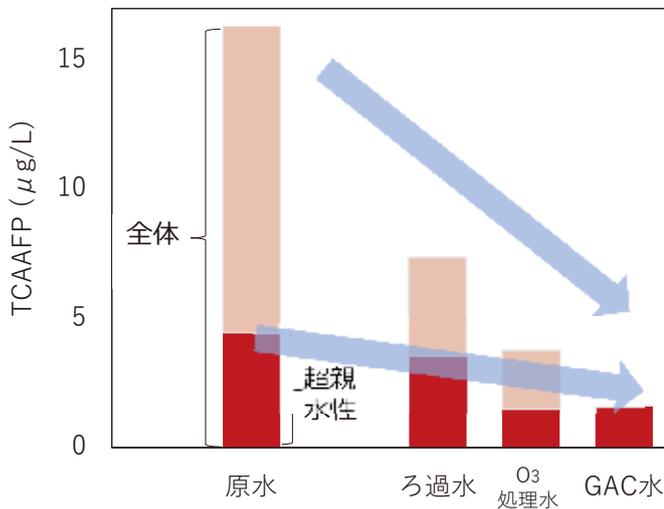
● 超親水性DOMsの寄与率



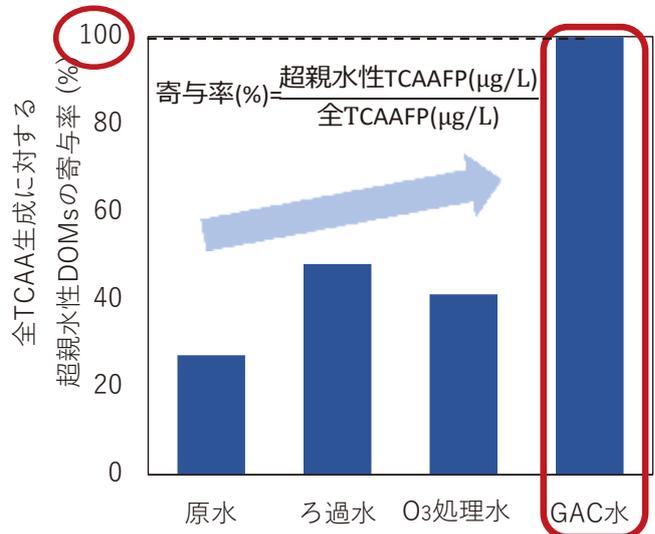
総DOMsと比べて超親水性DOMsは除去されにくく、管理が重要

結果と考察 | TCAAFP

● TCAAFP

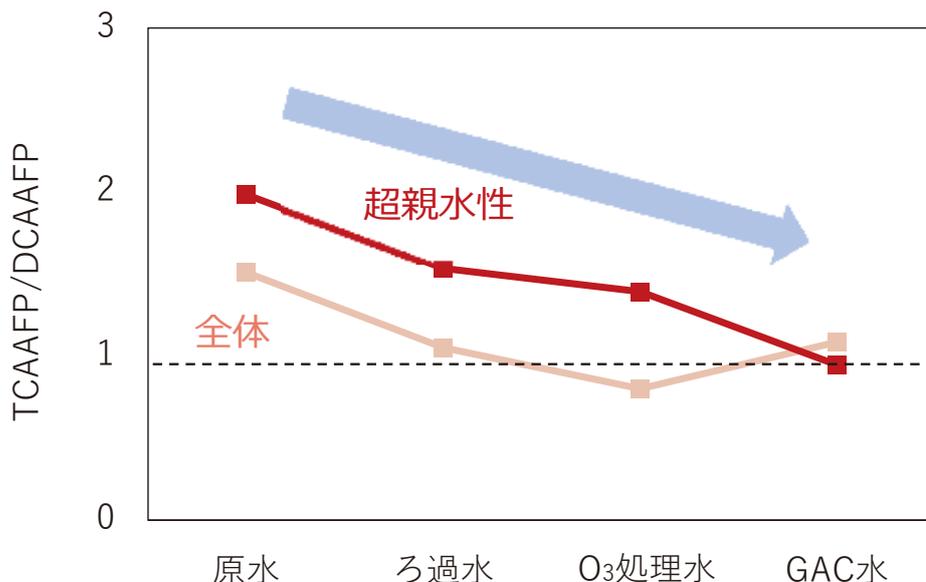


● 超親水性DOMsの寄与率



総DOMsと比べて超親水性DOMsは除去されにくく、管理が重要

結果と考察 | TCAAFP/DCAAFP



超親水性DOMsには、フェノール性の物質 (TCAA前駆体として重要な構造) がケトン構造を有する物質 (DCAA前駆体として重要な構造) に比べて多い

このセクションのまとめ

25

超親水性DOMsの浄水処理過程での挙動

- ・ 浄水処理過程で**除去しにくい物質**
- ・ **フェノール性物質**がケトン構造を有する物質に比べて多い可能性
- ・ TCAAFP前駆体のほぼ全てを占める

本研究のまとめ

26

超親水性DOMsに関する情報

物理化学的特性

- ・ 様々な物質群の混合体だが、**強酸性物質**が多くを占める
- ・ **硫黄原子**や**リン原子**を有する化合物
- ・ **窒素含有量**も比較的多い
- ・ **低分子**の物質

浄水処理過程での挙動

- ・ 他DOMsに比べて**除去しにくい**
- ・ **フェノール性**の物質が比較的多い
- ・ TCAAFP前駆体のほぼ全てを占める

ご清聴ありがとうございました。