Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費　終了研究成果報告書

精密質量分析計を用いた網羅的分子同定による湖沼COD成分の解明
(5RF-1601)

平成28年度～平成29年度

Comprehensive Molecular Identification of COD Composition in Lake by High Resolution Mass Spectrometry

〈研究代表機関〉
東京大学

平成30年5月

目次

Ⅰ. 成果の概要 ・・・・・・・・ 1
１．はじめに（研究背景等）
２．研究開発目的
３．研究開発の方法
４．結果及び考察
５．本研究により得られた主な成果
６．研究成果の主な発表状況
７．研究者略歴

Ⅱ. 成果の詳細
Ⅱ－１　精密質量分析計を用いた網羅的分子同定による湖沼COD成分の解明・・・・・・・ 11
（東京大学）
要旨
１．はじめに
２．研究開発目的
３．研究開発方法
４．結果及び考察
５．本研究により得られた成果
６．国際共同研究等の状況
７．研究成果の発表状況
８．引用文献

Ⅲ. 英文Abstract ・・・・・・・ 25

Ⅰ. 成果の概要

課題名　　5RF-1601 精密質量分析計を用いた網羅的分子同定による湖沼COD成分の解明

課題代表者名　春日 郁朗 （東京大学 大学院工学系研究科 都市工学専攻 准教授）

研究実施期間　平成28～29年度

累計予算額　　12,118千円(うち平成29年度:6,059千円)
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード　湖沼、COD、精密質量分析計、溶存有機物、環境基準

研究体制
(1)精密質量分析計を用いた網羅的分子同定による湖沼COD成分の解明(東京大学)

1. はじめに(研究背景等)

湖沼水質保全計画をはじめとした様々な水質保全対策の推進にもかかわらず、湖沼のCOD環境基準達成率は低迷している（平成28年度：56.7%）。国内の11の指定湖沼では、未だにCODの環境基準を達成していない。更に、琵琶湖などでは、CODが逆に漸増する現象が報告されており、溶存性の難分解性有機物が湖沼水質に影響を及ぼしている可能性が指摘されている。

CODをめぐるこれらの課題に対処するためには、CODの理解が欠かせない。しかし、COD自体、過マンガン酸カリウムによって酸化された有機物を部分的にとらえている指標であり、どのような溶存有機物（Dissolved Organic Matter: DOM）が湖沼の溶存CODに寄与し、環境基準達成の障害となっているのかは不明である。そこで本研究では、ブラックボックスである溶存CODの中身を分子式レベルで理解するためのツールとして精密質量分析計に着目した。精密質量分析計は極めて高い分解能を有しており、複雑な混合物を質量のみで分離可能である。また、質量精度も優れており、各分子イオンの精密質量から分子式を推定することも可能である。こうした利点を有する精密質量分析計と過マンガン酸カリウムによる酸化処理とを組み合わせることで、溶存CODに寄与する成分を特定するという着想を得た。この手法を確立することで、湖沼における溶存CODの成分が季節的にどのように変動するのか、またそれらの起源がどこに存在するのか、各地の湖沼で問題となる溶存CODの組成は共通しているのか、などといった疑問に対して学術的な視点から知見を提供することが期待される。

2. 研究開発目的

精密質量分析による湖沼溶存COD成分の解明に向けて、以下の目的を設定した。

a) 湖沼の溶存 COD 成分の探索手法の確立

複雑な DOM の中のどの成分が溶存 COD に寄与しているのかを明らかにする方法を確立する。ここでは、湖水を過マンガン酸カリウムによって酸化処理し、処理前後の DOM を精密質量分析計（電場型フーリエ変換質量分析計）によって分析することで、酸化後に消失した成分を溶存 COD 成分として抽出することを試みる。

b) 千葉県印旛沼における溶存 COD 成分の季節変動と起源推定

指定湖沼である千葉県印旛沼において通年の採水を実施し、溶存COD成分が分子式レベルでどのような季節変動を示すのかを明らかにする。また、印旛沼の流入河川水中のDOMの組成と湖水中の溶存COD成分とを照合することで、湖水中の溶存COD成分の起源を分子式レベルで推定する。

c) 微生物分解作用が難分解性有機物及び溶存 COD 成分に及ぼす影響評価

近年、琵琶湖をはじめとして COD の漸増が報告されており、その要因の一つとして難分解性有機物の蓄積が推測されている。難分解性有機物の起源としては、微生物の代謝産物などが疑われている。本研

究では、湖水を長期間の微生物分解実験に供することで、微生物分解が難分解性有機物の生成にどのような影響を与え、それらが溶存 COD 成分として寄与するかどうかを評価する。

d) 全国の指定湖沼における溶存 COD 成分の比較

現在、我が国には 11 の指定湖沼があるが、平成 28 年度時点において、いずれの湖沼においても COD の環境基準は達成されていない。これらの指定湖沼における溶存 COD 成分にはどのような特徴があるのか、どのような共通性があるのか、これまで知見がない。そこで、本研究では全指定湖沼から湖水を収集し、水質指標や溶存 COD 成分の分子式組成の特徴を比較する。

3. 研究開発の方法

(1)精密質量分析計を用いた網羅的分子同定による湖沼COD成分の解明

a) 湖沼の溶存 COD 成分の探索手法の確立

ガラス繊維ろ紙（孔径0.3 μm）でろ過した湖水1Lを、CODの分析条件（JIS K0102）に準じ、過マンガン酸カリウムによって酸化処理（95℃、30分間）した。酸化前後の試料は、BondElut PPL（Agilent社）を用いて固相抽出に供した。また、酸化時間がDOMの組成に及ぼす影響を評価するため、2016年9月に採水した印旛沼湖水を用いて、加熱前、95℃に達した直後、15分後、30分後、60分後、120分後の試料を分析に供した。

固相抽出した有機物を精密質量分析で解析した。精密質量分析計には、電場型フーリエ変換質量分析計Orbitrap Exactive（ThermoFisher Scientific社）を用いた。分析は3連とし、移動相をメタノール100%としたフローインジェクションモード（200 μL/min）で行った。イオン化にはエレクトロスプレーイオン化法(ESI:negative ion mode)を用いた。差異分析ソフトウェアSieve(ThermoFisher Scientific社）を用いて、同位体ピーク群の統合及びブランクピークの除外を行った。抽出したサンプル由来の分子イオンに対して、精密質量に基づいて分子式の推定を行った。推定した分子式については、各分子式のH/C, O/Cを計算して二次元にプロットしたvan Krevelen diagram解析を行うと共に、分子式中のC、H、O、Nの原子数に応じて、分子式の理論不飽和度DBE-Oを（1）式から計算した。

本研究では、酸化処理後にピークが消失したものを「COD molecules」、酸化後にもピークが残存するものを「persistent molecules」と分類した。今回の研究で推定したのは分子式であって、構造情報は不明である点には留意する必要がある。従って、便宜上「COD molecules」、「persistent molecules」としているが､これらの分類はあくまでも分子式ベースであり､異性体の違いを識別するものではない。

$$DBE - O = \frac{2C + 2 - H + N}{2} - O \qquad (1)$$

b) 千葉県印旛沼における溶存 COD 成分の季節変動と起源推定

2016年5月、7月、9月、11月、2017年1月、3月に千葉県印旛沼（西印旛沼）で表層湖水を採水した。7月、9月、1月、3月については、上水道取水口下、湖心、一本松下の3地点で採取した試料のコンポジット、5月については、上水道取水口下のみにおける試料、11月については強風下でボートが利用できなかったため、双子橋から採水した試料を用いた。a)で確立した方法により、溶存COD成分の分子式組成を解析した。

また、湖水のサンプリングと併せて、西印旛沼への主要な流入河川として、鹿島川（鹿島橋）、神崎川（神崎橋）においても採水を行い、固相抽出した河川水中の溶存有機物を精密質量分析計で解析し、分子式を推定した。河川水試料から推定した分子式と、湖水から検出したCOD moleculesの分子式を照合した。

c) 微生物分解作用が難分解性有機物及び溶存 COD 成分に及ぼす影響評価

2017 年 11 月に採水した琵琶湖北湖・南湖の表層水をガラス繊維ろ紙（孔径 1.0 μm）でろ過し、550℃で 6 時間焼いて炭素フリーとしたガラス瓶に入れた。暗所、20℃で 100 日間、静置培養した。a)で確立

した方法により、培養前後の湖水中の溶存 COD 成分の分子式組成の変化を解析した。

d) 全国の指定湖沼における溶存 COD 成分の比較

2017年10月から11月にかけて、全ての指定湖沼（八郎湖、釜房ダム貯水池、野尻湖、諏訪湖、霞ヶ浦、印旛沼、手賀沼、琵琶湖北湖・南湖、中海、宍道湖、児島湖）より湖水を収集した。収集した湖水をa)で確立した方法により分析し、溶存COD成分の分子式組成を評価した。

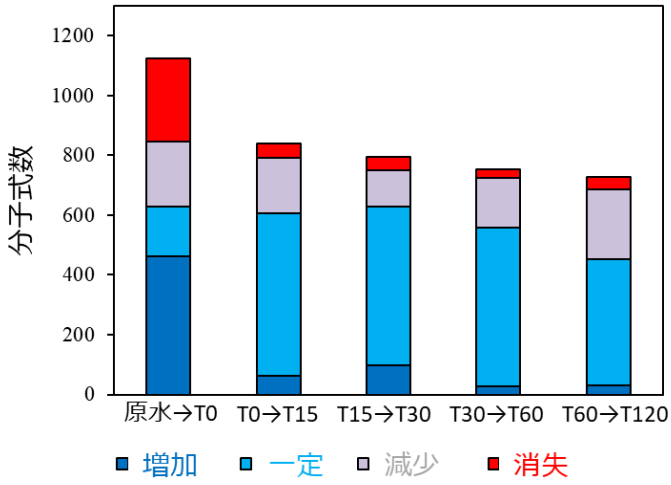
4. 結果及び考察

(1)精密質量分析計を用いた網羅的分子同定による湖沼COD成分の解明

a) 湖沼の溶存 COD 成分の探索手法の確立

2016年9月に採水した千葉県印旛沼の試料を用いて、過マンガン酸カリウムによる酸化時間を変化（酸化前、95℃に達した直後（T0）、15分後(T15)、30分後(T30)、60分後（T60）、120分後（T120））させた時に、有機物組成がどのように変化するのかを評価した。水温が95℃に達するT0までの予熱期間中の酸素消費量は、2.4 mg/Lであり、酸化時間120分までの酸素消費量6.6 mg/Lの36%に相当した。予熱期間の間でも酸化反応は進行することが示された。95℃に達した後は、酸素消費量の上昇が緩やかになり、CODの公定法で定められている30分後（T30）までの酸素消費量は4.5 mg/L（T120比68%）であった。

各時間の試料を固相抽出し、酸化処理前に存在したピークの強度変化を分類した結果を図(1)-1に示す。ここで、「消失」は該当する分子イオンのピークが完全になくなったもの、「減少」はピーク強度変化が-30%以上であったもの、「一定」はピーク強度変化が±30%未満であったもの、「増加」はピーク強度変化が+30%以上であったものである。「消失」あるいは「減少」したものは、酸化によって該当する分子イオンが完全に、あるいは部分的に分解していることを示唆している。「一定」のものは酸化されにくい性質の有機物である可能性が高い。一方、ピーク強度が「増加」した分子イオンは、高分子が部分的に分解されて生成した可能性や、他の有機物の分解により相対的にイオン化効率が改善された可能性などが考えられる。酸化前からT0までの予熱期間では、ピーク強度が「増加」した分子式数と「消失」した分子式数がすべての時点間でもっとも多く、予熱期間において大きな変化が生じていることが明らかになった。95℃に達したT0以降については、「一定」に分類される分子式数がもっとも多く、酸化に伴う分子式組成の大幅な変化は顕著ではなかった。また、「消失」に分類される分子式数は、「減少」に分類される分子式数よりも少なく、完全酸化のような反応も起こりにくいことが推察された。分子式の平均理論不飽和度（DBE-O）を計算すると、予熱期間、T0→T15において消失した分子式の平均理論不飽和度は他の分類の平均値よりも高いことが明らかとなった。このことから、不飽和度の高い分子が選択的に過マンガン酸カリウムにより酸化されていることが分子式レベルで確認された。以降の実験では、酸化時間はJIS0102のCODの分析条件に従い30分間として実験を実施した。また、ピーク強度が



