

小川原湖における 2-MIB 産生シアノバクテリアの  
出現に関する研究

静 一徳

Study on the emergence of 2-MIB producing cyanobacteria  
in Lake Ogawara

Kazunori Shizuka

## 目次

|  |    |
|--|----|
| 緒論 .....   | 1  |
| 1. カビ臭問題と発生地域 .....                                      | 1  |
| 2. 水道水の問題と水道基準値 .....                                    | 3  |
| 3. 漁業への影響 .....  | 4  |
| 4. 汽水湖におけるカビ臭問題 .....                                    | 5  |
| 5. カビ臭発生要因の解明のためのアプローチ .....                             | 7  |
| 6. 調査地概要 .....   | 8  |
| 7. 章の構成と研究構成 .....                                       | 10 |
| <br>第1章 2-MIB 発生時および 2-MIB 産生シアノバクテリア出現時<br>の水質の特徴 ..... | 12 |
| 1. 序言 .....  | 12 |
| 2. 試料および方法 .....   | 14 |
| 2-1. 長期モニタリングデータ .....                                   | 14 |
| 2-2. 2-MIB の発生年 .....                                    | 16 |
| 2-3. 統計解析 .....  | 17 |
| 3. 結果 .....  | 18 |

|   |    |
|---|----|
| 3-1. 2-MIB 発生と MOPPL-シアノバクテリアの出現年・時期と<br>その関係 ..... | 18 |
| 3-2. 水質および日照の長期的変動と 2-MIB 発生との関係 .....              | 20 |
| 3-3. 2-MIB 発生の多変量ロジスティック回帰分析 .....                  | 26 |
| 3-4. 予測モデルとしての精度検証 .....                            | 26 |
| 4. 考察 .....   | 29 |
| 4-1. 2-MIB および MOPPL-シアノバクテリアの出現年，出現時<br>期 .....    | 29 |
| 4-2. 2-MIB の発生と関係する水質 .....                         | 30 |
| 4-3. 予測モデル .....                                    | 34 |
| 5. 結論 .....   | 35 |
| <br>第 2 章 2-MIB 発生に関係する水質の変動要因 .....                | 37 |
| 1. 序言 .....   | 37 |
| 2. 試料および方法 .....                                    | 40 |
| 2-1. 解析に用いたデータセット .....                             | 40 |
| 2-2. 統計解析 .....                                     | 42 |
| 2-3. 一般化加法モデル（GAM）について .....                        | 42 |
| 2-4. 因果推論と交絡調整 .....                                | 44 |
| 2-5. バックドア基準について .....                              | 44 |

|  |    |
|--|----|
| 2-6. DAG の作成とバックドア基準を満たす交絡因子の選択 ....                                       | 45 |
| 2-7. 交絡調整のための一般化加法モデル .....  | 52 |
| 3. 結果 .....  | 53 |
| 3-1. 河川流量の年間，経年トレンド .....  | 53 |
| 3-2. 融雪水量および塩分躍層水深との関係 .....   | 53 |
| 3-3. 融雪水量との関係における統計的因果推論 .....   | 53 |
| 3-3-1. TN .....  | 57 |
| 3-3-2. DIN .....   | 57 |
| 3-3-3. 塩分 (Cl) .....   | 62 |
| 4. 考察 .....  | 62 |
| 4-1. 融雪水量および塩分躍層水深との関係 .....   | 65 |
| 4-2. $D/C_{Apr}$ と $[TN_{mix}]$ , $[DIN_{mix}]$ , $[Cl_{mix}]$ の因果関係 ..... | 65 |
| 4-2-1. TN .....  | 65 |
| 4-2-2. DIN .....   | 66 |
| 4-2-3. 塩分 (Cl) .....   | 67 |
| 5. 結論 .....  | 68 |

|  |    |
|--|----|
| 第 3 章 分子生態学的手法に基づく 2-MIB 産生糸状シアノバクテ<br>リアの組成解析 ..... | 70 |
| 1. 序言 .....  | 70 |

|  |    |
|--|----|
| 2. 試料および方法 .....   | 72 |
| 2-1. 植物プランクトンのサンプリング .....                                     | 73 |
| 2-2. 2-MIB 産生 <i>Pseudanabaena</i> の定量 .....                   | 73 |
| 2-3. シアノバクテリア株の培養と DNA 抽出 .....                                | 75 |
| 2-4. MOPPL-シアノバクテリアの分子生態学的解析 .....                             | 77 |
| 2-5. 2-MIB 産生シアノバクテリア群集の分子生態学的解析 .....                         | 80 |
| 2-6. 系統解析 .....  | 82 |
| 2-7. データ, 統計解析, バイオインフォマティクス .....                             | 82 |
| 3. 結果 .....  | 82 |
| 3-1. 湖水中の MOPPL-シアノバクテリア密度と 2-MIB 濃度の関係 .....                  | 82 |
| 3-2. 検鏡法と qPCR 法で求めた 2-MIB 産生 <i>Pseudanabaena</i> 密度の比較 ..... | 83 |
| 3-3. MOPPL-シアノバクテリアの分子生態学的解析 .....                             | 83 |
| 3-4. 2-MIB 発生時の 2-MIB 合成酵素遺伝子のアンプリコンシーケンス解析 .....              | 88 |
| 3-5. 小川原湖における 2-MIB 産生シアノバクテリア株の遺伝的類似性 .....                   | 92 |
| 4. 考察 .....  | 92 |
| 4-1. 検鏡による 2-MIB 産生シアノバクテリアの定量 .....                           | 92 |

|  |     |
|--|-----|
| 4-2. 分子生態学的アプローチ—小川原湖の 2-MIB 産生シアノバ<br>クテリアの生態を理解する強力な手がかり ..... | 98  |
| 5. 結 論 .....   | 100 |
| <br>第 4 章 総 合 討 論 .....  | 102 |
| 1. 小川原湖における 2-MIB 産生シアノバクテリアの出現時の特徴<br>.....                     | 102 |
| 2. これからの 2-MIB 産生シアノバクテリアの研究展開 .....                             | 105 |
| 3. 地球温暖化の影響 .....  | 107 |
| <br>謝 辞 .....  | 112 |
| <br>引用文献 .....   | 114 |

## 緒 論

### 1. カビ臭問題と発生地域

カビ臭物質の 2-メチルイソボルネオール(以下 2-MIB)や Geosmin は、上水への混入により水道水の品質低下や浄水コストを増加させるとともに、河川・湖沼、養殖場で発生した場合には水産物、農産物への着臭により品質低下を引き起こし、甚大な被害を生じさせている (Giglio et al. 2011 ; Srinivasan and Sorial 2011 ; Uwins 2011 ; Trigers 2011) 。 2-MIB, Geosmin の産生生物としては、これまで、シアノバクテリア、放線菌、真菌類 (Juttner and Watson 2007) , 粘液細菌 (Dickschat et al. 2005 ; Schulz et al. 2004) が報告されている。現在、当該カビ臭は、世界各地 (アメリカ, カナダ, 日本, 中国, エジプト, ドイツ, ブリテン諸島, スイス, オランダ, ノルウェー, イタリア, オーストラリア) で問題となっており (Uwins 2011), 各地の湖沼や養殖場で問題解決が求められている。そのため、カビ臭に関する研究や出版物は近年急増している (Watson et al. 2016)。

日本の水源湖沼・貯水池では、その 40% でカビ臭の発生が確認されている (須藤ら 2004) 。異臭味被害を受けた水道事業者数は、関東地方、近畿地方、中国地方が多く、2000 年以降、全国で増加傾向がみられる (厚生労働省 2005, 2008, 2013, 2018, 図 1) 。問題となるカビ臭は、富栄養化の進んだ湖沼で、シアノバクテリアにより産生されているケースが多い (Srinivasan and Sorial 2011) 。そのため、カビ臭抑制対策の一つとして、多くの湖沼で富栄養化を解消するための取り組みがなされている。

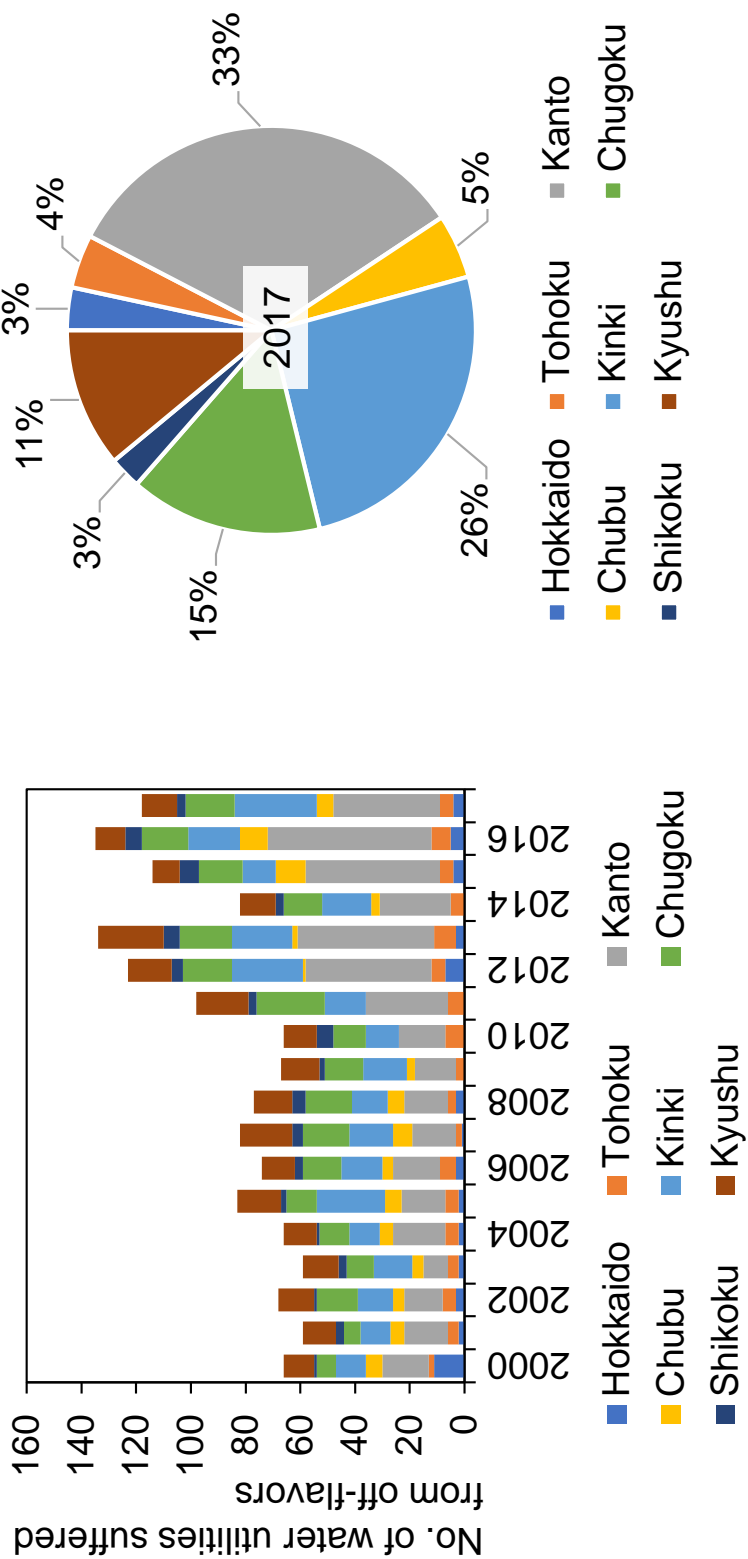


図1. 異臭味被害を受けた水道事業者数

## 2. 水道水の問題と水道基準値

環境中に出現する濃度では、Geosmin や 2-MIB はヒトや魚に対して毒性がないことが確認されている (Schulz et al. 2004 ; Robedson et al. 2006) 。しかし、ほとんどの人は、美的感覚に基づき飲食物の安全性や許容性を判断しており、味や匂いに、一時的に美的感覚の変化が生じた場合、警戒心や不安感を抱くため、カビ臭が生じた場合には浄水処理が必要とされ、カビ臭水が利用者の元に達した場合には、利用者との信頼関係が大きく損なわれかねない (Watson et al. 2016) 。

日本では、世界に先駆けて、1992 年に水質基準に関する省令の「快適水質項目」として 2-MIB および Geosmin の水道水目標値が定められ、2003 年の省令改正で両物質は「水質基準項目」に引き上げられ、基準値の達成と定期的な検査が義務付けられた。世界的には基準値を設けている国はほとんどなく、日本の他は、オーストラリアとアメリカ内のいくつかの地域のみである。これらの国および地域では、2-MIB および Geosmin の基準値はいずれも 10 ng/L に設定されている (Watson et al. 2016) 。2-MIB や Geosmin は、通常の浄水処理（凝集、沈殿、濾過、塩素処理など）では除去が難しい。そのため、各地の浄水場ではハイコストな活性炭やオゾンなどを用いた高度浄水処理が行われている (Sugiura and Nakano 2000) 。

日本における異臭味被害人口は、1990 年に 2 千万人台のピークを迎えたが、高度浄水処理が開始された 1992 年以降は急激に減少し、2007 年以降は 300 万人以下となった (厚生労働省 2017) 。しかし、異臭味被害を受けている事業体数は、2010 年度の 66 事業体から、2017 年度の 118 事業体へと近年急激に増加している (環境省 2018) 。

このような情勢から，高度浄水処理に伴う施設整備や，活性炭注入等による浄水コストが増大している。高度浄水処理施設の設置には莫大なコストがかかり，東京都の1浄水場では，1日当たり52万立方メートルの水の高度浄水処理施設の設置に約272億円，大阪府では3ヶ所の浄水処理施設の設備事業費に約753億円を投じていると報告されている。また，浄水施設設置後にも，処理量に応じて莫大なランニングコストがかかり，それは水道料金に反映されるため，そのような処理を必要としない水源水質への改善が肝要と考えられている（保坂 2001）。

### 3. 漁業への影響

上記のような水道水以外の問題として，カビ臭は水産業においても深刻な問題となっている。これまでにニジマス（Lindholm-Lehto 2019），チャネルキャットフィッシュ（Conte et al. 1996；Zimba and Grimm 2003），タイセイヨウサケ（Farmer et al. 1995），チョウザメ（Schrader et al. 2005），ヤマトシジミ（Takano et al. 2014；Tsujitani et al. 2018），オオクチバス（Schrader et al. 2005），ヨーロッパウナギ（Schram et al. 2016），ティラピア（Yamprayoon and Noomhorm 2000），マダイ（Kawaguchi et al. 2019），ワカサギ（岩崎・渡邊 2000），ハゼ類（岩崎・渡邊 2000），シラウオ（永瀬ら 2008；酒井・大罵 2010）等の魚種でカビ臭着臭が報告されている。カビ臭物質の2-MIBやGeosminは魚体内に鰓を通して吸収され，親油性が高いため，脂質が豊富な組織に蓄積されることが報告されている（Nam-Koong et al. 2016）。また，ヤマトシジミでは，貝の身への着臭の他，腸管に取り込まれたカビ臭産生シアノバクテリアの細胞が，シジミの加熱

調理過程で壊れるために、吸い物が着臭する（石飛 2011）。

カビ臭は水産物の価値を下げるため、養殖業者はカビ臭の除去のための追加処理を求められる。アメリカでは、ナマズのカビ臭除去にかかる追加コストは 1500～2300 万ドル/年と推定されている（Hanson 2003）。日本では、近年、内水面漁業がおこなわれる汽水湖でカビ臭が生じ、水産物への着臭により、大きな漁業被害がもたらされている（永瀬ら 2009；酒井・大畠 2010；高野ら 2014；辻谷ら 2018）。青森県の小川原湖では、シジミ、シラウオ、ワカサギへの 2-MIB によるカビ臭着臭により、2008 年の 10 月、11 月の被害額は前年度ベースで約 1 億 2 千 3 百万円であった（東奥日報 2008.12.4）。その他の水域では被害額は公表されていないものの、網走湖では、2013 年に 2-MIB によるカビ臭着臭により、シジミ漁を中止する措置がとられ、大きな問題となった（網走市議会 2013；世界の水事情 2013；高野ら 2014）。宍道湖では、2007 年から 2010 年にかけて、主要漁獲物であるヤマトシジミへのカビ臭着臭が問題となり、漁業者は出荷停止の自主規制を行うなど死活問題となった（石飛ら 2011；辻谷ら 2018）。この様にカビ臭は漁業に深刻な影響を与えているにも関わらず、カビ臭に対する対策は、現在のところ、畜養等による漁獲物からのカビ臭除去体制の構築や、出荷調整などの対策に限られている。

#### 4. 汽水湖におけるカビ臭問題

多くの汽水湖では漁業が営まれ、地域産業を支えている。汽水湖は貯水池やダムといった人工湖とは異なり、多くが自然に形成された湖沼である。しかし、上記したように、このような汽水湖におい

ても近年、カビ臭が生じてきている。現在までに、島根県の宍道湖（2007年～2010年：辻谷ら 2018）、鳥取県の湖山池（2006年～：永瀬ら 2009）、青森県の小川原湖（2008年～：酒井・大畠 2010）、北海道の網走湖（2013年～：高野ら 2014）と、内水面漁業の主要地においてカビ臭による漁業被害が報告されており、漁業生産を脅かしている。汽水湖におけるカビ臭発生要因の解明は喫緊の課題である。

このような状況であるにも関わらず、既往のカビ臭研究は、ほとんどが水道水源である貯水池やダムを対象として実施されており、漁業が行われる汽水湖におけるカビ臭研究は非常に少ない。したがって、発生要因はほぼ解明されておらず、対策すら実施できていない状況である。

淡水湖では、発生自体を抑制するため、間欠式空気揚水筒による湖水の曝気循環（保坂 2001）や干し上げ（梶山ら 2012）、流入負荷対策などが行われている。しかし、これらはいずれも発生機序の解明が不十分なまま実施されており、同じ対策を実施しても効果がある場合とない場合があり、効果がない場合においてもその理由は明確に分からないことが多い。研究が多くなされている貯水池やダムにおいても試行錯誤が続く状況にある中で、汽水湖という河川水と海水の両方が流入し、水文・水質が様々なタイムスケールで大きく変動する環境下におけるカビ臭の発生要因の解明には、体系的な研究手法の確立が重要であると考ええる。本研究では、以下に述べる考えに基づき、一つのカビ臭研究体系を設定し、汽水湖におけるカビ臭発生要因を解明することを目的とした。

## 5. カビ臭発生要因の解明のためのアプローチ

カビ臭の発生要因の解明に向けたアプローチは、実験的解析と、現場調査・観測データ解析の二つに分けられる。湖沼によって、アプローチの方法は大きく異なり、現場調査を中心としたもの（横田ら 2015；木村ら 2013）や、培養試験によるもの（工藤ら 2004 b），また両者を組み合わせたもの（高橋ら 2016）や、長期観測データの分析によるもの（Wang et al. 2019）等が存在する。この中ではランダム化に基づく培養実験が最も信頼性が高い（横尾 2019）。実験的にカビ臭発生の機序を研究する場合、研究の対象としては、1) カビ臭発生シアノバクテリアの増殖要因と、2) カビ臭発生シアノバクテリアのカビ臭物質産生・放出機序、および、3) 環境中におけるカビ臭物質の分解要因が挙げられる。2) に関しては、カビ臭発生シアノバクテリア自身の内的要因に強く制御されるため、3) に関しても分解に寄与する因子は限られているため（主にカビ臭分解バクテリア）、実験による解明が行いやすいと考えられる。しかし、1) については、実際の環境では、水文、水質、気象が複雑に絡みあった環境の中で、多様な生物群集が影響を及ぼしあい生態系を構築している。したがって、室内実験や、現場におけるマイクロコズムやメソコズムを用いた培養実験では、現実の湖沼の状況を完全に再現することは不可能に近い。例えば、実験的に水温や栄養塩類濃度と 2-MIB 発生シアノバクテリアの増殖速度の関係が明らかになったとしても、自然環境中では、これに年や季節、水域によって叢が変化する微生物群集との競合が関与する。よって、実際のフィールドで生じている現象を理解せずに、実験的にカビ臭発生シアノバクテリアの増殖要因を明らかにすることは難しい。以上より、まず湖沼の水質・気象やカ

カビ臭発生シアノバクテリアに関する現場調査や長期観測データから、その関係性を解明することが、湖沼におけるカビ臭発生問題を解決する上でのひとつのマイルストーンになると考えられる。

これまでのカビ臭の発生機序に関する研究は、主に水質とカビ臭発生に関連に着目して実施されてきた。しかし、カビ臭発生時の水質の形成には、気象や水文等の外部環境が強く影響している。よって、「カビ臭が、なぜこの水域において発生するか。どのようにして制御すればよいか」を理解するためには、カビ臭の発生と水質との関連とともに、その水質が形成される要因を、湖外環境の影響にも着目して明らかにする必要がある。しかし、湖外環境が水質に及ぼす影響から、水質とカビ臭の発生の関係について、一連のプロセスを対象とした研究は未だ存在しない。

本研究は、近年、2-MIBによるカビ臭が発生し、漁獲物への着臭による漁業被害が大きな問題となっている青森県の小川原湖を対象とした。小川原湖は、シジミ、シラウオ、ワカサギといった、汽水湖における漁業の主要対象種が、全国有数の規模で漁獲される汽水湖である。小川原湖では（地独）青森県産業技術センター内水面研究所（以下、内水面研究所）や、国土交通省による長期的な水質モニタリングが行われている。加えて、内水面研究所により、2-MIB産生糸状シアノバクテリアのモニタリングが行われており、豊富なデータが揃っている。小川原湖は、このように上記で設定した研究体系を適用する上での好条件が整っている。

## 6. 調査地概要

青森県の小川原湖は本州の最北端域に位置する汽水湖である。こ

の地域は冷温帯気候であり，過去 30 年間の年平均気温，最高気温，最低気温，12 月～2 月の冬季平均気温はそれぞれ，9.9℃，27℃，-7℃，-0.3℃である。平均年間降水量は 1291mm，12 月～2 月の冬季降水量の平均は 230 mm である。小川原湖は，平均水深 11m，最大水深 26m，湖水面積 63.2km<sup>2</sup>であり，湖容積 714×10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>に対し，年間流入水量は 695×10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>であるため，湖水の滞留時間は約 1 年と見積もられる。また流域面積は 805.4 km<sup>2</sup>であり（青森県 2017），ほとんどの河川水は，南部から流入し，北部から流出する。主に冬季に，太平洋の海水が，北部で太平洋につながる高瀬川より遡上流入する。塩水は，密度が高いために湖底に沿って流入し，最深部に滞留するため，塩分躍層が年間を通して形成されており，表層の塩分（0.6–2.6）と比べ，底層の塩分（9.5–15.9）は非常に高い値を示す。2000 年代の初頭は，水深 20m にあった塩分躍層は 2008 年までに水深 15m まで上昇し（木下ら 2014），2010 年以降，水深 15m から 18m に留まっている。夏季（7 月～9 月）は約 8m に水温成層が形成される。年により異なるが，冬季（12 月～2 月）には部分結氷または全面結氷が生じる。2008 年～2017 年にかけての年平均 TN（全窒素），TP（全リン）はそれぞれ 0.83 ± 0.07 mg/L，0.031 ± 0.005 mg/L である[水文水質データベース（<http://www1.river.go.jp/>）の St. G（本研究の St. 19）のデータから計算]。流域の土地利用は，森林が 52%，水田が 18%，畑が 13%，河川・湖沼が 9%，宅地が 9%である。流域からの TN，TP 負荷量は，それぞれ 1.31 g/m<sup>2</sup>/yr，0.0298 g/m<sup>2</sup>/yr と推定されている（Nishida and Suzuki 2007 より計算）。土地利用別の TN，TP 負荷割合は，TN では農業系が 45%，自然系が 22%，畜産系が 12%であり，TP では畜産系が 28%，自然系が 24%，農業系が 11%

と推定されている（青森県 2017）。小川原湖は北部で姉沼，南部で内沼と接続しており，その水は小川原湖へ流入している。

小川原湖は湖沼の漁獲量で宍道湖に続き，日本で第2位であるが（農林水産省 2006），2008年の秋から翌春にかけてカビ臭が発生し，シラウオ（*Salangichthys microdon*），ワカサギ（*Hypomesus nipponensis*），ヤマトシジミ（*Corbicula japonica*）等へのカビ臭着臭により商品価値が著しく低下し，多額の漁業被害（1億円以上）を生じた。小川原湖のカビ臭は，国交省のモニタリングにより，2-MIBに起因していることが確かめられている。2008年の発生後，2009年，2010年と連続して発生がみられたが，2011年には終息傾向を示し，2012年には全く発生せず，完全に終息したかに思われた。しかし，2013年に再び2-MIBが発生し，大きな漁業被害をもたらした。2014年以降も，規模は異なるが，断続的に2-MIBが発生しており，未だ完全な終息には至っていない状況にある。

## 7. 章の構成と研究構成

本研究は，上記のカビ臭研究に関するストラテジーや，カビ臭研究の状況に基づき，カビ臭による漁業被害が大きな問題となっている青森県の汽水湖—小川原湖—において，気象等の湖外因子から，水質，2-MIB発生という，マクロスケールからミクロスケールでのイベントの関連を包括的に明らかにするとともに，その実験的証明や定量的予測に必要な2-MIB産生シアノバクテリアの正確な動態把握手法として，分子生態学的手法の有用性を明らかにすることを目的とした。

目的を達成するために，第1章では，長期モニタリングデータの

統計的解析により，カビ臭の発生と水質の関係を明らかにし，発生要因の仮説，2-MIB 発生を事前に予測する手法を提案した（Shizuka et al. 2020 Water Research, in preparation for submission）。第 2 章では，カビ臭の発生と関係する水質の年次変動をもたらす要因を明らかにし，「なぜ，これまで小川原湖では生じていなかったカビ臭が，近年になり突然発生したのか」，水質に影響を及ぼす湖外の気象等要因を明らかにした（Shizuka et al. 2020 Journal of Environmental Quality, *in press*）。そして第 3 章では，長期的モニタリングデータから導き出した仮説を実験，調査で検証するために必要な，カビ臭産生シアノバクテリア側のデータとして，検鏡法の定量性の問題を提起し，分子生態学的手法の有用性を述べた（Shizuka et al. 2020 Aquaculture Science, *in press*）。

## 第 1 章 2-MIB 発生時および 2-MIB 産生シアノバクテリア出現時の水質の特徴

### 1. 序言

カビ臭は全ての湖沼に普遍的に存在するわけではなく、その発生には富栄養化が関与していると言われている（橋本・青山 2001；Watson et al. 2016）。近年におけるカビ臭問題の広がりを受けて、様々な湖沼で、シアノバクテリアによるカビ臭の発生要因を特定するため、またはカビ臭物質濃度を、カビ臭濃度以外のモニタリング項目から推定することや、発生の事前察知のため、予測モデルの構築が試みられてきた（Smith et al. 2002；Sugiura et al. 2004；Mau et al. 2004；Christensen et al. 2006；Dzialowski et al. 2007；Dzialowski et al. 2009；Parinet et al. 2010；Thuan et al. 2012；Journey et al. 2013；Parinet et al. 2013；Qi et al. 2012；Bruder et al. 2014；Kahoe et al. 2015；Chung et al. 2016；Bertone and O'Halloran 2016；Geer et al. 2017；Harris et al. 2017；Chong et al. 2018；Wang et al. 2019）。しかし、これらは全て飲料水用の貯水池・ダムを対象としたものであり、飲料水源ではなく、漁業利用が盛んな自然湖沼、特に汽水湖でのカビ臭発生の予測モデルの構築が試みられた事例は存在しない。本研究の対象地である小川原湖でも、シアノバクテリアを原因とするカビ臭の発生が確認されてきたが、カビ臭発生と水質との関係について解析した事例はなく、どのような機序でカビ臭の発生に繋がっているのかは全く明らかになっていない。

汽水湖は湖水に塩分が含まれるため、その生物相は淡水湖と大きく異なる。また、小川原湖のように水深が深い汽水湖においては、

海から侵入した海水が底層に滞留して高塩分層（塩分成層構造）を形成する。このような成層構造は、湖の物質循環に大きな影響を及ぼす。したがって、カビ臭の発生機序も、淡水湖とは異なる可能性がある。さらに、カビ臭発生に関して報告されているモデルの多くは、カビ臭物質と同時点に観測した項目により、カビ臭物質の濃度や発生を予測するものであり、カビ臭発生を事前に予測するモデル構築事例は、報告されている 19 事例中、4 例（Kahoe et al. 2015 ; Chung et al. 2016 ; Chong et al. 2018 ; Wang et al. 2019）しか存在しない。水産物が主なカビ臭被害対象となる場合、カビ臭発生後の対策は自主規制のみに限られているため、カビ臭発生前に発生を予測できることが望ましい。

そこで本研究では、小川原湖のカビ臭原因物質である 2-MIB および 2-MIB 産生シアノバクテリアについて、発生要因の推定と発生予測モデルの構築を目的とした。目的を達成するために、小川原湖における 2-MIB および 2-MIB 産生シアノバクテリアについて、まず、それらの濃度や密度の時期的な変動の特徴を明らかにした。また、その特徴を考慮した上で、2-MIB や 2-MIB 産生シアノバクテリアについて、水質や気象との関係を多変量解析により明らかにした。解析対象（回帰分析における目的変数）を選定するに当たり、2-MIB 発生の有無、2-MIB 濃度、2-MIB 産生シアノバクテリア密度が考えられた。2-MIB 濃度は、2-MIB 産生シアノバクテリアの密度とともに、2-MIB 産生シアノバクテリアによる 2-MIB 生合成量や 2-MIB 産生シアノバクテリアの死滅・生分解に伴う放出量、また湖水中での 2-MIB の分解速度に影響を受けるため、その定量的な予測を、2-MIB 産生シアノバクテリア密度に関するデータや予測値を使わず実施するこ

とは難しい。また、検鏡による 2-MIB 産生シアノバクテリア密度は、後述するように非産生種の混在が確認されており、検鏡データを対象とした量的解析は不確実性を有する。

一方、上述したように、小川原湖では 2-MIB は漁獲物への着臭が問題となっており、漁獲物への着臭によるクレームの発生が懸念された場合には、小川原湖漁業協同組合（以降、小川原湖漁協）による漁の操業規制が行われ、漁協等においてその記録が保管されている。上述した理由により、2-MIB 濃度や 2-MIB 産生シアノバクテリア密度を対象とした定量的な解析は難しいが、“操業規制レベルでの 2-MIB の発生の有無”を対象とした定性的な解析は可能である。そこで、本章では、漁業協同組合が操業規制を発動した年を“2-MIB の発生年”と定義し、2-MIB 発生と水質や気象との関係を明らかにし、2-MIB 産生シアノバクテリアの発生要因の推定および 2-MIB 発生予測モデルの構築を試みた。

## 2. 試料および方法

### 2-1. 長期モニタリングデータ

水温、塩分、溶存酸素濃度（DO）、pH、透明度（セッキ板による）は、（地独）青森県産業技術センター内水面研究所（以降、内水面研究所）による 1996 年～2018 年の St.1（湖南）、St.中央（湖中央）、St.5（湖北）における月 1 回の観測値を用いた（図 1-1）。全窒素（TN）、無機態窒素（DIN）、全リン（TP）、無機態リン（DIP）、クロロフィル a 濃度は国土交通省による 1996 年～2018 年の小川原湖水のモニタリングデータ（No. A（湖南 1）、No. C（湖南 2）、No. G（湖中央）、No. H（湖北）：水文水質データベース（<http://www1.river.go.jp/>））を

