

軟 X 線顕微鏡による琵琶湖産糸状カビ臭産生藍藻の細胞内微細構造観察

竹本邦子

関西医科大学医学部物理学教室 〒573-1010 大阪府枚方市新町 2-5-1

吉村真史

立命館大学総合科学技術研究機構 SR センター 〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

大東琢治

自然科学研究機構分子科学研究所極端紫外光研究施設 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷中38

山本章嗣

長浜バイオ大学バイオサイエンス学部アニマルバイオサイエンス学科 〒526-0829 滋賀県長浜市田村町1266

一瀬 諭

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター環境監視部門 〒520-0022 滋賀県大津市柳が崎 5-34

難波秀利

立命館大学理工学部物理科学科 〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

木原 裕

立命館大学総合科学技術研究機構 SR センター 〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

要旨

京阪神地区の水道水源地である琵琶湖で大增殖し、水道水にカビ臭をもたらす微小シアノバクテリアを、迅速かつ確実に識別するため、軟 X 線顕微鏡法を応用する取り組みを行っている。*Phormidium tenue* (*Pseudanabaena* sp.) と分類されたカビ臭産生する株 (PTG) としない株 (PTB) の微細構造の違いを軟 X 線顕微鏡で観察した結果、細胞内顆粒の大きさが異なることが分かった。微小シアノバクテリアの優れた観察ツールとして、内部のサブミクロンの構造を光学顕微鏡のような手軽さで観察できる軟 X 線顕微鏡が、透過型電子顕微鏡、低真空クライオ走査型電子顕微鏡と並んで使用されることを期待したい。

1. はじめに

日本は水の豊富な国であり、水はきれいで安全であるものとして信じられている。このため、日本では、「安全」で「おいしい」水が求められている。

日本はアジアモンスーン気候影響下にあり降雨に恵まれ、年間降雨量は世界平均の約2倍となっている。一方、水資源賦存量（水資源として理論上人間が最大限利用可能な水の量で、降水量から蒸発散量を引く当該地域の面積を乗じた値）は世界平均の半分以下である。さらに、急峻な地形と降雨の集中により、水資源賦存量の大部分は利用されないまま海に流出してしまう¹⁾。にもかかわらず、ヨーロッパでは飲料水の水源の75%を地下水に依存しているのに対し、日本では70%を河川などの表層水に依存しなければならない²⁾。表層水は、太陽光、気象、流入物質のなど様々な環境の影響を受けやすい。また、高度経済成長期以降、社会経済の発展に伴い、水源である河川や湖

沼の水質の悪化も問題となっている。水利権順位は、歴史的に、農場用水、工業用水、発電、水道水となっていることから、取水においても水道水は不利な状況となっている。

このような理由により、現在の日本では、「汚い水源」でも水道水の水源として利用せざるを得ない状況にあり、このような状況で「安全」で「おいしい」水が日々提供されているのである。

ダム湖や湖沼などの水道水源地において、初夏から秋にかけて大增殖し、水道水に著しい異臭味障害をもたらすシアノバクテリアがいる。国立保健医療科学院が2010年10月から2012年9月に行った調査によると、全国約62%の水道事業者、約42%の浄水場において生物障害が発生し、うち64%で異臭味障害が報告されている³⁾。異臭味障害の種類別内訳では63%がカビ臭・土臭になっており³⁾、シアノバクテリアによるカビ臭被害は深刻である。近年、異臭味による被害人口は減少傾向にあるが、被害事業者数は減少していない⁴⁾。このことは、水源地における異臭味

障害は根本的に解決できていないことを示し、水源地での異臭除去は重要な課題となっている。

現在、環境省ではこれらを環境監視項目とはしていない。カビ臭はヒトに感知されやすく、水道基準値である10 ng/L程度でも嗅覚に敏感なヒトはカビ臭を認知してしまう。しかし、カビ臭は通常の浄水処理でほとんど除去することができず、高度浄水処理（粉末活性炭処理、粒状活性炭処理、オゾン処理、生物処理の一つまたは複数を通常の浄水処理に組み合わせた浄水処理）の導入が必要となる。平成18年度版の水道統計水質編によると、10万 m³/日以上の規模の浄水施設で高度浄水処理を導入している割合は20%以下となっている⁵⁾。高度浄水処理の導入がなされていない場合、原水中の除去対象物質の濃度に合わせた活性炭の注入処理が必要となり、追加コストが発生する。このため、各都道府県や水道事業者は独自の監視体制を敷き、水源および浄水の連続監視を行っている。