図(1)-1　酸化前に存在した成分の各時点間のピーク強度変化

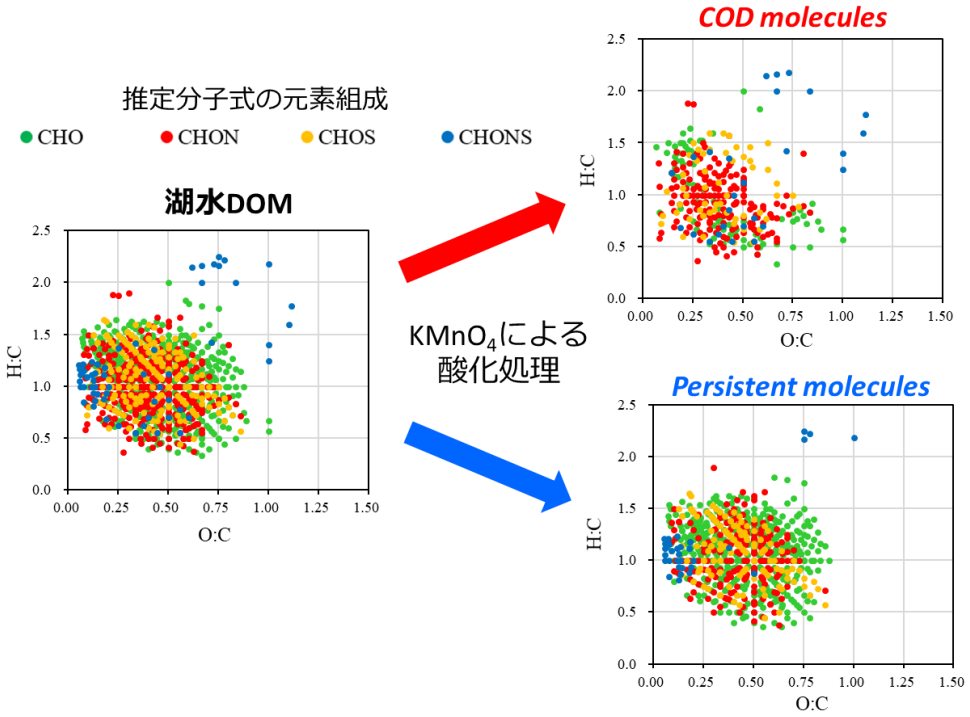
減少する分子イオンも部分的にCODに寄与していると考えられるが、本研究では、ピーク強度が酸化によって消失したもののみを「COD molecules」、残りを「persistent molecules」として分類することとした。このように、過マンガン酸カリウムによる前処理と精密質量分析計による解析とを組み合わせることにより、複雑な成分の混合物であるDOMの中から、溶存CODに寄与する成分を分子式レベルで抽出することに成功した。

一方、固相抽出の回収率、質量分析計における*m/z*の測定範囲（100～1000）の制約、ネガティブモードでイオン化されやすい物質のみが対象など、本研究の分析対象には制約がある点には留意する必要がある。また、精密質量分析で推定しているのはあくまでも分子式であり、異性体の違いは識別できていない。今後、こうした課題を解決することにより、より網羅的な評価が可能になると考えられる。

b） 千葉県印旛沼における溶存 COD 成分の季節変動と起源推定

2016年5月から2017年3月にかけて、2か月ごとに印旛沼湖水を採水し、a)で確立した方法によってCOD moleculesの抽出を試みた。いずれの季節からも、印旛沼のDOMから1000種類近い分子式を推定することができた。過マンガン酸カリウムによる処理により、推定した分子式をCOD moleculesとpersistent moleculesに分類した例（2016年7月）を図(1)-2に示す。図(1)-2では、推定した分子式の構成元素の種類ごとに、分子式のH:C, O:Cをプロットしている。このように、従来ブラックボックスであったCODの中身を、分子式レベルで可視化できた点は本研究の最大の成果である。他の季節についても分類を行った結果、図(1)-3に示すように、COD moleculesに分類されたのは、推定された全分子式数の20-30%に過ぎないことが明らかになった。persistent moleculesの中にも部分的に酸化された成分は含まれていると推察されるが、この結果は過マンガン酸カリウムによる酸化の選択性、COD指標の網羅性の限界を示していると考えられる。

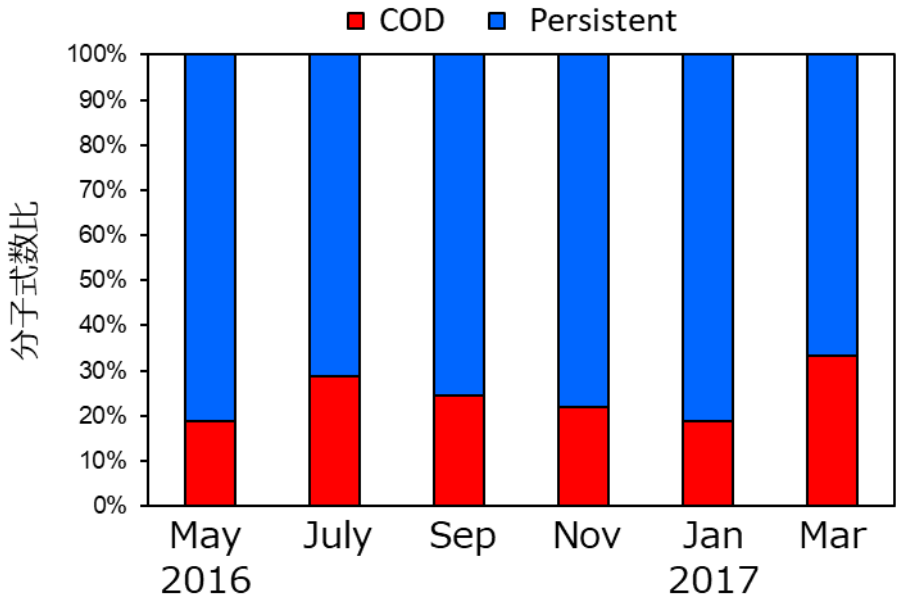
抽出されたCOD moleculesの組成に基づいて、その類似性をクラスター分析で解析した結果を図(1)-4に示す。クラスター分析の結果、COD moleculesの組成は、①7月・9月、②5月・11月・1月、③3月と大きく3つに分類されることが明らかになった。このことは、湖水中のCOD moleculesの組成は年間を通して一定ではなく、季節ごとに遷移していることを示唆している。実際に各クラスターで共通するCOD moleculesの分子式数に着目すると、2016年5月から2017年3月までの間ですべて共通したCOD moleculesの分子式数はわずかに10種類（表(1)-1）しかなく、季節変動の影響が大きいことがわかる。これらは、



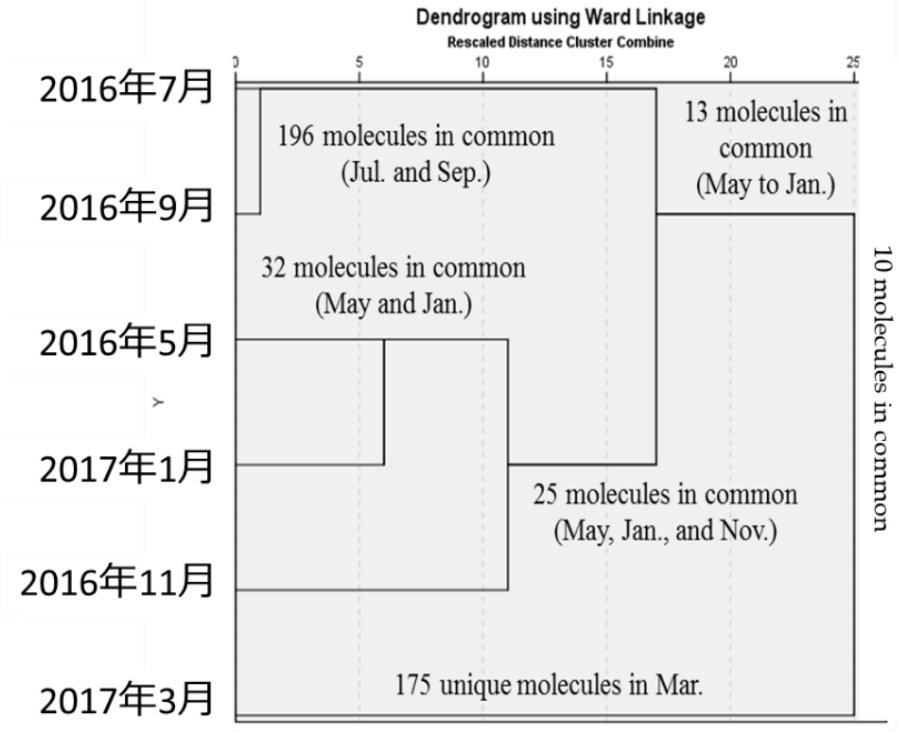
図(1)-2　印旛沼におけるCOD moleculesとpersistent moleculesの分類（2016年7月の例）

年間を通じて検出されていたことから、恒常的な発生源に由来しており、印旛沼の溶存COD成分のコアになっていることが推察される。

抽出されたCOD moleculesの分子式が、流入河川（鹿島川、神崎川）に含まれているかどうかを確認することで、湖水中のCOD moleculesの分子式を①湖水のみから検出、②湖水と鹿島川のみで共通、③湖水と神崎川のみで共通、④湖水と鹿島川・神崎川ですべて共通、に分類した。分類の結果を図(1)-5に示す。湖水のみから検出されたCOD moleculesは、主要な流入河川に含まれていなかったことから、内部生産由来であることが推測される。印旛沼の場合、2016年5月において、湖水のみから検出されるCOD



図(1)-3　印旛沼におけるCOD moleculesとpersistent moleculesの割合（分子式数比）

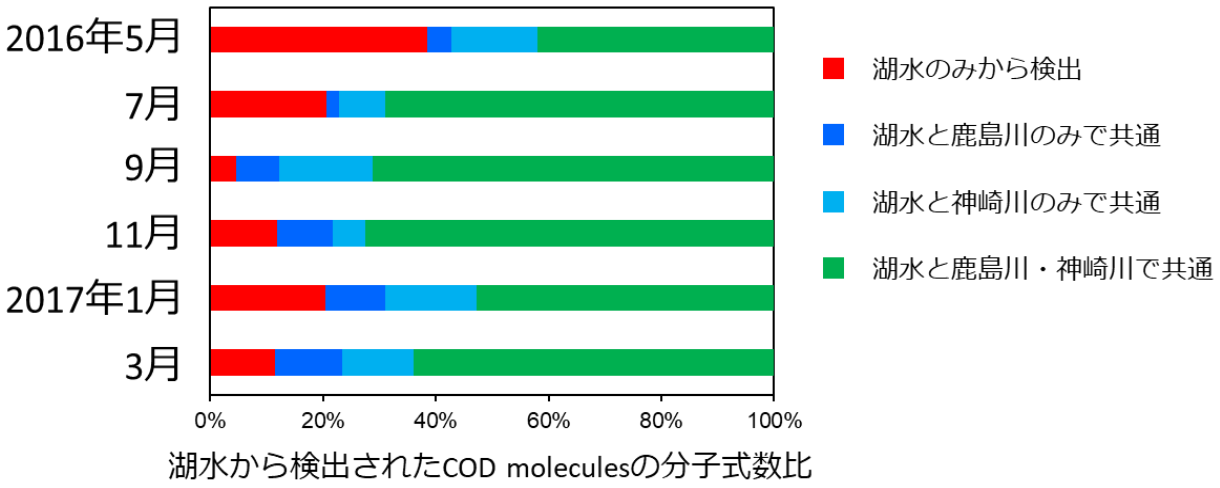


図(1)-4　印旛沼におけるCOD molecules組成の類似性

moleculesの分子式数が最も多かった。実際、2016年5月は湖水のChl-a濃度が最も高く、藻類由来の有機物が起源になっている可能性が示唆される。その他の季節については、湖水で検出されたCOD moleculesの80%以上はいずれかの河川水に含まれていたが、そのほとんどは両方の河川に共通していた。このことから、印旛沼の溶存COD成分の主要な起源としては流入河川の寄与が大きいと考えられる。このように、湖水中のCOD moleculesの起源を分子式レベルでトレースできることを示せた点は大きな成果の一つと言える。