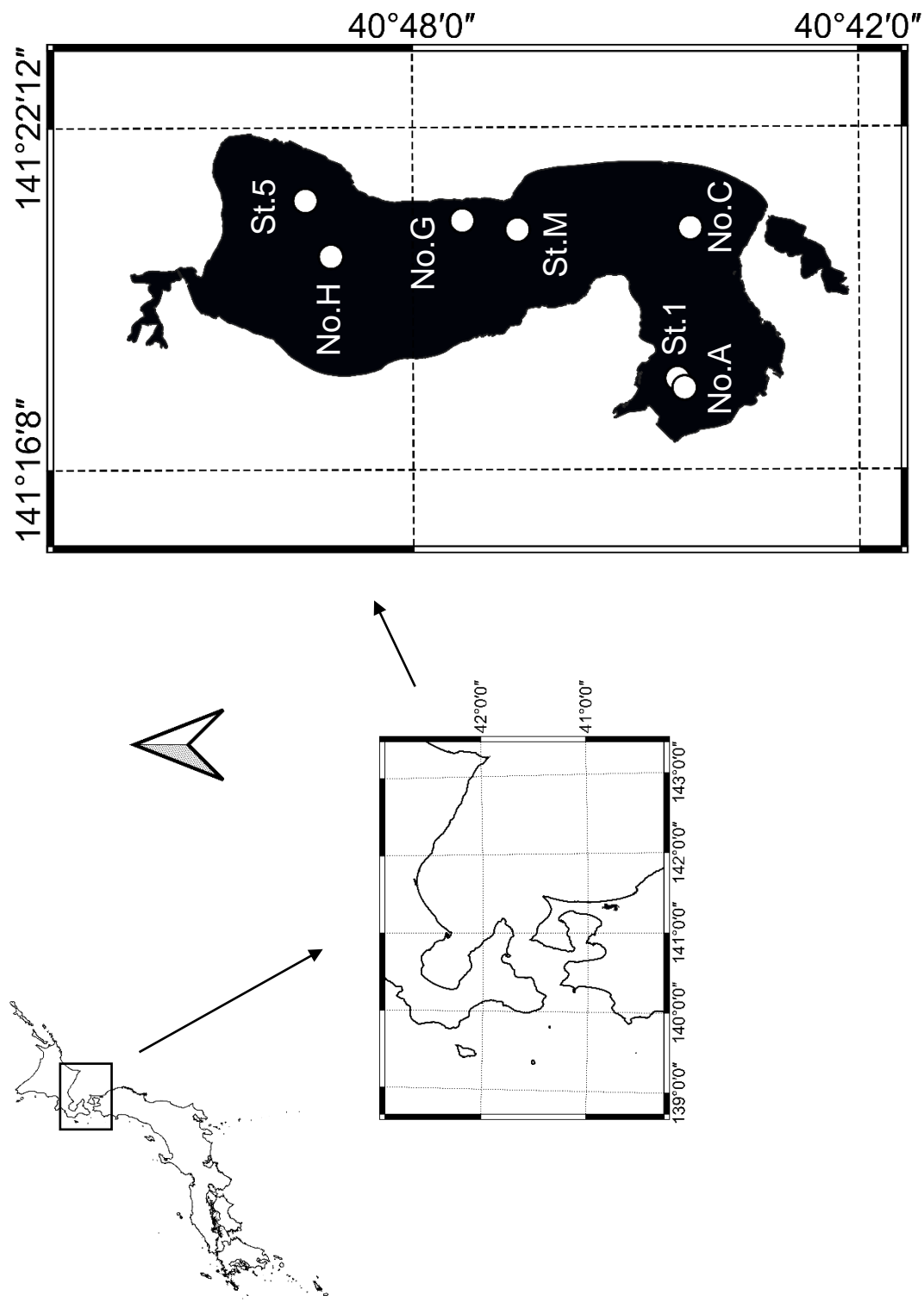


图1-1. 定点图

引用した（図 1-1）。月間日照時間は、気象庁による 1996 年～2018 年の三沢，六ヶ所の観測値（過去の気象データ（<https://www.data.jma.go.jp/gmd/risk/obsdl/>）より引用）を引用した。小川原湖の 2-MIB 産生シアノバクテリアと考えられているカビ臭産生 *Pseudanabaena* 様シアノバクテリア（Musty-odor-producing *Pseudanabaena*-like cyanobacteria; 以降，MOPPL-シアノバクテリア）密度は、内水面研究所による 2011 年～2018 年の小川原湖 St.中央の検鏡法による観測値を用いた。2-MIB 濃度は、国土交通省による 2011 年～2018 年の No. G の観測値を引用した。

## 2-2. 2-MIB の発生年

前記したように、本章では“カビ臭が原因で漁の操業規制が行われる水準での 2-MIB 発生の有無（以降，2-MIB 発生の有無）”を対象として解析した。小川原湖漁協の操業規制の通達文書には、小川原湖漁協では、漁獲物の食味試験においてカビ臭が感知された場合や、魚体の 2-MIB 濃度、湖水中の 2-MIB 濃度の推移を判断対象として操業規制を実施していたことが記されている。2008 年～2018 年の各年における湖水中の最大 2-MIB 濃度と、各年の操業規制の有無との対応について調べたところ、7 ng/L 以下では規制が無く、23 ng/L 以上では規制が行われていた。したがって、7～23 ng/L の間に魚介類への着臭が生じる閾値が存在すると考えられた。2007 年以前はカビ臭が原因の操業規制は行われなかったため、2007 年以前の湖水中の 2-MIB 濃度は、この濃度未満であったと推察した。また 1996 年～2003 年および 2005 年～2007 年の小川原湖漁協の総会資料や、内水面研究所の月 1 回の調査記録には、カビ臭の発生に関する記述はな

かった。ただし、2004 年に関しては、小川原湖漁協において、カビ臭による操業規制は生じていないものの、1996 年～2018 年の他の年では確認されなかったシジミの衰弱による出荷停止、貧酸素層の上昇によるシジミの大量斃死、シラウオ、ワカサギの成長不良と漁獲不振が発生し（長崎・細井 2008）、内水面研究所の調査記録では糸状藍藻類の大量発生が確認されたとの記載があった。また、小川原湖で 30 年以上にわたり漁や現場調査を行っている小川原湖漁協職員 2 名に聞き取り調査を実施したが、「2008 年以降のようなカビ臭は、2007 年以前はみられなかった」とのことであった。そこで、カビ臭による操業規制が行われなかった 1996 年～2003 年、2005 年～2007 年、2012 年、2014 年、2018 年を、2-MIB「非発生年」とし、操業規制が行われた 2008 年～2011 年、2013 年、2015 年～2017 年を 2-MIB 発生年とした。ただし、上記した様々な異常が確認された 2004 年に関しては解析から除外した。また、結果で記載するように、各年の湖水中の 2-MIB 濃度や MOPPL-シアノバクテリア密度は主に 8 月～10 月に増加する傾向がみられたことから、各年の 2-MIB 発生の判定は 8 月以降の状況で実施した。

### 2-3. 統計解析

2-MIB 発生に関与すると考えられる水質項目（水温、塩分、溶存酸素濃度、pH、透明度、全窒素濃度、無機態窒素濃度、全リン濃度、無機態リン濃度、TN/TP（重量比）、DIN/TP（重量比）、クロロフィル a 濃度）と気象項目（日照時間）について、2-MIB 発生時期より前、具体的には 4 月～9 月のこれらの平均値を説明変数の候補とし、各年の 2-MIB 発生の有無を目的変数としたロジスティック回帰分析

を行った。

統計解析は統計ソフト R (ver.3.6.0; R Core Team 2019) で実施し、ロジスティック回帰分析には `brglm` パッケージ (Kosmidis 2019) の `brglm` 関数を使用した。AIC 最小モデルの探索は `MuMIn` パッケージ (Barton 2019) の `dredge` 関数により、説明変数の総組み合わせで実施した。Nagelkerke (Cragg-Uhler) の疑似決定係数は `DescTools` (Signorell 2019) パッケージの `PseudoR2` 関数により算出した。発生予測モデルの汎化性能 (未知データに対する予測性能) 評価は 5 分割交差検証 (5-fold cross-validation) により実施した。ランダムに 5 分割したデータの内、4 つの訓練データから構築したモデルにより、1 つのテストデータの予測を行い、汎化性能の指標として `Recall` (検出率), `Precision` (精度), `F-measure` (検出率と精度の総合的評価), `Specificity` (特異度), `Accuracy` (正解率) の算出を、分割データの全ての組み合わせ (5 組) で実施し、5 組平均の各指標値を算出した。この時のモデルによる判別のカットオフ値は 50% とした。これらの一連の計算を 1000 回実施し、1000 回平均の各指標値を算出した。

### 3. 結果

#### 3-1. 2-MIB 発生と MOPPL-シアノバクテリアの出現年・時期とその関係

2011 年 4 月以降の、湖水中 2-MIB 濃度と MOPPL-シアノバクテリア密度は年、時期により大きく変動した (図 1-2)。いずれも 8 月～10 月頃から増殖し始め、11 月～12 月以降に減少し、6 月～7 月に最低値を示す傾向があった。8 月以降をみると、操業規制が行われな

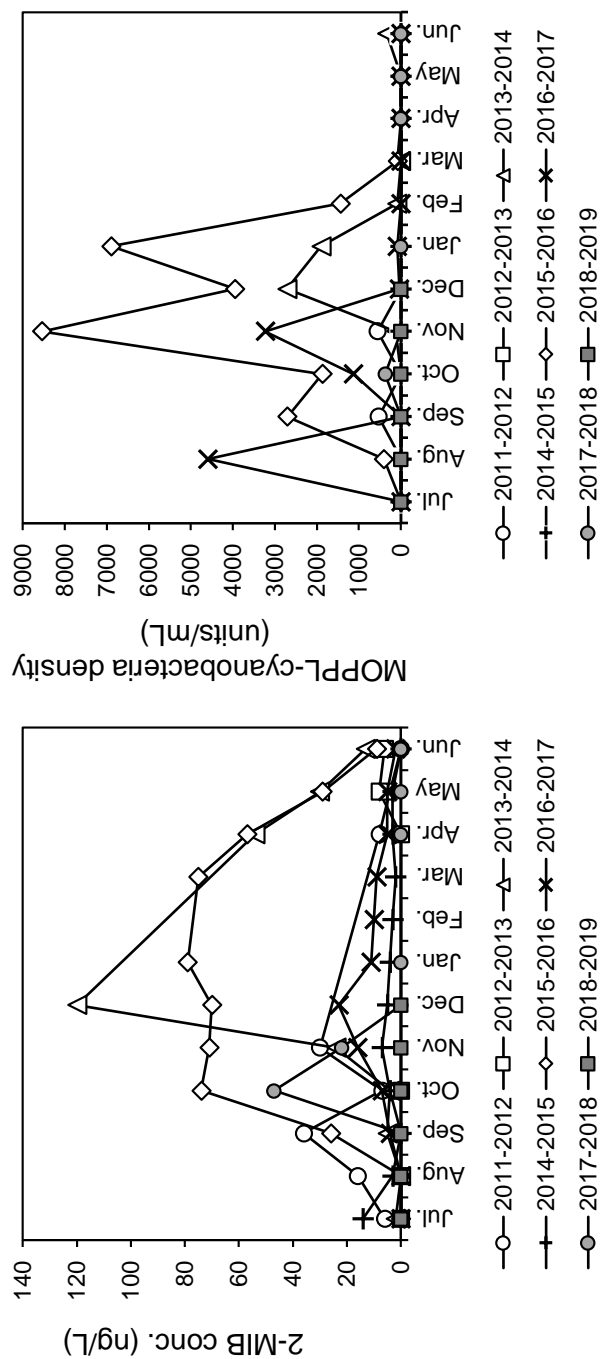


図1-2. 小川原湖中央における2-MIB濃度とMOPPL-シアノバクテリア密度の季節変動

かった 2012 年～2013 年，2014 年～2015 年，2018 年～2019 年は，湖水中 2-MIB 濃度は最大でも 2014 年 11 月の 7 ng/L，MOPPL-シアノバクテリアは検出限界以下（< 4 units/mL）であった。

### 3-2. 水質および日照の長期的変動と 2-MIB 発生との関係

月別の水質及び日照の経年変化を図 1-3～図 1-5 に示す。塩分，pH，透明度（Secchi depth），TN，TP，DIN，DIP，クロロフィル a 濃度，TN/TP，DIN/TP に大きな年次変動が確認された一方，水温，溶存酸素濃度，日照時間には明確な年次変動は確認されなかった。

各年の 8 月以降の 2-MIB 発生の有無について，2-MIB が発生するまでの 4 月～9 月までの水質，日照時間によるロジスティック回帰分析を行った結果，月により項目が異なるが，有意な関係が認められた（表 1-1，図 1-6）。TN，TP，クロロフィル a 濃度，pH，透明度については，一部の月および 4 月～9 月の平均値と，有意な関係が認められた。DIN，TN/TP，DIN/TP，塩分については，ほとんどの月および 4 月～9 月の平均値と，有意な関係が認められた。有意な関係が認められた項目の回帰係数の正負は，月によらず一定であった。回帰係数が正であり，値が高いほど 2-MIB 発生確率が高い項目は，TP，クロロフィル a 濃度，塩分，pH であった。回帰係数が負であり，値が小さいほど 2-MIB 発生確率が高い項目は，TN，DIN，TN/TP，DIN/TP，透明度であった。各項目の 4 月～9 月平均値を用いたロジスティック回帰分析による疑似決定係数は，塩分が最大の 0.845 であり，次いで DIN/TP が 0.813，DIN が 0.729，pH が 0.725，TN/TP が 0.717，TP が 0.644，TN が 0.601，透明度が 0.553，クロロフィル a 濃度が 0.500 であった。一方，DIP，水温，溶存酸素濃度，日照時間

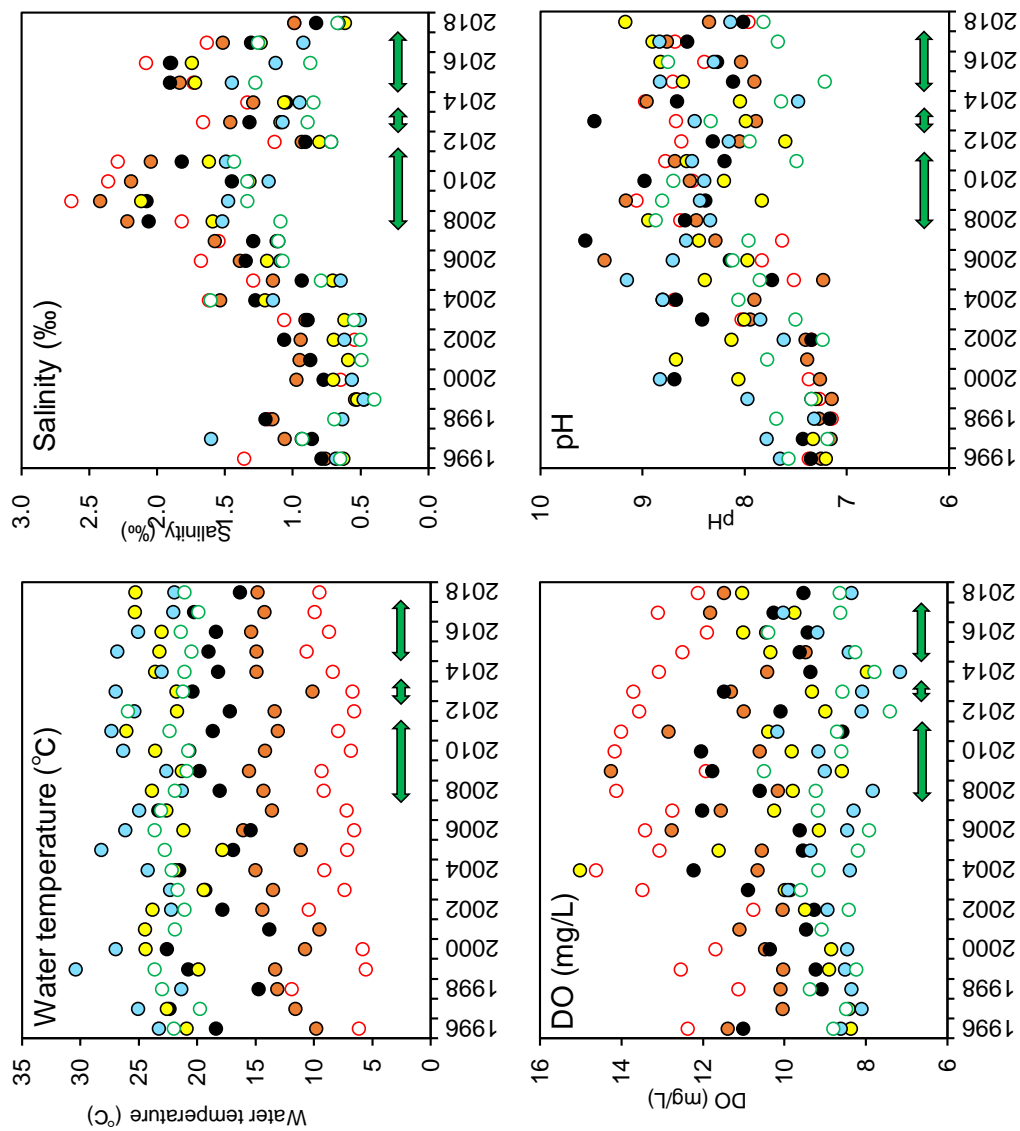


図1-3. 月別の水温，塩分，DO，pHの経年的推移  
 湖北，湖中央，湖南の平均値  
 ⇔は2-MIB発生年を示す

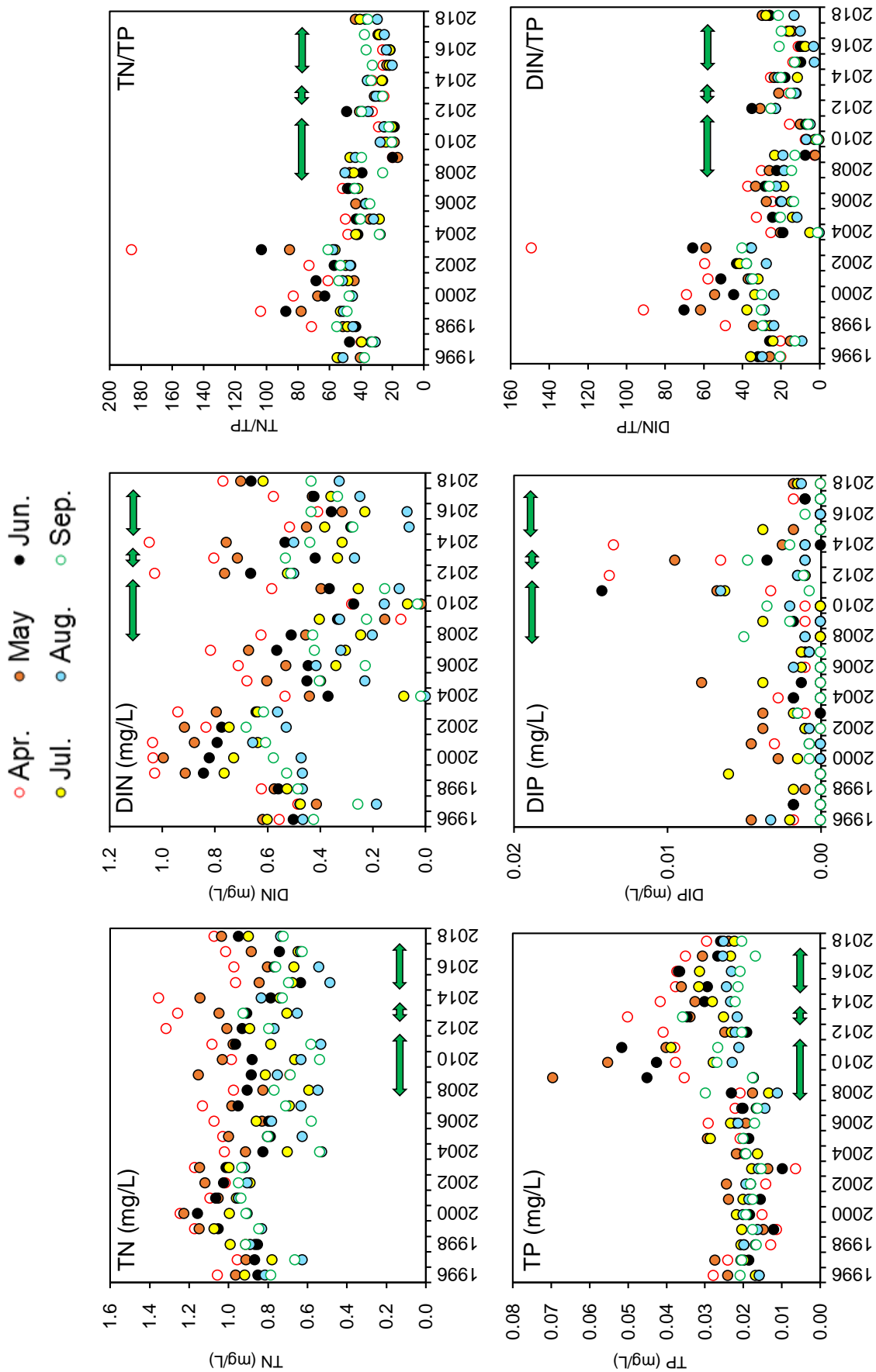


図1-4. 月別のTN, DIN, TP, DIP, TN/TP, DIN/TPの経年的推移  
 湖北, 湖中央, 湖南の平均値  
 ⇔は2-MIB発生年を示す

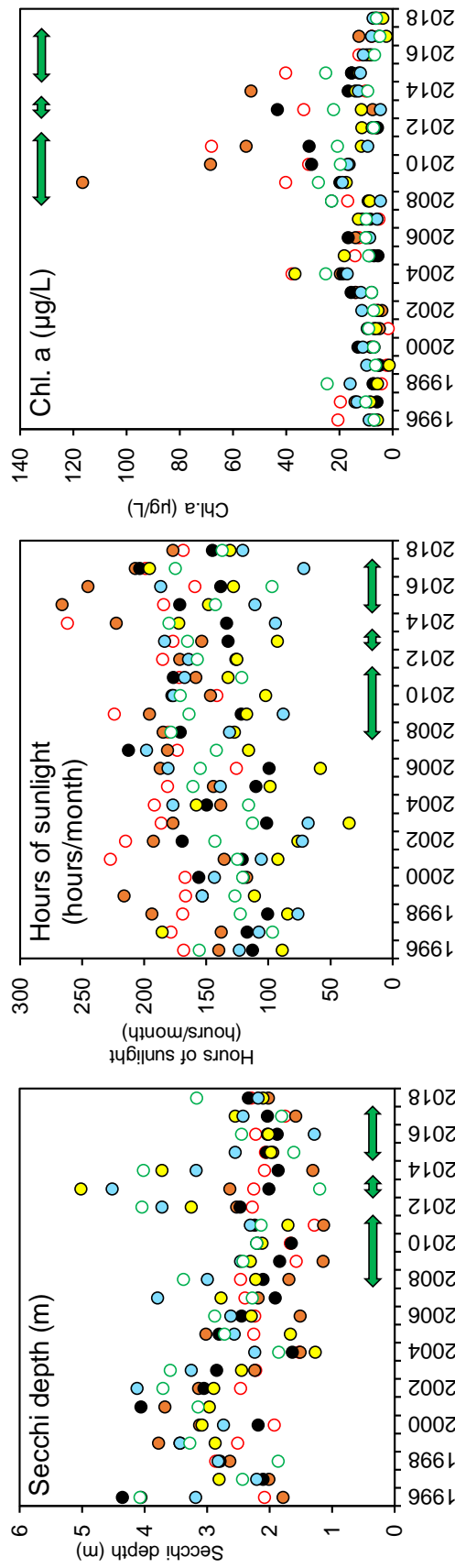


図1-5. 月別の透明度, 日照時間, クロロフィルa濃度の経年的推移

透明度, クロロフィルa濃度は湖北, 湖中央, 湖南の平均値, 日照時間は三沢, 六ヶ所の平均値  
 ⇔は2-MIB発生年を示す

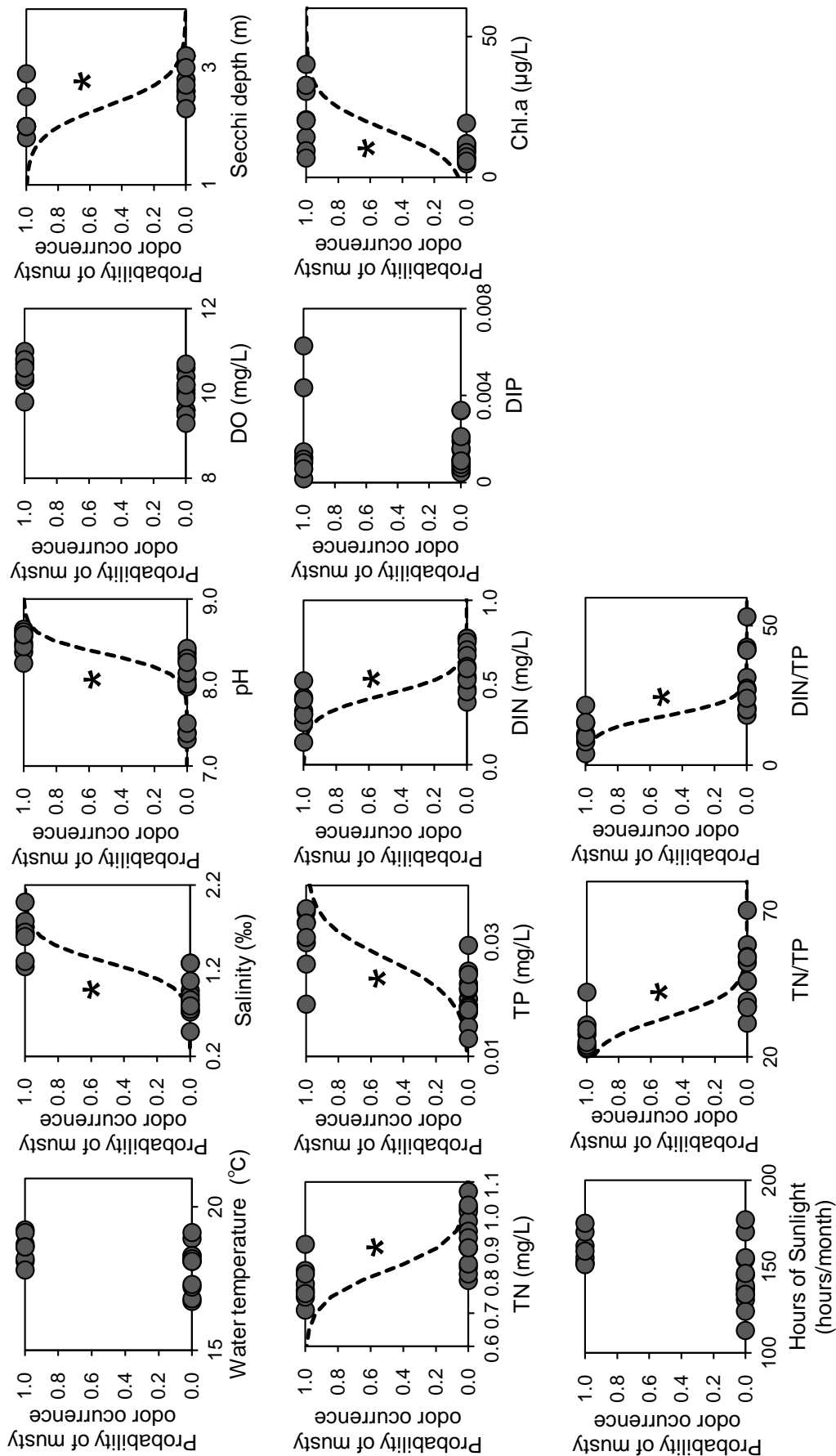


図1-6. 2-MIB発生に対する変数別のロジスティック回帰分析結果  
 各変数は4月～9月の平均値  
 \* :  $p < 0.05$

表1-1. 月別・変数別のロジスティック回帰分析結果

| Coefficients          |           | Apr.     | Nag. $R^2$ | May      | Nag. $R^2$ | Jun.     | Nag. $R^2$ | Jul.     | Nag. $R^2$ | Aug.     | Nag. $R^2$ | Sep.     | Nag. $R^2$ | Ave. Apr.-Sep. | Nag. $R^2$ |
|-----------------------|-----------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------------|------------|
| TN<br>(mg/L)          | Intercept |          |            |          |            |          |            | 12.8 *   | 0.668      | 9.72 *   | 0.636      |          |            | 17.7 *         | 0.601      |
|                       | slope     |          |            |          |            |          |            | -17.0 *  |            | -14.8 *  |            |          |            | -21.3 *        |            |
| DIN<br>(mg/L)         | Intercept | 4.06     | 0.536      | 4.60 *   | 0.640      | 9.66 *   | 0.767      | 4.24 *   | 0.615      | 3.49 *   | 0.678      |          |            | 6.74 *         | 0.729      |
|                       | slope     | -6.88 *  |            | -9.20 *  |            | -21.6 *  |            | -11.8 *  |            | -13.2 *  |            |          |            | -15.8 *        |            |
| TP<br>(mg/L)          | Intercept | -4.27 *  | 0.454      | -6.05 *  | 0.602      | -7.34 *  | 0.755      |          |            |          |            |          |            | -7.93 **       | 0.644      |
|                       | slope     | 127 *    |            | 194 *    |            | 269 *    |            |          |            |          |            |          |            | 294 *          |            |
| DIP<br>(mg/L)         |           |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |                |            |
| TN/TP                 | Intercept | 5.24     | 0.640      | 5.83 *   | 0.672      | 5.81 *   | 0.767      | 3.78 *   | 0.439      | 3.45     | 0.354      | 6.15 *   | 0.552      | 7.70 *         | 0.717      |
|                       | slope     | -0.156 * |            | -0.178 * |            | -0.179 * |            | -0.118 * |            | -0.109 * |            | -0.183 * |            | -0.230 *       |            |
| DIN/TP                | Intercept | 4.13     | 0.708      | 3.75 *   | 0.718      | 5.29 *   | 0.836      | 2.62     | 0.540      | 2.60 *   | 0.582      | 3.47     | 0.571      | 6.26 *         | 0.813      |
|                       | slope     | -0.203 * |            | -0.195 * |            | -0.287 * |            | -0.165 * |            | -0.193 * |            | -0.210 * |            | -0.352 *       |            |
| Chl.a<br>( $\mu$ g/L) | Intercept | -2.77 *  | 0.593      |          |            |          |            |          |            |          |            | -2.76 *  | 0.430      | -2.96 *        | 0.500      |
|                       | slope     | 0.133 *  |            |          |            |          |            |          |            |          |            | 0.167 *  |            | 0.175 *        |            |
| Temp.<br>(°C)         |           |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |                |            |
| Sal.<br>(‰)           | Intercept |          |            | -9.68 *  | 0.851      | -10.0 *  | 0.834      | -7.82 *  | 0.822      | -4.72 *  | 0.517      | -6.60 *  | 0.663      | -9.57 *        | 0.845      |
|                       | slope     |          |            | 6.39 *   |            | 7.51 *   |            | 6.69 *   |            | 4.19 *   |            | 6.64 *   |            | 7.39 *         |            |
| DO<br>(mg/L)          |           |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |                |            |
| pH                    | Intercept | -26.5 *  | 0.640      |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            | -76.8 *        | 0.725      |
|                       | slope     | 3.16 *   |            |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            | 9.22 *         |            |
| Secchi<br>(m)         | Intercept |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            | 4.34 *   | 0.489      | 9.19 *         | 0.553      |
|                       | slope     |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            | -1.72 *  |            | -3.93 *        |            |
| Sun<br>(h/month)      |           |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |                |            |
|                       | Intercept |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |                |            |
|                       | slope     |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |          |            |                |            |

有意な回帰係数のみ記載

\* :  $p < 0.05$

Nag.  $R^2$  : Nagelkerkeの疑似決定係数

には有意な関係は認められなかった。

### 3-3. 2-MIB 発生の変量ロジスティック回帰分析

各月の水質および日照の 13 項目を説明変数とし、2-MIB 発生の有無を応答変数としたロジスティック回帰モデルをフルモデルとし、各月ごとに説明変数の総組み合わせで AIC 最小モデル（ベストモデル）を探索した結果を表 1-2 に示す。

各月のベストモデルの説明変数は、塩分、透明度、DIP、TN/TP、DIN/TP、日照時間の内の 2 項目の組み合わせであった。月間で比較した結果、8 月が AIC 最小モデルで、次いで 4 月、5 月、6 月、9 月、7 月の順であった。Nagelkerke の疑似決定係数は 0.812～0.940 であり、観測データ変動の 81%～94%を説明した。

4 月～9 月の全モデルで AIC を比較した場合の、ベストモデルの AIC との差が 2 以下 ( $\Delta AIC=2.0$ ) のモデルを表 1-3 に示す。4 月、5 月のモデルが多く選出された。4 月としては、上述のモデルの他、pH（正の関係；以降、(+/-) で示す）、DIN（-）のモデル、pH（+）、DIP（-）のモデル、塩分（+）、pH（+）のモデル、塩分（+）のみのモデルがランクインした。5 月としては、上述のモデルの他、塩分（+）、DIN/TP（-）のモデル、塩分（+）、TP（+）のモデルがランクインした。これらの Nagelkerke の疑似決定係数は 0.857～0.940 であり、観測データ変動の 86%～94%を説明した。

### 3-4. 予測モデルとしての精度検証

5 分割交差検証により、AIC 基準でのベストモデルから  $\Delta AIC=2.0$  までのモデルの汎化性能評価を行った結果、Recall（検出率）が 0.809

表1-2. 各月の多変量ロジスティック回帰分析におけるベストモデル（AIC最小モデル）

| Month     | Intercept | Sal.<br>(‰) | Secchi depth<br>(m) | DIP<br>(mg/L) | TN/TP  | DIN/TP | Sunlight<br>(h/month) | AIC  | Nag.<br>$R^2$ |
|-----------|-----------|-------------|---------------------|---------------|--------|--------|-----------------------|------|---------------|
| April     | -34.1     | 16.6        |                     |               |        |        | 0.0424                | 9.2  | 0.940         |
| May       | -0.31     | 4.74        |                     |               | -0.191 |        |                       | 9.7  | 0.929         |
| June      | 0.11      | 3.02        |                     |               |        | -0.234 |                       | 10.5 | 0.911         |
| July      | -7.58     | 6.49        |                     |               |        |        |                       | 11.9 | 0.812         |
| August    | -1.49     | 7.04        |                     |               |        | -0.380 |                       | 9.1  | 0.940         |
| September | 8.17      |             | -3.60               | 1157          |        |        |                       | 10.8 | 0.897         |