2. 琵琶湖とカビ原因生物

日本最大の面積と貯水量を持ち、京阪神地区約1,450万人の活動を支える水源である琵琶湖でも、1969年にカビ臭が感知されて以降、毎年のようにカビ臭の発生が報告されている^{6,7)}。琵琶湖のカビ臭の原因物質については、特定のシアノバクテリアや放線菌によって生成される2-メチルイソボルネオール（2-methyl-isoborneol : 2-MIB）とジェオスミン（trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol）が確認されている^{8,9)}。カビ臭原因生物としては、2-MIBを産生する浮遊性糸状シアノバクテリアが確認され、*Phormidium tenue* (*Pseudanabaena* sp.) と同定された^{10,11)}。その後の調査で、琵琶湖では*P. tenue*の出現数に比べ2-MIB産生量が低い事例が報告され、*P. tenue*の分離培養により、2-MIBを産生する緑色の株（PTG）と産生しない茶色の株（PTB）が存在することが分かった^{12,13)}。

PTGとPTBの識別は、色素やヒトの嗅覚で行われている。しかし、照射光条件より色素が変化する性質（補色順化）の報告¹³⁾や、2-MIB産生量が培養条件に依存するという報告¹²⁾から、色や臭いだけの識別には限界がある。微細藻類の同定は、通常、顕微鏡観察により形態的特徴を調べ、行われている。様々な藻類が混在する現地調査では、形態による識別法は必須である。細胞径が1~2 μmと小さい*P. tenue*の形態的特徴を捉えるには、どのような顕微鏡が適当であろうか。

光学顕微鏡（LM）は、生体試料に損傷を与えることなく、生きたままの状態での細胞内部の微細構造や動きを観察することができる優れた顕微鏡である。しかし、空間分解能は、回折限界により、光の波長の1/2程度（約200 nm）までに制限され、*P. tenue*の形態的特徴を捉えることは難しい。透過型電子顕微鏡（TEM）は10 nm以下の高分解能観察が可能である。しかし、シアノバクテリアを高解像

度でTEM観察するためには、十分薄い試料に、電子線の散乱・吸収を大きくするための重金属染色を施し、真空中に保持する必要がある。このため、試料は通常、化学固定、脱水、超薄切片化、染色することが必須で、生きた状態の形態的特徴が必ずしも保持されない場合もあり、また、観察までに時間を要するという弱点を持つ。種の同定には、DNAバーコーディング情報を利用した方法もあるが、藻類ではまだ整備されていない。また、分子生物学的手法を用いた微生物の多様性解析には課題も残されており、藍藻類の分類学的検討には、形態的特徴の理解が必要とされている^{14,15)}。

著者等は、LMより高い分解能を持ち、TEMより高い透過能を持つX線顕微鏡（XM）を用いて、未処理の*P. tenue*を丸ごと観察し、特徴的な微細構造を見出し、両者を簡単に識別する方法の開発を目指している。本稿では、現在、我々が取り組んでいる、XMによる*P. tenue*の細胞内微細構造の観察と微細構造同定研究について紹介する。

3. 軟X線顕微鏡

3.1 軟X線吸収コントラストイメージング

XMとはX線をプローブとして用いた顕微鏡の総称であり、ここでは、軟X線を用いたXMを軟X線顕微鏡（軟XM）と呼ぶ。XMは、X線と物質の相互作用を利用してイメージングを行う。X線イメージングには、吸収コントラスト、散乱、蛍光、位相コントラストを用いる方法がある。我々は、軟X線領域で適度な減衰効果を示す吸収コントラストによるイメージング¹⁶⁾を主に研究してきた。特に、軟X線領域の「水の窓」と呼ばれる酸素（O）のK吸収端（2.3 nm, 543 eV）と炭素（C）のK吸収端（4.4 nm, 284 eV）の間の領域（Fig. 1）では、生体の重要な構成物質であるタンパク質や核酸の吸収に比べて水の吸収が1桁以上小さいので、生体試料を水の存在を意識することなく観察することができる^{19,20)}。