表(1)-1　印旛沼湖水から年間を通して検出されたCOD moleculesの分子式

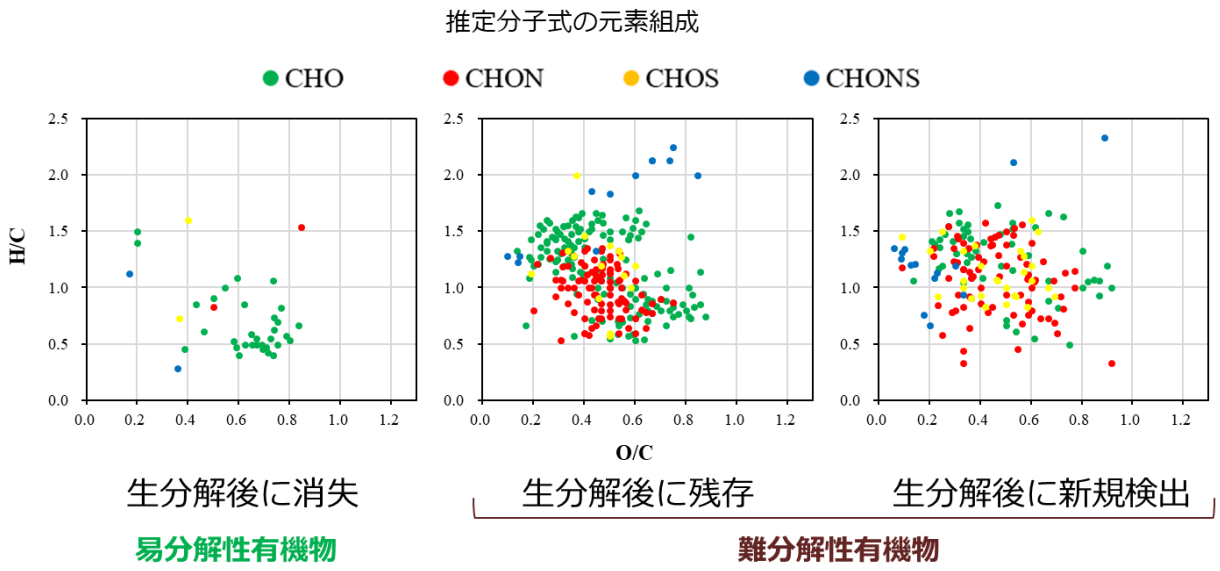
推定分子式	測定分子量 (Da)	理論分子量 (Da)	質量誤差 (ppm)
$C_{14}H_{16}O_2$	216.1154	216.1150	1.85
$C_{14}H_{18}O_2$	218.1307	218.1307	0.00
$C_{17}H_{26}O_4$	222.0354	222.0351	1.35
$C_{19}H_{22}O_5$	250.0590	250.0590	0.00
$C_{20}H_{26}O_4$	268.0488	268.0484	1.49
$C_{11}H_{10}O_5N_2$	282.1294	282.1290	1.42
$C_{14}H_8O_4N_2$	294.1828	294.1831	1.02
$C_{14}H_9O_7N$	303.0383	303.0379	1.32
$C_{11}H_{10}O_3S$	330.1465	330.1467	0.61
$C_{15}H_{22}O_3S$	330.1833	330.1831	0.61



図(1)-5　印旛沼湖水から検出されたCOD moleculesの起源別割合（分子式数比）

c) 微生物分解作用が難分解性有機物及び溶存 COD 成分に及ぼす影響評価

2017 年 11 月に採水した琵琶湖北湖・南湖の表層水をガラス繊維ろ紙（孔径 1.0 μm）でろ過した後、暗所で 100 日間静置培養した。培養前後を比較すると、DOC は半減していたが、溶存 COD はほとんど変化していなかった。培養前後の DOM を固相抽出して精密質量分析で解析したところ、琵琶湖北湖については、培養前後で共通していた分子式は 1215、培養前のみから検出された分子式は 74、培養後のみから検出された分子式は 286 あり、培養によって新たな成分が生成していたことが示唆された。同様の傾向は南湖についても確認された。培養前のみから検出された分子式は易分解性有機物であると考えられる一方、培養後のみから新規に検出された分子式は、微生物の代謝産物・死菌成分と推察される。過マンガン酸カリウムによる酸化処理を行い、これらの中から COD molecules を抽出した。図(1)-6 に、琵琶湖北湖における COD molecules の培養前後の変化を示す。元の湖水中に含まれている COD molecules の一部は微生物分解を受けるものの、大半は難分解性であることがわかる。一方、100 日間の微生物分解



図(1)-6　琵琶湖北湖の培養前後の COD molecules の変化

実験後に新規に検出された分子式の中には、COD molecules に分類されるものも含まれていることが明らかになった。このことは、微生物分解作用により、難分解性の COD molecules が生成することを示唆しており、湖沼内の DOM あるいは溶存 COD の質的な形成過程に対して、微生物が影響を及ぼしていることが推測された。こうした知見は、湖沼における難分解性有機物の蓄積などの機構解明にも有用と考えられる。

d)　全国の指定湖沼における溶存 COD 成分の比較

2017年10月から11月にかけて、我が国の11の指定湖沼（八郎湖、釜房ダム貯水池10月・11月、野尻湖、諏訪湖、霞ヶ浦、印旛沼、手賀沼、琵琶湖北湖・南湖、中海、宍道湖、児島湖）から湖水を採水し、溶存COD成分の分子式組成を評価した。DOCは1.3 mg/L（釜房ダム貯水池10月）～5.0 mg/L（霞ヶ浦）、$DCOD_{Mn}$は、1.2 mg/L（琵琶湖北湖・南湖）～5.0 mg/L（霞ヶ浦）の範囲であった。

過マンガン酸カリウムによる処理により、固相抽出したDOMをCOD moleculesとpersistent moleculesに分類した。検出された分子式のうち、COD moleculesに分類された割合（分子式数比）は、15%（八郎湖）～54%（中海）、平均26%であった。COD moleculesの割合が50%を超えた中海を除き、いずれの湖沼でもCOD moleculesは全体の一部に過ぎないことが確認された。

表(1)-2に、各指定湖沼のCOD molecules組成の一致度を示した。高い一致度を示した釜房ダム貯水池の10月と11月（一致度：79%）や琵琶湖北湖と南湖（一致度：79%）は除き、湖沼間のCOD moleculesの組成の一致度は17%～61%であり、湖沼によって特徴的な組成があることが推察された。分子式レベルで精査すると、すべての湖沼に共通したCOD moleculesは13種類のみであった。これらのことから、溶存COD成分の中身は各湖沼によって異なっている可能性が高く、湖沼におけるCOD対策を進めるにあたって、各湖沼特有の溶存CODの発生源や質的な形成過程の特徴などを把握することが重要と考えられた。

表(1)-2　指定湖沼のCOD moleculesの一致度

	釜房ダム 10月	釜房ダム 11月	野尻湖	諏訪湖	霞ヶ浦	印旛沼	手賀沼	琵琶湖 北湖	琵琶湖 南湖	中海	宍道湖	児島湖
八郎湖	36%	35%	29%	38%	25%	48%	31%	35%	25%	20%	46%	48%
釜房ダム 10月		79%	36%	40%	17%	39%	39%	29%	23%	34%	54%	51%
釜房ダム 11月			33%	36%	17%	34%	31%	24%	18%	29%	54%	48%
野尻湖				55%	33%	37%	40%	53%	55%	51%	51%	38%
諏訪湖					35%	47%	44%	56%	51%	46%	58%	46%
霞ヶ浦						23%	32%	33%	33%	25%	30%	33%
印旛沼							58%	53%	45%	32%	53%	57%
手賀沼								40%	36%	37%	47%	59%
琵琶湖 北湖									79%	48%	47%	37%
琵琶湖 南湖										49%	39%	30%
中海											46%	29%
宍道湖												61%

5. 本研究により得られた主な成果

（1）　科学的意義

a）湖沼の溶存 COD 成分を探索する手法の確立

湖沼の COD は、これまでバルクの指標として扱われており、その成分に関する情報は皆無であった。本研究において、過マンガン酸カリウムによる酸化処理と精密質量分析とを統合することにより、精密質量分析計が出力する DOM 組成のビッグデータから、環境基準の対象となりうる溶存 COD に寄与する成分を抽出する方法を確立することに成功した。

b）千葉県印旛沼における溶存 COD 成分の季節変動と起源解析

湖沼 COD の値がワースト 1 位である千葉県印旛沼を対象として、通年の採水調査を実施して溶存 COD 成分の季節変動を初めて解明した。溶存 COD 成分の組成を分子式レベルで比較したところ、湖水の溶存 COD 成分は年間を通して検出されるコアな成分と、各季節に特異的に検出される成分から構成されることが明らかになった。このことは、湖水の溶存 COD 成分が決して一様ではないことを示している。また、湖水の COD molecules と印旛沼に流入する河川水中の DOM との照合を分子式レベルで行った結果、印旛沼の溶存 COD 成分の多くは流入河川水にも含まれており、外部負荷の影響が大きいことが推察された。一方、湖水のクロロフィル a が高い時期には、流入河川水からは検出されない成分の頻度も高まり、内部負荷の寄与を示唆する結果が得られた。このように、湖沼の溶存 COD 成分の起源を分子式レベルで評価できる可能性を示したことは､環境科学分野における精密質量分析計の活用例としても新規性がある。

c）微生物分解作用が難分解性有機物及び溶存 COD 成分に及ぼす影響評価

各地の湖沼で難分解性有機物の蓄積が報告されているが、その一因として微生物の寄与が疑われている。すなわち、易分解性 DOM を微生物が分解すると同時に、微生物が排出する代謝産物や死菌由来の成分が難分解性有機物として蓄積しているという仮説である。本研究では、100 日間の微生物分解実験を実施し、培養後に残存する DOM を解析し、溶存 COD 成分に変化があるかどうかを評価した。その結果、培養前の湖水に含まれていた溶存 COD 成分に加えて、培養後には新たな溶存 COD 成分が生成している可能性が示された。このことは、湖沼における DOM と微生物との相互関係、微生物が溶存 COD 成分をはじ

めとしたDOMの質的形成過程に及ぼす影響を示す知見として、微生物生態学的にも重要である。

d) 全国の指定湖沼における溶存COD成分の比較

本研究では、日本全国の11指定湖沼から湖水を収集し、溶存COD成分の組成を初めて比較した。分子式レベルで11指定湖沼の溶存COD成分の組成を比較したところ、その組成はそれぞれ特徴的であった。また、すべての湖沼に共通していた溶存COD成分の分子式は限られていた。こうした知見はバルクのCODの値を比較するだけではわからないため、本研究の成果は指定湖沼の有機汚濁の特徴を解明する上でも有用と考えられる。