値のある変数が各モデルに導入された変数，値は回帰係数

Nag.  $R^2$  : Nagelkerkeの疑似決定係数

表1-3. 全月を比較対象とした多変量ロジスティック回帰モデルの比較

| Month     | Intercept | Sal.<br>(‰) | pH   | Secchi<br>depth (m) | DIN<br>(mg/L) | TP<br>(mg/L) | DIP<br>(mg/L) | TN/TP  | DIN/TP | Sunlight<br>(h/month) | AIC  | Nag. $R^2$ | Recall | Precision | F-measure | Specificity | Accuracy |
|-----------|-----------|-------------|------|---------------------|---------------|--------------|---------------|--------|--------|-----------------------|------|------------|--------|-----------|-----------|-------------|----------|
| August    | -1.49     | 7.04        |      |                     |               |              |               |        | -0.380 |                       | 9.1  | 0.940      | 0.963  | 0.992     | 0.978     | 0.994       | 0.982    |
| April     | -34.1     | 16.6        |      |                     |               |              |               |        |        | 0.0424                | 9.2  | 0.940      | 0.955  | 0.800     | 0.871     | 0.838       | 0.885    |
| April     | -24.4     |             | 3.82 |                     | -10.3         |              |               |        |        |                       | 9.6  | 0.931      | 0.947  | 0.890     | 0.918     | 0.920       | 0.931    |
| May       | -0.308    | 4.74        |      |                     |               |              |               | -0.191 |        |                       | 9.7  | 0.929      | 0.907  | 0.955     | 0.930     | 0.969       | 0.944    |
| April     | -57.9     |             | 7.12 |                     |               |              | -498          |        |        |                       | 9.8  | 0.927      | 0.994  | 0.884     | 0.935     | 0.911       | 0.944    |
| August    | -2.48     | 11.2        |      |                     |               |              |               | -0.272 |        |                       | 10.1 | 0.920      | 0.836  | 0.899     | 0.866     | 0.936       | 0.896    |
| April     | -29.9     | 6.83        | 2.28 |                     |               |              |               |        |        |                       | 10.2 | 0.918      | 0.997  | 0.801     | 0.889     | 0.832       | 0.898    |
| June      | 0.108     | 3.02        |      |                     |               |              |               |        | -0.234 |                       | 10.5 | 0.911      | 0.809  | 0.938     | 0.869     | 0.960       | 0.900    |
| May       | -0.740    | 3.28        |      |                     |               |              |               |        | -0.195 |                       | 10.6 | 0.910      | 0.860  | 0.941     | 0.899     | 0.959       | 0.920    |
| May       | -13.5     | 5.08        |      |                     |               | 204          |               |        |        |                       | 10.6 | 0.908      | 0.883  | 0.886     | 0.885     | 0.922       | 0.906    |
| September | 8.17      |             |      | -3.60               |               |              | 1157          |        |        |                       | 10.8 | 0.897      | 0.895  | 0.857     | 0.876     | 0.891       | 0.892    |
| April     | -13.2     | 8.22        |      |                     |               |              |               |        |        |                       | 10.8 | 0.857      | 0.852  | 0.850     | 0.851     | 0.900       | 0.881    |
| June      | 0.00285   | 3.77        |      |                     |               |              |               | -0.160 |        |                       | 11.0 | 0.899      | 0.911  | 0.857     | 0.883     | 0.896       | 0.902    |

ベストモデルから $\Delta AIC \leq 2$ の2-MIB発生予測モデルを記載  
値のある変数が各モデルに導入された変数，値は回帰係数  
Nag.  $R^2$  : Nagelkerkeの疑似決定係数

～0.997, Precision (精度) が 0.800～0.992, F-measure (検出率と精度の総合的評価) が 0.851～0.978, Specificity (特異度) が 0.832～0.994, Accuracy (正解率) が 0.881～0.982 であり, 全体として汎化性能の高いモデルが得られた (表 1-3)。全モデルの中では, AIC が最小であった 8 月の塩分 (+), DIN/TP (-) モデルが Recall 以外の全ての項目が最も高く (全指標値: 0.963～0.994), 汎化性能が最も高いと判断された。一方, AIC では 2 番目に小さかった 4 月の塩分 (+), 日照時間 (+) モデルは, Recall 以外の項目が低く (Recall 以外: 0.800～0.885), 発生年の検出率の高いものの, その汎化性能は悪いと判断された。複数の汎化性能指標を考慮すると, 各指標のバランスが良く, 次に汎化性能が高いと考えられるのは, AIC では 4 番目に小さい 5 月の塩分 (+), TN/TP (-) モデルであった (全指標値: 0.907～0.969)。また, 発生年の検出率 (Recall), 発生年の判定精度 (Precision) の総合指標である F-measure からは, AIC では 5 番目である 4 月の pH (+), DIP (-) モデルが 0.935 と, 上記の 8 月モデルに次いで高かった。

#### 4. 考察

##### 4-1. 2-MIB および MOPPL-シアノバクテリアの出現年, 出現時期

小川原湖では 2008 年から 2-MIB によるカビ臭漁業被害が発生した (酒井, 大嶋 2010)。内水面研究所で MOPPL-シアノバクテリアのモニタリングを開始した 2011 年以降の経年的な発生状況では, 特に 2013 年, 2016 年に高頻度の 2-MIB の発生が確認されており, 現在も 2-MIB の発生は終息していない状況にある。また, 2-MIB 濃度および 2-MIB 産生シアノバクテリアの季節的な変動について, ダ

ム湖でのカビ臭產生シアノバクテリアは、15℃以上で増殖することが報告されているが（工藤ら 2004，高橋 2016），小川原湖では，秋口の 8 月～10 月から増加し始め，翌春に向けて減少するというように，春から夏は少なく，秋から冬に多い季節変動を示した。これは小川原湖における 2-MIB 產生シアノバクテリアの特徴と考えられた。

#### 4-2. 2-MIB の発生と関係する水質

本章では，各年の 8 月以降の 2-MIB 発生の有無を目的（目的変数）とし，多変量ロジスティック回帰分析により，水質，日照時間の 13 項目からの発生要因の推定や，発生予測モデルの開発を試みた。説明変数として用いた水質や日照時間には 4 月～9 月の値を用いたが，その理由としては，発生の有無に影響するのは発生初期や，それ以前の水質であること，また事前の発生予測としては，出来る限り前の時点で発生の予測ができることがより望ましいと考えたためである。小川原湖における 2-MIB および 2-MIB 產生シアノバクテリアの出現は，主に 8 月～10 月に増加を開始し，翌春に向けて減少するサイクルである。そのため，小川原湖の 2-MIB 產生シアノバクテリアにとって前年からの状況が変化すると推察される春（4 月）以降の水質および日照時間を用いた。

解析の結果，小川原湖では TN，DIN，TN/TP，DIN/TP，透明度が低く，TP，クロロフィル a，塩分，pH が高い時に，高い確率で 2-MIB が発生していることが明らかとなった（表 1-1）。特に DIN，TN/TP，DIN/TP，塩分は 4 月～9 月の多くの月で有意な関係が検出された。2-MIB 產生 *Pseudanabaena* は，日本ではしばしば *Phormidium* と呼ばれてきた（Izaguirre et al. 1999；Izaguirre and Taylor 2004；Niiyama

et al. 2016 ; Tuji and Niiyama 2018)。DIN については，低 DIN 時に *Phormidium tenue* が優占する傾向にあること（吉田ら 1996），*Pseudanabaena* sp.密度と DIN に負の相関（Huang et al. 2018）がみられたことが報告されている。また Smith (1983) は，世界各地の 17 の湖沼を対象とした研究により，TN/TP（重量比）が 29 以下でシアノバクテリアの割合が高まることを報告している。本研究でも，2-MIB 非発生年の TN/TP（重量比）の最低値は 31.5 であり，それ未満では発生年となっているため，Smith (1983) の報告によるシアノバクテリアの割合が高まる閾値と概ね一致した。

小川原湖の一次生産においてはリン制限にある（西田ら 2006）。本研究でも TP と 2-MIB の発生に関係がみられたものの，DIN や TN/TP，DIN/TP の方が，より多くの月で有意となった。これらは疑似決定係数も TP より高く，特に DIN や DIN/TP が高い値を示したことから，TP よりも DIN が 2-MIB の発生に強く関与していることが示唆された。また，小川原湖では，通常は無機態窒素の割合が高い傾向にあるが，2-MIB 発生年はその割合が低く，2010 年などのように，DIN がほぼ枯渇状態の場合も確認される（図 1-4）。一方，無機態窒素が利用される条件としては，リン制限が解除される必要がある。よって，小川原湖では 2-MIB 産生シアノバクテリアの増殖に，高リン濃度下での無機態窒素の低濃度化，すなわち「リン制限緩和下における無機態窒素の低濃度化」が 1 要因として関与している可能性が推察される。

*P. tenue* は多糖類の粘質鞘を形成し，低栄養条件下では，この粘質鞘に存在する細菌による有機物の無機化により，生理・生態的に有利になる可能性が指摘されている（吉田ら 1996）。また，シアノバ

クテリアの一部には、窒素固定能を持つ種が存在する。小川原湖での 2-MIB 産生種である *Pseudanabaena* は、窒素固定に有益な異質細胞を有していないものの、種によってニトロゲナーゼ構造遺伝子の一つである *nifH* 遺伝子を保有していることや (Acinas et al. 2009), 窒素固定能があることも実験的に確認されている (Eigemann et al. 2019)。よって、高リン濃度条件で生産性が上昇し、リンと窒素による共制限が進行した場合に、2-MIB 産生 *Pseudanabaena* が生理・生態的に有利になる可能性が考えられる。今後、低栄養条件における、リン制限緩和下における無機態窒素の低濃度化が 2-MIB 産生シアノバクテリアの増殖に影響している可能性について、この観点での培養試験等による検証が必要である。

各月の 13 項目を対象としたベストモデル探索の結果、最も AIC が低くなるのは 8 月のモデルであった。小川原湖において 2-MIB 産生シアノバクテリア、及び 2-MIB が発生を開始するのは主に 8 月～10 月であったことから、発生開始時期である 8 月の水質条件が 2-MIB 産生シアノバクテリアの出現の有無に最も強く影響していることは、妥当な解析結果と考えられる。また 8 月のモデルでは DIN/TP が予測因子として選択されていることは、前述した、2-MIB 産生シアノバクテリアの増殖に「リン制限緩和下における無機態窒素の低濃度化」が影響しているという仮説を支持する。

ところで、8 月のベストモデルは AIC が 9.1 なのに対し、4 月、5 月のベストモデルもそれぞれ 9.2, 9.7 であり、8 月と差が小さく、疑似決定係数も 0.940, 0.929 と非常に高かった (表 1-2)。この理由として、(1) 春の水質が 2-MIB 産生シアノバクテリアの増殖に影響しているか、(2) 春の水質が秋以降の水質に影響し、秋以降の水質

が 2-MIB 産生シアノバクテリアの増殖に影響していることの 2 つが考えられるが、春の水質が、秋以降の 2-MIB 産生シアノバクテリアの出現に影響することを支持する知見やデータは現時点では存在しないため、それよりも春の水質が秋以降の水質に影響し、2-MIB 産生シアノバクテリアの発生につながっている可能性が高いと考えられる。4 月のベストモデルの変数として、塩分その他、日照時間が選択された。上記の文脈に基づき、この理由を考察すると、春の日照時間の増加が、春季ブルーム期の藻類の一次生産を増大させ、DIN の消費を促進する可能性が考えられる。また、5 月、6 月のベストモデルで DIN/TP, TN/TP が入っていることや、ベストモデルと AIC の差が小さかった 4 月、5 月の他のモデルでは、pH, TP が正、DIN, DIP が負の影響として入っていることも、これまでの仮説を支持する。すなわちリン濃度が高く、日照時間が長いと、より一次生産が活性化し (pH もそれに伴い上昇し)、春期に DIN が消費され、発生初期に当たる 8 月の DIN/TP の低下に繋がっている可能性がある。

また、4 月～8 月のベストモデル全てに塩分が入っていることは注目に値する。特に、出現に直接的な影響があると考えられる 8 月のベストモデルにも、これまで述べてきた DIN/TP に加えて塩分も選択されている。この理由として、小川原湖では、上記で仮説を立てた「リン制限緩和下における無機態窒素の低濃度化」以外にも、2-MIB 産生シアノバクテリアの発生に影響している因子が存在する可能性を示唆する。2 章、3 章でも述べるように、小川原湖の塩分、リン、窒素濃度には、塩分躍層水深が大きく影響する。高塩分、高リン濃度となりやすいのは塩分躍層水深が浅い年であるが(第 2 章)、このような年には、窒素、リン以外にも、高塩分層に多く貯留され

た微量金属等が高塩分層から供給され、小川原湖の 2-MIB 産生シアノバクテリアの増殖に関与している可能性が考えられる。そのため、高塩分層からの表層への様々な物質の移流拡散の指標として、生物的過程をほとんど受けない塩分は、それらの動態を包括する良い指標因子になっている可能性が推察される。また、別の可能性として、小川原湖では表層塩分は 1.0%~2.5%と変動幅は小さいものの、塩分による直接的な植物プランクトン群集組成への影響も考えられる。塩分は、一般にシアノバクテリアの増殖を阻害することが確認されており (Moisander et al. 2002), もし小川原湖の 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* の出現に塩分が作用しているとすれば、高塩分化に伴い、シアノバクテリア内の競合が緩和される可能性がある。富栄養条件化における窒素、リンの共制限化や、微量金属や塩分が 2-MIB 産生シアノバクテリアの増殖に及ぼす影響について、今後実験的な検証が必要である。

#### 4-3. 予測モデル

4 月~9 月の全モデルの内、ベストモデルから  $\Delta AIC=2.0$  までのモデル (13 モデル) を対象に、5 分割交差検証によりモデルの汎化性能評価を行った結果、これらは 2-MIB の発生に対して高い汎化性能を有した (表 1-3)。最も汎化性能が高いと評価された 8 月のベストモデルはいずれの汎化性能指標値も 95%以上の値を示し、8 月の塩分、DIN/TP を調べることで、高い確率で予測が可能であることを示唆している。さらに、4 月~5 月のモデルも 1 項目 (4 月の Precision) を除いて 90%以上の汎化性能指標値を示し、春の時点で、秋以降の操業規制レベルの 2-MIB の発生について、実用的なレベルで予測が

可能と推察された。これらの予測モデルに使われるデータは最大でも 2 項目と少なく，また低費用で迅速に観測が可能なものであることから，費用対効果が高く，また発生初期の 8 月から比較すると，対策の準備期間としても 3 ヶ月～4 ヶ月を掛けることができる。4 月あるいは 5 月の 2 項目の水質のみを用いた 2-MIB 発生の予測手法は，継続なモニタリングや十分な対策期間を必要とする 2-MIB 対策には非常に有益な手法と考えられる。

上記で得られた 2-MIB 産生シアノバクテリアの出現要因に関する仮説の検証には，2-MIB 産生シアノバクテリア密度の精度の高い定量を実現する必要がある。また，本章で得られた 2-MIB 発生の有無に加え，今後，その規模（2-MIB 産生シアノバクテリア密度）の予測が行えれば，その発生規模に応じて，より効果的な対策を講じることができる。そこで，2-MIB 産生シアノバクテリアの定量手法について第 3 章で検討した。

## 5. 結論

本章では，小川原湖における 2-MIB の発生に関わる水質及び気象条件を，長期モニタリングデータの統計的解析より明らかにするとともに，実用的な予測モデルを構築した。具体的には，2-MIB の発生には，リン制限緩和下における無機態窒素の低濃度化が関与している可能性を示すとともに，8 月以降の 2-MIB および 2-MIB 産生シアノバクテリアの発生の有無を，4 月や 5 月の水質 2 項目（pH と DIP，塩分と TN/TP）から高い確率で予測することが可能であることを示した。本研究で確立したモデルは，秋以降の 2-MIB 発生を，春の時点で予測するという点において実用性が高い。本章の成果は，

2-MIB 発生要因の解明，そして，小川原湖の漁業被害の軽減に大きく貢献するものである。

## 第 2 章

### 2-MIB 発生に関係する水質の変動要因

#### 1. 序言

第 1 章において、小川原湖における 2-MIB 発生に、TN, DIN, TP, 塩分が関連していることを見出した。本章では、これらの水質に及ぼす内的小よび外的要因を明らかにすることにより、これらの要因が、水質変動を介して 2-MIB 発生に至るまでのプロセスをつなぐことを目的とする。

小川原湖の水質に最も影響すると考えられる要因の一つとして塩分躍層水深（塩淡界面水深）が挙げられる。塩分躍層水深は、湖内への海水の遡上侵入により上昇し、風や流れによる躍層付近の乱流により、塩水が表層に連行されることで下降する（木下ら 2014）。近年、海水の侵入イベントの増加により塩分躍層が上昇しているが、それに伴い、水質の急激な富栄養化が確認されている（木下ら 2014; 小泉ら 2014）。塩分躍層以深の高塩分層（9.5‰～15.9‰）は、混合層との密度差により混合が妨げられているために、高濃度の栄養塩が蓄積している。塩分躍層の上昇に伴い、界面面積が拡大し、高塩分層中の栄養塩類が混合層へ供給されやすくなることで、湖水全体の水質の悪化をもたらすと考えられている。したがって、2-MIB の発生に及ぼす因子解明には、塩分躍層水深と表層水質との関係を見出すことが第一に重要であると考ええる。しかし、小川原湖において、塩分躍層水深と表層水質との経年的な変化の関係については未だ明らかになっていない。そこで、本章では 2-MIB の発生に関連する水質（TN, DIN, TP, 塩分）と塩分躍層水深との関係を明らかにする

ことを第一の目的とした。

湖の水質に影響を及ぼすもう一つの大きな要因としては、流域からの流入負荷が挙げられる。窒素やリン等の栄養塩類は、流域から湖へ流入河川水を通じて供給される。また、淡水の流入は湖水の塩分を希釈する。河川からの栄養塩類負荷量は、出水時に大きくなることが知られているが（田淵・高村 1985）、小川原湖の流入河川の出水は主に融雪時期と台風時期に生じる（湖沼技術研究会 2007）。小川原湖は積雪地帯に位置するため、融雪時期は、冬期の積雪が融雪水となって河川水と合流し、大きな流量となる。融雪時期の水量は、冬期の気温、降水量を反映する積雪量の変動により、大きな年変動を示す。また、台風や温帯低気圧による降水も河川流量を増加させる。これらは年により接近、上陸数が変動するため、この時期（8月～10月）の河川流量も大きな年変動を示す（気象庁 <https://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/tohoku.html>）。このように、流入河川の出水時期は、融雪時期と台風時期の2つある。第1章では4月～9月の水質に着目して検討し、2-MIBの発生と明瞭な関係を見出した。この期間の水質には、期間の始めに該当する4月に生じる融雪水の影響が大きいと考えられる。そこで本章では、2-MIBの発生に関連する水質の外的変動要因として、融雪水量の寄与を明らかにすることを第二の目的とした。

また、2-MIB発生に関連する水質に与える内的小および外的変動要因の関係を正しく評価するためには、関係の因果性について評価する必要がある。まず塩分躍層水深は、大潮時に偶然、低気圧や前線の通過などが重なるなどにより、海面水位が湖水位を長時間超えた場合の、偶発的な海水侵入で上昇する（長尾ら 1996；鶴田ら 2001）

ため、塩分躍層水深に作用する他の要因が、水質とのみかけ上の関係（交絡）を生じさせるとは考えにくい。したがって、有意な関係が検出された場合には、塩分躍層水深の影響とみて問題ないと考えられる。一方で、先述したように、融雪水量は冬期の気温、降水量の影響を受ける。これらのうち、特に気温は、以下に述べるように、融雪水量とは別のプロセスでも、冬期の湖の栄養塩類、および、塩分循環に影響すると考えられる。すなわち、冬期の小川原湖面に強風が吹くと、湖水の流動を通じて塩分躍層付近に乱れが生じ、その結果、高塩分層から高濃度の栄養塩や、塩分が混合層に供給される（西田ら 2006）。一方、高塩分層は貧酸素または無酸素であるため、高塩分層との混合は、混合層の硝酸態窒素の脱窒を引き起こし（Brettar and Rheinheimer 1991）、混合層の TN（以下、 $[TN_{mix}]$ ）が減少する可能性がある。しかるに、冬期の気温が低いために湖面が結氷すると、このような強風による作用が妨げられ、高塩分層からの栄養塩類や塩分の供給が減少する一方で、脱窒量も減少する可能性がある。小川原湖の湖面の結氷には、気温が強く影響するため（宮ら 1993）、上記したプロセスにより、冬期の気温は、融雪水量とは別のプロセスでも、冬期の湖の栄養塩類、塩分循環に影響する可能性がある。

よって、融雪水量と水質に相関がみられた場合にも、それを融雪水の影響として考えるには慎重な検討が必要である。すなわち、実際には、冬期の気象が、結氷等を通じて湖の水質へ影響する（杉原・平井 2016）ことで、融雪水量と水質との間に“見かけ上の関係”，すなわち交絡が生じる可能性がある。よって外的要因の影響を正しく評価するためには、両者の関係の因果性について検討する必要がある。

る。そこで、2-MIB の発生に関連する水質項目の外的変動要因として、融雪水量を評価するに当たっては、その因果性について、統計的因果推論による検討を行った。

## 2. 試料および方法

### 2-1. 解析に用いたデータセット

塩分は、第 1 章と同様に、青森県産業技術センター内水面研究所による 1996 年～2018 年の St.1（湖南）、St.中央（湖中央）、St.5（湖北）の平均値を用いた（図 2-1）。塩分躍層水深は酒井・大寫（2010）を参考に、塩分 5‰ の水深とした。1996 年～2005 年は、国土交通省の水文水質データベース（<http://www1.river.go.jp/>）の、小川原湖 No. G, No. C における塩化物イオンの鉛直観測データから算出した。また、2006 年～2018 年は、内水面研究所の湖中央における塩分の鉛直観測データから算出した。

小川原湖への河川流入量（Discharge, 以降 D/C）として、小川原湖の主要流入河川 6 河川（土場川，七戸川，砂土路川，姉沼川，赤川，中津川）の 1989 年～2018 年における日別流量（ $\text{m}^3/\text{s}$ ）を合計し、その月平均値を D/C（ $\text{m}^3/\text{s}$ ）として算出した。この 6 河川で小川原湖の全流域の 81%を占めている。また、日別流量には全データのうち 0.5%未満の欠測値が含まれていたため、それらは、欠測期間の前後 30 日間の流量の相関が最も高い他の河川流量との回帰式から補完した（ $r^2 > 0.67$ ）。

湖中央に位置する No.G の表層における、1989 年～2018 年の月別全窒素濃度（ $[\text{TN}_{\text{mix}}]$ ），全リン濃度（ $[\text{TP}_{\text{mix}}]$ ），塩素濃度（ $[\text{Cl}_{\text{mix}}]$ ）のデータは、国土交通省の水文水質データベース

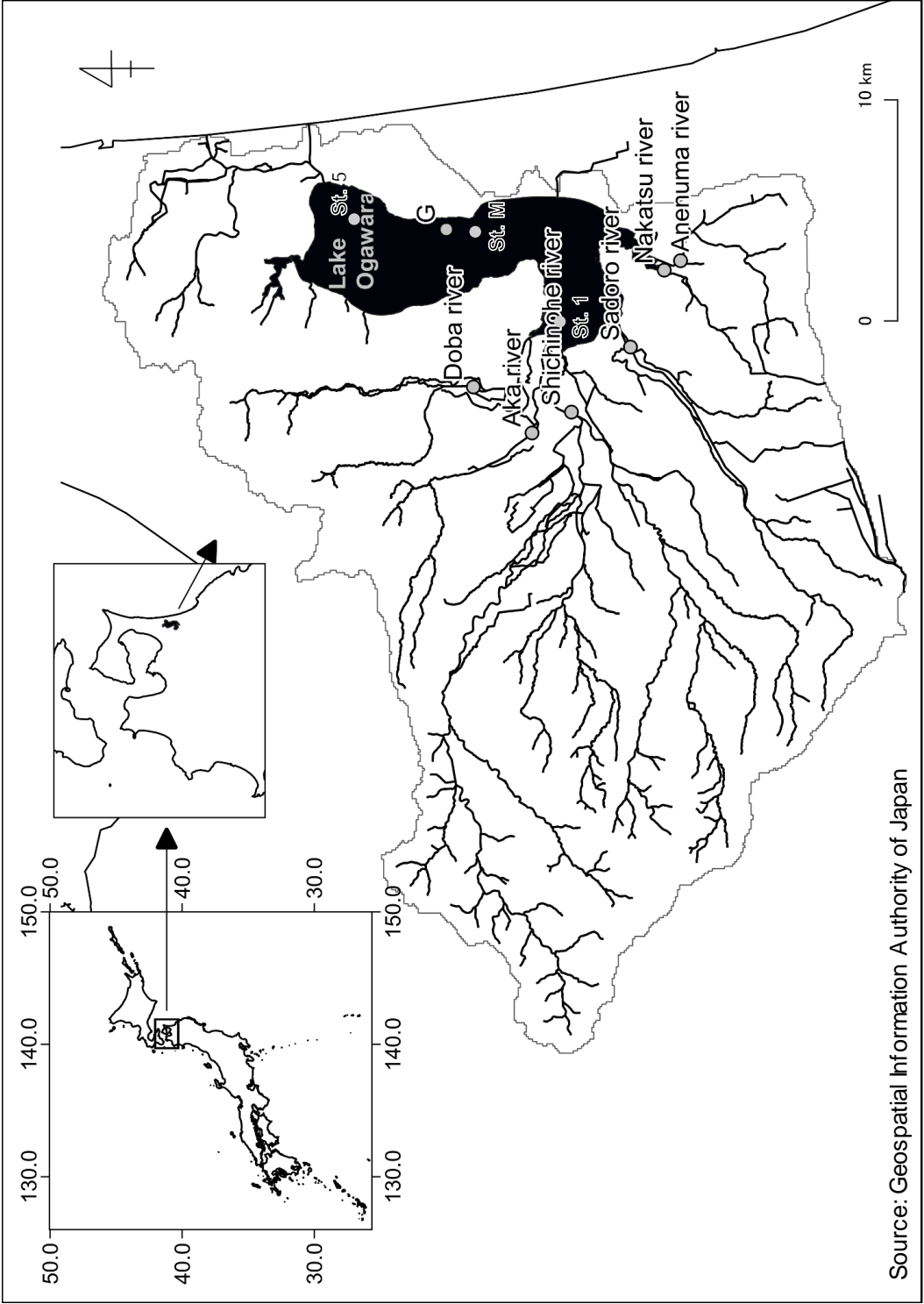


图2-1. 定点图

(<http://www1.river.go.jp/>) から引用した。また，同データベースから硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3\text{-N}$ )，亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2\text{-N}$ )，アンモニウム態窒素 ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) を引用し，合計値を無機態窒素濃度 ( $[\text{DIN}_{\text{mix}}]$ ) とした。 $[\text{TN}_{\text{mix}}]$  はアルカリ性ペルオキシ二硫酸カリウム分解・紫外吸光度測定法により定量された (JIS K0102 2016，定量範囲 = 0.05~2.0 mg/L， $\text{CV} < 10\%$ )。 $[\text{TP}_{\text{mix}}]$  はペルオキシ二硫酸カリウム分解-モリブデン青吸光度法により定量された (JIS K0102 2016，定量範囲 = 0.003~0.5 mg/L， $\text{CV} < 10\%$ )。 $[\text{Cl}_{\text{mix}}]$  は硝酸銀滴定法により定量された (上水試験方法 2011，定量範囲 = 2~170 mg/L， $\text{CV} < 10\%$ )。

十和田における日別最深積雪深度を，気象庁 HP の過去の気象データ・ダウンロード (<https://www.data.jma.go.jp/gmd/risk/obsdl/index.php>) から引用した。

## 2-2. 統計解析

ピアソンの積率相関係数は統計ソフト R (ver. 3.4.1 ; R Core Team, 2017，以降 R) の `cor.test` 関数より算出した。時系列の単位根の有無については，R の `forecast` パッケージ (Hyndman et al. 2019) の `ndiffs` 関数を用い，時系列の単位根の有無について，拡張ディッキー-フルー検定 (ADF 検定) を実施した。単位根が存在した場合には，差分をとることで定常化した後，相関分析および回帰分析を実施した。河川流量および塩分躍層水深と各因子の関係は，非線形の可能性があったため，一般化加法モデル (GAM) による解析を実施し，各因子に対する河川流量および塩分躍層水深の有意性を検証した。

## 2-3. 一般化加法モデル (GAM) について

一般化加法モデル（generalized additive model : GAM）は，説明変数の滑らかな関数の和としての線形予測子を持つ一般化線形モデルであり（Wood 2017），説明変数の非線形関係を検出する（Hastie and Tibshirani 1986）。GAM は各説明変数による線形回帰の代わりに，平滑化スプラインによる非線形関数を使用する（式 1）

$$y = \alpha + f_1(x_1) + f_2(x_2) + \cdots + f_n(x_n) + \varepsilon \quad (\text{式 1})$$

ただし， $f_n(x_n)$ は平滑化スプラインによって決定される関数であり， $\alpha$ と $\varepsilon$ はそれぞれ切片と残差である。モデルの形式は有効自由度（effective degrees of freedom : EDF）で表され，EDF が大きいほど，より複雑な非線形関係を示す（Hu et al. 2016）。EDF が 1 の場合は線形回帰を表すため（Hunsicker 2016），GAM は線形回帰を内包し，もし最適なモデルが線形関係であった場合には線形関係を出力する。本研究の GAM 解析は，R の mgcv パッケージ（Wood 2017）を用いて実施し，全ての説明変数に平滑化スプラインを適用した。目的変数の分布には正規分布，リンク関数は恒等リンク関数を指定した。平滑化スプラインの種類には，薄板平滑化スプラインを指定した。

以下の GAM をフィッティングし， $[TN_{\text{mix}}]$ ， $[DIN_{\text{mix}}]$ ， $[TP_{\text{mix}}]$ ， $[Sal_{\text{mix}}]$ に対する河川流量および塩分躍層水深の有意性を検証した：

$$[X_{\text{mix}}]_i = \alpha_i + f(D/C_{\text{Apr}}) + f(D_{55}) + \varepsilon_i \quad (\text{式 2})$$

ここで $[X_{\text{mix}}]_i$ は i 月（4 月～9 月）における $[TN_{\text{mix}}]$ ， $[DIN_{\text{mix}}]$ ， $[TP_{\text{mix}}]$ ， $[Sal_{\text{mix}}]$ ，また， $f(D/C_{\text{Apr}})$ は（以下，月や期間を D/C の右側に下付き文字で付記する；例えば  $D/C_{\text{Apr}}$ ）4 月の河川流入水量のスプライン関

数,  $f(D_{5s})$ は 4 月～9 月における 5‰塩分水深（塩分躍層水深）のスプライン関数, そして  $\alpha_i$ ,  $\varepsilon_i$ は, それぞれ切片と残差である。

#### 2-4. 因果推論と交絡調整

序論で述べたように, 融雪水が湖の栄養塩濃度および塩分へ及ぼす影響を評価するには, 可能性のある交絡の影響を取り除く必要がある。そこで, まず既往の研究を参考に, 有向非巡回グラフ (DAG) を作成した (Shu et al. 2013)。DAG とは次のように定義される。

(i) 因子は因果関係の方向性を表す矢印で結ばれる

(ii) 閉回路を形成する有向道が存在しない。

さらに詳しい DAG の詳細説明は他の文献を参照されたい (Suttorp et al., 2014)。作成した DAG はバックドア基準に基づく交絡因子の同定のために使用した。同定された交絡因子による交絡調整を, GAM による多変量回帰モデルで実施した。GAM を用いた理由は, 先述したように, 融雪水と説明変数の間の関係が非線形である可能性があったためである。GAM は目的変数と説明変数の関係が非線形関係であった場合, 残差交絡を減少させるうえで線形回帰モデルよりも良い選択であることが報告されている (Benedetti and Abrahamowicz 2004)。GAM は R の `mgcv` パッケージにて, 全ての説明変数に平滑化スプラインを割り当てることで実施した。

#### 2-5. バックドア基準について

もし変数  $X$  と  $Y$  の双方に影響する共通の変数  $Z$  が存在した場合,  $Z$  は  $X$  と  $Y$  に偽の相関を作り出す可能性がある。そのような場合, DAG において,  $X$  から  $Y$  への因果の方向とは逆に,  $X$  の上流の  $Z$  を