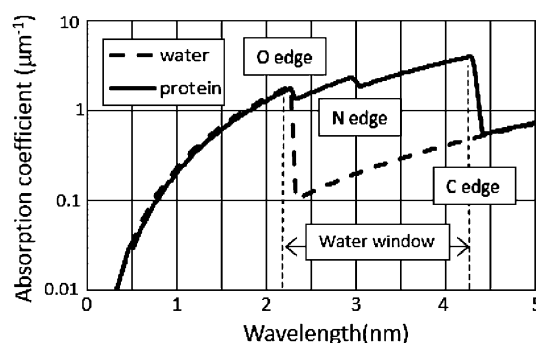


Fig. 1 Absorption coefficients of water and a typical protein in the soft x-ray wavelength region. The absorption coefficients were obtained using the data of Henke et al^{17,18)}.

3.2 立命館大学軟 X 線顕微鏡ビームライン

我々は、立命館大学 SR センター（滋賀県草津市）に結像型軟 X 線顕微鏡専用ビームライン（BL-12）を設置し、1996年より軟 X 線顕微鏡の開発と応用に関する研究を行っている^{21,22}）。

立命館大学 SR センターでは、超伝導小型放射光光源（蓄積エネルギー：575 MeV、ビーム電流：300 mA、軌道直径：1 m）から放射される赤外線から X 線までの放射光を利用することができる²³）。放射光の光子密度は827 eV（1.5 nm）で最大で、軟 XM には有利な放射光光源となっている。光源より取り出した放射光を後述の光学系で分光し、任意のエネルギーで顕微鏡観察を行う。この顕微鏡の最大の特徴は試料を大気中に設置できることにある。軟 X 線は空気によって容易に減衰してしまう。このため、軟 XM では、一般に、真空引きや He 等によるガス置換が行われた試料槽を用いる必要がある。BL-12では、必要最小限の試料スペースを大気中に設けることで、大気圧中の試料を、LM と同じ感覚で観察することができる。

Fig. 2 に BL-12 の光学系を示す。BL-12 はスリット、平面ミラー、集光ゾーンプレート（Condenser Zone Plate (CZP), Göttingen Univ., KZP 7, 直径：9 mm, 最外輪帯幅：53.7 nm, ゾーン数：41,890²⁴）、ピンホール（直径：20 μm ）、対物ゾーンプレート（Objective ZP (OZP), NTT-AT, FZP-S38/84, 直径：84 μm , 最外輪帯幅：36 nm, ゾーン数：550）、背面照射型 CCD 検出器（浜松ホトニクス株式会社, C4880-21-24WD）で構成されている。

光源から取り出した白色の放射光を楔形スリットで整形し、平面ミラーに入射角40 mrad で入射させ、1 keV 以上の高エネルギー光をカットしている。ミラーチャンバーは、SiC と SiO₂ の2種類の平面ミラーを装備しており、エネ

ルギーに応じて使い分けている。平面ミラーで反射した光は、CZP とピンホールからなる直線型分光器を通過する。この分光器は、Schmahl（Göttingen 大学）のグループによって開発されたものである²⁵）。ZP は、焦点距離が波長によって異なるので、ZP の後方の光軸上にピンホールを置くと、CZP とピンホールの距離を焦点距離とする単色光だけがピンホールを通過する。得られる波長分解能は、縦方向の色収差がピンホールサイズと等しいとすると、