(2)環境政策への貢献

湖沼におけるCOD環境基準達成率の低さは水環境行政の大きな課題である。本研究は、湖沼における溶存COD成分を分子式レベルで解析することで、溶存CODによる湖沼の水質汚濁の詳細を解明した研究である。特に、従来、CODについてはその指標性に課題があることが指摘されてきた。本研究により、DOMの中で過マンガン酸カリウムにより酸化されやすい成分と酸化されにくい成分を分子式レベルで分類することができたことは、環境基準としてのCODの理解を深めることに貢献したと言える。

また、溶存CODとして寄与する成分が、恒常的なコアな成分と季節的に変動する成分から構成されることを示した知見については、環境基準の達成を目指すにあたって、湖沼の有機汚濁の季節変動を理解することの重要性を示唆するものである。

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はない。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

本研究の成果は、CODという指標が何を見ているのか、何を見ていないのかを明示的に示すものであり、湖沼の有機汚濁指標としてのCODの妥当性の再評価や、TOCなど他の有機物指標の意義を今後検討する上でも有用な知見になると考えられる。

また、本研究が提示した、湖水中の溶存COD成分の起源を分子式レベルでトレースする方法論は、湖沼で問題となる溶存COD成分の発生源対策の優先順位を決定する際に役立つことが見込まれる。従来、実際の湖沼のCODとしてどの起源からの寄与が重要なのかを明確に確認することは困難であった。溶存COD成分に関して湖水と各起源の有機物を分子式レベルで照合できるということは、水質改善対策の立案を戦略的に進める上でも有用である。

本研究では、日本全国の11指定湖沼のDOM、溶存COD成分の分子式組成を初めて明らかにした。このような調査自体、前例がなく、我が国の湖沼の有機汚濁の詳細な状況を把握する成果となった。分子式組成データというビッグデータを蓄積することで、湖沼の有機物組成が水質改善対策や気候変動などによって長期的にどのように変化していくのか、データベースとして活用することが期待される。

6. 研究成果の主な発表状況

(1)主な誌上発表

＜査読付き論文＞

特に記載すべき事項はない。

＜査読付論文に準ずる成果発表＞

特に記載すべき事項はない。

(2)主な口頭発表(学会等)

1) V. YUTHAWONG, I. KASUGA, F. KURISU, and H. FURUMAI: 第52回日本水環境学会年会 (2018)

“Insights into the molecular-level composition of COD_{Mn} components in Lake Inba assessed by Orbitrap mass spectrometry”

2) 中嶌泰介, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明：第52回日本水環境学会年会 (2018)
「全国の指定湖沼を対象とした溶存有機物分子組成と細菌群集構造の関連性評価」

3) V. YUTHAWONG, I. KASUGA, F. KURISU, and H. FURUMAI: The 3rd International Form on Asian Water Environment Technology. Singapore, 2018.
“Application of high resolution mass spectrometry to characterize dissolved organic matter in lake”

4) 春日郁朗、栗栖太：第20回日本水環境学会シンポジウム (2017)
「溶存有機物分子組成の高分解能・精密質量分析による網羅的評価 -Chemical diversityとMicrobial diversityとの接点-」

5) 中嶌泰介、春日郁朗、栗栖太、古米弘明：第20回日本水環境学会シンポジウム (2017)
「湖沼微生物ループにおける*Limnohabitans*近縁細菌に由来する代謝産物の網羅的解析」

6) 中嶌泰介、春日郁朗、栗栖太、古米弘明：環境微生物系学会合同大会2017 (2017)
「琵琶湖溶存有機物に寄与する細菌由来の代謝産物成分のOrbitrap質量分析計を用いた探索」

7) I. KASUGA, V. YUTHAWONG, F. KURISU, and H. FURUMAI: ASLO2017 Aquatic Sciences Meeting, Hawaii, 2017.
“Molecular source tracking of dissolved organic matter in a hypereutrophic lake by Orbitrap mass spectrometry”

8) V. YUTHAWONG, I. KASUGA, F. KURISU, and H. FURUMAI: ASLO2017 Aquatic Sciences Meeting, Hawaii, 2017.
“Application of Orbitrap mass spectrometry to reveal low molecular weight dissolved organic matter responsible for COD in a eutrophic lake”

9) V. YUTHAWONG, I. KASUGA, F. KURISU, and H. FURUMAI: 第51回日本水環境学会年会 (2017)
“Application of high resolution mass spectrometry to evaluate seasonal variation of organic matter responsible for COD_{Mn} in Lake Inba”

7. 研究者略歴

研究代表者

春日 郁朗

東京大学工学部卒業、工学博士、現在、同大学院工学系研究科都市工学専攻 准教授

II. 成果の詳細

Ⅱ－１　精密質量分析計を用いた網羅的分子同定による湖沼COD成分の解明

東京大学
大学院工学系研究科　都市工学専攻　　春日　郁朗

平成28～29年度累計予算額：12,118千円（うち平成29年度：6,059千円）
予算額は、間接経費を含む。

［要旨］
湖沼水質保全計画をはじめとした水質保全対策の推進にもかかわらず、湖沼のCOD環境基準達成率は低迷している。国内の11の指定湖沼では、未だにCODの環境基準を達成している湖沼はない。更に、琵琶湖などでは、CODが逆に漸増する現象が報告されており、溶存性の難分解性有機物が湖沼水質に影響を及ぼしている可能性も指摘されている。CODをめぐるこれらの課題に対処するためにはCODの理解が欠かせない。しかし、CODは過マンガン酸カリウムによって酸化された有機物を部分的にとらえる指標であり、どのような溶存有機物（Dissolved Organic Matter: DOM）が湖沼の溶存CODに寄与し、環境基準達成の障害となっているのかは不明である。そこで本研究では、極めて高い分解能と高質量精度を併せ持った精密質量分析計を活用し、湖沼における溶存CODの組成を分子式レベルで理解することを目的とした。

まず、過マンガン酸カリウムによる酸化処理前後の試料を精密質量分析計で解析し、湖水中のDOMをCOD molecules（過マンガン酸カリウムにより酸化されやすい）とpersistent molecules（過マンガン酸カリウムにより酸化されにくい）に分類する手法を確立した。確立した手法を用いて、千葉県印旛沼の湖水中の溶存COD成分の組成の季節変動を評価したところ、印旛沼の溶存COD成分は、年間を通して検出されるコアな成分と季節に特異的な成分から構成されており、ダイナミックに変動していることが示された。また、流入河川水中のDOMと照合することで、湖水中の溶存COD成分の起源を分子式レベルで推定したところ、大半は流入河川由来であることが示された。しかし、湖水中のクロロフィルaが高い時期については、内部生産由来と考えられる湖水に特有の分子式の検出割合が高くなる傾向が認められた。また、琵琶湖湖水を用いた100日間微生物分解実験により、湖沼における溶存COD成分の質的な形成過程を評価した。その結果、100日間で消失する易分解性のCOD moleculesが存在する一方で、培養後の試料からは元の湖水に含まれない難分解性のCOD moleculesが新たに検出された。このことから、湖沼における微生物の作用が、溶存COD成分の組成にも影響を及ぼすことが推測された。最後に、日本全国の11指定湖沼における溶存COD成分の組成を比較し、各湖沼の有機汚濁の特徴を評価した。その結果、湖沼によって溶存COD成分の組成は特徴的であることが明らかになった。

［キーワード］
湖沼、COD、精密質量分析計、溶存有機物、環境基準

１．はじめに

湖沼水質保全計画をはじめとした様々な水質保全対策の推進にもかかわらず、湖沼のCOD環境基準達成率は低迷している（平成28年度：56.7%）。国内の11の指定湖沼では、未だにCODの環境基準を達成していない。更に、琵琶湖などでは、CODが逆に漸増する現象が報告されており、溶存性の難分解性有機物が湖沼水質に影響を及ぼしている可能性が指摘されている。

CODをめぐるこれらの課題に対処するためには、CODの理解が欠かせない。しかし、COD自体、過マンガン酸カリウムによって酸化された有機物を部分的にとらえている指標であり、どのような溶存有機物（Dissolved Organic Matter: DOM）が湖沼の溶存CODに寄与し、環境基準達成の障害となっているのかは不明である。そこで本研究では、ブラックボックスである溶存CODの中身を分子式レベルで理解するためのツールとして精密質量分析計に着目した。精密質量分析計は極めて高い分解能を有しており、複

雑な混合物を質量のみで分離可能である。また、質量精度も優れており、各分子イオンの精密質量から分子式を推定することも可能である。こうした利点を有する精密質量分析計と過マンガン酸カリウムによる酸化処理とを組み合わせることで、溶存CODに寄与する成分を特定するという着想を得た。この手法を確立することで、湖沼における溶存CODの成分が季節的にどのように変動するのか、またそれらの起源がどこに存在するのか、各地の湖沼で問題となる溶存CODの組成は共通しているのか、などといった疑問に対して学術的な視点から知見を提供することが期待される。

２．研究開発目的

精密質量分析による湖沼溶存COD成分の解明に向けて、以下の目的を設定した。

a） 湖沼の溶存 COD 成分の探索手法の確立

複雑な DOM の中のどの成分が溶存 COD に寄与しているのかを明らかにする方法を確立する。ここでは、湖水を過マンガン酸カリウムによって酸化処理し、処理前後の DOM を精密質量分析計（電場型フーリエ変換質量分析計）によって分析することで、酸化後に消失した成分を溶存 COD 成分として抽出することを試みる。

b） 千葉県印旛沼における溶存 COD 成分の季節変動と起源推定

指定湖沼である千葉県印旛沼において通年の採水を実施し、溶存COD成分が分子式レベルでどのような季節変動を示すのかを明らかにする。また、印旛沼の流入河川水中のDOMの組成と湖水中の溶存COD成分とを照合することで、湖水中の溶存COD成分の起源を分子式レベルで推定する。

c） 微生物分解作用が難分解性有機物及び溶存 COD 成分に及ぼす影響評価

近年、琵琶湖をはじめとして COD の漸増が報告されており、その要因の一つとして難分解性有機物の蓄積が推測されている。難分解性有機物の起源としては、微生物の代謝産物などが疑われている。本研究では、湖水を長期間の微生物分解実験に供することで、微生物分解が難分解性有機物の生成にどのような影響を与え、それらが溶存 COD 成分として寄与するかどうかを評価する。

d） 全国の指定湖沼における溶存 COD 成分の比較

現在、我が国には 11 の指定湖沼があるが、平成 28 年度時点において、いずれの湖沼においても COD の環境基準は達成されていない。これらの指定湖沼における溶存 COD 成分にはどのような特徴があるのか、どのような共通性があるのか、これまで知見がない。そこで、本研究では全指定湖沼から湖水を収集し、水質指標や溶存 COD 成分の分子式組成の特徴を比較する。

３．研究開発方法

(1)精密質量分析計を用いた網羅的分子同定による湖沼COD成分の解明

a） 湖沼の溶存 COD 成分の探索手法の確立

ガラス繊維ろ紙（孔径0.3 μm）でろ過した湖水1Lを、CODの分析条件（JIS K0102）に準じ、過マンガン酸カリウムによって酸化処理（95℃、30分間）した。酸化前後の試料は、BondElut PPL（Agilent社）を用いて固相抽出に供した。また、酸化時間がDOMの組成に及ぼす影響を評価するため、2016年9月に採水した印旛沼湖水を用いて、加熱前、95℃に達した直後、15分後、30分後、60分後、120分後の試料を分析に供した。