辿り Y と連絡している形，つまり X から Y へ，裏口（バックドア）を通じた関係が形成されており，このような経路を“バックドアパス”と呼ぶ（Pearl 1995）。バックドア基準は次のように定義される：DAG において X は Y へ有向道があるとする。このとき，次の条件を満たす頂点集合 S は (X, Y) についてバックドア基準を満たす（図 2-2，図 2-3）

- (i) X から S の任意の要素へ有向道がない。
- (ii) DAG より X から出る矢線を除いたグラフにおいて，S が X と Y を有向分離する。

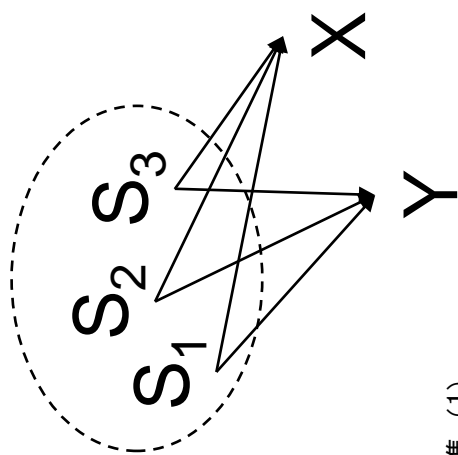
交絡の影響は，バックドア基準を満たす全ての因子を回帰モデルの説明変数に導入することで取り除くことが可能であり，これは交絡調整と呼ばれる。

## 2-6. DAG の作成とバックドア基準を満たす交絡因子の選択

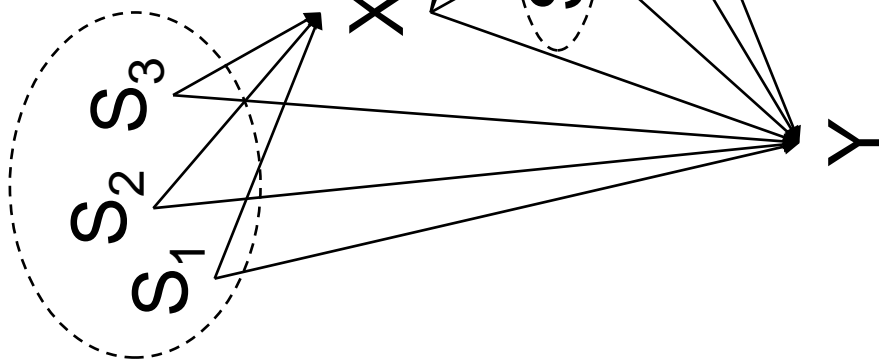
図 2-4 は  $D/C_{\text{SpG}}$  と春から夏の  $[TN_{\text{mix}}]$ ,  $[DIN_{\text{mix}}]$ ,  $[Cl_{\text{mix}}]$  との因果関係について，既往の報告や因子間の相関関係を基に提案した DAG である。 $[TN_{\text{mix}}]$ ,  $[DIN_{\text{mix}}]$  については，DAG に基づくと，バックドア基準を満たす 3 因子 ( $[TN_{\text{mix}}]_{\text{Mar}}$ ,  $[Cl_{\text{mix}}]_{\text{Mar}}$ ,  $[TP_{\text{mix}}]_{\text{Mar}}$ ) を説明変数として選択することにより，GAM による交絡調整を行うことが出来る（以下，月を  $[TN_{\text{mix}}]$ ,  $[DIN_{\text{mix}}]$ ,  $[Cl_{\text{mix}}]$ ,  $[TP_{\text{mix}}]$  の右側に下付き文字で付記する；例えば  $[TN_{\text{mix}}]_{\text{Mar}}$ ）。主な 3 つのバックドアパスは次の通りである。

- (i) 河川から冬期に負荷される TN が 3 月の  $[TN_{\text{mix}}]$ ,  $[DIN_{\text{mix}}]$  に影響し，続く春から夏にも影響する
- (ii) 冬期の D/C は混合層の塩分，ひいては混合層と高塩分層の塩

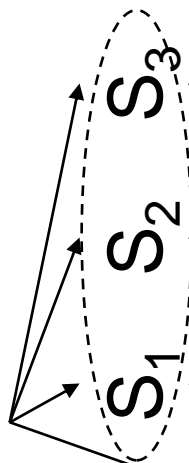
バックドア基準 (2) を満たす変数集合  $S$   
 $\sim S$  により  $X$  から  $Y$  への全てのバックドアパスが閉鎖されている



バックドア基準 (1)  
 を満たす変数集合  $S$   
 $\sim S$  は  $X$  の下流にない



バックドア基準 (1)  
 を満たさない変数集合  $S$   
 $\sim S$  は  $X$  の下流にある



バックドア基準 (2) を満たさない  
 変数集合  $S$   
 $\sim S$  では  $X$  から  $Y$  へのバックドアパス  
 を全ては閉鎖できない

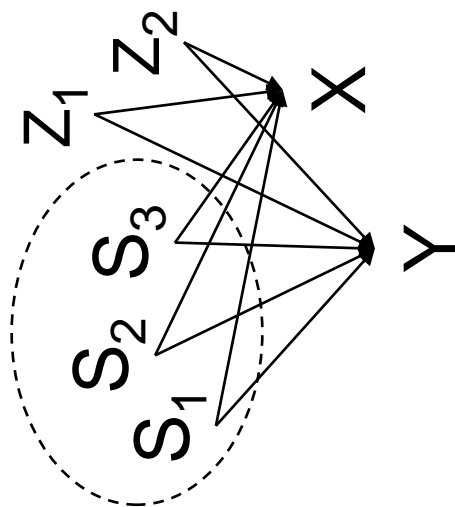


図2-2.  $X$  から  $Y$  への因果効果推定におけるバックドア基準

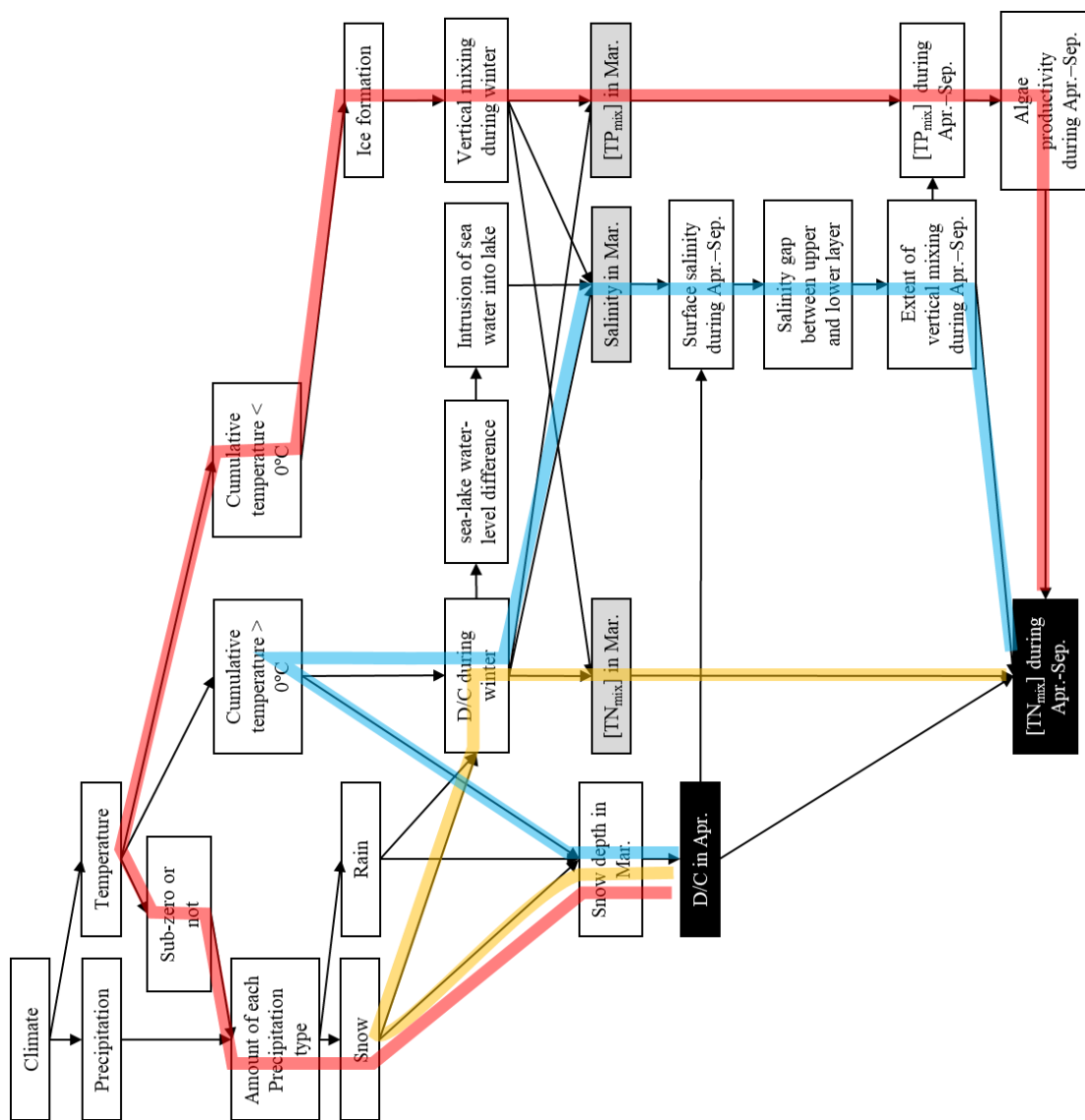


図2-3. D/C<sub>Apr</sub> から4月～9月の[TN<sub>mix</sub>]への因果効果推定におけるバックドアパスの例  
 3つのバックドアパスを赤線、黄色線、青線で示す（全てのバックドアパスは示していない）  
 [TN<sub>mix</sub>]<sub>Mar</sub>, [Cl<sub>mix</sub>]<sub>Mar</sub>, [TP<sub>mix</sub>]<sub>Mar</sub> で全てのバックドアパスが閉鎖され、3変数はバックドア基準を満たす

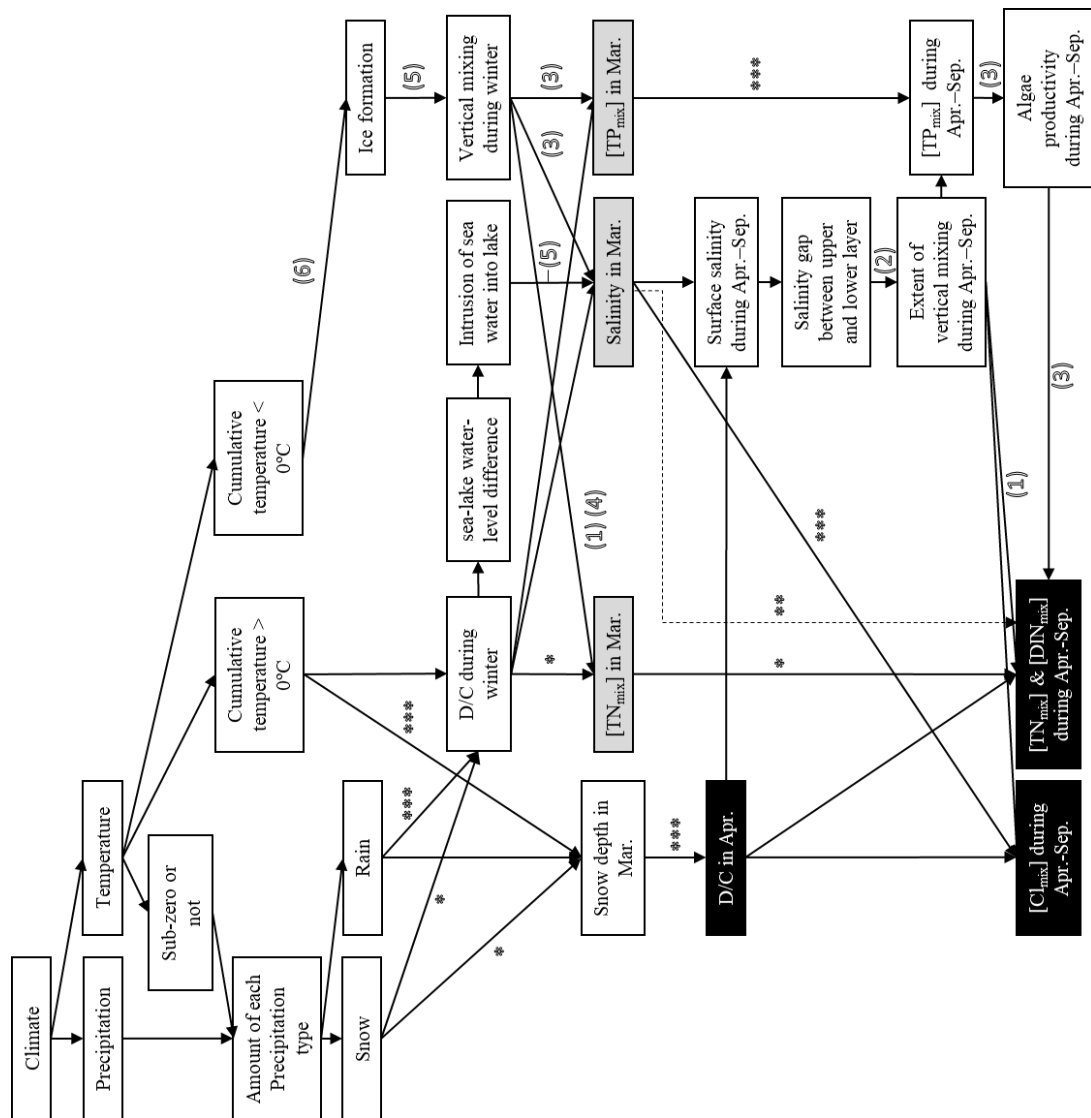


図2-4. D/C<sub>Apr</sub> から4月～9月の[TN<sub>mix</sub>], [Cl<sub>mix</sub>], [TP<sub>mix</sub>]への因果効果推定のために設計したDAG  
 \*, \*\*, \*\*\*は、それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ での有意な相関を示す  
 ( ) は各経路の参考文献番号を示す  
 (1) Brettar and Rheinheimer (1991) ; (2) 小泉ら (2014) ; (3) 西田ら (2006)  
 (4) 西田・鈴木 (2007) ; (5) 杉原・平井 (2016) ; (6) Yoshikawa et al. (2014)

分差に影響する。塩分差は春以降の混合層と高塩分層の混合に影響する。高塩分層の[TN]は[TN<sub>mix</sub>]よりも約 8 倍高いため(1993 年-2017 年の水文水質データベースのモニタリングデータから計算), 混合層と高塩分層の混合は[TN<sub>mix</sub>], [DIN<sub>mix</sub>]を上昇させる可能性がある。一方で, 高塩分層は貧酸素または無酸素であるため, 2 層間の混合は脱窒を引き起こす可能性があり (Brettar and Rheinheimer 1991), ゆえに[TN<sub>mix</sub>], [DIN<sub>mix</sub>]が減少する可能性がある。後者のプロセスは 4 月の[Cl<sub>mix</sub>]と春から夏の[TN<sub>mix</sub>], [DIN<sub>mix</sub>]の間に見られる負の相関関係からも支持されており, 混合層が高塩分層と混合しやすいほど, 春から夏の[TN<sub>mix</sub>], [DIN<sub>mix</sub>]が低下することを示唆している (表 2-1)。

- (iii) 湖の結氷は, 風による鉛直混合を弱め, 高塩分層から混合層へのリンの供給を減少させる。[TP<sub>mix</sub>]はリン制限下にある小川原湖 (西田ら 2006) の一次生産に強く影響する。一次生産に伴い, 窒素もバイオマスに組み込まれるため, バイオマスの沈降は窒素を混合層から除去する (西田ら 2006)。このプロセスは, [TP<sub>mix</sub>]が 4 月に高い時は, その後の月の[TN<sub>mix</sub>], [DIN<sub>mix</sub>]が減少している関係から支持されている (表 2-2)。

[Cl<sub>mix</sub>]については, DAG に基づき, バックドア基準を満たす 1 因子 ([Cl<sub>mix</sub>]<sub>Mar</sub>)を選択し, これを説明変数に加えた GAM により交絡調整を行った (図 2-4)。冬期の気象は, 表層塩分に別の経路を介して影響する。すなわち, 冬期の気象は, 冬期の D/C に影響し, 希釈により冬期の表層塩分に影響するとともに, 結氷状況への作用を通じた鉛直混合への影響により, 高塩分層から混合層への塩分供給, ひいては冬期の表層塩分に影響するバックドアパスが考えられた。

表2-1.  $[Cl_{mix}]_{Apr}$ と各月の $[TN_{mix}]$ および $[DIN_{mix}]$ の相関分析

|               | Apr.      | May       | Jun.      | Jul.     | Aug.     | Sep.      | Oct.      | Nov.     | Dec.      | Jan.     | Feb.     | Mar.  |
|---------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|-------|
| $[TN_{mix}]$  | -0.35     | -0.18     | -0.46 *   | -0.55 ** | -0.52 ** | -0.50 **  | -0.64 *** | -0.52 ** | -0.41 *   | -0.09    | -0.25    | 0.12  |
| $[DIN_{mix}]$ | -0.66 *** | -0.79 *** | -0.82 *** | -0.45 *  | -0.34    | -0.66 *** | -0.41 *   | -0.55 ** | -0.65 *** | -0.53 ** | -0.69 ** | -0.39 |

表2-2.  $[TP_{mix}]_{Apr}$ と各月の $[TN_{mix}]$ および $[DIN_{mix}]$ の相関分析

|               | Apr.  | May     | Jun.     | Jul.    | Aug.    | Sep.    | Oct.     | Nov.  | Dec.  | Jan.  | Feb.  | Mar.  |
|---------------|-------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $[TN_{mix}]$  | 0.19  | 0.03    | -0.41 *  | -0.42 * | -0.37 * | -0.36   | -0.52 ** | -0.28 | -0.29 | -0.02 | -0.23 | 0.04  |
| $[DIN_{mix}]$ | -0.18 | -0.39 * | -0.54 ** | -0.31   | -0.26   | -0.45 * | -0.46 *  | -0.25 | -0.35 | -0.25 | -0.41 | -0.17 |

本研究では、DAG はバックドア基準を満たす説明変数（S）を選択することを目的として作成した。データが不十分であるため、S の上流に位置する全ての因果構造は検証していない。しかし、S の上流にある因子が S を介してのみ Y（目的変数）に影響する限り、交絡調整は S で可能である。言い換えれば、Z の上流にある変数を全て検証、定量化しなくても因果関係を検証することが可能である（林・黒木 2016）。また、本研究で加えた個々の説明変数（S）についても、その 4 月～9 月の  $[TN_{mix}]$ ,  $[DIN_{mix}]$ ,  $[Cl_{mix}]$  への因果効果の推定において、他の変数セットがバックドア基準を満たすと考えられたため、本研究ではそれぞれの変数の有意性を、その個々の変数の因果効果と考えて差し支えないと判断した。

## 2-7. 交絡調整のための一般化加法モデル

上記の検討結果から、以下の GAM を  $[TN_{mix}]$ ,  $[DIN_{mix}]$ ,  $[Cl_{mix}]$  への影響評価における交絡調整のためにフィッティングした：

$$[TN_{mix}]_i = \alpha_i + f(D/C_{Apr}) + f([TN_{mix}]_{Mar}) + f([Cl_{mix}]_{Mar}) + f([TP_{mix}]_{Mar}) + \varepsilon_i \quad (\text{式 3})$$

$$[DIN_{mix}]_i = \alpha_i + f(D/C_{Apr}) + f([TN_{mix}]_{Mar}) + f([Cl_{mix}]_{Mar}) + f([TP_{mix}]_{Mar}) + \varepsilon_i \quad (\text{式 4})$$

$$[Cl_{mix}]_i = \alpha_i + f(D/C_{Apr}) + f([Cl_{mix}]_{Mar}) + \varepsilon_i \quad (\text{式 5})$$

ここで  $[TN_{mix}]_i$ ,  $[DIN_{mix}]_i$ ,  $[Cl_{mix}]_i$  は、それぞれ  $i$  月における  $[TN_{mix}]$ ,  $[DIN_{mix}]$ ,  $[Cl_{mix}]$ , また  $f(D/C_{Apr})$ ,  $f([TN_{mix}]_{Mar})$ ,  $f([Cl_{mix}]_{Mar})$ ,  $f([TP_{mix}]_{Mar})$  は各説明変数のスプライン関数、そして  $\alpha_i$ ,  $\varepsilon_i$  は、それぞれ  $i$  月における切片と残差である。このような条件下で、各変数の有意性で春以降の  $[TN_{mix}]$ ,  $[DIN_{mix}]$ ,  $[Cl_{mix}]$  への因果効果の評価が可能である。

### 3. 結果

#### 3-1. 河川流量の年間，経年トレンド

図 2-5 は河川流量の年間変動を示している。4 月と 8 月～9 月に 2 つのピークがみられた。D/C<sub>Apr</sub> は 4 月の降水量とは有意な相関が検出されないが ( $r = -0.1, p > 0.05$ ), 3 月の積雪深度と有意な相関があった ( $r = 0.66, p < 0.001$ )。D/C<sub>Apr</sub> ( $36.5 \pm 17.3 \text{ m}^3/\text{s}$ ), D/C<sub>Aug</sub> ( $35.3 \pm 18.1 \text{ m}^3/\text{s}$ ), D/C<sub>Sep</sub> ( $39.1 \pm 14.9 \text{ m}^3/\text{s}$ ) には大きな経年変動があった。D/C<sub>Apr</sub> は  $4.7 \times 10^7 \sim 2.1 \times 10^8 \text{ m}^3/\text{月}$  であり，これは湖の混合層（塩分躍層（水深 18m）の上層）体積の約 7%～31%に相当した。

#### 3-2. 融雪水量および塩分躍層水深との関係

1996 年～2018 年における 4 月～9 月平均の TN, DIN, TP, 塩分を目的変数として，D/C<sub>Apr</sub>（融雪水量）と 4 月～9 月の塩分躍層水深（5‰塩分水深）を説明変数とした GAM をフィッティングした結果，TN, DIN, 塩分は融雪水量と塩分躍層水深，TP は塩分躍層水深が有意となった（図 2-6，表 2-3）。TN, DIN, 塩分に対する D/C<sub>Apr</sub>, TP に対する塩分躍層水深の EDF（effective degrees of freedom, 有効自由度）は 2 に近い値を示し，非線形関係であることを示した。一方，TN, DIN, 塩分に対する塩分躍層水深の EDF は 1 であり，線形関係を示した。各モデルによる TN, DIN, TP, 塩分の決定係数は 0.591, 0.548, 0.439, 0.733 であり，4 月～9 月の TN, DIN, TP, 塩分変動の 59%, 55%, 44%, 73%を説明した。

#### 3-3. 融雪水量との関係における統計的因果推論

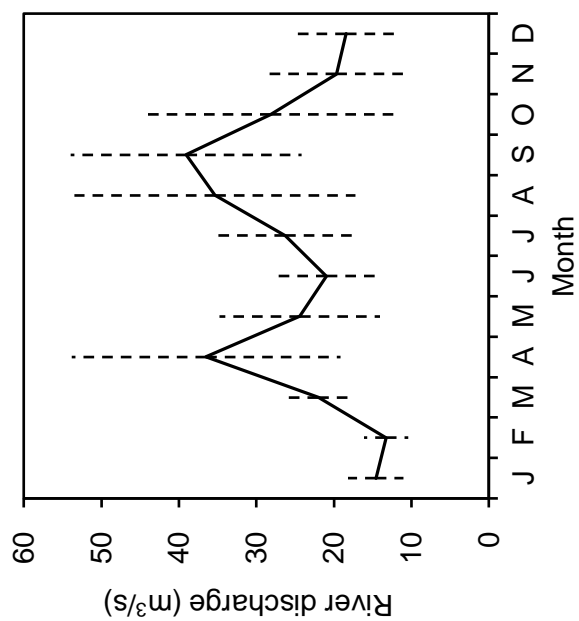


図2-5. 小川原湖への流入河川水量の時期的変動  
 実線は1989年～2017年の各月平均  
 破線は標準偏差

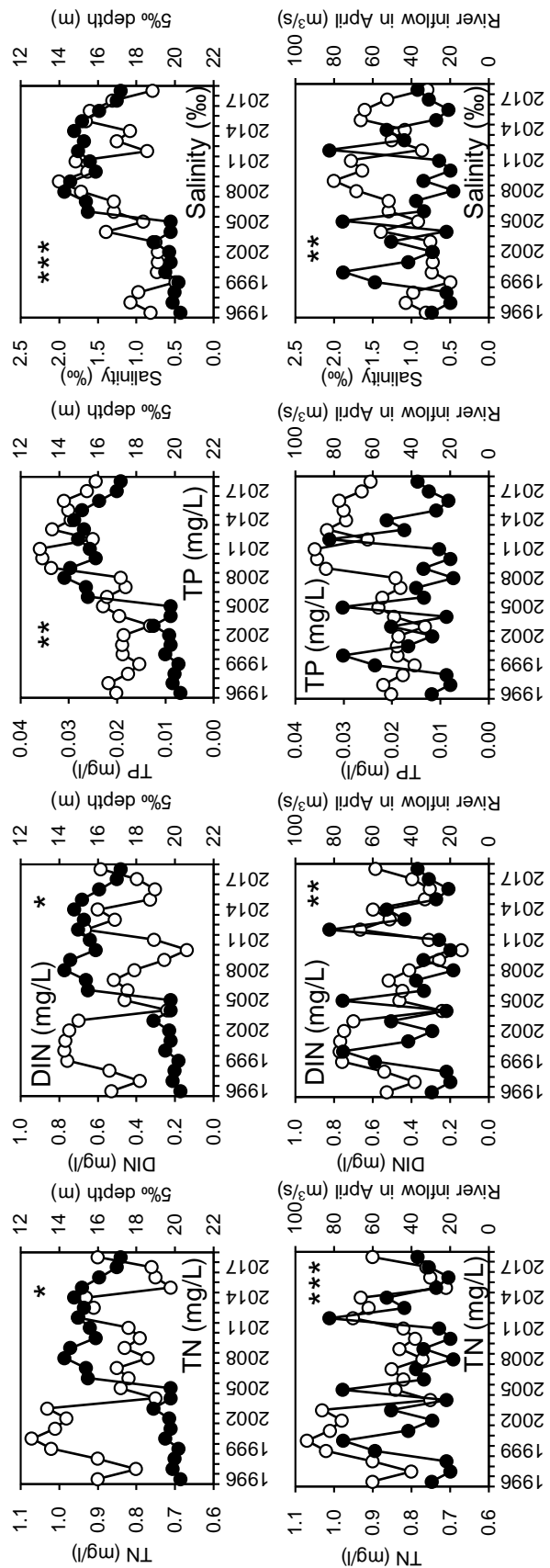


図2-6. 塩分躍層水深（5‰水深）， $D/C_{Apt}$ と4月～9月平均のTN, DIN, TP, 塩分の推移  
 ○がTN, DIN, TP, 塩分, ●が塩分躍層水深（5‰水深）， $D/C_{Apt}$ を示す  
 \*, \*\*, \*\*\*は, 塩分躍層水深（5‰水深）， $D/C_{Apt}$ を説明変数としたGAMにおいて検出された $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ での有意な関係を示す

表2-3. 塩分躍層水深（5‰水深），D/C<sub>Apr</sub>を説明変数，4月～9月平均のTN，DIN，TP，塩分を応答変数としたGAM分析結果  
 EDF: effective degrees of freedom（有効自由度）

| Response variables | Explanatory variables |     |                   |     | adj. $R^2$ |
|--------------------|-----------------------|-----|-------------------|-----|------------|
|                    | D/C <sub>Apr</sub>    |     | 5‰ Salinity depth |     |            |
|                    | EDF                   | $p$ | EDF               | $p$ |            |
| TN                 | 2.09                  | *** | 1.00              | *   | 0.591      |
| DIN                | 1.98                  | **  | 1.00              | *   | 0.548      |
| TP                 | 1.00                  |     | 2.50              | **  | 0.439      |
| Sal                | 1.93                  | **  | 1.00              | *** | 0.733      |

### 3-3-1. TN

図 2-7 は GAM により得られた各変数の  $[TN_{mix}]$  への限界効果 (marginal effect) を示している。4 月～8 月の  $[TN_{mix}]$  は、月により有意性が異なるが、説明変数群との間に有意な関係を示した。 $D/C_{Apr}$  は、5 月のみに正の関係を示した。 $[TN_{mix}]_{Mar}$  とは、4 月～6 月に正の関係があった。 $[Cl_{mix}]_{Mar}$  とは、4 月～7 月に負の関係または V 字型の関係があった。 $[TP_{mix}]_{Mar}$  とは、5 月、6 月に負の関係、7 月は有意な関係が認められたものの、不明瞭な関係性を示した。

8 月は、 $[TN_{mix}]_{Mar}$  と有意な関係がみられたものの、外れ値の影響が大きく、不明瞭な関係性を示した。9 月はいずれの変数との間にも有意な関係は検出されなかった。しかし、図 2-8 に示したように、4 変数で構成した GAM は 4 月～9 月の  $[TN_{mix}]$  をよく説明した。

### 3-3-2. DIN

図 2-9 は GAM により得られた各変数の  $[DIN_{mix}]$  への限界効果を示している。4 月～6 月の  $[DIN_{mix}]$  は、月により有意性が異なるが、説明変数群との間に有意な関係を示した。 $D/C_{Apr}$  は、4 月のみに正の関係を示した。 $[DIN_{mix}]_{Mar}$  とは、4 月～6 月に正の関係があった。 $[Cl_{mix}]_{Mar}$  とは 4 月～6 月に有意な関係が検出された。ただし、 $[TN_{mix}]$  が示したような V 字型の関係は示さず、 $[Cl_{mix}]_{Mar}$  の増加に伴い  $[DIN_{mix}]$  は低下する傾向を示した。 $[TP_{mix}]_{Mar}$  とは、有意な関係を示さなかった。

7 月から 9 月は、 $[TN_{mix}]$  の場合と同様、いずれの変数も有意な関係をほとんど示さなかった。しかし、図 2-10 に示したように、4 変数で構成した GAM は 4 月～9 月の  $[DIN_{mix}]$  をよく説明した。

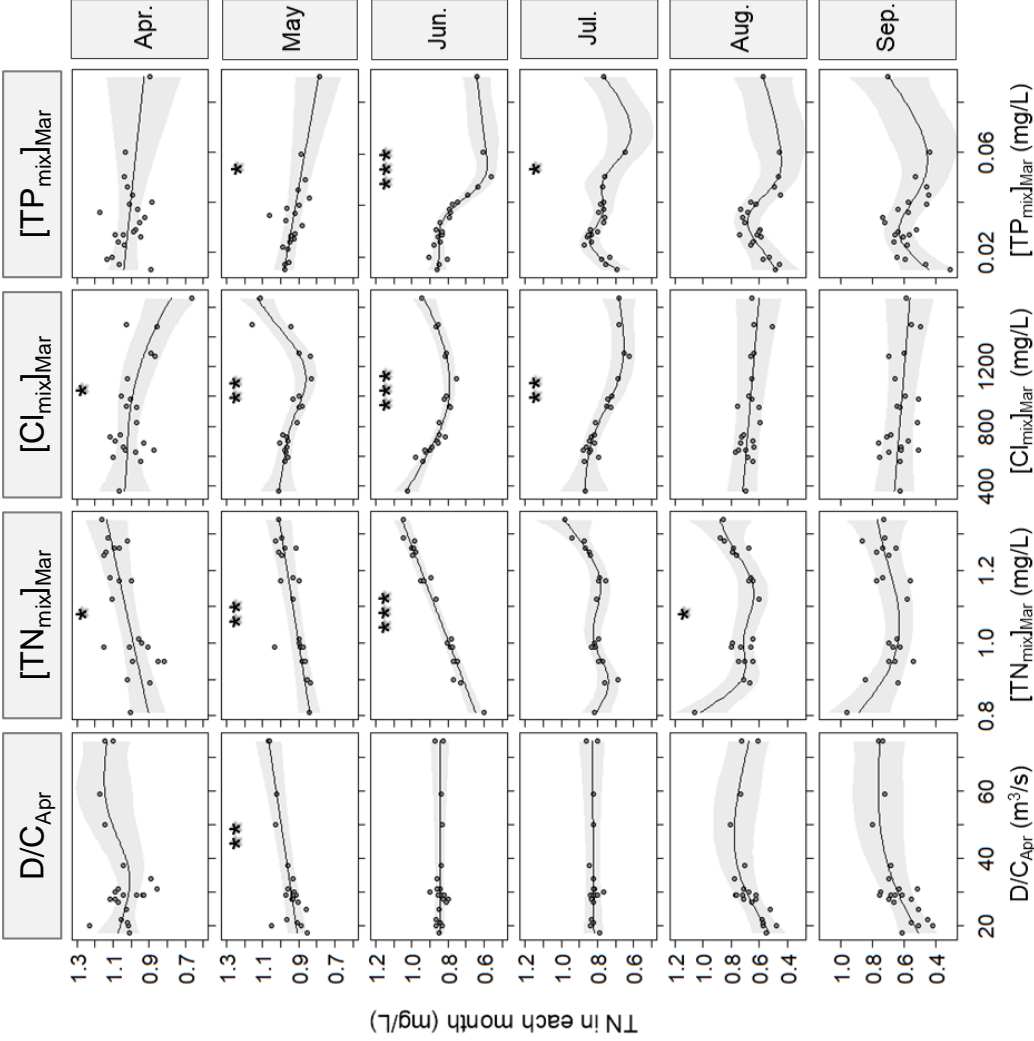


図2-7. GAMにより得られた各変数の $[TN_{mix}]$ への限界効果  
 \*, \*\*, \*\*\*は、それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ での有意な関係  
 実線は推定された平均値, 灰色帯は95%信頼区間