$$\frac{\lambda}{\Delta\lambda} = \frac{R}{2\sqrt{2}r}$$

となる²⁶）。ここで、 R は ZP の半径、 r はピンホールの半径である。ピンホールを通過した単色光は、試料に到達し、試料を透過した単色 X 線は、試料直後に置かれた OZP によって CCD 検出器上に拡大した X 線像を結ぶ。顕微鏡の焦点（ピント）の調整は、試料を光軸方向に移動させることで行っている。利用可能な軟 X 線の波長は、水の窓を含む 1.7 nm～4.4 nm である。空間分解能、倍率、視野は、波長 2.0 nm と 2.33 nm のとき、それぞれ 65 nm, 770倍, 16 μm と 53.5 nm, 897倍, 13.7 μm となっている。ここでの空間分解能は、ナイフエッジの信号強度の 20%～80% の変化に対応する距離で評価した値を用いている。

空気による軟 X 線の減衰を避けるため、全ての光学素子は真空槽内に設置されている。試料スペースの前後の真空槽に厚さ 100 nm の窒化シリコン膜の窓を設けることで、軟 X 線を大気中に取り出せるようになっており、大気中に設置された試料を観察することができる（**Fig. 2**）。大気層幅は、空気による減衰を考慮すると、1 mm 以下が要求される。OZP は試料の下流にある真空槽と連動して動くので、通常使用している OZP では、大気層幅が 1 mm を超えてしまう波長域が存在する。このため、BL-12 では、仕様の異なる OZP を用意し、大気層幅を 1 mm 以下に保てるようにしている。

顕微鏡システムには、 x, y, z, θ の電動 4 軸試料ステージが、試料を鉛直下向きで回転軸が鉛直方向になるよう設置されている。観察には、2次元観察モードと3次元観察モードが用意されている。2次元観察では、**Fig. 3(a)** に示

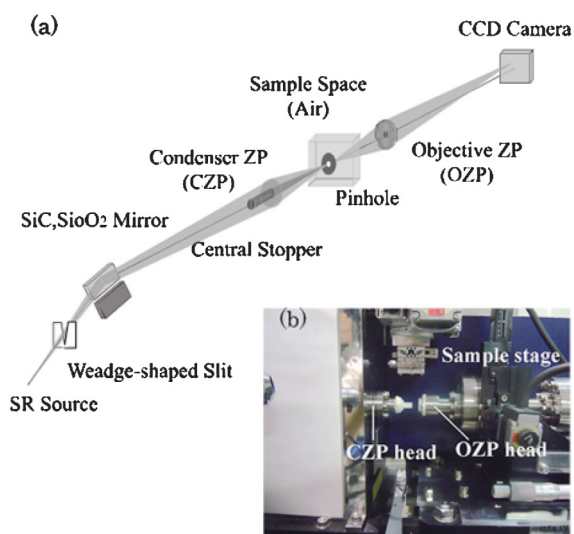


Fig. 2 (Color online) Schematic diagram of BL-12 (a). The inset is an overview around sample stage (b). Sample is placed in air between CZP and OZP heads.

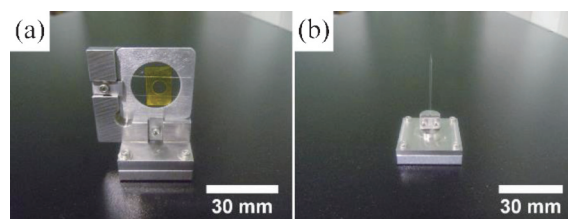


Fig. 3 (Color online) Photographs of sample mountings for 2D observation (a) and 3D observation (b).

すように、試料を、粘着テープでアルミプレートに取り付け、試料ステージに固定する。電動ステージにより、ミリメートル範囲の観察が可能である。風乾試料は、電子顕微鏡用グリッドやポリイミド薄膜やシリコン窒化膜上に保持される。含水試料は、2枚のポリイミド薄膜やシリコン窒化膜またはガラスキャピラリーに封入し保持される。

3次元観察は、Fig. 3(b)に示すように、試料を封入したガラスキャピラリーを試料ステージに固定する。試料を回転させて取得したXM像を用いComputer Tomography (CT)法により3次元像を取得する²⁷⁾。その他、プレ観察およびXM観察位置確認用のLMと低温観察用のクライオシステムが用意されている^{28,29)}。