固相抽出した有機物を精密質量分析で解析した。精密質量分析計には、電場型フーリエ変換質量分析計Orbitrap Exactive（ThermoFisher Scientific社）を用いた。分析は3連とし、移動相をメタノール100%としたフローインジェクションモード（200 μL/min）で行った。イオン化にはエレクトロスプレーイオン化法(ESI:negative ion mode)を用いた。差異分析ソフトウェアSieve(ThermoFisher Scientific社）を用いて、同位体ピーク群の統合及びブランクピークの除外を行った。抽出したサンプル由来の分子イオンに対して、精密質量に基づいて分子式の推定を行った。分子式の推定にはCompound identification algorithmを用いた[1)]。推定した分子式については、各分子式のH/C, O/Cを計算して二次元にプロットしたvan Krevelen diagram解析を行うと共に、分子式中のC、H、O、Nの原子数に応じて、

分子式の理論不飽和度DBE-Oを（1）式から計算した。

本研究では、酸化処理後にピークが消失したものを「COD molecules」、酸化後にもピークが残存するものを「persistent molecules」と分類した。今回の研究で推定したのは分子式であって、構造情報は不明である点には留意する必要がある。従って、便宜上「COD molecules」、「persistent molecules」としているが、これらの分類はあくまでも分子式ベースであり、異性体の違いを識別するものではない。

$$DBE-O=\frac{2C+2-H+N}{2}-O \qquad (1)$$

b） 千葉県印旛沼における溶存 COD 成分の季節変動と起源推定

2016年5月、7月、9月、11月、2017年1月、3月に千葉県印旛沼（西印旛沼）で表層湖水を採水した。7月、9月、1月、3月については、上水道取水口下、湖心、一本松下の3地点で採取した試料のコンポジット、5月については、上水道取水口下のみにおける試料、11月については強風下でボートが利用できなかったため、双子橋から採水した試料を用いた。a)で確立した方法により、溶存COD成分の分子式組成を解析した。

また、湖水のサンプリングと併せて、西印旛沼への主要な流入河川として、鹿島川（鹿島橋）、神崎川（神崎橋）においても採水を行い、固相抽出した河川水中の溶存有機物を精密質量分析計で解析し、分子式を推定した。河川水試料から推定した分子式と、湖水から検出したCOD moleculesの分子式を照合した。

c） 微生物分解作用が難分解性有機物及び溶存 COD 成分に及ぼす影響評価

2017 年 11 月に採水した琵琶湖北湖・南湖の表層水をガラス繊維ろ紙（孔径 1.0 μm）でろ過し、550℃で 6 時間焼いて炭素フリーとしたガラス瓶に入れた。暗所、20℃で 100 日間、静置培養した。a)で確立した方法により、培養前後の湖水中の溶存 COD 成分の分子式組成の変化を解析した。

d） 全国の指定湖沼における溶存 COD 成分の比較

2017年10月から11月にかけて、全ての指定湖沼（八郎湖、釜房ダム貯水池、野尻湖、諏訪湖、霞ヶ浦、印旛沼、手賀沼、琵琶湖北湖・南湖、中海、宍道湖、児島湖）より湖水を収集した。収集した湖水をa)で確立した方法により分析し、溶存COD成分の分子式組成を評価した。

４．結果及び考察

(1)精密質量分析計を用いた網羅的分子同定による湖沼COD成分の解明

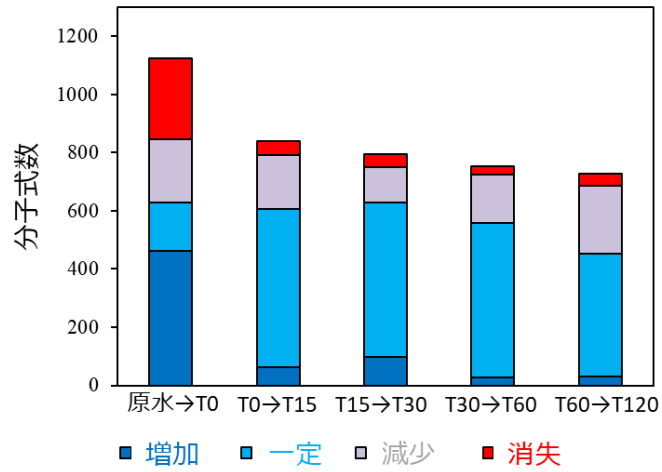
a） 湖沼の溶存 COD 成分の探索手法の確立

2016年9月に採水した千葉県印旛沼の試料を用いて、過マンガン酸カリウムによる酸化時間を変化（酸化前、95℃に達した直後（T0）、15分後(T15)、30分後(T30)、60分後（T60）、120分後（T120））させた時に、有機物組成がどのように変化するのかを評価した。水温が95℃に達するT0までの予熱期間中の酸素消費量は、2.4 mg/Lであり、酸化時間120分までの酸素消費量6.6 mg/Lの36%に相当した。予熱期間の間でも酸化反応は進行することが示された。95℃に達した後は、酸素消費量の上昇が緩やかになり、CODの公定法で定められている30分後（T30）までの酸素消費量は4.5 mg/L（T120比68%）であった。

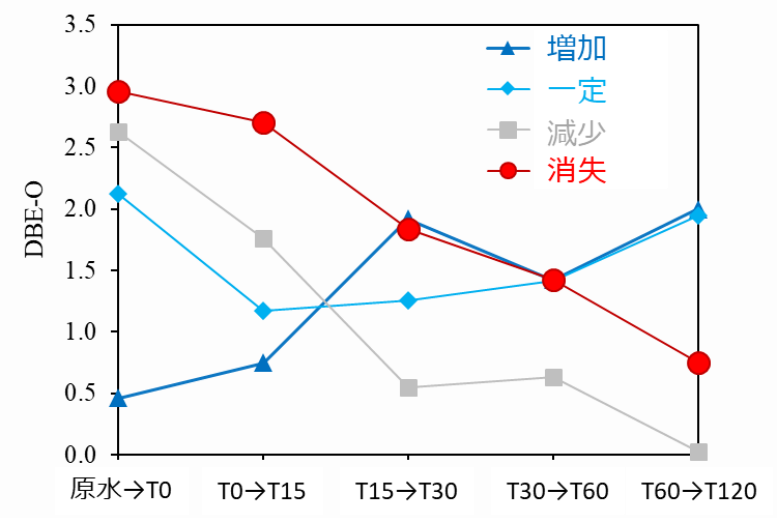
各時間の試料を固相抽出し、酸化処理前に存在したピークの強度変化を分類した結果を図(1)-7に示す。ここで、「消失」は該当する分子イオンのピークが完全になくなったもの、「減少」はピーク強度変化が-30%以上であったもの、「一定」はピーク強度変化が±30%未満であったもの、「増加」はピーク強度変化が+30%以上であったものである。「消失」あるいは「減少」したものは、酸化によって該当する分子イオンが完全に、あるいは部分的に分解していることを示唆している。「一定」のものは酸化されにくい性質の有機物である可能性が高い。一方、ピーク強度が「増加」した分子イオンは、高分子が部分的に分解されて生成した可能性や、他の有機物の分解により相対的にイオン化効率が改善された可

能性などが考えられる。酸化前からT0までの予熱期間では、ピーク強度が「増加」した分子式数と「消失」した分子式数がすべての時点間でもっとも多く、予熱期間において大きな変化が生じていることが明らかになった。95℃に達したT0以降については、「一定」に分類される分子式数がもっとも多く、酸化に伴う分子式組成の大幅な変化は顕著ではなかった。また、「消失」に分類される分子式数は、「減少」に分類される分子式数よりも少なく、完全酸化のような反応も起こりにくいことが推察された。図(1)-8に、図(1)-7における分類（増加、一定、減少、消失）に基づいて、各分類に属する分子式の理論不飽和度（DBE-O）を計算した結果を示す。その結果、予熱期間、T0→T15において消失した分子式の平均理論不飽和度は他の分類の平均値よりも高いことが明らかとなった。このことから、不飽和度の高い分子が選択的に過マンガン酸カリウムにより酸化されていることが分子式レベルで確認された。以降の実験では、酸化時間はJIS0102のCODの分析条件に従い30分間として実験を実施した。また、ピーク強度が減少する分子イオンも部分的にCODに寄与していると考えられるが、本研究では、ピーク強度が酸化によって消失したもののみを「COD molecules」、残りを「persistent molecules」として分類することとした。このように、過マンガン酸カリウムによる前処理と精密質量分析計による解析とを組み合わせることにより、複雑な成分の混合物であるDOMの中から、溶存CODに寄与する成分を分子式レベルで抽出することに成功した。

一方、固相抽出の回収率、質量分析計における*m/z*の測定範囲（100～1000）の制約、ネガティブモードでイオン化されやすい物質のみが対象など、本研究の分析対象には制約がある点には留意する必要がある。また、精密質量分析で推定しているのはあくまでも分子式であり、異性体の違いは識別できていない。今後、こうした課題を解決することにより、より網羅的な評価が可能になると考えられる。



図(1)-7　酸化前に存在した成分の各時点間のピーク強度変化



図(1)-8　各グループの平均理論不飽和度（DBE-O）の変化

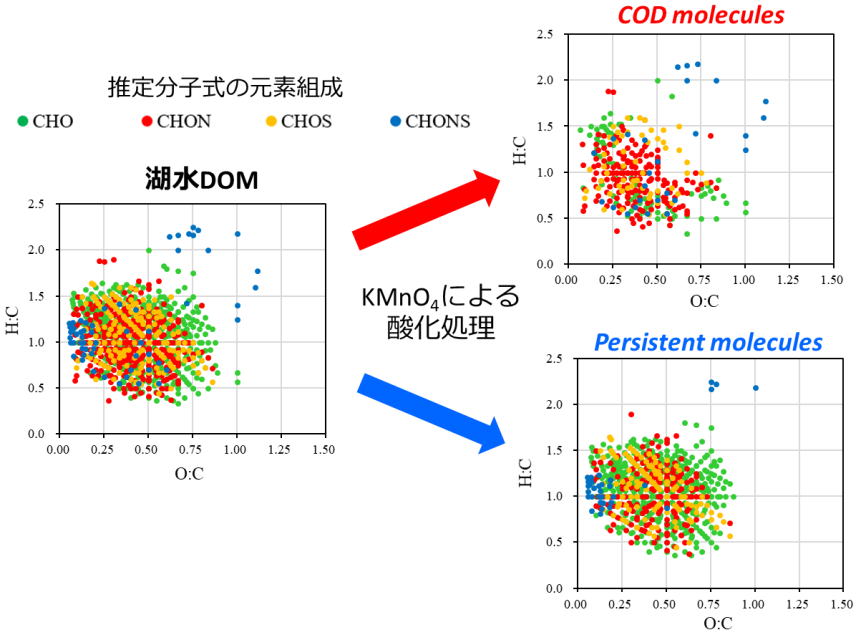
b)　千葉県印旛沼における溶存 COD 成分の季節変動と起源推定

2016年5月から2017年3月にかけて、2か月ごとに印旛沼湖水を採水し、a)で確立した方法によってCOD moleculesの抽出を試みた。湖水の水質測定結果を表(1)-3に示す。いずれの季節からも、印旛沼のDOMから1000種類近い分子式を推定することができた。過マンガン酸カリウムによる処理により、推定した分子式をCOD moleculesとpersistent moleculesに分類した例（2016年7月）を図(1)-9に示す。図(1)-9では、推定した分子式の構成元素の種類ごとに、分子式のH:C，O:Cをプロットしている。このように、従来ブラックボックスであったCODの中身を、分子式レベルで可視化できた点は本研究の最大の成果である。他の季節についても分類を行った結果、COD moleculesに分類されたのは、図(1)-10に示すように、推定された全分子式数の20-30%に過ぎないことが明らかになった。persistent moleculesの中にも部分的に酸化された成分は含まれていると推察されるが、この結果は過マンガン酸カリウムによる酸化の選択性、COD指標の網羅性の限界を示していると考えられる。