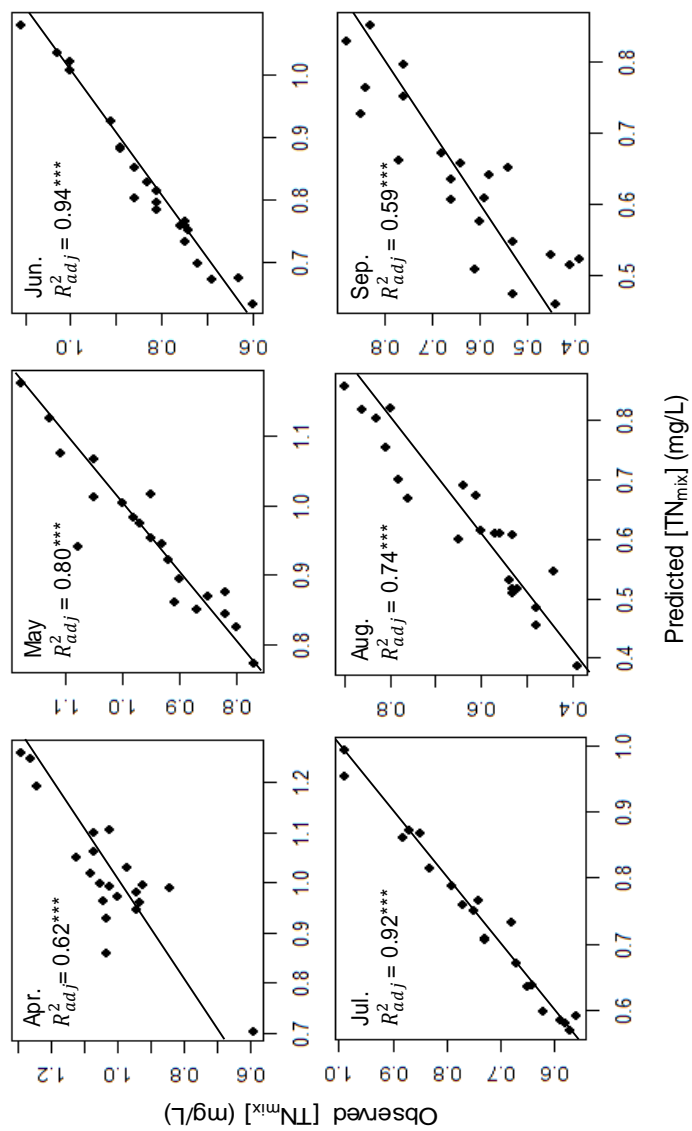


図2-8. GAMIによる $[TN_{mix}]$ の推定値と実測値のプロット（月別）  
実線は $y = x$

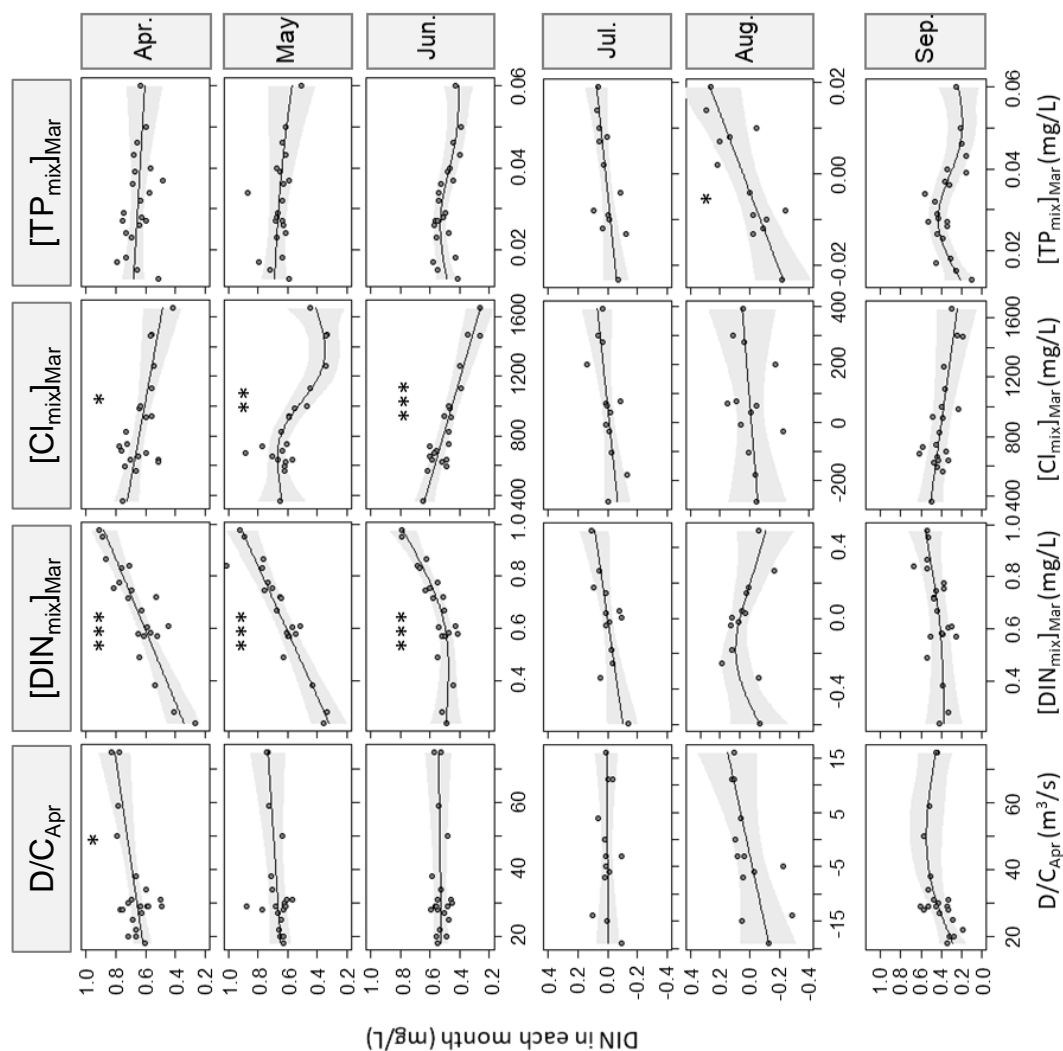


図2-9. GAMにより得られた各変数の[DIN<sub>mix</sub>]<sub>Mar</sub>への限界効果  
 \*, \*\*, \*\*\*は、それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ での有意な関係  
 実線は推定された平均値、灰色帯は95%信頼区間  
 7月, 8月は1階差分系列で分析

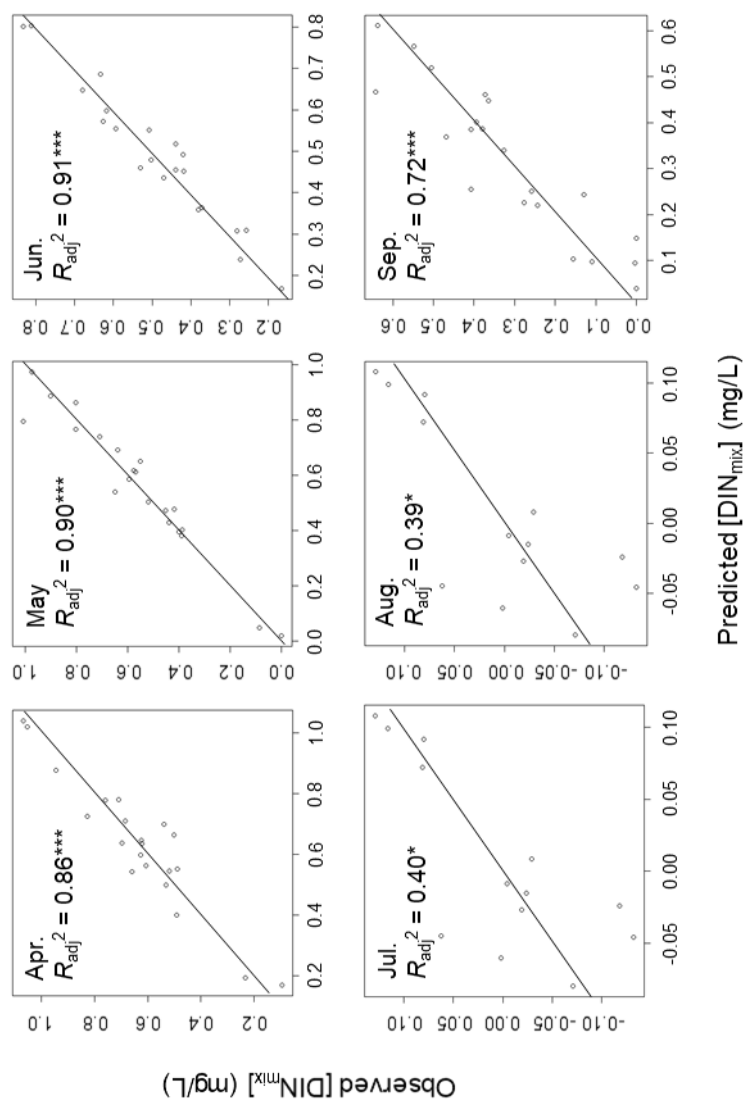


図2-10. GAMによる[DIN<sub>mix</sub>]の推定値と実測値のプロット（月別）  
実線は $y=x$

### 3-3-3. 塩分 (Cl)

図 2-11 は GAM により得られた各変数の  $[Cl_{mix}]$  への限界効果を示している。4 月～9 月の  $[Cl_{mix}]$  は、月により有意性が異なるが、説明変数群との間に有意な関係を示した。 $D/C_{Apr}$  は、5 月～8 月に負の関係を示した。 $[Cl_{mix}]_{Mar}$  とは、4 月～7 月に正の関係があった。

図 2-12 に示したように、4 変数で構成した GAM は 4 月～9 月の  $[Cl_{mix}]$  をよく説明した。

## 4. 考察

### 4-1. 融雪水量および塩分躍層水深との関係

塩分躍層水深は 4 項目— $[TN]$ ,  $[DIN]$ ,  $[TP]$ ,  $[Cl]$ —の全てと有意な相関関係を示した。また序論でも記述したように、塩分躍層水深の変動に交絡が影響するとは考えにくいため、塩分躍層水深は、2-MIB の発生と関係する水質—低 TN, 低 DIN, 高 TP, 高塩分—に影響していると推察される。この結果は、「塩分躍層水深が上昇すると、高塩分層からの塩分供給量が増大することにより混合層の塩分が上昇するのに加え、高塩分層からリンが供給されやすくなるため、混合層のリン濃度が上昇し、春季ブルーミングによる窒素消費が増大する。そのため、4 月以後の窒素濃度が低下する。」という小川原湖における既往のシミュレーション研究結果とも合致しており（西田ら 2006）、妥当な解析結果の解釈と考えられる。

一方、融雪水量と有意な関係がみられたのは、TN, DIN, 塩分であり、TP に関しては関連が認められなかった。TP と有意な関係が認められなかった理由として、以下のことが挙げられる。

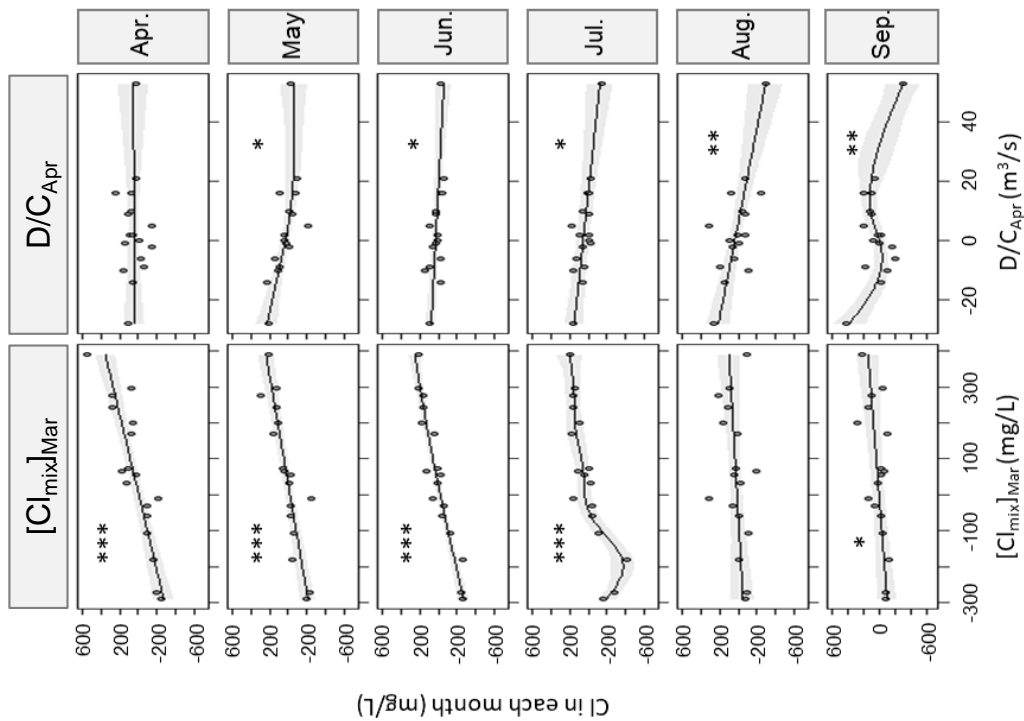


図2-11. GAMにより得られた各変数の $[Cl_{mix}]$ への限界効果  
 \*, \*\*, \*\*\*は、それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ での有意な関係  
 実線は推定された平均値、灰色帯は95%信頼区間  
 全て1階差分系列で分析

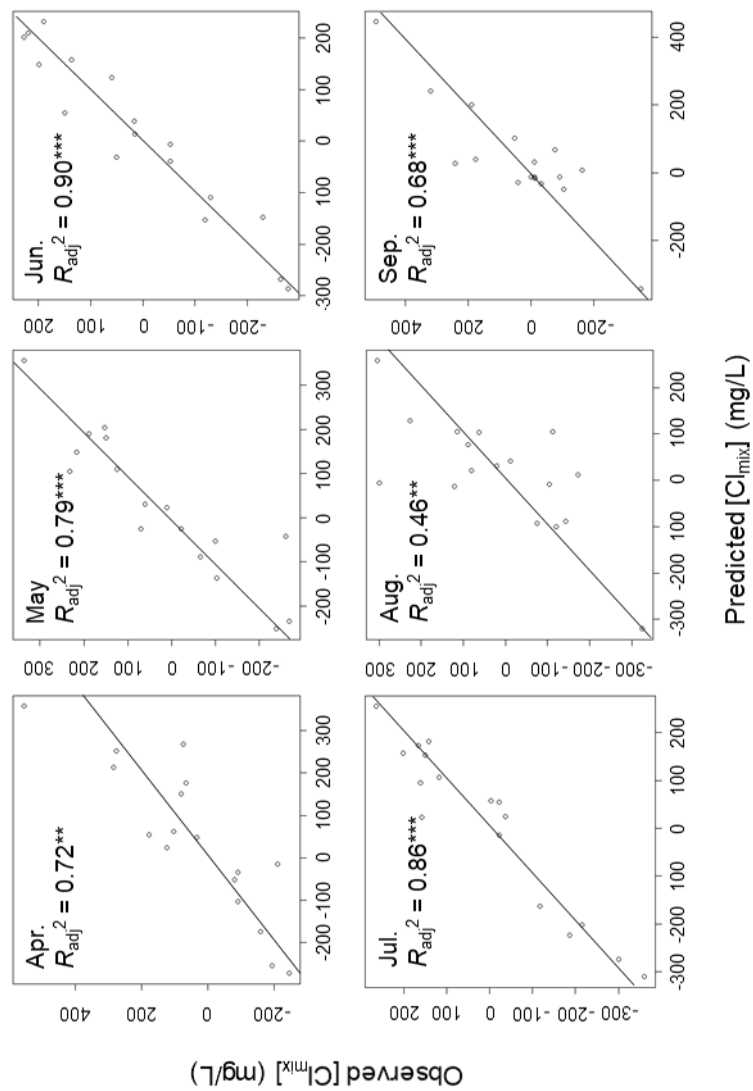


図2-12. GAMによる $[Cl_{mix}]$ の推定値と実測値のプロット（月別）  
実線は $y = x$

(i) 小川原湖に流入する高瀬川支流は、流域の土壌がリン酸を吸着しやすい黒ボク土であるため、ほとんどの流入リンは粒子態で流入し、これらは小川原湖に流入後、比較的速やかに湖底に沈降する（岡田ら 2013）。したがって、高塩分層からのリンの内部負荷の影響のほうが、春期の河川からのリン負荷の影響よりも大きい。

(ii) 硝酸とは異なり、還元環境でもリンは除去されない

(iii) 小川原湖は一次生産においてリン制限にあるため、冬季に風による混合で高塩分層から供給されたリンは、春季ブルームで直ちに消費され、その後のリン濃度に強く影響を及ぼさない（西田ら 2006）。

次に、融雪水量と有意な関係がみられた TN, DIN, 塩分（Cl で解析）の GAM による統計的因果推論の実施結果について、次節で考察を行った。

#### 4-2. $D/C_{Apr}$ と $[TN_{mix}]$ , $[DIN_{mix}]$ , $[Cl_{mix}]$ の因果関係

##### 4-2-1. TN

GAM による交絡調整を行った結果、4 月～8 月の  $[TN_{mix}]$  と、説明変数（月により異なる）との間に、有意な関係が認められた。特筆すべきは、 $D/C_{Apr}$  と有意な正の関係が認められたのは 5 月の  $[TN_{mix}]$  のみであったことである。このことから、 $D/C_{Apr}$  と塩分躍層水深との GAM により検出された 4 月～9 月の  $D/C_{Apr}$  と  $[TN_{mix}]$  との間の関係は、交絡による見かけ上の関係であり、異なる因子が各月の  $[TN_{mix}]$  に影響を与えていることが示唆された。4 月～6 月は、 $[TN_{mix}]_{Mar}$  との間に正の関係があったことから、4 月～6 月は、DAG

で仮定した自己回帰が強く影響していると推察された。4月～7月は、 $[Cl_{mix}]_{Mar}$ と負の関係またはV字型の関係が検出された。これは、ある $[Cl_{mix}]_{Mar}$ に達するまでは、高塩分層との塩分差が低下することで、鉛直循環が生じやすくなるほど、脱窒量が増加するが、ある $[Cl_{mix}]_{Mar}$ を超えると、高塩分層からの窒素供給量が脱窒量を上回ることを示唆している。特に、5月、6月は、 $[Cl_{mix}]_{Mar}$ が1100 mg/Lまで $[TN_{mix}]$ が低下するが、それ以上になると、 $[TN_{mix}]$ が上昇に転じている。この2方向の結果は、DAGの仮定と合致している。5月～7月には、 $[TN_{mix}]$ は、 $[TP_{mix}]_{Mar}$ と負の関係を示したが、この関係は、DAGで仮定したように、リン供給により一次生産が増加し、それに伴い窒素の沈降量が増加することを表していると推察された。一方、8月から9月の $[TN_{mix}]$ は、いずれの個々の変数との間にも明瞭な関係を示さなかった。しかし、GAMは8月、9月の $[TN_{mix}]$ の変動を比較的よく説明していた（決定係数はそれぞれ0.74, 0.59）。このことから、個々の変数と8月、9月の関係性が不明瞭となった理由として、冬期の気象は8月、9月の $[TN_{mix}]$ に影響を及ぼすものの、各因子の効果は時間経過に伴い低下していったと考えられた。

#### 4-2-2. DIN

GAMによる交絡調整を行った結果、4月～7月の $[DIN_{mix}]$ と、月により異なる説明変数との間に、有意な関係が認められた。特筆すべきは、 $D/C_{Apr}$ と有意な正の関係が認められたのは4月の $[DIN_{mix}]$ とのみであったことである。この結果から、 $[TN_{mix}]$ と同様に、 $D/C_{Apr}$ と4月～9月の $[DIN_{mix}]$ との間の関係は、交絡による見かけ上の関係であり、各月の $[DIN_{mix}]$ には、 $D/C_{Apr}$ 以外の因子が影響を与えている

ことが示唆された。4月～6月の $[DIN_{mix}]$ は、 $[DIN_{mix}]_{Mar}$ と正の関係を示したことから、4月～6月は、DAGで仮定した自己回帰が生じていると推察された。4月～7月の $[DIN_{mix}]$ は、 $[Cl_{mix}]_{Mar}$ と有意な関係が認められたが、 $[TN_{mix}]$ で見られたようなV字型の関係は認められず、 $[Cl_{mix}]_{Mar}$ の増加に伴い $[DIN_{mix}]$ は低下した。このことから、 $[Cl_{mix}]_{Mar}$ が高くなると、前述したように脱窒量が増加するが、ある $[Cl_{mix}]$ を超えると、高塩分層からのリンの供給量も増加してリン制限が緩和され、リン酸とともにDINがバイオマスに取り込まれて有機態窒素になる結果、それを含むTNは混合層で増える一方、混合層のDINは変化しないか、または低下すると考えられた。 $[TN_{mix}]$ の場合とは異なり、3月の $[TP_{mix}]$ は、いずれの月の $[DIN_{mix}]$ とも有意な関係を示さなかった。これは、小川原湖はリン制限にあるため、3月の $[TP_{mix}]$ は3月の時点でバイオマス中に既に固定されており、そのため、4月以降の $[DIN_{mix}]$ には影響しないものの、鉛直循環が弱まってくる5月以降、死んだバイオマスの方への沈降に伴い $[TN_{mix}]$ は低下すると推察された。7月から9月の $[DIN_{mix}]$ は、 $[TN_{mix}]$ と同様に、いずれの変数との間にも有意な関係を示さなかった。しかし、GAMは、7月、8月、9月における $[DIN_{mix}]$ を、有意に説明することができた(決定係数は順に0.40, 0.39, 0.72)。このことから、 $[TN_{mix}]$ と同様に、冬期の気象は7月、8月、9月の $[DIN_{mix}]$ に影響するものの、各因子の効果は時間経過に伴い弱まっていくことが示唆された。

#### 4-2-3. 塩分 ( $Cl$ )

GAMによる交絡調整を行った結果、4月の $[Cl_{mix}]$ は、 $D/C_{Apr}$ と有意な関係を示さなかったものの、5月～8月の $[Cl_{mix}]$ は、 $D/C_{Apr}$ と有

意な負の関係を示した。したがって、TN や DIN の場合とは異なり、 $D/C_{Apr}$  が塩分（Cl）に及ぼす影響は、見かけ上ではなくて因果であり、融雪水による直接的な塩分希釈効果があると推察された。一方、4 月に関係が認められなかった理由としては、塩分の測定地点が小川原湖の中央であったために、4 月の時点では、融雪水の影響が及びきっていなかったと推察された。

## 5. 結論

本章では、2-MIB 発生に関係する水質—TN, DIN, TP, 塩分（塩素濃度）—の変動要因として、内部負荷に大きく影響を及ぼす塩分躍層水深と、外部負荷として4月河川流量（融雪水量）の影響を調べた。その結果、塩分躍層水深は、TN, DIN, TP, 塩分（塩素濃度）の全ての項目に影響することが示された。一方、融雪水量は、TN, DIN, 塩分と関係するものの、TPとは関係が認められなかった。融雪水量がTN, DIN, 塩分に及ぼす影響（因果関係）を評価するため、統計的因果推論を行った。塩分に関しては、冬期の結氷による鉛直混合の程度その他、融雪水による直接的な希釈の影響を受けると推察された。一方、TN, DINに関しては、融雪水量に影響を与える冬季の気象が影響すると推察された。つまり、 $D/C_{Apr}$ が多い冬は、真冬日の日数が多く、このような気象条件においては、TN, DINが高い水準になる以下のプロセスが起こると考えられた。

- (i)  $D/C_{spr}$ が多いため、流域からより多くの窒素が供給される
- (ii) 湖の結氷が鉛直混合を減少させ、高塩分層から混合層への塩分やリン、無酸素水の供給を弱める。その結果、低いリン濃度により、続く3月の一次生産も低く維持され、バイオマスの沈降

による 5 月以降の混合層からの窒素の除去量が少なくなる。

- (iii) 混合層の塩分が低いと、高塩分層との密度差が大きく、両層間の混合が起こりにくくなり、その結果、混合層がより好気的な条件になり、脱窒量が減少する。

### 第 3 章

## 分子生態学的手法に基づく 2-MIB 産生糸状シアノバクテリアの組成解析

### 1. 序言

第 1 章，第 2 章の結果から，小川原湖における 2-MIB の発生および 2-MIB 産生シアノバクテリアの出現と水質の関係，また水質に及ぼす気象等の影響が明らかになり，気象や水質から，2-MIB 発生の予測が可能であることが示唆された。しかし，実際の現場において，発生予測を対策に適用する上では，発生の有無のみならず，発生の規模も重要な情報となる。また，第 1 章で提示したような発生要因の実験的検証や，発生抑制対策を実施する上では，その結果や対策効果を定量的に評価することが求められる。このような状況の中で，後述するように，小川原湖において内水面研究所がモニタリングを実施してきた 2-MIB 産生シアノバクテリアは定量性において課題を抱えており，その真の量的動態の把握が困難な状況にある。そこで，第 3 章では，2-MIB 発生量の予測と発生要因の解明および抑制対策に資するため，2-MIB 産生シアノバクテリアの定量における課題の抽出とその要因，また，量的動態を把握する上で必要な観点と手法について検討する。

糸状シアノバクテリアである *Pseudanabaena* は，湖沼における 2-MIB 産生微生物として知られている。カビ臭産生 *Pseudanabaena* のモニタリングには，検鏡法が慣習的に用いられてきており，*Pseudanabaena* と環境因子との関係が明らかにされてきた（吉田ら 1996；横山・山下 2007a；横山・山下 2007b；Gao et al. 2018）。小

川原湖でも，内水面研究所により，カビ臭產生 *Pseudanabaena* 様シアノバクテリア（musty odor-producing *Pseudanabaena*-like cyanobacteria：MOPPL-シアノバクテリア）の湖水中密度が長年にわたり，検鏡法によりモニタリングされてきた。しかし，2-MIB 產生 *Pseudanabaena* についての多くの研究では，出現メカニズムについて十分には明らかになっていない。この理由として，生物顕微鏡で *Pseudanabaena* のトリコームを分類するためには，様々な分類形質を確かめる必要があり（Tuji and Niiyama 2018），また，分類形質は同種内でも変動するため，環境水中に存在する様々なタイプのトリコームを分類することが難しく，その動態を正確に捉えられていないことが原因となっていることが示唆されている（Oikawa and Ishibashi 2004）。さらに，*Pseudanabaena* の 2-MIB 產生能の有無に関して，*Oscillatoria* や *Synechococcus* のように株特異性があることが知られている（Izaguirre and Taylor 2004）。よって，2-MIB 產生株の計数に生物顕微鏡を使用することには限界がある。しかし，生物顕微鏡での 2-MIB 產生株の計数値が，どの程度の誤差を有するのかについて，定量的に検証された事例は存在しない。

分子生態学的手法は，微生物を種/株レベルで追跡を可能にする技術の一例である。*Pseudanabaena* の分類には，分子生態学的手法の利用が推奨されている（Oikawa and Ishibashi 2004；Tuji and Niiyama 2018）。また，近年，2-MIB および Geosmin の合成に関与する遺伝子の同定が進んでいる。2-MIB 合成に関与する遺伝子としては，放線菌（Komatsu et al. 2008）とシアノバクテリア（Giglio et al. 2011; Wang et al. 2011）から，その最終的な生成段階に関与する 2 遺伝子（メチルトランスフェラーゼ，モノテルペンシクラーゼ）が報告さ

れた。2-MIB の合成経路としては，GPP メチルトランスフェラーゼ（GPPMT）により，ゲラニルニリン（GPP）酸が s-アデノシルメチオニンのメチル基を受け取り 2-メチル GPP が作られ，2-メチル GPP が 2-MIB 合成酵素（シノニム：2-MIB シクラーゼ，モノテルペンシクラーゼ）により環状化されることで，2-MIB が合成されることが考えられている。このように 2-MIB および Geosmin の合成関連遺伝子の同定が進む中，カビ臭産生シアノバクテリアに特化して定量する手法として，カビ臭物質合成の最終段階を触媒するカビ臭合成酵素遺伝子をターゲットとしたリアルタイム PCR 法が開発され，環境中におけるカビ臭産生シアノバクテリアの動態に関する研究が大きく進歩した（2-MIB—Wang et al. 2016; Chiu et al. 2016 and geosmin—Giglio et al. 2008; John et al. 2018）。近年データベースが充実してきている 2-MIB 合成酵素遺伝子の次世代シーケンサーを使ったアンプリコンシーケンス解析は，環境中に存在する 2-MIB 産生シアノバクテリアを網羅的に把握する上で優れた手法である。しかしながら，2-MIB 合成酵素遺伝子のアンプリコンシーケンス解析により，2-MIB 産生シアノバクテリアの組成を調べた事例は，存在しない。そこで，本章では検鏡法とリアルタイム PCR 法により，小川原湖における 2-MIB 産生シアノバクテリアの出現状況を調べてその結果を比較した。またアンプリコンシーケンス解析により，網羅的に 2-MIB 産生シアノバクテリアの種/株を明らかにすることで，2-MIB 産生シアノバクテリアの定量における課題の抽出と，量的動態を調査する上で必要な観点と手法を明らかにすることを目的とした。

## 2. 試料および方法

## 2-1. 植物プランクトンのサンプリング

2011 年 4 月～2018 年 12 月に湖中央（St.19：40°46'35.39"N, 141°20'19.34"E）にて表層水 1L を採取した。採取した湖水はクーラーボックスで研究室に搬送し、速やかに 300 mL を 4%中性ホルマリンまたは 1%ルゴール液で固定した。DNA 分析用の試料（表層水 1L）は、1 月、4 月、7 月に湖中央にて採取した。10 月には、2-MIB 産生シアノバクテリアの空間的変動を調査するため、湖中央を含めた 9 地点にて湖水を採取した（図 3-1）。採取した水はクーラーボックスで研究室に搬送し、400 mL～500 mL を 0.22- $\mu$ m Sterivex® filter（EMD Millipore Corp., USA）で濾過した。濾過サンプルは DNA 抽出まで -20℃で保管した。

## 2-2. 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* の定量

MOPPL-シアノバクテリアの検鏡定量は、ユニット密度が高い時（ $\geq 500$  units/mL）は、フックスローゼンタール血球計算盤（高さ 0.2 mm；面積 0.0625 mm<sup>2</sup>）で 80 フィールドを計数し、ユニット密度が低い時（ $\leq 500$  units/mL）は、セジウィックラフターカウンティングチャンバーで 500 フィールドを計数することにより実施した。トリコーム長も同時に計測し、密度を 1 mL あたりに含まれる 100  $\mu$ m のトリコーム数で算出した。2-MIB 産生シアノバクテリアの定量はリアルタイム PCR 法により実施した。フィルターサンプルからの DNA 抽出は、DNeasy® PowerSoil Pro Kit（QIAGEN, Germany）を用いて行った。抽出した DNA は -80℃で保管した。プライマーとしては、2-MIB 合成酵素遺伝子（2-MIB シクラーゼ遺伝子）の TaqMan® qPCR 用に開発された CRTf と CRTr を使用し、Ctaq をプローブとして用