4. 軟X線顕微鏡によるシアノバクテリア観察

4.1 実験方法

試料は、キャピラリー洗浄法により1985年7~10月に琵琶湖南湖から分離され、現在、*Phormidium tenue* (*Pseudanabaena* sp.)と同定されている緑色のカビ臭産生糸状藍藻 (PTG) と茶色の非産生糸状藍藻 (PTB) の2種を用いた。継代培養は、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターにおいて、藍藻用のCT培地とM11培地を併用し月1回実施された。それぞれの培地10 mlを試験管10本に分注し、20°C, 2,000 Lxs (8 h明/16 h暗), 4回転/minの回転振とう培養機 (TAITEC RT550) で1か月間培養した。

十分に増殖したことを肉眼で確認した後、ヒトの鼻によるカビ臭の確認と落射蛍光顕微鏡 (G, B励起) による光合成色素の確認により、それぞれPTGとPTBとして実験に用いた^{30,31)}。

未処理の細胞懸濁液を、ポリイミド薄膜 (膜厚<350 nm) 上に滴下し、風乾させた試料 (風乾試料) と、含水細胞を2枚の極薄ポリイミド薄膜の間に滴下しシリコングリースで密封した試料および懸濁液をガラスキャピラリーに封入した試料 (含水試料) を用意した。

軟XM観察は、立命館大学SRセンター軟X線顕微鏡

ビームライン (BL-12) において行った。

4.2 XM観察結果

高い吸収コントラストの像を得るには、空気中の細胞を観察する場合は、空気の透過率の高い短波長の利用が有効である。細胞懸濁液の中の細胞を観察する場合は、水とタンパク質の吸収差が大きい「水の窓」の波長の利用が有効である。「水の窓」の波長の利用であれば、この場合であっても、水の透過率を確保するため、水層の厚さは10 μm以下に制御する必要がある。

Fig. 4に、無固定、無染色のPTGを、風乾し波長1.9 nmで観察したXM像(a)、含水細胞を2枚のポリイミド薄膜で挟み乾燥を避けて1.9 nmで観察したXM像(b)、細胞懸濁液をガラスキャピラリーに封入し2.33 nmで観察したXM像(c)を示す。桿菌状の細胞が連なった糸状構造が確認できる。細胞の周囲で、細胞外マトリクス多糖 (粘質鞘) は確認できない。風乾の細胞中には顆粒体 (Fig. 4(a)白矢頭) の存在が確認できる。この顆粒体は高いX線吸収を示していることから、ガス胞ではなく中身の詰まった顆粒体である。顆粒体は細胞あたり1個以上存在し、2個以上の場合には細胞の長軸方向に配列していた。細胞をポリイミド薄膜で挟み含水状態 (Fig. 4(b)) を保持した場合でも、水層が薄いためXM像を観察できた。この場合も、風乾試料と同様に細胞内の顆粒体を観察することができることから、顆粒体は風乾によるアーチファクトではないことが示された。

高いコントラストで顆粒体を観察するため、風乾した試料を2.0 nmの波長で観察した (Fig. 5)。PTGの方がPTBに比べて太く、PTGの細胞径は $1.35 \pm 0.12 \mu\text{m}$ 、PTBは $1.08 \pm 0.06 \mu\text{m}$ であった。全ての細胞内に顆粒体が確認できた。PTGとPTBに含まれる顆粒体の大きさについて調べたところ、500 nmと800 nm付近に二つのピークを持つ分布を示し、特に、PTGでは直径1 μm以上の大きな顆粒を持つ細胞も多く存在していた³⁰⁾。