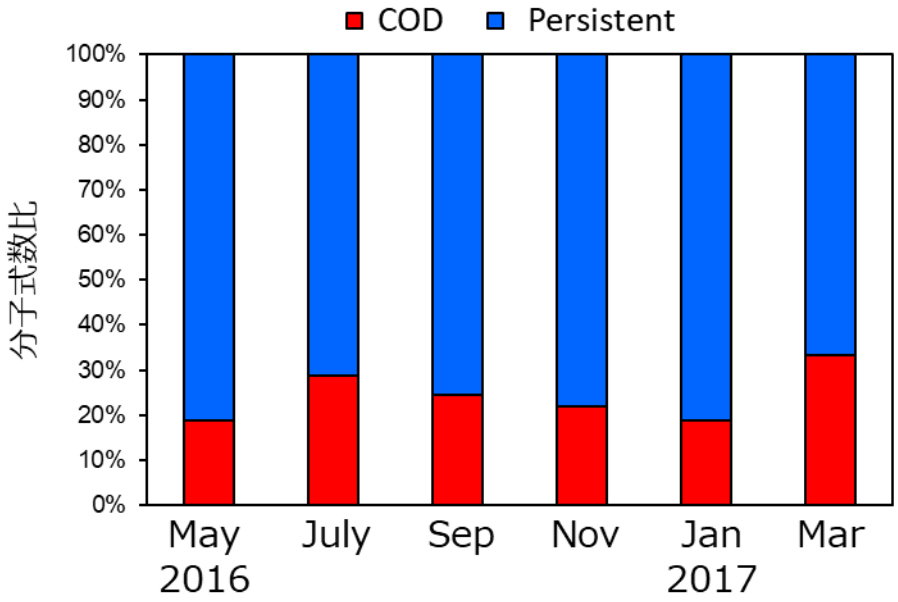
抽出されたCOD moleculesの組成に基づいて、その類似性をクラスター分析で解析した結果を図(1)-11に示す。クラスター分析の結果、COD moleculesの組成は、①7月・9月、②5月・11月・1月、③3月と大きく3つに分類されることが明らかになった。このことは、湖水中のCOD moleculesの組成は年間を通して一定ではなく、季節ごとに遷移していることを示唆している。実際に各クラスターで共通するCOD moleculesの分子式数に着目すると、2016年5月から2017年3月までの間ですべて共通したCOD moleculesの分子式数はわずかに10種類（表(1)-4）しかなく、季節変動の影響が大きいことがわかる。これらは、年間を通じて検出されていたことから、恒常的な発生源に由来しており、印旛沼の溶存COD成分のコアになっていることが推察される。

表(1)-3 印旛沼湖水の水質結果

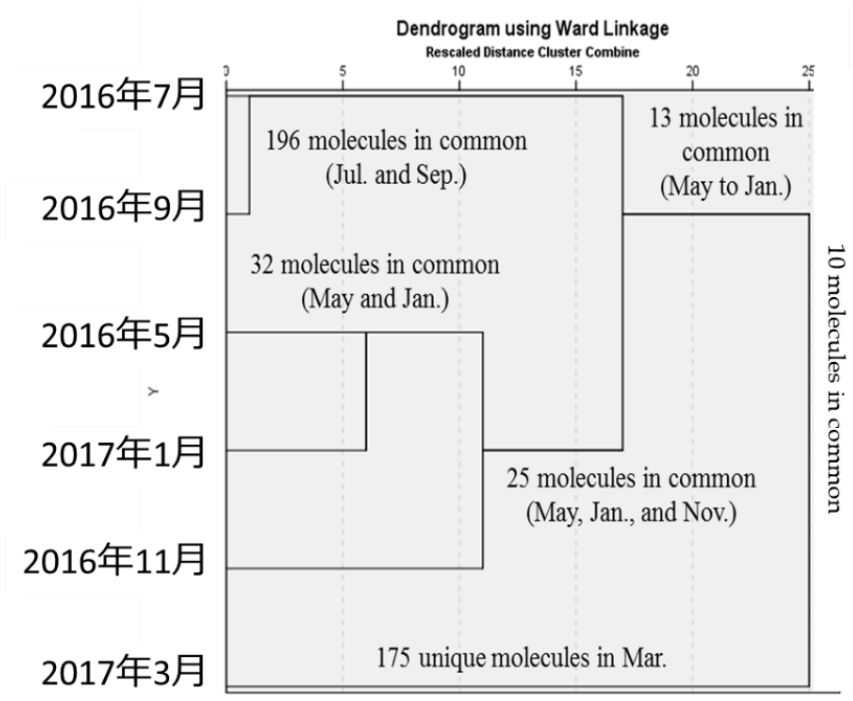
	2016.5	2016.7	2016.9	2016.11	2017.1	2017.3
TOC (mgC/L)	9.5	5.9	3.9	3.4	4.8	4.6
DOC (mgC/L)	3.4	4.0	2.7	2.2	2.1	2.4
COD_{Mn} (mg/L)	12.3	9.3	6.1	5.4	6.4	8.4
$DCOD_{Mn}$ (mg/L)	4.1	3.9	3.5	2.5	2.7	1.9



図(1)-9　印旛沼におけるCOD moleculesとpersistent moleculesの分類（2016年7月の例）



図(1)-10　印旛沼におけるCOD moleculesとPersistent moleculesの割合（分子式数比）



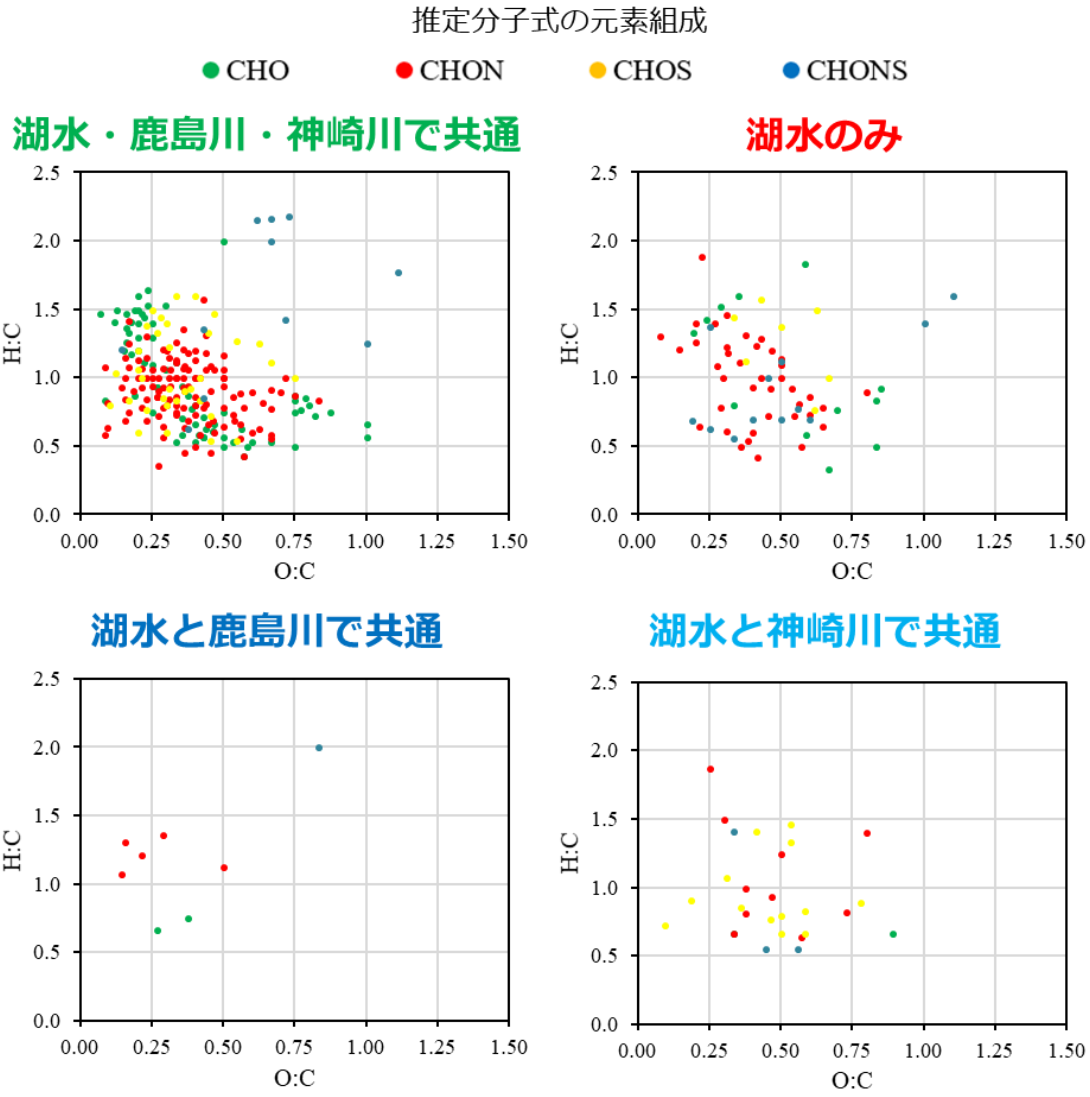
図(1)-11　印旛沼におけるCOD molecules組成の類似性

抽出されたCOD moleculesの分子式が、流入河川（鹿島川、神崎川）に含まれているかどうかを確認することで、湖水中のCOD moleculesの分子式を、①湖水のみから検出、②湖水と鹿島川のみで共通、③湖水と神崎川のみで共通、④湖水と鹿島川・神崎川ですべて共通、に分類した。2016年7月の試料を例に、起源別に湖水のCOD moleculesを分類した例を図(1)-12に示す。同時期の湖水と流入河川で共通しているということは、内部生産起源を完全に否定するものではないが、該当するCOD moleculesの起源として流入河川の可能性が高いことを示唆している。逆に、流入河川では見られずに湖水のみで検出されたCOD moleculesは、他の流入河川などの寄与を完全に否定するものではないが、藻類や底泥など内部生産起源であることを示唆していると考えられる。2016年5月から2017年1月までの試料を分類した結果を図(1)-13に示す。湖水のみから検出されたCOD moleculesは、主要な流入河川に含まれていなかったことか

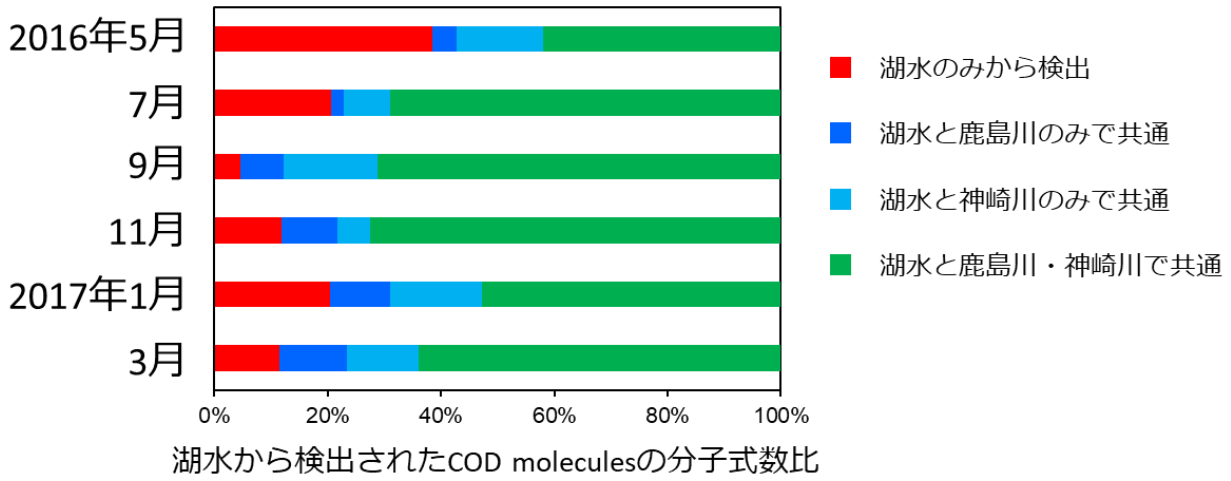
表(1)-4　印旛沼湖水から年間を通して検出されたCOD moleculesの分子式