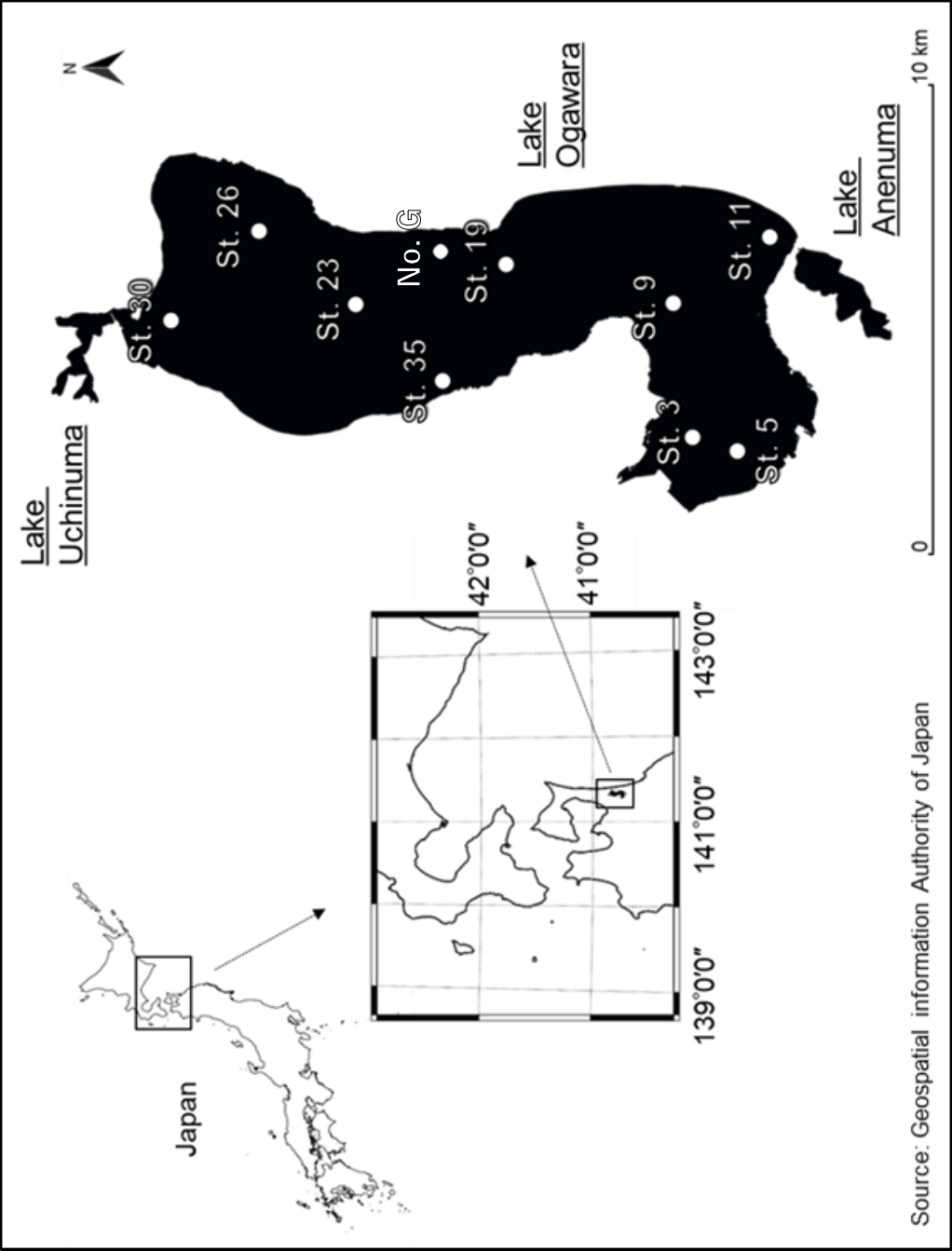


图3-1. 定点图

いた (Wang et al. 2016)。qPCR 酵素として TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用い、リアルタイム PCR 装置として StepOnePlus® Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用した。qPCR 反応は、50°C で 2 分間保持後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C で 15 秒間、58°C で 1 分間を 1 サイクルとして 40 サイクルの増幅反応を行った。

2-MIB 産生シアノバクテリアの標準株は、対数増殖期にある *Pseudanabaena* sp. AIFI-4 株 (表 3-1) を使用した。培養液中の総ユニット数 (100 µm のトリコーム数) を算出し、0.22-µm Sterivex® filter (Millipore) で回収した。フィルターからの DNA 抽出は DNeasy® PowerSoil Pro Kit により行った。DNA 溶液の 10 倍希釈系列を作成し、リアルタイム PCR による標準曲線のテンプレートとして用いた。また、結果で記載するように、2-MIB 合成酵素遺伝子のアンプリコンシーケンス解析から、本研究で用いた試料では、*Pseudanabaena* のみが唯一の 2-MIB 産生シアノバクテリアであることが明らかになったため、この標準曲線により、Ct 値を 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* ユニット数に換算し、その値を濾過した湖水量で割ることで、湖水 1 mL あたりの 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* ユニット密度を算出した。

### 2-3. シアノバクテリア株の培養と DNA 抽出

本研究で使用したシアノバクテリア株は 2 グループに分けられる。1 つは AIFI 株、もう 1 つは NIES 株である。AIFI 株は、2016 年～2017 年に小川原湖、内沼および姉沼から単離した 8 株で、MOPPL-シアノバクテリアの AIFI-3, AIFI-4, AIFI-5, AIFI-6, AIFI-7, AIFI-18, AIFI-19, AIFI-22 である (表 3-1)。NIES 株は、微生物系統保存

表3-1. 小川原湖および接続水域から単離した株の諸元

| Strain Name | Sampling date | Sampling points | Sampling depth | Incubation Medium |
|-------------|---------------|-----------------|----------------|-------------------|
| AIFI-3      | 2016/6/15     | Anenuma         | 0m             | CT                |
| AIFI-4      | 2016/6/15     | Anenuma         | 0m             | CT                |
| AIFI-5      | 2016/6/15     | Anenuma         | 0m             | CT                |
| AIFI-6      | 2016/6/15     | Anenuma         | 0m             | CT                |
| AIFI-7      | 2016/6/15     | Anenuma         | 0m             | CT                |
| AIFI-18     | 2017/7/27     | Uchinuma        | 0m             | CT                |
| AIFI-19     | 2017/7/27     | Uchinuma        | 0m             | CT                |
| AIFI-22     | 2017/9/21     | Ogawara (St. 3) | 0m             | CT                |

施設から譲渡された株で、*Pseudanabaena yagii* (NIES-4237, NIES-4238) と *P. cinerea* (NIES-4062, NIES-4063 ; 表 3-2) の 4 株を含んでいる。*P. cinerea* は Tuji and Niiyama (2018) により、小川原湖でもその存在が確認された新種である。MOPPL-シアノバクテリアは小川原湖、姉沼および内沼で高密度に存在していたものをピペット洗浄法 (Tuji and Niiyama 2018) で単離した。これらの株は CT 培地で明暗周期を明期 12 時間、暗期 12 時間として 20℃で培養した。AIFI 株は 0.22- $\mu$ m Sterivex® filter (Merck Millipore) で回収し、フィルターからの DNA 抽出はフェノールクロロホルム法 (Kojima et al. 2014) により実施した。NIES 株は 2,400×g で 30 分間遠心分離して回収した。遠心分離後のサンプルから、DNeasy® PowerSoil Kit で DNA を抽出した。

#### 2-4. MOPPL-シアノバクテリアの分子生態学的解析

AIFI 株では、16S rRNA 遺伝子の部分領域 (V3–V4) を PCR 増幅した。プライマーは CYA371F (Janse et al. 2003), CYA781R (Nübel et al. 1997), 酵素は Platinum® DNA Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用した。PCR 装置は、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® (TP600) を用いた。PCR 産物のダイレクトシーケンスは、PCR と同じプライマーを用いて 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems) で実施した。獲得したシーケンスはマニュアルでアセンブルし、DDBJ データベースを BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/blastn?lang=ja>) で検索した。取得配列は DDBJ に登録した (表 3-3)。

2-MIB 合成酵素遺伝子を標的としたプライマー MIB3313F, MIB4226R (Suurnäkki et al. 2015) により、TaKaRa PCR Thermal Cycler

表3-2. 本研究で使用了たNIES株の諸元

| Strains name | Species name                 | Dates of sampling | Locality           | Incubation medium | Reference               |
|--------------|------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|
| NIES-4237    | <i>Pseudanabaena yagii</i>   | 13-Jan-2016       | Lake Kasumigaura   | C                 | Tuji and Niiyama (2018) |
| NIES-4238    | <i>Pseudanabaena yagii</i>   | 13-Jan-2016       | Lake Kasumigaura   | C                 | Tuji and Niiyama (2018) |
| NIES-4062    | <i>Pseudanabaena cinerea</i> | 19-Nov-2014       | Serikawa Reservoir | CT                | Tuji and Niiyama (2018) |
| NIES-4063    | <i>Pseudanabaena cinerea</i> | 19-Nov-2014       | Serikawa Reservoir | CT                | Tuji and Niiyama (2018) |

表3-3. 本研究で取得した16S rRNA及び2-MIB合成酵素遺伝子配列のアクセッション番号

| Strain Name | Species                      | 16S rRNA | 2-MIB synthase |
|-------------|------------------------------|----------|----------------|
| NIES-4237   | <i>Pseudanabaena yagii</i>   | -        | LC507458       |
| NIES-4238   | <i>Pseudanabaena yagii</i>   | -        | LC507459       |
| NIES-4062   | <i>Pseudanabaena cinerea</i> | -        | LC507460       |
| NIES-4063   | <i>Pseudanabaena cinerea</i> | -        | LC507461       |
| AIF1-3      | <i>Pseudanabaena</i> sp.     | LC506581 | -              |
| AIF1-4      | <i>Pseudanabaena</i> sp.     | LC506582 | LC507462       |
| AIF1-5      | <i>Pseudanabaena</i> sp.     | LC506583 | -              |
| AIF1-6      | <i>Pseudanabaena</i> sp.     | LC506584 | -              |
| AIF1-7      | <i>Pseudanabaena</i> sp.     | LC506585 | -              |
| AIF1-18     | <i>Pseudanabaena</i> sp.     | LC506586 | -              |
| AIF1-19     | <i>Pseudanabaena</i> sp.     | LC506587 | -              |
| AIF1-22     | <i>Pseudanabaena</i> sp.     | LC506588 | -              |

Dice® (TP600) を用いて PCR を実施し、各株の 2-MIB 合成酵素遺伝子の存在の把握を行った。さらに、後に述べるアンプリコンシーケンス解析の OTU (operational taxonomic units) との、2-MIB 合成酵素遺伝子の配列類似度解析のため、AIFI 株と NIES 株の 2-MIB 合成酵素遺伝子の増幅をプライマーに mibf, mibr (Wang et al. 2015) を用いて行った。PCR 産物のダイレクトシーケンスを、PCR と同じプライマーを用いて 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems™) で実施した。取得したシーケンスはマニュアルでアセンブルし、DDBJ に登録した (表 3-3)。2-MIB 産生 AIFI 株の詳細な系統解析のため、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を、プライマーとして 27f (Lane 1991), ITSCYA225R (Valério et al. 2009), PCR 酵素として Platinum® Taq polymerase を用いて、PCR により増幅した。PCR 産物のダイレクトシーケンスを、CYA371F (Janse et al. 2003), PS16S600r (Niiyama et al. 2016), F3L (Hiraishi et al. 1994), ITSCYA225R (Valério et al. 2009) を用いて、3730xl DNA analyzer で実施した。取得した配列はマニュアルでアセンブルし、DDBJ データベースを BLAST 検索した。取得した配列は DDBJ に登録した (表 3-3)。

## 2-5. 2-MIB 産生シアノバクテリア群集の分子生態学的解析

2-MIB 産生シアノバクテリア群集のアンプリコンシーケンス解析には、2-MIB 合成酵素遺伝子を用いた。2-MIB 合成酵素遺伝子のアンプリコンシーケンス解析は、2-MIB が検出された 2017 年 10 月に、9 地点で採取した湖水で実施した (図 3-1)。アンプリコンシーケンス解析は株式会社生物技研に外注した (<https://gikenbio.com/>)。1st PCR のプライマーは MIBS02F, MIBS02R を用いた。PCR 酵素として

TaKaRa ExTaq® HS (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いた。PCR 条件は、94℃で 2 分間の初期変性後、94℃で 30 秒間、56℃で 30 秒間、72℃で 1 分間を 1 サイクルとして 30 サイクルの増幅反応、72℃で 10 分間の最終伸長とした。2nd PCR は、フォワードプライマーとして 5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC AC [P5 adaptor]-XXXXXXXX [8-mer index]-ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG C [sequencing primer]-3'、リバープライマーとして 5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT [P7 adaptor]-XXXXXXXX [8-mer index]-GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT G [sequencing primer]-3'を用いた。PCR 酵素は ExTaq® HS を用い、PCR 条件は、94℃で 2 分間の初期変性、94℃で 30 秒間、60℃で 30 秒間、72℃で 30 秒間を 1 サイクルとして 12 サイクルの増幅反応、72℃で 5 分間の最終伸長とした。シーケンスは MiSeq® (Illumina)により、2×300 bp ペアエンドの条件で実施した。Fastx toolkit の fastq\_barcode\_splitter を用いて、配列の読み始めが用いたプライマーと完全一致する配列のみを抽出した。抽出した配列からプライマー配列とリード後半 120 塩基を削除した。その後、sickle tools を用いてクオリティー値が 20 未満の配列を取り除き、40 塩基以下の長さとなった配列をペア配列とともに破棄した。ペアエンドマージスクリプト FLASH を用いて、クオリティーフィルタリングを通った配列をマージした。マージの条件は、マージ後の断片長 300 塩基、リードの断片長 180 塩基、最低オーバーラップ長 10 塩基とした。OTU 作成は、usearch を用いて 97%の配列相同性の条件で行った。取得した配列は DDBJ に登録した (Accession No. DRA009137)。

## 2-6. 系統解析

AIFI 株の 16S rRNA 遺伝子，2-MIB 合成酵素遺伝子のアンプリコンシーケンス解析の OTU の系統解析は，MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/> ; Kumar et al. 2016) を用いた。配列のアラインメントは，MEGA7 の MUSCLE で実施してマニュアルでチェックした。系統樹は 1000 回繰返しのブートストラップにより近接接合法で実施した。*Limnothrix planktonica* KLL-C001 clone c (KP726239.1) と *Oscillatoria limosa* LBD 305b (HQ630885.1) を，それぞれ 16S rRNA 遺伝子と 2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹の外群として使用した。

## 2-7. データ，統計解析，バイオインフォマティクス

小川原湖の湖中央 (No.G) における 2-MIB 濃度を，国交省による水文水質データベース (<http://www1.river.go.jp/>) より引用した。ピアソンの積率相関係数は統計ソフト R (ver. 3.6.0 ; R Core Team, 2019 ; 以降 R と記載) の `cor.test` 関数により算出した。アンプリコンシーケンス解析における各 OTU の分類推定は Claident ver. 0.2 (Tanabe and Toju 2013 ; Tanabe 2018) により実施した。

## 3. 結果

### 3-1. 湖水中の MOPPL-シアノバクテリア密度と 2-MIB 濃度の関係

シアノバクテリアの細胞死亡後の生分解による 2-MIB 放出のタイムラグを考慮するため，MOPPL-シアノバクテリア密度と 12 か月後までの 2-MIB 濃度との相関分析を行い，決定係数を算出した。MOPPL-シアノバクテリア密度は 0 か月～4 か月後の 2-MIB 濃度と

有意な相関を示したが，決定係数は最大でも 0.241（2 か月後）であり，MOPPL-シアノバクテリアは 2-MIB 濃度の変動を十分に説明できなかった（表 3-4，図 3-2）。

### 3-2. 検鏡法と qPCR 法で求めた 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* 密度の比較

2017 年には，St.19 において，1 月，10 月に MOPPL-シアノバクテリア（検鏡法）が検出されたが，2-MIB 産生 *Pseudanabaena*（qPCR 法）は 10 月のみ検出された（図 3-3）。10 月の糸状体密度の空間分布は，水域により異なっていた。2-MIB 産生 *Pseudanabaena* が検出された 10 月の全定点，および 1 月，4 月，7 月の St.19 における MOPPL-シアノバクテリア密度（検鏡法）と 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* 密度（qPCR 法）をプロットすると，これらの間に有意な相関が見いだされた（ $r^2 = 0.58$ ， $p < 0.01$ ；図 3-4）。しかし，回帰直線の傾きは 0.08 であったことから，qPCR 法により求めた 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* 密度は，検鏡法で求めた MOPPL-シアノバクテリアのわずか 8%程度であったと推察された。

### 3-3. MOPPL-シアノバクテリアの分子生態学的解析

小川原湖とその接続水域から単離した MOPPL-シアノバクテリアの 8 株の 16S rRNA の V3-V4 領域（405 bp）の BLAST 検索を行った結果，AIFI-3，AIFI-4，AIFI-5，AIFI-6，AIFI-7 の最近似配列は *Pseudanabaena* sp.（100.0%；LC314134.1/LC314136.1）であった。AIFI-22 は *P. cinerea/galeata* が最近似配列であった（100.0%；*P. cinerea*，LC314116.1/LC314118.1/ LC314120.1/LC314122.1，および *P. galeata*，

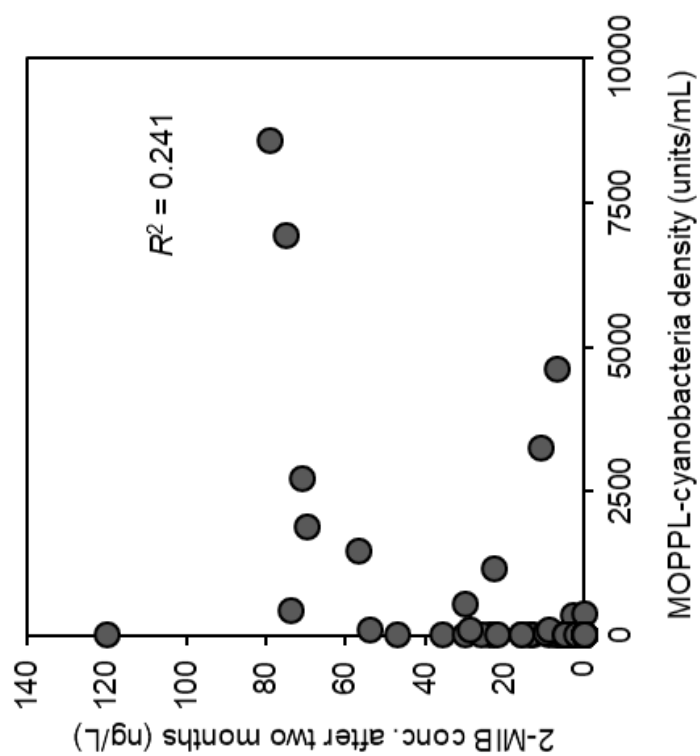


図3-2. MOPPL-シアノバクテリア密度と2か月後の2-MIB濃度の関係

表3-4. MOPPL-シアノバクテリアと2-MIB濃度（+タイムラグ（月））の決定係数

|              |         | 2-MIB conc. in lake water (+time lag of month) |           |           |          |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------|---------|--|-----------|-----------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|              |         | 0  | +1        | +2        | +3       | +4    | +5    | +6    | +7    | +8    | +9    | +10   | +11   | +12   |
| MOPPL-       |         |  |           |           |          |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| cyanobacteri | 0.080 * | 0.065 *  | 0.241 *** | 0.177 *** | 0.161 ** | 0.025 | 0.001 | 0.005 | 0.022 | 0.024 | 0.010 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| a density    |         |  |           |           |          |       |       |       |       |       |       |       |       |       |

\*, \*\*, \*\*\*は、それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ での有意な相関

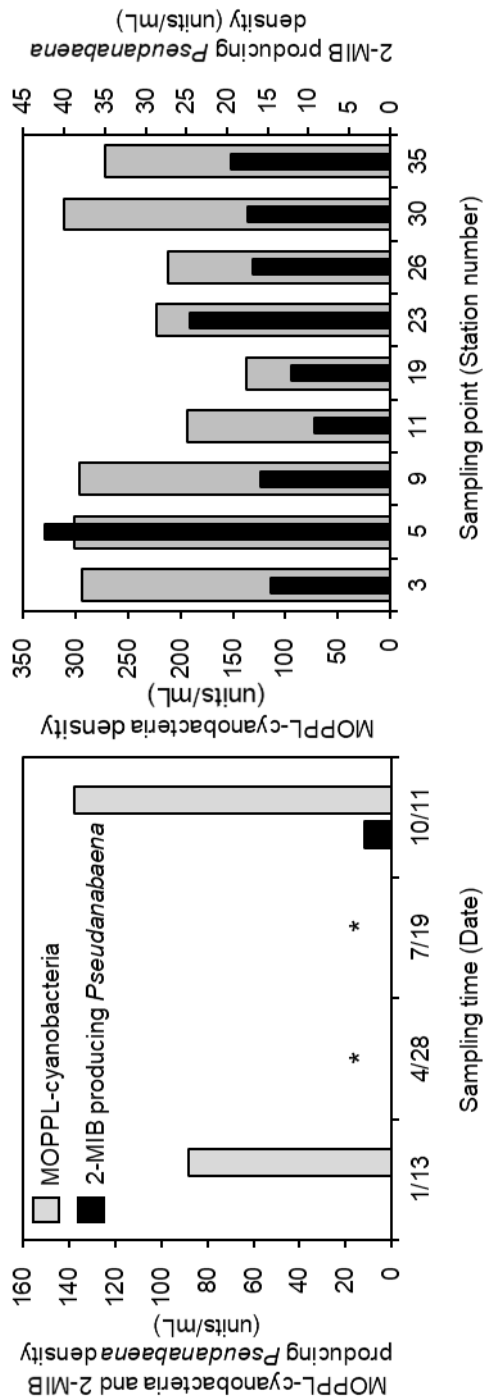


図3-3. 月別、地点別の検鏡法により求めたMOPPL-シアノバクテリア密度とリアルタイムPCRにより求めた2-MIB産生*Pseudanabaena*密度  
 左図：St.19，右図：2017年10月の9地点

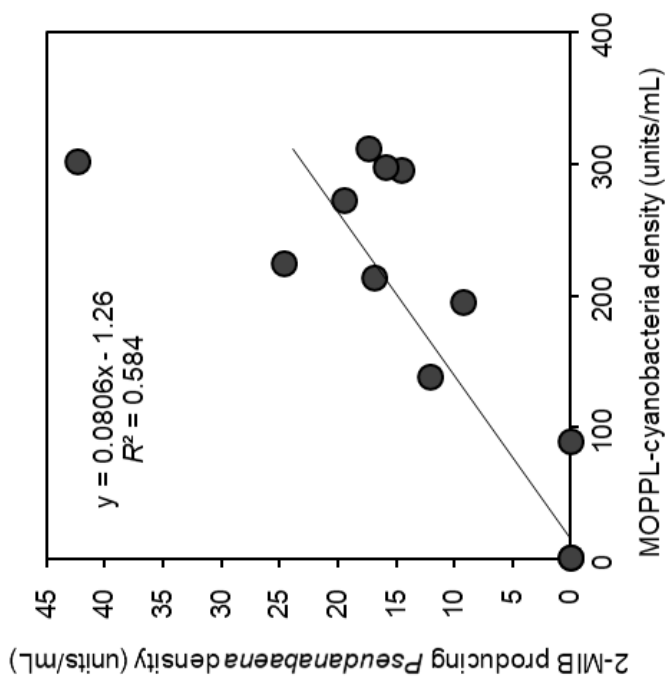


図3-4. 検鏡法により求めたMOPPL-シアノバクテリア密度とリアルタイムPCRにより求めた2-MIB産生*Pseudanabaena*密度の関係  
実線は回帰直線を示す

LC085885.1/KM386853.1/MN128993.1)。AIFI-18 と AIFI-19 は *Pseudanabaena* sp. (100.0% ; LC016775.1/KX263938.1) が最近似配列であった。2-MIB 合成酵素遺伝子を使用した PCR の結果, AIFI-3, AIFI-4, AIFI-5, AIFI-6, AIFI-7 で同遺伝子が検出されたが, AIFI-18, AIFI-19, AIFI-22 では検出されなかった。AIFI 株の系統樹解析の結果, 8 株は 3 クレードに類別され, (1) AIFI-3-7, (2) AIFI-18-19, (3) AIFI-22 であった (図 3-5)。BLAST による AIFI 株間での類似性解析を実施した結果, (1) と (2) は 97.8%, (1) と (3) は 98.3%, (2) と (3) は 97.3%であった (表 3-5)。

#### 3-4. 2-MIB 発生時の 2-MIB 合成酵素遺伝子のアンプリコンシーケンス解析

2017 年 10 月の 9 地点で採取した湖水の 2-MIB 合成酵素遺伝子のアンプリコンシーケンス解析の結果, 各地点でのリード数は 49,627 ~ 69,874 リード (平均 61,587 リード) であり, 総 OTU 数は 112 であった。2-MIB 合成酵素遺伝子以外の非特異的増幅や, 1%未満の OTU を除去した結果, 43,347 ~ 69,871 リード (平均 60,848 リード), 2 つの OTU が残った。除去した OTU のリード比率は, 1 地点 (St. 11, 13%) 以外は 0.19%未満であった。Claident v0.2 により, 残った 2OTU は *Pseudanabaena* sp.と推定された (表 3-6)。OTU-1 の最近似配列は BLAST 検索では *P. limnetica* str. Castaic Lake (HQ630883.1) であり, 類似性は 99.6%であった。一方, OTU-2 の最近似配列は *P. yagii* NIVA-CYA 111 (HQ630887.1) であり, 類似性は 100%であった。OTU-1 のリード比率は全地点で 98.8%以上であった一方, OTU-2 は 3 地点でのみ出現し, リード比率は St. 11 (1.2%), St. 30 (<1%),

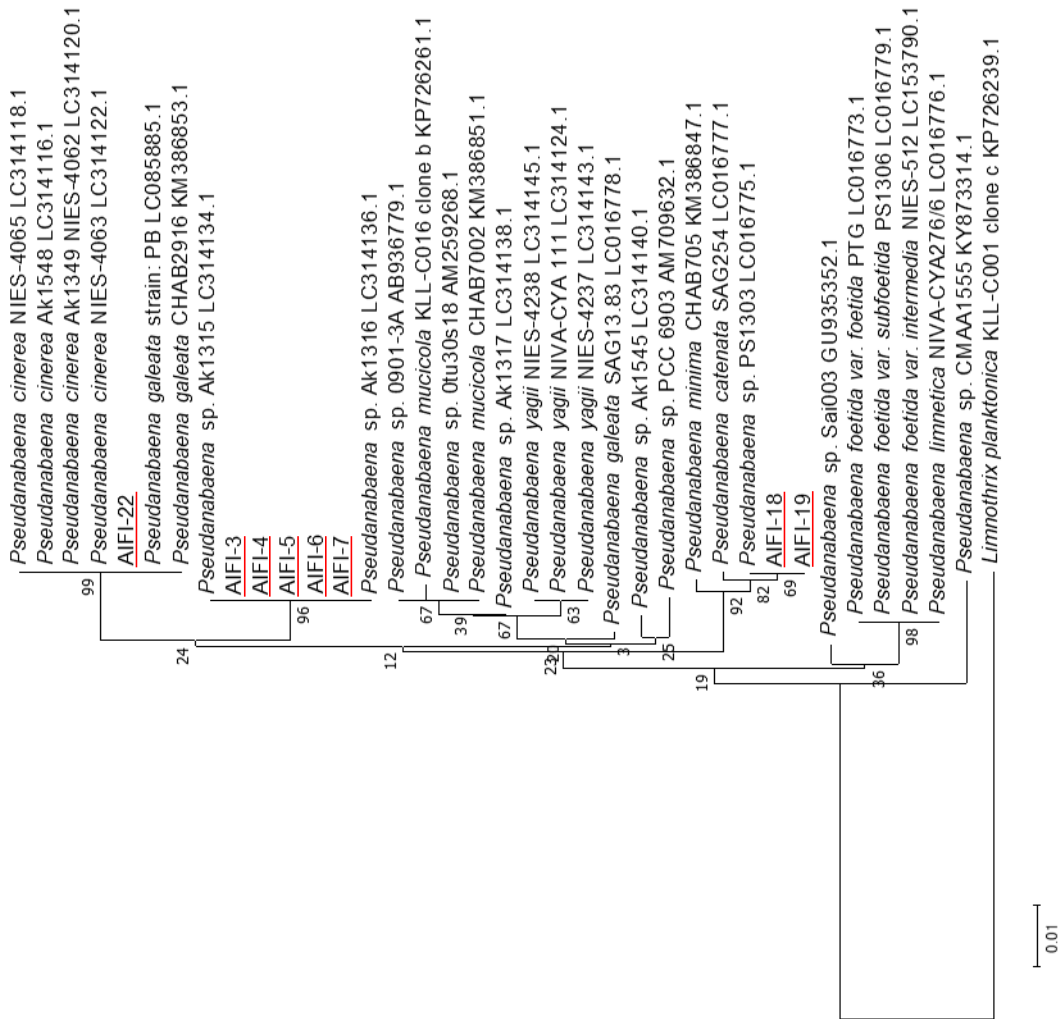


図3-5. 16S rRNAのV3-V4領域遺伝子配列（410bp）に基づいた近隣結合法による系統樹  
分岐の数字はブートストラップ値  
赤下線：本章で配列取得したAIFI株

表3-5. AIFI株間の16S rRNAのV3-V4領域遺伝子配列の類似性行列

|         | AIFI-3 | AIFI-4 | AIFI-5 | AIFI-6 | AIFI-7 | AIFI-18 | AIFI-19 |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| AIFI-4  | 100.0  |        |        |        |        |         |         |
| AIFI-5  | 100.0  | 100.0  |        |        |        |         |         |
| AIFI-6  | 100.0  | 100.0  | 100.0  |        |        |         |         |
| AIFI-7  | 100.0  | 100.0  | 100.0  | 100.0  |        |         |         |
| AIFI-18 | 97.8   | 97.8   | 97.8   | 97.8   | 97.8   |         |         |
| AIFI-19 | 97.8   | 97.8   | 97.8   | 97.8   | 97.8   | 100.0   |         |
| AIFI-22 | 98.3   | 98.3   | 98.3   | 98.3   | 98.3   | 97.3    | 97.3    |

表3-6. 2-MIB 合成酵素遺伝子のアンプリコンシーケンス解析で得られたOTUの分類（2017年10月）

|       | Claident                 | web BLAST  | similarity | Most similar strains used in this study      | similarity |
|-------|--------------------------|--|------------|--|------------|
| OTU-1 | <i>Pseudanabaena</i> sp. | <i>Pseudanabaena limnetica</i> str. Castaic Lake | 99.6%      | <i>Pseudanabaena cinerea</i> NIES-4062, 4063 | 100.0%     |
| OTU-2 | <i>Pseudanabaena</i> sp. | <i>Pseudanabaena yagiji</i> NIVA-CYA 111         | 100.0%     | <i>Pseudanabaena</i> sp. AIF1-4              | 100.0%     |

St. 35 (<1%) であった (表 3-7)。

### 3-5. 小川原湖における 2-MIB 産生シアノバクテリア株の遺伝的類似性

AIFI 株と NIES 株の中で、OTU-1 の最近似配列は、小川原湖でも存在が確認された新種 (Tuji and Niiyama 2018) の、*P. cinerea* NIES-4062/4063 であった (類似性 100%)。OTU-2 の最近似配列は *Pseudanabaena* sp. AIFI-4 で類似性は 100% であった (表 3-6)。また、OTU-1 と OTU-2 の系統解析の結果、両者は別々のクレードに属した (図 3-6)。

2-MIB 合成酵素遺伝子を有していた *Pseudanabaena* sp. AIFI-4 のより詳細な系統解析のため、ほぼ全長の 16S rRNA (1450 bp) の BLAST 検索を実施した結果、最も近い配列は *Pseudanabaena* sp. AK1315/AK1316 (LC314134.1/LC314136.1) であり、類似性は 100.0% であった。*Pseudanabaena* sp. AIFI-4 と *P. cinerea* NIES-4062/4063 の類似性は 97.8% であった。16S rRNA 遺伝子 (1421bp) の系統樹解析の結果、AIFI-4 は *P. cinerea* NIES-4062/4063 と別のクレードに属した (図 3-7)。

## 4. 考察

### 4-1. 検鏡による 2-MIB 産生シアノバクテリアの定量

近年の分子生態学的手法の発展により、*Pseudanabaena* は以前考えられていたよりも多様性が高く、そのため分類体系が大きく変遷している。以前は別の種に分類されていた株が、新しい種に登録される事例も出てきている (Niiyama et al. 2016)。このような分類体

表3-7. 2-MIB合成酵素遺伝子のアンプリコンシーケンス解析で得られた  
OTUの定点別リード数比率組成（2017年10月）

|       | St.3    | St.5    | St.9    | St.11   | St.19   | St.23   | St.26   | St.30   | St.35   |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| OTU-1 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 0.98828 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 0.99995 | 0.99642 |
| OTU-2 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.01172 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00000 | 0.00005 | 0.00358 |

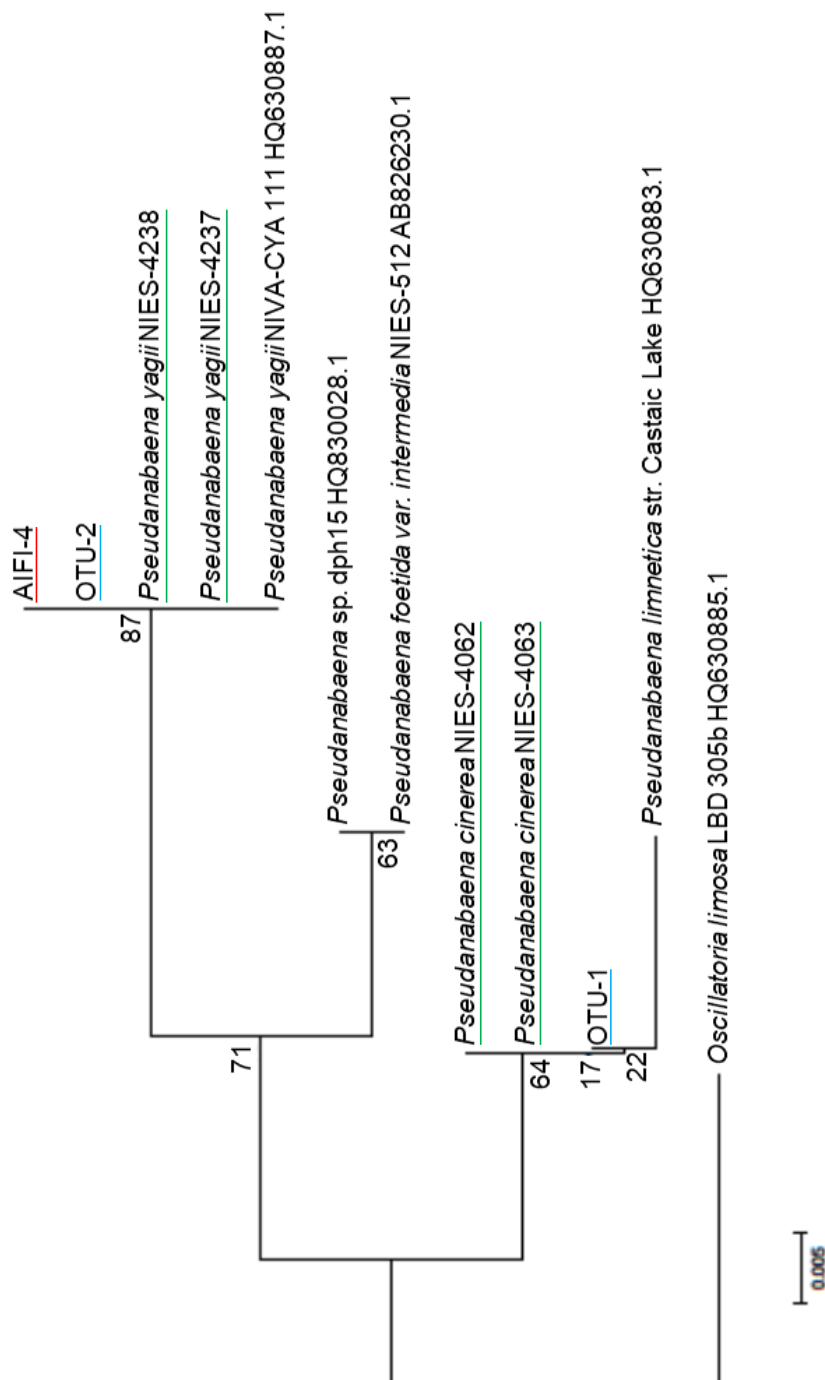


図3-6. 2-MIB合成酵素遺伝子のアミノ酸配列（216bp）に基づいた近隣結合法による系統樹  
 分岐の数字はブートストラップ値  
 赤下線：本章で配列取得したAIFI株  
 緑下線：本章で配列取得したNIES株  
 青下線：本章で2-MIB合成酵素遺伝子のアンプリコンシーケンス解析により取得したOTU

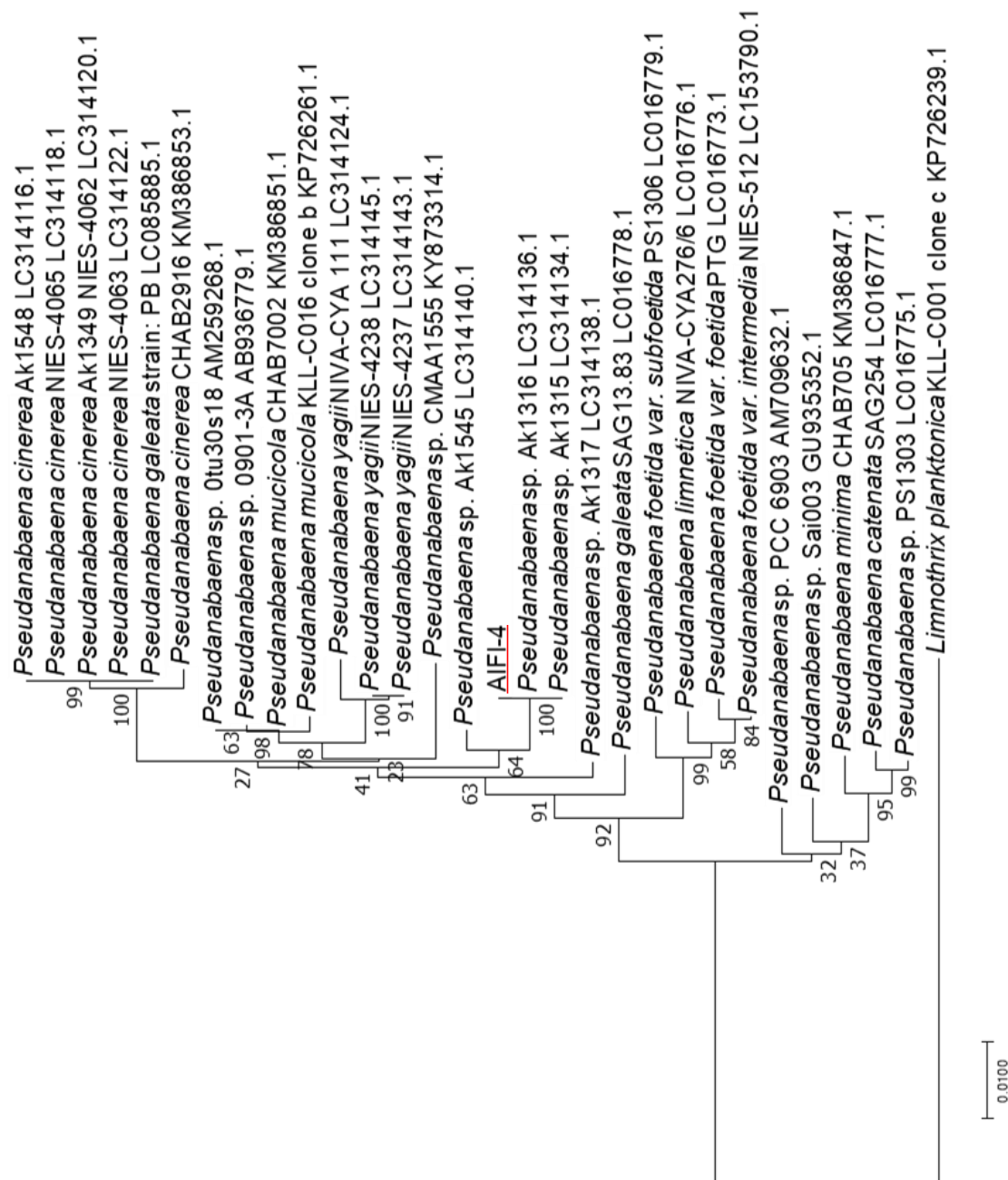


図3-7. 16S rRNA遺伝子配列（1421bp）に基づいた近隣結合法による系統樹  
 分岐の数字はブートストラップ値  
 赤下線：本章で配列取得したAIFI株

系の変遷に伴って行われてきた分類法の研究の中で、検鏡観察のみで種分類することが難しいことが明らかとなっており、分子生態学的手法を併用して分類することが推奨されている（辻・新山 2018）。そこで、本研究は、伝統的な検鏡法による長期間の MOPPL-シアノバクテリアのモニタリングから、その出現の時期的変化を明らかにするとともに、2-MIB 産生 *Pseudanabaena* の量的、および組成的な特徴について、リアルタイム PCR や次世代シーケンス解析などの分子生態学的手法により検討した。

2-MIB 濃度は MOPPL-シアノバクテリア密度と有意な関係があり、2 か月後の 2-MIB 濃度と MOPPL-シアノバクテリア密度の決定係数が最も高かった（表 3-4）。2 か月後の 2-MIB 濃度である理由としては、シアノバクテリアからの 2-MIB の多くが、シアノバクテリアの細胞の死滅、生分解されるときに放出されることに起因していると考えられる（Srinivasan and Sorial 2011）。しかし、その値は 0.241 であり、MOPPL-シアノバクテリア密度では 2-MIB 濃度を最大 24%しか説明できなかった。そのような低い相関は既往の研究でも報告されている（工藤ら 2004；佐藤・天野 2007）。この理由について、2-MIB を産生しないシアノバクテリアも MOPPL-シアノバクテリアとして計数している可能性が考えられている。実際、2-MIB 産生 *Pseudanabaena* と MOPPL-シアノバクテリアの関係を解析すると、これらの間に有意な相関が得られはしたものの、2-MIB 産生 *Pseudanabaena* 密度は MOPPL-シアノバクテリアのわずか約 8%であり、また MOPPL-シアノバクテリア密度は 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* 密度の変動の 58%を説明し、その関係にはばらつきが見られた（図 3-4）。そのため、MOPPL-シアノバクテリアには比較的多くの 2-MIB

非産生種/株が含まれていたと考えられる。これを支持するように、8 株の MOPPL-シアノバクテリアは、16S rRNA による系統樹において 3 クレードに属し、1 クレードに属する 5 株—AIFI-3, -4, -5, -6, -7—のみが、2-MIB 合成酵素遺伝子を有していた。

検鏡法は、MOPPL-シアノバクテリア密度を計測するために伝統的に用いられており、湖の水文・水質データや気象データを合わせて長期に渡るデータの蓄積がある。これらのデータは、2-MIB 産生シアノバクテリアの発生を定性的に予測するに当たり、非常に有用である（第 1 章）。しかし、2-MIB 産生 *Pseudanabaena* の定量的変化を言及するには、信頼性が足りていない。実際、MOPPL-シアノバクテリア密度と 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* 密度には有意な相関があったものの、2-MIB 産生 *Pseudanabaena* 密度は MOPPL-シアノバクテリアのわずか約 8%であった。それゆえに、検鏡法の信頼性は、MOPPL-シアノバクテリアの種/株的組成に大いに影響を受け、検鏡法により取得した定量値は、2-MIB 非産生 *Pseudanabaena* を含んだ 2-MIB 産生種“様” *Pseudanabaena* であることに留意すべきと考えられる。MOPPL-シアノバクテリア密度と 2-MIB 濃度の間の弱い関係は他の湖沼でも確認されており、2-MIB 非産生株も計数していることが示唆されている（工藤ら 2004；佐藤・天野 2007）。さらに、*Pseudanabaena* の 2-MIB 産生能の有無は種レベルで異なることが知られているが、検鏡法のみでは種レベルで同定することは非常に難しい（辻・新山 2018）。よって、単離株の分類においてのみならず、2-MIB 産生 *Pseudanabaena* の生態を解明し、効率的な 2-MIB 対策を実施するためにも、検鏡法は分子生態学的手法を併用して実施すべきと考えられる。

#### 4-2. 分子生態学的アプローチ—小川原湖の 2-MIB 産生シアノバクテリアの生態を理解する強力な手がかり

研究当初は、検鏡値と 2-MIB 濃度、検鏡値と qPCR 値の不明瞭な関係性から、*Pseudanabaena* 以外の 2-MIB 産生シアノバクテリアが存在することを予想していた。しかし、アンプリコンシーケンス解析の結果から、2017 年の小川原湖における 2-MIB 産生種は 2 つの OTU の *Pseudanabaena* のみであることが示唆された。この属は長期に渡りモニタリング対象としてきた属である。これらの OTU を AIFI 株や NIES 株と比較すると、OTU-1 と OTU-2 は、それぞれ *P. cinerea* (NIES-4062/4063) と *Pseudanabaena* sp. AIFI-4 と完全に一致した。*P. cinerea* (NIES-4062/4063) と *Pseudanabaena* sp. AIFI-4 は、16S rRNA 遺伝子 (1450bp) の配列類似性が 97.8%であり、系統樹では異なるクレードに属した。*Pseudanabaena* sp. AIFI-4 は小川原湖に流入する接続水域である姉沼から単離された株である。よって、Tuji and Niiyama (2018) によって小川原湖からも報告された *P. cinerea* の他に、少なくとももう 1 株、*Pseudanabaena* AIFI-4 という、16S rRNA と 2-MIB 合成酵素遺伝子の異なる株が小川原湖には存在すると考えられた。

これらの生態学的特徴の違いについて以下に述べる。まず、OTU-1 と OTU-2 が単離された時期が異なっている。つまり、OTU-1 と高い相同性を示した NIES 株の *P. cinerea* は 11 月に単離されており、OTU-2 と高い相同性を示した *Pseudanabaena* sp. AIFI-4 は 6 月に単離されている。加えて、光環境への適応性に関連する細胞の色が 2 株では異なり、OTU-1 と高い相同性を有する *P. cinerea* は灰緑色か

ら灰色である一方，OTU-2 と高い相同性の *Pseudanabaena* sp. AIFI-4 は青緑色である。よって，両株の適した光環境は異なると考えられる。さらに 2-MIB が検出されたときの 2017 年 10 月の両株の分布パターンは異なり，OTU-1 は全ての採水地点で優占していたが，OTU-2 は 3 地点でのみ検出された。このような両株の時期的，空間的な分布様式の違い，また細胞色の違いを考慮すると，小川原湖における 2-MIB 産生株の 2 株の増殖特性は異なる可能性がある。

2-MIB 産生 *Pseudanabaena* は，日本ではしばしば *Phormidium* と呼ばれてきた (Izaguirre et al. 1999 ; Izaguirre and Taylor 2004 ; Niiyama et al. 2016 ; Tuji and Niiyama 2018)。他の湖沼でも，*Phormidium* や *Pseudanabaena* として報告されてきた 2-MIB 産生シアノバクテリアが，年に複数回のピークを有し，出現時期が年により異なることが報告されている (工藤ら 2004 ; 鈴木ら 2011 ; Chong et al. 2018)。これには種/株の遷移が関係している可能性がある。そのため，小川原湖の *Pseudanabaena* の動態要因を解明し，その出現を予測するには，その動態を株レベルで追うことが必要であろう。

上記してきたように，検鏡法で計数される MOPPL-シアノバクテリアは 2-MIB 産生株と 2-MIB 非産生株を含んでおり，また 2-MIB 産生株の中でも，優占株が季節的に遷移している可能性が考えられてきたが (及川ら 2000 ; Oikawa and Ishibashi 2004)，この現象について定量的に解析を行った事例はなかった。この観点で，本研究は MOPPL-シアノバクテリア中の 2-MIB 産生株，さらにそれらの組成の変動を定量的に評価した初めての事例である。さらに，リアルタイム PCR とアンプリコンシーケンス解析を用いて，2-MIB 産生シアノバクテリアの動態の株レベルでの把握の実現可能性を実証し，高

精度の予測と 2-MIB 産生シアノバクテリア対策に光を当てた意義の高いものである。

本研究でアンプリコンシーケンス解析に用いた湖水サンプルは 2017 年の 10 月のサンプルであり，2 つの OTU の MOPPL-シアノバクテリア中の比率の季節および経年変動は考慮していない。したがって，その組成が水質や気象条件に影響を受ける可能性があるため，小川原湖における 2-MIB 産生シアノバクテリアの動態を完全に理解するためには，さらなる研究が必要である。出現株の変動を考慮せずに水質や気象条件との関係を解析した場合，誤った解釈につながる可能性がある。これまで，*Pseudanabaena* の出現に関する研究は，ほとんどが *Pseudanabaena* sp./spp.を単一の生態的特性と仮定して実施されてきている。今後，*Pseudanabaena* sp./spp.を株レベルで追跡することで，株レベルで異なる，水環境や気象との明瞭な関係性の解明が可能になると期待される。

## 5. 結論

2-MIB 合成酵素遺伝子の qPCR，及び検鏡観察によると，qPCR により求めた 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* 密度は，検鏡観察により求めた MOPPL-シアノバクテリア密度の約 8%であった。さらに，2-MIB 合成酵素遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンス解析では，2017 年 10 月の小川原湖では，一つの OTU に占められており，特定の *Pseudanabaena* 株が 2-MIB 産生に関わっていたと推察された。しかしながら，いくつかの地点では異なる OTU も検出された。この結果は，小川原湖では，検鏡法ではとらえきれない 2-MIB 産生 *Pseudanabaena* の変動が，種/株レベルで生じていることを示唆して

いる。

## 第 4 章

### 総合考察

#### 1. 小川原湖における 2-MIB 産生シアノバクテリアの出現時の特徴

本研究は、水産業が盛んな汽水湖—小川原湖—における、2-MIB の発生予測と発生制御を目的としたものである。実験的研究に先んじて、湖沼水質や気象に関する長期観測データから、水質、気象等の環境因子と 2-MIB および 2-MIB 産生シアノバクテリア出現の関係性を解明することが、2-MIB 問題解決のための 1 つのマイルストーンになるという研究戦略の下、(1) 湖外因子(気象等)—水質—2-MIB 発生という一連のプロセスを包括的に明らかにすること、さらに、(2) 2-MIB 発生の定量的予測や抑制対策に必要な、2-MIB 産生シアノバクテリアの、株レベルでの精度の高い動態把握手法を検討することを目的とした。

(1) に関して、汽水湖の大きな特徴である塩分と 2-MIB 発生との間に、強い関連性を見出し、高塩分(4 月～9 月平均:1.3‰～2.0‰)年に、2-MIB の発生頻度が高いことを明らかにした(第 1 章、第 2 章)。また、高塩分の水質形成要因として、冬季の温暖な気象や、海水侵入量の増加による塩分躍層水深の上昇が関与していることを突き止めた。窒素、リンといった多量栄養塩はその大部分が高塩分層内に存在するため、それらの濃度は、高塩分層と混合層(表層水)との混合程度—塩分が良い指標となる—と密接に関連し、高塩分時には、低窒素濃度、高リン濃度となる傾向を明らかにした。これらの機序としては、真冬日の少ない冬季温暖年には融雪水による塩分希釈作用が弱まること、また、結氷が減少することにより、鉛直循

環が増加し，それに伴い高塩分層からのリン供給量や表層水中での硝酸の脱窒量が増加すること，さらに，それらは，塩分躍層水深（高塩分層体積）が上昇することで，より促進されることを明らかにした。これらの発見は，貯水池やダム湖等の淡水湖沼における従来の研究では確認されていない事象であり，冷温帯に属する汽水湖の水質変動の特徴をよく反映したものと考えられる。また上記してきたように，小川原湖では塩分，窒素，リンと 2-MIB の発生は密接な関係を有しているため，これらの変数のうち，塩分と他の 1 因子のみで，各年の漁業被害が生じるレベルでの 2-MIB の発生について，高精度な予測モデルを構築することができた。以上のように，長期観測データを利用することで，気象等が水質変動を通して 2-MIB を発生させる一連のプロセスが明らかとなり，さらに 2-MIB の発生予測モデルを構築することができた（図 4-1）。本研究は，現場の観測データの詳細な解析が，2-MIB の発生要因の絞り込みや，予測モデルの開発に非常に有用であることを示すものである。

（2）に関しては，2-MIB 産生 *Pseudanabaena* の生態や，2-MIB 発生予測モデルをさらに定量的予測モデルに発展させるために必要となる，2-MIB 産生シアノバクテリアの定量手法について分子生態学的手法を取り入れて検討した（第 3 章）。従来の検鏡法は，2-MIB 非産生種をかなり含んで計数しており，たとえば，本研究の対象年（2017 年）では，2-MIB 産生株は検鏡値のわずか 8%しか含まれていないことを明らかにした。さらに，小川原湖には，16S rRNA や 2-MIB 合成酵素遺伝子の配列が異なる 2 株の 2-MIB 産生株が存在することを示し，2-MIB 産生シアノバクテリアに特化した定量，さらに 2-MIB 産生シアノバクテリアの株レベルの動態把握には，分子生態

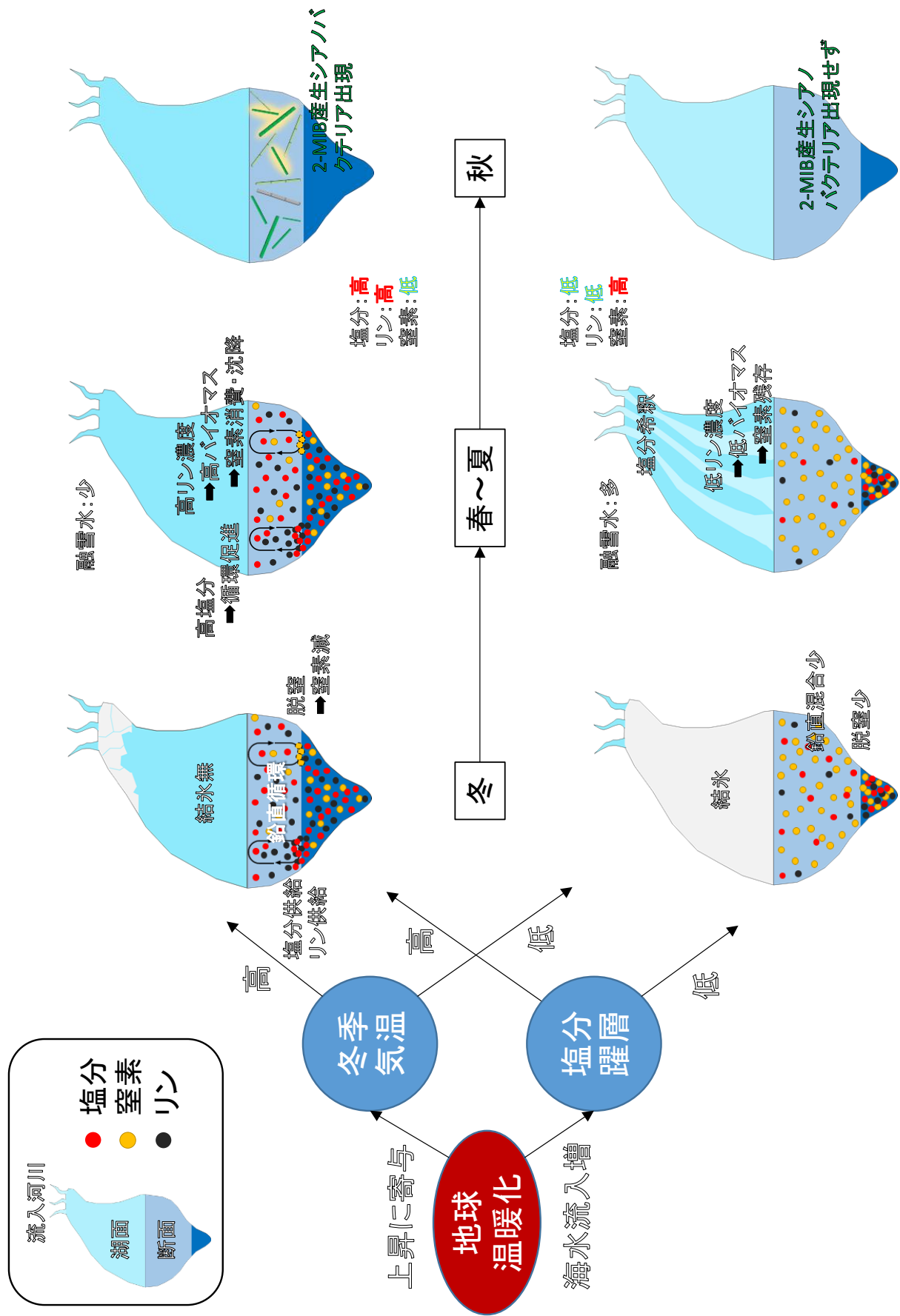


図4-1. 2-MIB産生シアノバクテリアの出現に至るまでのプロセス（小川原湖）

学的手法が有用であることを示した（図 4-2）。

上記のように，本研究では 2-MIB 発生と関連する水質を明らかにし，さらに水質の上流の因子を明らかにすることで，近年の小川原湖における 2-MIB 発生の大元の要因として，気象や海水侵入の影響を明らかにした。本研究で提示した研究プロセスや，2-MIB 産生シアノバクテリアの動態把握手法は，これまで研究がほとんど行われていない汽水湖のみならず，水源水域である淡水湖沼においても非常に有用なロールモデルとなると考えられる。

## 2. これからの 2-MIB 産生シアノバクテリアの研究展開

本研究は，2-MIB の発生予測と発生制御を最終目的としたものである。目的を達成する過程の中で，本研究では，「湖沼の水質・気象やカビ臭産生シアノバクテリアに関する現場調査や長期観測データから，その関係性を解明する」という，1 つのマイルストーンに達することができた。そこで，「*in situ* の微生物群集の中での 2-MIB 産生シアノバクテリアの増殖特性—水質との関係—を解明する」ことを，次のマイルストーンとして考える。

これまで行われてきた 2-MIB 産生シアノバクテリアの増殖特性に関する培養試験は，純粋培養系において水温，栄養塩，光環境等を制御するか，または現場から得られた湖水に栄養塩を添加したり，濾過した現場水に単離培養株を添加して増殖特性を把握する試験であった（工藤ら 2004 b；横山・山下 2007a；横山・山下 2007b；高橋ら 2016）。しかし，湖沼では植物プランクトン間の競合が増殖に大きく影響するため，純粋培養系における 2-MIB 産生シアノバクテリアの増殖特性が，そのまま環境中でも当てはまる可能性は低い。

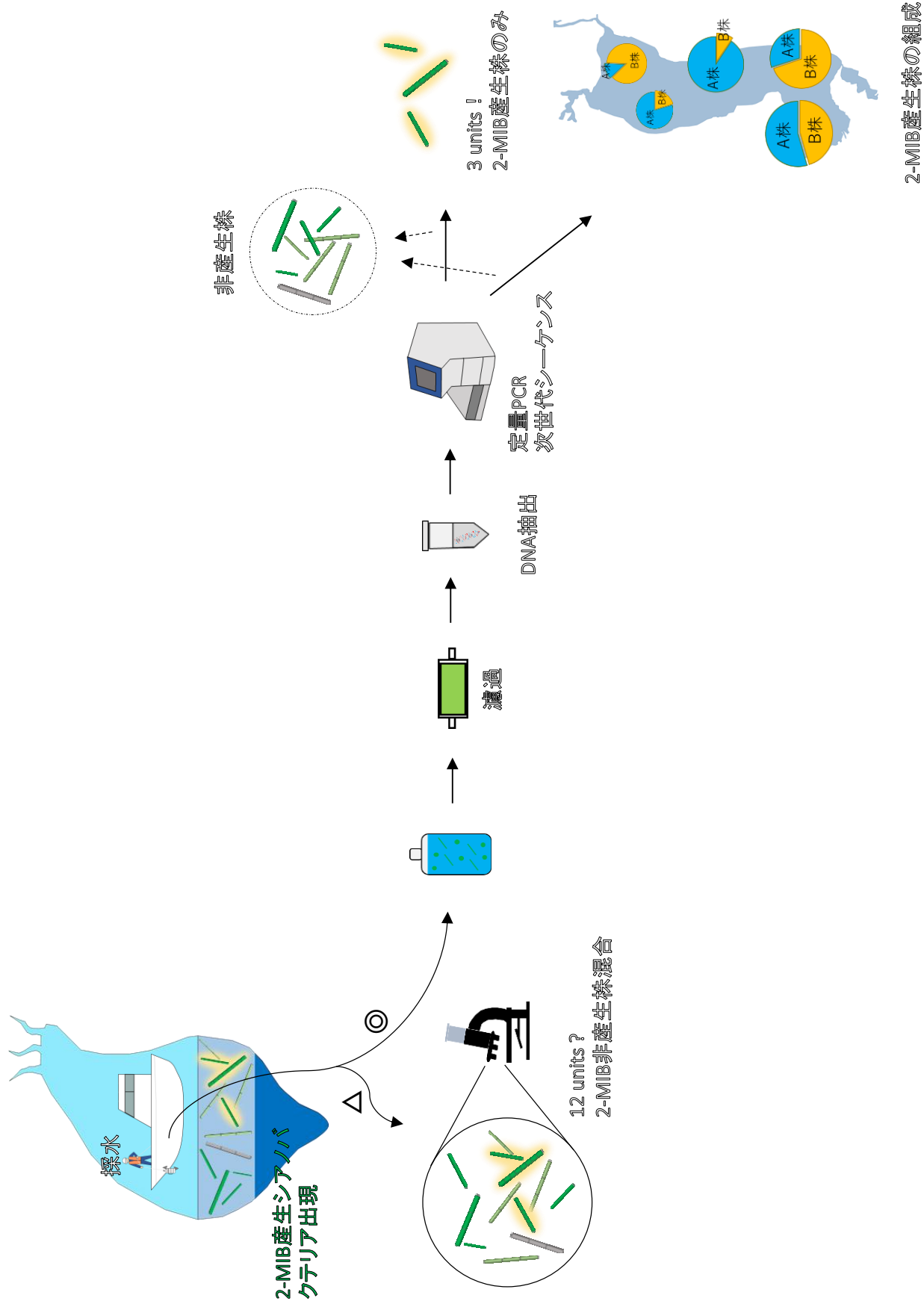


図4-2. 分子生態学的手法による2-MIB産生シアノバクテリアの動態把握

一方、現場水に栄養塩等を添加した、*in situ* のシアノバクテリア群集を培養する実験において、群集組成の把握に主に検鏡が用いられてきたが（横山・山下 2007a；横山・山下 2007b），その場合，本研究の第 3 章で示したような検鏡による定量性の問題が生じている可能性が高い。実際，検鏡により 2-MIB 産生シアノバクテリアである *Phormidium* の増殖が確認されても，2-MIB がほとんど検出されない事例が報告されている（横山・山下 2007b）。これらのことを鑑みると，今後は，*in situ* のシアノバクテリア群集を対象に培養試験を行う際は，分子生態学的手法を導入することで，2-MIB 産生シアノバクテリアの動態を詳細に明らかにできると期待される。そして，培養試験の設計においては，現場調査やモニタリングデータの解析結果を基にすることで，適切な 2-MIB 発生機序の解明および発生抑制策の開発につながることを期待される。

### 3. 地球温暖化の影響

本研究では 2-MIB 発生と関連する水質，水質の上流の因子を明らかにすることで，近年，小川原湖において 2-MIB が発生した大元の要因として，冬季の温暖な気象や海水侵入の影響を明らかにした。これらは，地球温暖化に伴う，地球規模の気候変動の影響を大きく受ける。そこで，小川原湖における 2-MIB の将来的な動態について考察した。

地球温暖化に伴い，年平均気温は，青森で 100 年あたり 1.9℃，むつで 50 年あたり 0.7℃，深浦で 50 年あたり 0.3℃，八戸で 50 年あたり 0.9℃の割合で上昇している（仙台管区气象台 2016）。また，冬季（前年 12 月～2 月）の平均気温は，年平均気温よりも上昇速度が速

く、青森で 100 年あたり 2.1℃、むつで 50 年あたり 0.9℃、深浦で 50 年あたり 0.7℃、八戸で 50 年あたり 1.2℃の割合で上昇している。冬の降水量に関しては、むつ、八戸で、それぞれ 50 年あたり 49.9mm、46.6mm の割合で減少している。一方、降雪の深さの合計、年最深積雪深には、むつを除いて、長期的な傾向は確認されていないものの、東北地方の年降雪量、最深積雪の将来予測では、いずれの地域においても明確な減少が予測されている（仙台管区気象台 2016）。これらの予測から、小川原湖においては冬季の結氷期間および結氷面積の減少、また小川原湖の流域においては融雪水の減少が予想される。また、世界平均海面水位の平均上昇率は、1901 から 2010 年の期間で 1 年あたり 1.7 [1.5～1.9] mm、1971～2010 年の期間で 1 年あたり 2.0 [1.7～2.3] mm、1993～2010 年の期間で 1 年あたり 3.2 [2.8～3.6] mm であった可能性が非常に高いことが報告されており（Stocker et al. 2013）、世界の海面水位に明確な上昇傾向が確認されている。日本沿岸では 1906 年～2017 年の期間では、明瞭な上昇傾向はみられないものの、1960 年以降でみると、上昇傾向が確認され、北海道・東北地方沿岸では、1971 年～2010 年で 1 年あたり 1.4 [1.0～1.9] mm、1993 年～2010 年で 1 年あたり 2.2 [0.8～3.7] mm の上昇率であった（仙台管区気象台 2016）。沿岸域の海水位の上昇は、小川原湖への海水の浸入イベントを増加させると考えられ、よって、地球温暖化は小川原湖の高塩分層の拡大（塩分躍層水深の上昇）につながる可能性がある。

小川原湖は冷温帯に属し、冬季（12 月～2 月）の平均気温が 0℃付近である（図 4-3）ため、冬季結氷の有無や規模は、冬季気温により大きく年変動する。また、小川原湖は汽水湖であり、海水位が湖