推定分子式	測定分子量 (Da)	理論分子量 (Da)	質量誤差 (ppm)
$C_{14}H_{16}O_2$	216.1154	216.1150	1.85
$C_{14}H_{18}O_2$	218.1307	218.1307	0.00
$C_{17}H_{26}O_4$	222.0354	222.0351	1.35
$C_{19}H_{22}O_5$	250.0590	250.0590	0.00
$C_{20}H_{26}O_4$	268.0488	268.0484	1.49
$C_{11}H_{10}O_5N_2$	282.1294	282.1290	1.42
$C_{14}H_8O_4N_2$	294.1828	294.1831	1.02
$C_{14}H_9O_7N$	303.0383	303.0379	1.32
$C_{11}H_{10}O_3S$	330.1465	330.1467	0.61
$C_{15}H_{22}O_3S$	330.1833	330.1831	0.61

図(1)-12　印旛沼におけるCOD moleculesの起源別分類（2016年7月の例）



ら、内部生産由来であることが推測される。印旛沼の場合、2016年5月において、湖水のみから検出されるCOD moleculesの分子式数が最も多かった。実際、2016年5月は湖水のChl-a濃度が最も高く、藻類由来の有機物が起源になっている可能性が示唆される。その他の季節については、湖水で検出されたCOD moleculesの80%以上はいずれかの河川水に含まれていたが、そのほとんどは両方の河川に共通していた。このことから、印旛沼の溶存COD成分の主要な起源としては流入河川の寄与が大きいと考えられる。この



図(1)-13　印旛沼湖水から検出されたCOD moleculesの起源別割合（分子式数比）

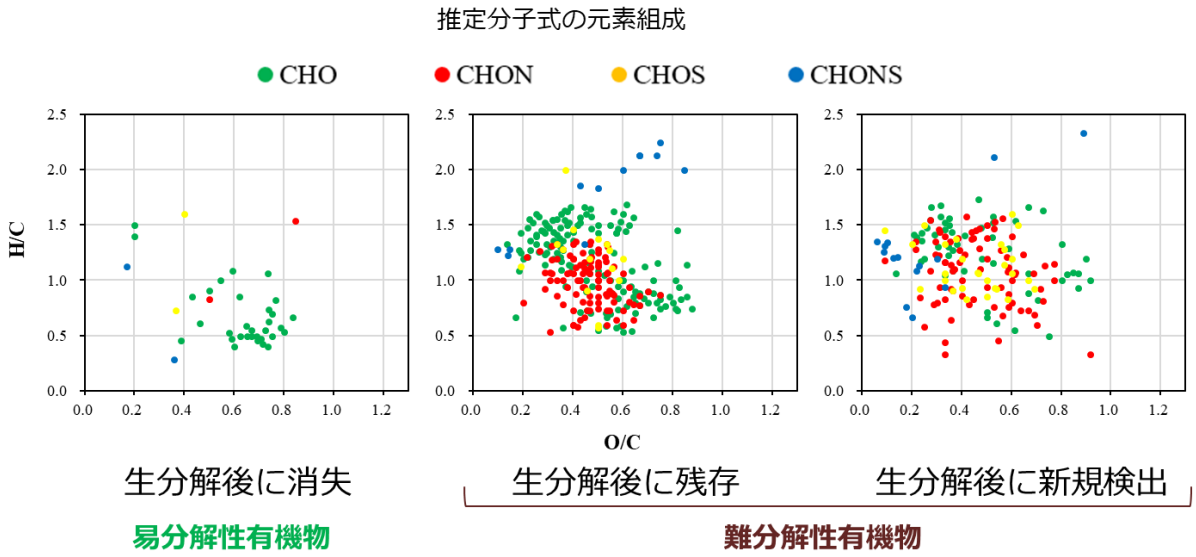
ように、湖水中のCOD moleculesの起源を分子式レベルでトレースできることを示せた点は大きな成果の一つと言える。

c) 微生物分解作用が難分解性有機物及び溶存 COD 成分に及ぼす影響評価

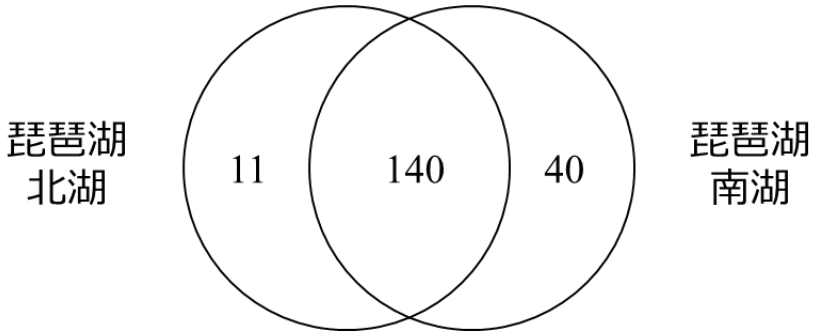
2017 年 11 月に採水した琵琶湖北湖・南湖の表層水をガラス繊維ろ紙（孔径 1.0 μm）でろ過した後、暗所で 100 日間静置培養した。表(1)-5 に、培養前後の DOC、$DCOD_{Mn}$ の変化を示した。DOC は約半減したのに対して、$DCOD_{Mn}$ の値は培養前後でほとんど変化せず 1.1～1.2 mg/L であった。この結果、$DCOD_{Mn}$/DOC は上昇することが確認された。培養前後の DOM を固相抽出して精密質量分析で解析したところ、琵琶湖北湖については、培養前後で共通していた分子式は 1215、培養前のみから検出された分子式は 74、培養後のみから検出された分子式は 286 あり、培養によって新たな成分が生成していたことが示唆された。同様の傾向は南湖についても確認された。培養前のみから検出された分子式は易分解性有機物であると考えられる一方、培養後のみから新規に検出された分子式は、微生物の代謝産物・死菌成分と推察される。過マンガン酸カリウムによる酸化処理を行い、これらの中から COD molecules を抽出した。図(1)-14 に、琵琶湖北湖における COD molecules の培養前後の変化を示す。元の湖水中に含まれている COD molecules の一部は微生物分解を受けるものの、大半は難分解性であることがわかる。一方、100 日間の微生物分解実験後に新規に検出された分子式の中には、COD molecules に分類されるものも含まれていることが明らかになった。図(1)-15 に示すように、琵琶湖北湖・南湖について、微生物分解実験 100 日後に新規に検出された COD molecules の共通性を評価したところ、大半の COD molecules は共通していた。以上のことは、微生物分解作用により、難分解性の COD molecules が生成することを示唆しており、湖沼内の DOM あるいは溶存 COD の質的な形成過程に対して、微生物が影響を及ぼしていることが推測された。こうした知見は、湖沼における難分解性有機物の蓄積などの機構解明にも有用と考えられる。

表(1)-5　微生物分解実験における培養前後の水質変化

	琵琶湖北湖		琵琶湖南湖	
	培養前	培養後	培養前	培養後
DOC (mg/L)	2.2	1.0	2.1	0.9
$DCOD_{Mn}$ (mg/L))	1.2	1.1	1.2	1.2
$DCOD_{Mn}$/DOC	0.55	1.10	0.57	1.33



図(1)-14　琵琶湖北湖の培養前後のCOD moleculesの変化



図(1)-15　微生物分解実験100日後に新規に検出されたCOD moleculesの包含関係（琵琶湖北湖・南湖）

（ベン図中の数字は分子式数）

d)　全国の指定湖沼における溶存 COD 成分の比較

2017年10月から11月にかけて、我が国の11の指定湖沼（八郎湖、釜房ダム貯水池10月・11月、野尻湖、諏訪湖、霞ヶ浦、印旛沼、手賀沼、琵琶湖北湖・南湖、中海、宍道湖、児島湖）から湖水を採水し、溶存COD成分の分子式組成を評価した。表(1)-6に、各試料の水質測定結果を示す。DOCは1.3 mg/L（釜房ダム貯水池10月）～5.0 mg/L（霞ヶ浦）、$DCOD_{Mn}$は、1.2 mg/L（琵琶湖北湖・南湖）～5.0 mg/L（霞ヶ浦）の範囲であった。$DCOD_{Mn}$とDOCの比である$DCOD_{Mn}$/DOCは、0.55（琵琶湖北湖）～1.27（中海）を示した。

過マンガン酸カリウムによる処理により、固相抽出したDOMをCOD moleculesとpersistent moleculesに分類した。酸化処理前の湖水から検出された分子式はいずれの湖沼も1000種類近くあったが、そのうちCOD moleculesに分類された割合（分子式数比）は15%（八郎湖）～54%（中海）、平均26%であった。COD moleculesの割合が50%を超えた中海を除き、いずれの湖沼でもCOD moleculesは全体の一部に過ぎないことが確認された。COD moleculesの割合が高かった中海は、$DCOD_{Mn}$/DOCが最も高いという特徴が見られた。

表(1)-7に、各指定湖沼のCOD molecules組成の一致度を示した。高い一致度を示した釜房ダム貯水池の10月と11月（一致度：79%）や琵琶湖北湖と南湖（一致度：79%）を除き、湖沼間のCOD moleculesの組成の一致度は17%～61%であり、湖沼によって特徴的な組成があることが推察された。分子式レベルで精

査すると、すべての湖沼に共通したCOD moleculesは13種類のみであった（表(1)-8）。これらのことから、溶存COD成分の中身は各湖沼によって異なっている可能性が高く、湖沼におけるCOD対策を進めるにあたって、各湖沼特有の溶存CODの発生源や質的な形成過程の特徴などを把握することが重要と考えられた。

表(1)-6　各湖沼試料の水質測定結果

	採水日	DOC (mg/L)	$DCOD_{Mn}$ (mg/L)	$DCOD_{Mn}$/DOC
八郎湖	2017年11月8日	3.4	3.2	0.94
釜房ダム貯水池10月	2017年10月18日	1.4	1.4	1.00
釜房ダム貯水池11月	2017年11月15日	1.3	1.4	1.08
野尻湖	2017年10月11日	2.0	1.6	0.80
諏訪湖	2017年10月11日	3.0	2.4	0.80
霞ヶ浦	2017年10月11日	5.0	3.8	0.76
印旛沼	2017年10月23日	3.6	2.2	0.61
手賀沼	2017年10月23日	3.2	1.9	0.59
琵琶湖北湖	2017年11月1日	2.2	1.2	0.55
琵琶湖南湖	2017年11月1日	2.1	1.2	0.57
中海	2017年11月1日	2.2	2.8	1.27
宍道湖	2017年11月1日	1.9	1.8	0.95
児島湖	2017年11月21日	3.5	3.2	0.91

表(1)-7　指定湖沼のCOD molecules組成の一致度

	釜房ダム 10月	釜房ダム 11月	野尻湖	諏訪湖	霞ヶ浦	印旛沼	手賀沼	琵琶湖 北湖	琵琶湖 南湖	中海	宍道湖	児島湖
八郎湖	36%	35%	29%	38%	25%	48%	31%	35%	25%	20%	46%	48%
釜房ダム 10月		79%	36%	40%	17%	39%	39%	29%	23%	34%	54%	51%
釜房ダム 11月			33%	36%	17%	34%	31%	24%	18%	29%	54%	48%
野尻湖				55%	33%	37%	40%	53%	55%	51%	51%	38%
諏訪湖					35%	47%	44%	56%	51%	46%	58%	46%
霞ヶ浦						23%	32%	33%	33%	25%	30%	33%
印旛沼							58%	53%	45%	32%	53%	57%
手賀沼								40%	36%	37%	47%	59%
琵琶湖 北湖									79%	48%	47%	37%
琵琶湖 南湖										49%	39%	30%
中海											46%	29%
宍道湖												61%