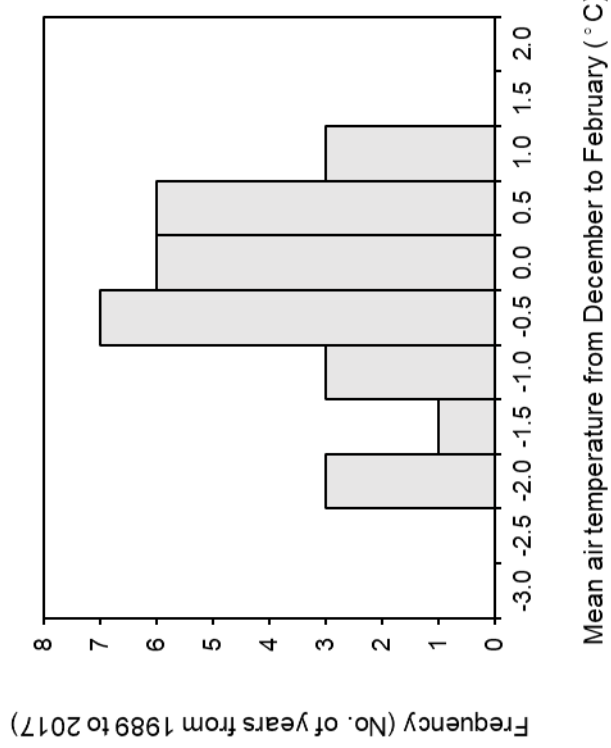


図4-3. 1989年～2017年の冬期（12月～2月）の日平均気温の頻度分布

水位を上回る期間が長期化すると、海水の湖への遡上、侵入が生じる。小川原湖は最大水深が 26m であり、侵入した海水が湖深部に滞留する。このように形成された高塩分層には、高濃度の栄養塩類や塩分が蓄積し、これらの上層の混合層への供給のしやすさは、塩分躍層水深（高塩分層体積）に影響を受ける。本研究より、小川原湖において冬季の結氷の程度や融雪水量が低下し、塩分躍層水深の上昇が生じると、高塩分、高リン濃度、低窒素濃度で代表される水質が形成され、このような水質時に 2-MIB が発生することが明らかとなった。よって、地球温暖化は、小川原湖における 2-MIB 発生イベントを増加させると予想される（図 4-1）。

しかし、地球温暖化が 2-MIB イベントにどのような影響をもたらすかは、湖沼によって異なると考えられる。小川原湖は最大水深が 26m と、日本の汽水湖の中では福井県の日向湖、水月湖、鹿児島県の海鼠湖に続いて 4 番目に深い汽水湖であり（環境省 2014）、侵入した海水が湖深部に滞留しやすい構造を持つ。また、このような構造も影響し、表層塩分は 0.6‰～2.6‰と低い。しかし、汽水湖への海水の侵入や、侵入した海水の湖水との混合のしやすさは、海面高度と湖水面高度の差や、湖の深さに影響を受けるが、浅い汽水湖では、侵入した湖水と海水の混合が生じやすく、海水が滞留しにくい汽水湖も存在する。また、小川原湖は冷温帯に属し、冬季の平均気温が 0℃に近く、冬季には湖面結氷や、初春には融雪水の流入が生じるが、温帯や熱帯に属する湖沼などでは、湖面結氷や融雪水が無い汽水湖も存在する。よって、汽水湖によって、2-MIB の発生機序は異なり、地球温暖化の影響も異なると考えられる。2-MIB 問題が生じている汽水湖では、湖沼毎にその発生機序を明らかにしていかなければな

らない。

水道水では高度浄水処理により 2-MIB の処理技術は発展してきたが、その運用コストを考えれば 2-MIB の発生を未然に防止することが望ましく、発生機序の解明に予算を投じ防止に努めることは、上記してきた将来的な動向予測を考慮すれば費用対効果が高いと考えられる。漁業被害が問題となっている湖沼においても同様である。また、このような現場レベルでの対策の他、国レベルでは、SDGs としても挙げられている気候変動対策が重要である。地球温暖化の影響として、水産物のカビ臭の増加の可能性は、これまでほとんど考慮されてこなかったが、今後、顕在化する可能性が高い。地球温暖化対策では、水道や漁業における 2-MIB の増加による経済的損失についても早急に考慮、評価し、対策に反映させる必要がある。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導、ご助言を賜り、本論文のご校閲を賜りました北里大学獣医学部生物環境学科陸水循環学研究室の眞家永光講師、水圏環境学研究室の樽屋啓之教授、前教授の丹治 肇博士に心から感謝の意を示します。多くのご助言をいただきました北里大学獣医学部生物環境学科水圏環境学研究室の柿野 亘講師、また遺伝子分析にあたりご指導、ご助言をいただいた細胞分子機能学研究室の山本裕司講師に誠に感謝申し上げます。

調査や現場情報の提供に多大なるご協力をいただきました小川原湖漁業協同組合の濱田正隆代表理事組合長、細井 崇会計主任、沼田広樹課長、蛭名秀樹課長、ならびに小川原湖漁業協同組合の皆様 に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、地方独立行政法人青森県産業技術センターから研究環境と多大な支援をいただきました。また、内水面研究所調査研究部所長の工藤敏博氏（当時）、二木幸彦氏（当時）、菊谷尚久氏、部長の長崎勝康氏（当時）、榊 昌文氏、研究員の松谷紀明氏を始め、職員の皆様には、学位取得にあたり便宜を図っていただくと共に、様々な面でお世話になりました。謹んで感謝申し上げます。

鹿児島大学学術研究院農水産獣医学域農学系農学部食料生命科学科土壌科学研究室の池永 誠准教授、国立研究開発法人水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所の中山奈津子主任研究員、名古屋大学フィールド科学教育研究センター東郷フィールド耕地情報利用研究室の村瀬 潤教授には、研究設計や計画、技術面など、様々な面でご助言・ご指導をいただきました。心より御礼申し上げます。

東北大学大学院農学研究科海洋生物科学コース水産資源生態学研究室の片山知史教授,伊藤絹子准教授,宮城大学食産業学群の南 卓志客員教授には,数多くの温かいご助言,ご支援をいただきました。心より御礼申し上げます。

最後に,様々な面で支え,応援してくれた妻の亜優,両親,妹,親戚の皆様に深く感謝します。

## 引用文献

- 網走湖議会. 2013. 経済建設委員会会議録. <https://www.city.abashiri.hokkaido.jp/070shigikai/files/25.8.9keizai.pdf>
- Acinas, S. G., Haverkamp, T. H., Huisman, J. and Stal, L. J. 2009. Phenotypic and genetic diversification of *Pseudanabaena* spp. (cyanobacteria). *The ISME journal* 3:31–46.
- 青森県. 2017. 小川原湖水環境改善行動指針. <https://www.pref.aomori.lg.jp/soshiki/kankyo/kankyo/files/ogawarakosisin.pdf>, 2018 年 12 月 10 日.
- Barton, K. and Barton, M. K. 2019. Package ‘MuMIn’.
- Benedetti, A. and Abrahamowicz, M. 2004. Using generalized additive models to reduce residual confounding. *Stat. Med.* 23:3781–3801.
- Bertone, E. and O’Halloran, K. 2016. Analysis and modelling of taste and odour events in a shallow subtropical reservoir. *Environments* 3:22.
- Brettar, I. and Rheinheimer, G. 1991. Denitrification in the central Baltic: Evidence for H<sub>2</sub>S-oxidation as motor of denitrification at the oxic-anoxic interface. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 77:157–169.
- Bruder, S., Babbar-Sebens, M., Tedesco, L. and Soyeux, E. 2014. Use of fuzzy logic models for prediction of taste and odor compounds in algal bloom-affected inland water bodies. *Environ. Monit. Assess.* 186:1525–1545.
- Chiu, Y. T., Yen, H. K. and Lin, T. F. 2016. An alternative method to quantify 2-MIB producing cyanobacteria in drinking water

- reservoirs: Method development and field applications. *Environ. Res.* 151:618–627.
- Chong, S., Lee, H. and An, K. G. 2018. Predicting taste and odor compounds in a shallow reservoir using a three-dimensional hydrodynamic ecological model. *Water* 10:1396.
- Christensen, V.G., Graham, J.L., Milligan, C.R., Pope, L.M. and Ziegler, A.C. 2006. Water quality and relation to taste-and-odor compounds in the North Fork Ninnescah River and Cheney Reservoir, south-central Kansas, 1997–2003. *U.S. Geol. Surv. Sci. Investig. Rep.* 2006–5095.
- Chung, S. W., Chong, S. A. and Park, H. S. 2016. Development and applications of a predictive model for geosmin in North Han River, Korea. *Procedia Eng.* 154:521–528.
- Conte, E. D., Conway, S. C., Miller, D. W. and Perschbacher, P. W. 1996. Determination of methylisoborneol in channel catfish pond water by solid phase extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Water Res.* 30:2125–2127.
- Dickschat, J. S., Bode, H. B., Mahmud, T., Muller, R. and Schulz S. 2005. A Novel Type of Geosmin Biosynthesis in Myxobacteria. *J. Org. Chem.* 70:5174–5182.
- Dzialowski, A. R., Huggins, D. G., Denoyelles, J., Jakubauskas, M., Lim, N. C. and Beury, J. 2007. Predicting Taste and Odor Events in Kansas Reservoirs–Phase 1. *Kansas Biol. Sur. Rep.* 143.
- Dzialowski, A. R., Smith, V. H., Huggins, D. G., deNoyelles, F., Lim, N. C., Baker, D. S. and Beury, J. H. 2009. Development of

- predictive models for geosmin-related taste and odor in Kansas, USA, drinking water reservoirs. *Water Res.* 43:2829–2840.
- Eigemann, F., Vogts, A., Voss, M., Zoccarato, L. and Schulz-Vogt, H. 2019. Distinctive tasks of different cyanobacteria and associated bacteria in carbon as well as nitrogen fixation and cycling in a late stage Baltic Sea bloom. *bioRxiv.* 775825.
- Farmer, L. J., McConnell, J. M., Hagan, T. D. J. and Harper, D. B. 1995. Flavour and off-flavour in wild and farmed Atlantic salmon from locations around Northern Ireland. *Water Sci. Technol.* 31:259–264.
- Gao, J., Zhu, J., Wang, M. and Dong, W. 2018. Dominance and growth factors of *Pseudanabaena* sp. in drinking water source reservoirs, Southern China. *Sustainability* 10:3936.
- Geer, T. D., Calomeni, A. J., Kinley, C. M., Iwinski, K. J. and Rodgers, J. H. 2017. Predicting in situ responses of taste-and odor-producing algae in a Southeastern US reservoir to a sodium carbonate peroxyhydrate algaecide using a laboratory exposure-response model. *Water, Air, & Soil Poll.* 228:53.
- Giglio, S., Chou, W. K. W., Ikeda, H., Cane, D. E., and Monis, P. T. 2011. Biosynthesis of 2-methylisoborneol in cyanobacteria. *Environ. Sci. Technol.* 45:992–998.
- Giglio, S., Jiang, J., Saint, C. P., Cane, D. E. and Monis, P. T. 2008. Isolation and characterization of the gene associated with geosmin production in cyanobacteria. *Environ. Sci. Technol.* 42:8027–8032.
- Hanson T.R. 2003. Economic impact of off-flavor to the U.S. catfish

- industry. pp. 13–29. *In*: Off-Flavors in Aquaculture. (Rimando, A.M. and Schrader, K.K. eds.), American Chemical Society, Washington, DC.
- Harris, T. D. and Graham, J. L. 2017. Predicting cyanobacterial abundance, microcystin, and geosmin in a eutrophic drinking-water reservoir using a 14-year dataset. *Lake Reserv. Manag.* 33:32–48.
- Hastie, T. and Tibshirani, R. 1986. Generalized Additive Models. *Stat. Sci.* 1: 297–318.
- 橋本徳蔵, 青山幹. 2001. 水道とかび臭のつながり. 「水道水とおいしいのはなし」(おいしい水を考える会編) 技報堂出版, 東京. 25–56.
- 林岳彦, 黒木学. 2016. 相関と因果と丸と矢印のはなし. 「岩波データサイエンス Vol. 3」(岩波データサイエンス刊行委員会編) 岩波書店, 東京. 28–48.
- Hiraishi, A., Shin, Y. K., Ueda, Y. and Sugiyama, J. 1994. Automated sequencing of PCR-amplified 16S rDNA on ‘Hydrolink’ gels. *J. Microbiol. Methods* 19:145–154.
- 保坂三継. 2001. かび臭はどうやって取り除くの. 「水道水とおいしいのはなし」(おいしい水を考える会編) 技報堂出版, 東京. 103–140.
- Hu, R., Li, Q., Han, B. P., Naselli-Flores, L., Padisak, J. and Salmaso, N. 2016. Tracking management-related water quality alterations by phytoplankton assemblages in a tropical reservoir. *Hydrobiol.* 763:109–124.

- Huang, X., Huang, Z., Chen, X. P., Zhang, D., Zhou, J., Wang, X. and Gao, N. 2018. The predominant phytoplankton of *Pseudoanabaena* holding specific biosynthesis gene-derived occurrence of 2-MIB in a drinking water reservoir. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25:19134–19142.
- Hunsicker, M. E., Kappel, C.V., Selkoe, K. A., Halpern, B. S., Scarborough, C., Mease, L. and Amrhein, A. 2016. Characterizing driver–response relationships in marine pelagic ecosystems for improved ocean management. *Ecol. Appl.* 26:651–663.
- Hyndman, R. J. et al. 2019. Package ‘forecast’.
- 石橋良信，佐藤敦久，今野弘，後藤光亀，八木正一．1984．釜房湖のカビ臭発生要因の分析と流動特性．衛生工学研究論文集．20:83–96．
- 石飛裕，平塚純一，桑原弘道．2011．（寄稿）宍道湖・中海水域の水産業振興に向けた調査研究等の課題．島根県水産技術センター研究報告．3:99–110．
- 岩崎順，渡邊直樹．2001．1998年冬・春期の霞ヶ浦北浦における植物プランクトンとカビ臭の関係．茨城県内水面水産試験場調査研究報告．36:24–35．
- Izaguirre, G. and Taylor, W. D. 2004. A guide to geosmin-and MIB-producing cyanobacteria in the United States. *Water Sci. Technol.* 49:19–24.
- Izaguirre, G., Taylor, W. D. and Pasek, J. 1999. Off-flavor problems in two reservoirs, associated with planktonic *Pseudanabaena* species. *Water Sci. Technol.* 40:85–90.

- Janse, I., Meima, M., Kardinaal, W. E. A. and Zwart, G. 2003. High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6634–6643.
- John, N., Koehler, A. V., Ansell, B. R., Baker, L., Crosbie, N. D. and Jex, A. R. 2018. An improved method for PCR-based detection and routine monitoring of geosmin-producing cyanobacterial blooms. *Water Res.* 136:34–40.
- Journey, C. A., Beaulieu, K. M. and Bradley, P. M. 2013. Environmental factors that influence cyanobacteria and geosmin occurrence in reservoirs. pp. 27–55. *In: Current Perspectives in Contaminant hydrology and water resources sustainability.* (Paul, B. eds.), IntechOpen Limited, London.
- Jüttner, F. and Watson, S. B. 2007. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4395–4406.
- 梶山泰弘，齋藤源，加藤宏基．2012．干し上げによるカビ臭抑制効果に関する研究．平成24年度水源地環境技術研究所所報．29–35．
- 神山和則．2009．土壌侵食ポテンシャルの広域評価とリンの流出．土・水研究会資料．26:41–47．
- 環境省 水・大気環境局 水環境課．2014．第3章 汽水湖の現状と課題．日本の汽水湖～汽水湖の水環境の現状と保全．  
[https://www.env.go.jp/water/kosyou/brackish\\_lake/chpt3.pdf](https://www.env.go.jp/water/kosyou/brackish_lake/chpt3.pdf),  
2019年12月16日．
- Kawaguchi, O., Tanaka, M., Yoshii, M., Iwamoto, Y., Midooka, A.,

- Toutani, F., Nagao, N., Matsumoto, T., Mabuchi, R. and Tanimoto, S. 2019. Off-flavor of red sea bream *Pagrus major* reared in recirculating aquaculture systems with low salinity is caused by 2-methylisoborneol. *Fish. Sci.* 85:553–560.
- Kahoe, M. J., Chun, K. P. and Baulch, H. M. 2015. Who Smells? Forecasting Taste and Odor in a Drinking Water Reservoir *Environ. Sci. Technol.* 49:10984–10992.
- 木村文宣，本間隆満，前田充典，松川正彦．2013．上流域からのカビ臭物質および原因藻類の流入がダム貯水池のカビ臭現象に及ぼす影響．ダム工学．23:39–49．
- 木下隆史，赤穂良輔，石川忠晴，鶴田泰士．2014．小川原湖の塩分状態変化に関する長期シミュレーション．土木学会論文集 B1（水工学）．70:I\_1609–I\_1614．
- 小泉祐二，藤原広和，松尾悠佑，沼山天馬．2014．近年の小川原湖における水質変化の特徴．土木学会論文集 B1（水工学）．70：I\_1579–I\_1584．
- Kojima, H., Tokizawa, R., Kogure, K., Kobayashi, Y., Itoh, M., Shiah, F. K., Okuda, N. and Fukui, M. 2014. Community structure of planktonic methane-oxidizing bacteria in a subtropical reservoir characterized by dominance of phylotype closely related to nitrite reducer. *Sci. Rep.* 4:5728.
- 湖沼技術研究会．2007．6.3 小川原湖の水理・水質特性．  
[https://www.mlit.go.jp/river/shishin\\_guideline/kankyo/kankyoku/osyo/tec/index.html](https://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/kankyo/kankyoku/osyo/tec/index.html), 2019 年 9 月 5 日．
- Kosmidis, I. 2013. brglm: Bias reduction in binary-response Generalized

## Linear Models.

厚生労働省．2005．水質汚染事故による水道の被害及び水道の異臭味被害状況について．

<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/jouhou/suisitu/pdf/o4.pdf>, 2019 年 12 月 16 日．

厚生労働省．2008．水質汚染事故による水道の被害及び水道の異臭味被害状況について．

<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kikikanri/dl/03b.pdf>, 2019 年 12 月 16 日．

厚生労働省．2013．水質汚染事故による水道の被害及び水道の異臭味被害状況について． [https://www.mhlw.go.jp/file/06-](https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/13-4_1.pdf)

[Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/13-4\\_1.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/13-4_1.pdf), 2019 年 12 月 16 日．

厚生労働省．2018．水質汚染事故による水道の被害及び水道の異臭味被害状況について．

<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kikikanri/03.html>, 2019 年 12 月 16 日．

工藤勝弘，河上智行，山田正．2004．ダム貯水池におけるホルミディウムとカビ臭．水文・水資源学会誌．17:331–342．

工藤勝弘，河上智行，山田正．2004．ダム貯水池の滞留時間と藻類増殖に関する実験的考察．水文・水資源学会誌．17:607–617．

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870–1874.

Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. pp. 115–176. *In*: Nucleic

- Acid Techniques in Bacterial Systematics. (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. eds.), Jon Wiley and Sons, Chichester.
- Lindholm-Lehto, P. C., Suurnäkki, S., Pulkkinen, J. T., Aalto, S. L., Tirola, M. and Vielma, J. 2019. Effect of peracetic acid on levels of geosmin, 2-methylisoborneol, and their potential producers in a recirculating aquaculture system for rearing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Eng.* 85:56–64.
- Mau, D. P., Ziegler, A. C., Porter, S. D. and Pope, L. M. 2004. Surface-water-quality conditions and relation to taste-and-odor occurrences in the Lake Olathe watershed, northeast Kansas, 2000-02. *U.S. Geol. Surv. Sci. Investig. Rep.* 2004–5047.
- Meybeck, M. 1995. Global distribution of lakes. pp. 1–35. *In*: Physics and chemistry of lakes. (Lerman, A., Imboden, D. M. and Gat, J. R. eds.), Springer, Berlin.
- 宮昭彦，小林正隆，笹本誠，堺茂樹，平山健一．1993．小川原湖の全面結氷日の予測．水工学論文集．37:129–134．
- Moisander, P. H., McClinton Iii, E. and Paerl, H. W. 2002. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microb. Ecol.* 43:432–442.
- 農林水産省．2006．内水面漁業生産統計調査．  
[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/naisui\\_gyosei/index.html](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/naisui_gyosei/index.html),  
2019年9月14日．
- 長尾正之，西部隆宏，石川忠晴，山浦勝明．1996．小川原湖への塩分侵入現象の確率統計的考察．水工学論文集．40:583–588．

- 長崎勝康，細井崇．2008．2004 年に小川原湖で発生した貧酸素層の状況について．青森県水産総合研究センター内水面研究所事業報告集．1:96-113．
- 永瀬知美，奥田益算，若林健二．2009．湖山池のカビ臭原因プランクトンに関する研究．鳥取県衛生環境研究所報．49:24-29．
- Nam-Koong, H., Schroeder, J. P., Petrick, G. and Schulz, C. 2016. Removal of the off-flavor compounds geosmin and 2-methylisoborneol from recirculating aquaculture system water by ultrasonically induced cavitation. *Aquacult. Eng.* 70: 73-80.
- 日本規格協会．2016．工場排水試験方法：JISK0102 2016．
- 日本水道協会．2011．上水試験方法．
- Niiyama, Y., Tuji, A., Takemoto, K. and Ichise, S. 2016. *Pseudanabaena foetida* sp. nov. and *P. subfoetida* sp. nov. (Cyanophyta/Cyanobacteria) producing 2-methylisoborneol from Japan. *Fottea* 16:1-11.
- 西田修三，鈴木誠二，中辻啓二．2006．外部擾乱に対する小川原湖の水質応答特性．水工学論文集．50:1333-1338．
- 西田修三，鈴木誠二．2007．小川原湖の水質変動と物質循環．日本水産工学会誌．44:39-43．
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. and Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3327-3332.
- Oikawa, E. and Ishibashi, Y. 2004. Species specificity of musty odor producing *Phormidium tenue* in Lake Kamafusa. *Water Sci. Technol.* 49:41-46.

- 及川栄作, 石橋良信, 阿部隆弘, 梅津洋. 2000. かび臭および毒素産生藍藻類の系統発生的分類. 環境工学研究論文集. 37:183–191.
- 岡田竜洋, 眞家永光, 長崎勝康, 柿野亘, 蛭名秀樹, 富栴朗充, 角勇悦, 嶋栄吉. 2013. 小川原湖の底質環境と底生動物群集. 農業農村工学会論文集. 81:453–461.
- Parinet, J., Rodriguez, M. J. and Serodes, J. 2010. Influence of water quality on the presence of off-flavour compounds (geosmin and 2-methylisoborneol). *Water Res.* 44:5847–5856.
- Parinet, J., Rodriguez, M. J. and Sérodes, J. B. 2013. Modelling geosmin concentrations in three sources of raw water in Quebec, Canada. *Environ. Monit. Assess.* 185:95–111.
- Pearl, J. 1995. Causal diagrams for empirical research. *Biometrika* 82: 669–688.
- Pearl, J. 2009. Causal inference in statistics: An overview. *Stat. Surv.* 3:96–146.
- Qi, M., Chen, J., Sun, X., Deng, X., Niu, Y. and Xie, P. 2012. Development of models for predicting the predominant taste and odor compounds in Taihu Lake, China. *PloS one* 7:e51976.
- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput., Vienna.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput., Vienna.
- Robertson, R. F., Hammond, A., Jauncey, K., Beveridge, M. C. M. and Lawton, L. A. 2006. An investigation into the occurrence of geosmin responsible for earthy–musty taints in UK farmed

- rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 259:153–163.
- 佐藤宏明, 天野正秋. 2007. 浅い貯水池の水位低下・干し上げに伴う 2-MIB への影響. 応用生態工学. 10:141–154.
- 酒井憲司, 大畠巖. 2010. 小川原湖の水質悪化の状況とその原因に関する考察 (中間報告). 河川環境総合研究所報告. 16:35–48.
- Schrader, K. K., Rubio, S. A., Piedrahita, R. H. and Rimando, A. M. 2005. Geosmin and 2-methylisoborneol cause off-flavors in cultured largemouth bass and white sturgeon reared in recirculating-water systems. *N. Am. J. Aquac.* 67:177–180.
- Schram, E., Schrama, J., Kusters, K., Kwadijk, C. and Palstra, A. 2016. Effects of exercise and temperature on geosmin excretion by European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 451:390–395.
- Schulz, S., Fuhlendorff, J. and Reichenbach, H. 2004. Identification and synthesis of volatiles released by the myxobacterium *Chondromyces crocatus*. *Tetrahedron* 60:3863–3872.
- 世界の水事情. 2013. 北海道にてシジミ漁ストップ...異臭騒ぎにつき. <http://water-news.info/4695.html>.
- 仙台管区気象台. 2016. 東北地方の気候の変化. <http://www.jma-net.go.jp/sendai/wadai/kikouhenka/kikouhenka-report.html#report>, 2019 年 12 月 22 日.
- Shu, G., Sun, B., Podgurski, A. and Cao, F. 2013. MFL: Method-level fault localization with causal inference. pp. 124–133. *In*: 2013 IEEE Sixth International Conference on Software Testing, Verification and Validation. IEEE.
- Signorell, A. et al. 2019. DescTools: tools for descriptive statistics.

- Smith, V.H. 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science* 221:669–671.
- Smith, V. H., Sieber-Denlinger, J., deNoyelles Jr, F., Campbell, S., Pan, S., Randtke, S. J., Blain, G. H. and Strasser, V. A. 2002. Managing taste and odor problems in a eutrophic drinking water reservoir. *Lake Reserv. Manag.* 18:319–323.
- Srinivasan, R. and Sorial, G. A. 2011. Treatment of taste and odor causing compounds 2-methyl isoborneol and geosmin in drinking water: A critical review. *J. Environ. Sci.* 23:1–13.
- Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G. K., Tignor, M., Allen, S. K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P. M. 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. In: Intergovernmental Panel on Climate Change, Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report (AR5). Cambridge University Press, New York.
- 須藤隆一，小浜暁子，稲森悠平，徐開欽，李玉友，秋葉道宏，金主鉉，藤本尚志. 2004. 浄水の生物学. 「水環境保全のための生物学」(須藤隆一編) 産業用水調査会，東京. 183–209.
- 杉原幸樹，平井康幸. 2016. 塩淡水境界を持つ汽水湖の結氷下の水質挙動. 土木学会論文集 B1 (水工学) . 72:I\_655–I\_660.
- Sugiura, N. and Nakano, K. 2000. Causative microorganisms for musty odor occurrence in the eutrophic Lake Kasumigaura. *Hydrobiologia* 434:145–150.
- Sugiura, N., Utsumi, M., Wei, B., Iwami, N., Okano, K., Kawauchi, Y. and Maekawa, T. 2004. Assessment for the complicated occurrence

- of nuisance odours from phytoplankton and environmental factors in a eutrophic lake. *Lakes. Reserv. Res. Manag.* 9:195–201.
- Suttorp, M.M., Siegerink, B., Jager, K.L., Zoccali, C. and Dekker, F.W. 2014. Graphical presentation of confounding in directed acyclic graphs. *Nephrol. Dial. Transplant.* 30:1418–1423.
- Suurnäkki, S., Gomez-Saez, G. V., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Fewer, D. P. and Sivonen, K. 2015. Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds. *Water Res.* 68:56–66.
- 鈴木淳士，梅田信，松川正彦．2011．釜房湖における 2-MIB の増加要因の検討．東北地域災害科学研究．47:123–127．
- Srinivasan, R., and Sorial, G. A. 2011. Treatment of taste and odor causing compounds 2-methylisoborneol and geosmin in drinking water: A critical review. *J. Environ. Sci.* 23:1–13.
- 高橋威一郎，高瀬勝教，竹下佳代子，河野博幸，馬見塚守，岐津英明．2016．芹川ダムにおけるかび臭物質産生藍藻及び 2-メチルイソボルネオール の推移についての評価．水環境学会誌．39:51–62．
- 田淵俊雄，高村義親．1985．農業集水域からの窒素・リンの流出．「集水域からの窒素・リンの流出」東京大学出版会，東京．130-183．
- Tanabe, A. S. 2018. Claident v 0.2.2019.05.10, A Software Distributed by Author. <http://www.fifthdimension.jp/>.
- Tanabe, A. S. and Toju, H. 2013. Two new computational methods for universal DNA barcoding: a benchmark using barcode sequences

- of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *PLoS one* 8:e76910.
- 高野 敬志，隼野 寛史，泉 敏彦．2014．網走湖産ヤマトシジミのカビ臭発生時における放射菌の調査．北海道立衛生研究所報．64:23-26.
- 竹内 萌，木村 郷，松原 久．2013．2-メチルイソボルネオール臭気の閾値とそれに及ぼすシジミ煮汁の影響．地方独立行政法人青森県産業技術センター食品総合研究所研究報告．5:57-60.
- Thuan, D. H., Umeda, M., Matsukawa, M. and Tanaka, H. 2012. Prediction model of taste-and-odor events in Kamafusa Reservoir. *J. Japan Soc. Civil Eng., Ser. B1*. 68:I\_289-I\_294.
- Tuji, A. and Niiyama, Y. 2018. Two new *Pseudanabaena* (Cyanobacteria, Synechococcales) species from Japan, *Pseudanabaena cinerea* and *Pseudanabaena yagii*, which produce 2-methylisoborneol. *Phycological Res.* 66:291-299.
- 辻 彰洋，新山 優子．2018．*Pseudanabaena* 属（シアノバクテリア）の分類とカビ臭産生の判別形質．日本水処理生物学会誌．54:115-120.
- 辻谷 睦巳，相崎 守弘，神門 利之．2018．宍道湖におけるカビ臭発生藻類 *Coelosphaerium* sp. がヤマトシジミのろ過活性，肥満度およびカビ臭着臭へ与える影響．水環境学会誌．41:91-96.
- 鶴田 泰士，石川 忠晴，西田 修三，藤原 広和，村井 禎美．2001．小川原湖への海水進入現象に関わる水理データの整備と復元．水文・水資源学会誌．14:13-26.
- Uwins, H. K. 2011. Triggers for taste and odour events: A study of

- microbial production of geosmin and 2-methylisoborneol. PhD Thesis, Griffith University, Nathan.
- Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereiram, P. and Tenreiro, R. 2009. Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology* 155:642–656.
- Wang, M., Yoshimura, C., Allam, A., Kimura, F., and Honma, T. 2019. Causality analysis and prediction of 2-methylisoborneol production in a reservoir using empirical dynamic modeling. *Water Res.* 163:114864.
- Wang, Z., Song, G., Shao, J., Tan, W., Li, Y. and Li, R. 2016. Establishment and field applications of real-time PCR methods for the quantification of potential MIB-producing cyanobacteria in aquatic systems. *J. Appl. Phycol.* 28:325–333.
- Wang, Z., Xiao, P., Song, G., Li, Y. and Li, R. 2015. Isolation and characterization of a new reported cyanobacterium *Leptolyngbya bijugata* coproducing odorous geosmin and 2-methylisoborneol. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22:12133–12140.
- Watson, S. B., Monis, P., Baker, P., and Giglio, S. 2016. Biochemistry and genetics of taste-and odor-producing cyanobacteria. *Harmful Algae* 54:112–127.
- Wood, S.N. 2017. Introducing GAMs. pp. 161–193. *In: Generalized Additive Models—An introduction with R, Second Edition.* Chapman and Hall/CRC, New York.
- Yamprayoon, J. and Noomhorm, A. 2000. Geosmin and off-flavor in Nile

- tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 9:29–41.
- 横尾英史. 2019. 2019 年ノーベル経済学賞から考える「ランダム化比較試験 (RCT)」について：環境政策を「検証」できる？  
[http://www.nies.go.jp/social/topics\\_rct.html](http://www.nies.go.jp/social/topics_rct.html), 2020 年 1 月 3 日.
- 横田恭平. 2015. 芹川ダムの下流で 2-MIB が高濃度で検出された 2014 年のダム周辺の水質特性について. *水環境学会誌*. 38:181–188.
- 横山洋, 山下彰司. 2007a. ダム貯水池におけるカビ臭発生要因の検討. *河川技術論文集*. 13:23–28.
- 横山洋, 山下彰司. 2007b. ダム貯水池におけるフォルミジウム由来カビ臭発生機構の検討. *寒地土木研究所月報*. 655:12–20.
- 吉田陽一, 中原紘之, 堀家健司. 1996. 琵琶湖南湖におけるホルミデイウムの優占的発生と水質および気象要因等との相互関係. *日本水産学会誌*. 62:872–877.
- Yoshikawa, Y., Watanabe, Y. and Itoh, A. 2014. A simple equation for ice sheet thickness and ice formation/breakup prediction. *J. JSCE*. 2:203–213.
- Zimba, P. V. and Grimm, C. C. 2003. A synoptic survey of musty/muddy odor metabolites and microcystin toxin occurrence and concentration in southeastern USA channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) production ponds. *Aquaculture* 218:81–87.