表(1)-8　指定湖沼間で共通していたCOD molecules

推定分子式	測定分子量 (Da)	理論分子量 (Da)	質量誤差 (ppm)
$C_7H_{13}O_3NS$	191.0616	191.0616	0.00
$C_{12}H_6O_8$	278.0062	278.0063	0.36
$C_{12}H_{10}O_{10}$	314.0275	314.0274	0.32
$C_{15}H_6O_9$	330.0014	330.0012	0.61
$C_{15}H_{12}O_{11}$	368.0381	368.0380	0.27
$C_{16}H_8O_{11}$	376.0069	376.0067	0.53
$C_{15}H_{12}O_{12}$	384.0331	384.0329	0.52
$C_{16}H_{14}O_{12}$	398.0486	398.0485	0.25
$C_{18}H_{14}O_{12}$	422.0487	422.0485	0.47
$C_{17}H_{14}O_{13}$	426.0441	426.0434	1.64
$C_{18}H_{16}O_{13}$	440.0585	440.0591	1.36
$C_{20}H_{18}O_{13}$	466.0746	466.0747	0.21
$C_{20}H_{18}O_{14}$	482.0696	482.0697	0.21

５．本研究により得られた成果

（１）科学的意義

a）湖沼の溶存 COD 成分を探索する手法の確立

湖沼の COD は、これまでバルクの指標として扱われており、その成分に関する情報は皆無であった。本研究において、過マンガン酸カリウムによる酸化処理と精密質量分析とを統合することにより、精密質量分析計が出力する DOM 組成のビッグデータから、環境基準の対象となりうる溶存 COD に寄与する成分を抽出する方法を確立することに成功した。

b）千葉県印旛沼における溶存 COD 成分の季節変動と起源解析

湖沼 COD の値がワースト 1 位である千葉県印旛沼を対象として、通年の採水調査を実施して溶存 COD 成分の季節変動を初めて解明した。溶存 COD 成分の組成を分子式レベルで比較したところ、湖水の溶存 COD 成分は年間を通して検出されるコアな成分と、各季節に特異的に検出される成分から構成されることが明らかになった。このことは、湖水の溶存 COD 成分が決して一様ではないことを示している。また、湖水の COD molecules と印旛沼に流入する河川水中の DOM との照合を分子式レベルで行った結果、印旛沼の溶存 COD 成分の多くは流入河川水にも含まれており、外部負荷の影響が大きいことが推察された。一方、湖水のクロロフィル a が高い時期には、流入河川水からは検出されない成分の頻度も高まり、内部負荷の寄与を示唆する結果が得られた。このように、湖沼の溶存 COD 成分の起源を分子式レベルで評価できる可能性を示したことは､環境科学分野における精密質量分析計の活用例としても新規性がある。

c）微生物分解作用が難分解性有機物及び溶存 COD 成分に及ぼす影響評価

各地の湖沼で難分解性有機物の蓄積が報告されているが、その一因として微生物の寄与が疑われている。すなわち、易分解性 DOM を微生物が分解すると同時に、微生物が排出する代謝産物や死菌由来の成分が難分解性有機物として蓄積しているという仮説である。本研究では、100 日間の微生物分解実験を実施し、培養後に残存する DOM を解析し、溶存 COD 成分に変化があるかどうかを評価した。その結果、培養前の湖水に含まれていた溶存 COD 成分に加えて、培養後には新たな溶存 COD 成分が生成している可能性が示された。このことは、湖沼における DOM と微生物との相互関係、微生物が溶存 COD 成分をはじめとした DOM の質的形成過程に及ぼす影響を示す知見として、微生物生態学的にも重要である。

d）全国の指定湖沼における溶存 COD 成分の比較

本研究では、日本全国の 11 指定湖沼から湖水を収集し、溶存 COD 成分の組成を初めて比較した。分子式レベルで 11 指定湖沼の溶存 COD 成分の組成を比較したところ、その組成はそれぞれ特徴的であった。また、すべての湖沼に共通していた溶存 COD 成分の分子式は限られていた。こうした知見はバルクの COD の値を比較するだけではわからないため、本研究の成果は指定湖沼の有機汚濁の特徴を解明する上でも有用と考えられる。

（２）環境政策への貢献

湖沼におけるCOD環境基準達成率の低さは水環境行政の大きな課題である。本研究は、湖沼における溶存COD成分を分子式レベルで解析することで、溶存CODによる湖沼の水質汚濁の詳細を解明した研究である。特に、従来、CODについてはその指標性に課題があることが指摘されてきた。本研究により、DOMの中で過マンガン酸カリウムにより酸化されやすい成分と酸化されにくい成分を分子式レベルで分類することができたことは、環境基準としてのCODの理解を深めることに貢献したと言える。

また、溶存CODとして寄与する成分が、恒常的なコアな成分と季節的に変動する成分から構成されることを示した知見については、環境基準の達成を目指すにあたって、湖沼の有機汚濁の季節変動を理解することの重要性を示唆するものである。

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はない。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

本研究の成果は、CODという指標が何を見ているのか、何を見ていないのかを明示的に示すものであり、湖沼の有機汚濁指標としてのCODの妥当性の再評価や、TOCなど他の有機物指標の意義を今後検討する上でも有用な知見になると考えられる。

また、本研究が提示した、湖水中の溶存COD成分の起源を分子式レベルでトレースする方法論は、湖沼で問題となる溶存COD成分の発生源対策の優先順位を決定する際に役立つことが見込まれる。従来、実際の湖沼のCODとしてどの起源からの寄与が重要なのかを明確に確認することは困難であった。溶存COD成分に関して湖水と各起源の有機物を分子式レベルで照合できるということは、水質改善対策の立案を戦略的に進める上でも有用である。

本研究では、日本全国の11指定湖沼のDOM、溶存COD成分の分子式組成を初めて明らかにした。このような調査自体、前例がなく、我が国の湖沼の有機汚濁の詳細な状況を把握する成果となった。分子式組成データというビッグデータを蓄積することで、湖沼の有機物組成が水質改善対策や気候変動などによって長期的にどのように変化していくのか、データベースとして活用することが期待される。

６．国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

７．研究成果の発表状況

（１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

特に記載すべき事項はない。

＜査読付論文に準ずる成果発表＞

特に記載すべき事項はない。

＜その他誌上発表（査読なし）＞

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

1) V. YUTHAWONG, I. KASUGA, F. KURISU, and H. FURUMAI: 第52回日本水環境学会年会（2018）
“Insights into the molecular-level composition of COD_{Mn} components in Lake Inba assessed by Orbitrap mass spectrometry”
2) 中嶌泰介，春日郁朗，栗栖太，古米弘明：第52回日本水環境学会年会（2018）
「全国の指定湖沼を対象とした溶存有機物分子組成と細菌群集構造の関連性評価」
3) V. YUTHAWONG, I. KASUGA, F. KURISU, and H. FURUMAI: The 3rd International Form on Asian Water Environment Technology. Singapore, 2018.
“Application of high resolution mass spectrometry to characterize dissolved organic matter in lake”
4) 春日郁朗、栗栖太：第20回日本水環境学会シンポジウム（2017）
「溶存有機物分子組成の高分解能・精密質量分析による網羅的評価 -Chemical diversityとMicrobial diversityとの接点-」
5) 中嶌泰介、春日郁朗、栗栖太、古米弘明：第20回日本水環境学会シンポジウム（2017）
「湖沼微生物ループにおける*Limnohabitans*近縁細菌に由来する代謝産物の網羅的解析」
6) 中嶌泰介、春日郁朗、栗栖太、古米弘明：環境微生物系学会合同大会2017（2017）
「琵琶湖溶存有機物に寄与する細菌由来の代謝産物成分のOrbitrap質量分析計を用いた探索」
7) I. KASUGA, V. YUTHAWONG, F. KURISU, and H. FURUMAI: ASLO2017 Aquatic Sciences Meeting, Hawaii, 2017.
“Molecular source tracking of dissolved organic matter in a hypereutrophic lake by Orbitrap mass spectrometry”
8) V. YUTHAWONG, I. KASUGA, F. KURISU, and H. FURUMAI: ASLO2017 Aquatic Sciences Meeting, Hawaii, 2017.
“Application of Orbitrap mass spectrometry to reveal low molecular weight dissolved organic matter responsible for COD in a eutrophic lake”
9) V. YUTHAWONG, I. KASUGA, F. KURISU, and H. FURUMAI: 第51回日本水環境学会年会（2017）
“Application of high resolution mass spectrometry to evaluate seasonal variation of organic matter responsible for COD_{Mn} in Lake Inba”

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

1)一般公開ワークショップ「溶存有機物をめぐる最新の知見と高度浄水処理技術の展開」（主催：日本水環境学会 将来の水環境変化に対応した水供給システム研究委員会、2017年7月11日、東京大学工学部14号館141号室、観客約90名）にて講演

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

特に記載すべき事項はない。

８．引用文献

1） E.B. KUJAWINSKI and M.D. BEHN: Analytical Chemistry, 78, 13, 4363-4373 (2006)
Automated analysis of electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra of natural organic matter

III. 英文Abstract

Comprehensive Molecular Identification of COD Composition in Lake by High Resolution Mass Spectrometry

Principal Investigator: Ikuro KASUGA
Institution: The University of Tokyo
7-3-1, Hongo, Bunkyo, Tokyo, 113-8656, JAPAN
Tel: +81-3-5841-6263 / Fax: +81-3-5841-6244
E-mail: kasuga@env.t.u-tokyo.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Lake, COD, High resolution mass spectrometer, Dissolved organic matter, Environmental quality standards

The compliance rate of COD standard in lakes remained approximately 56.7% in FY2016. To understand COD issue in lakes, in-depth characterization of dissolved organic matter (DOM) specifically contributing to COD is required. However, the composition of COD remains unknown since DOM is the complex of various substances and oxidation by potassium permanganate is totally dependent on types of organic molecules. In this study, high-resolution mass spectrometry was applied to elucidate the molecular-level composition of DOM contributing to COD.

Classification of DOM molecules into “COD molecules mainly contributing to dissolved COD (DCOD)” and “persistent molecules hardly oxidized by potassium permanganate” was successfully achieved through comparison of mass profiles of lake water samples before and after potassium permanganate oxidation. Seasonal variations of COD molecules in Lake Inba in Chiba Prefecture were evaluated by applying the established method. The results showed that COD molecules in Lake Inba were composed of molecules always detected throughout the year and molecules specific to each sampling season. It indicates that DCOD composition can change seasonally in Lake Inba. To explore the sources of the COD molecules in Lake Inba, they were compared with DOM molecules in rivers flowing to the lake. Most of COD molecules were also found in the river samples, suggesting that external rivers were the major potential sources of COD molecules. However, the percentages of COD molecules that were exclusive to the lake water increased when chlorophyll a concentration in lake water was high. They were probably derived from some internal sources such as algae.

Long-term biodegradation experiment was performed for Lake Biwa samples to evaluate how DCOD composition was shaped by microorganisms. While some labile COD molecules disappeared after 100 days incubation, we detected new COD molecules after incubation. These additional components were regarded as refractory COD molecules generated by microorganisms, suggesting that microbial functions are one of the key factors to determine DCOD composition in lake water.

Finally, DCOD composition in all 11 designated lakes in Japan were compared. Compositional similarity of COD molecules among these lakes was 17–79%, indicating that each lake has unique DCOD composition. The findings on the composition of COD molecules are

useful to understand organic pollution mechanism in lakes in Japan.