顆粒体の構成元素に関する知見を得るため、2.0 nmで確認できた顆粒体をOのK吸収端よりも長い波長である

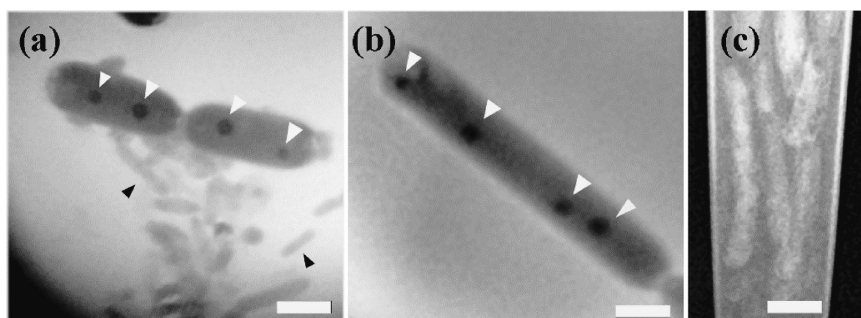


Fig. 4 Soft XM images of PTG. White arrowheads indicate granules. (a) An air-dry sample at 1.9 nm. Exposure time was 2 min. Black arrowheads indicate symbiotic bacteria. (b) A wet sample at 1.9 nm. Exposure time was 10 min. (c) Suspension-cultured cells at 2.33 nm. Exposure time was 3 min. Scale bar is 2 μm.

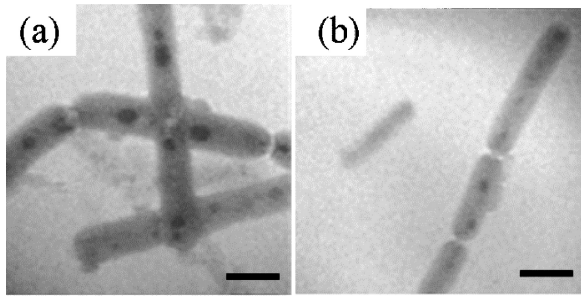


Fig. 5 Soft XM images of PTG (a) and PTB (b) at 2.0 nm. Exposure time was 2 min. Scale bar is 5 μm .

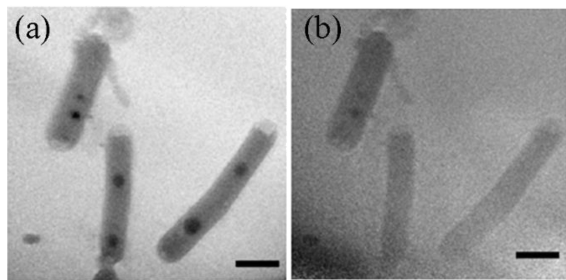


Fig. 6 Multiple XM images of the same PTGs. Observation wavelength was 2.0 nm (a) and 2.33 nm (b). Exposure time was 5 min. Scale bar is 2 μm .

2.33 nm で観察したところ、顆粒体が消えてしまった (Fig. 6)。さらに観察を続けたところ、2.0 nm で観察できた顆粒体には、2.33 nm で消える顆粒体と消えない顆粒体が存在することが分かった。顆粒の大きさとの関係については、現在検討中である。この結果は、2.33 nm で消えた顆粒体の一部は、O が重要な構成要素、もしくはこの顆粒に O を多く含む物質を濃縮していることを示唆している。

4.3 構造の同定

シアノバクテリアは原核細胞であり、真核細胞のような細胞小器官は存在しないが、細胞内には特化した形態と機能を持つ細胞内構造物 (原核細胞オルガネラ) が存在することが知られている。これまでに、集光性アンテナ、フィコビリソーム、ポリリン酸顆粒、シアノフィシン顆粒、ポリヒドロキシアルカノート (PHA) 顆粒、カルボキシソーム/多面小体、脂質体、チラコイド中心、DNA 含有領域およびリボソームといった細胞内構造が同定されている³²⁻³⁷。

軟 XM 観察で確認できた顆粒体構造の同定を行うため、透過型電顕 (TEM) 観察と低真空クライオ走査電顕 (LT/LV-SEM) 観察を行った。細胞内部を高分解能観察ができる TEM に対し、LT/LV-SEM は急速凍結した含水試料の外形を直接観察できる。また、金属コーティング無しでも観察できるのでエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) が可能である。

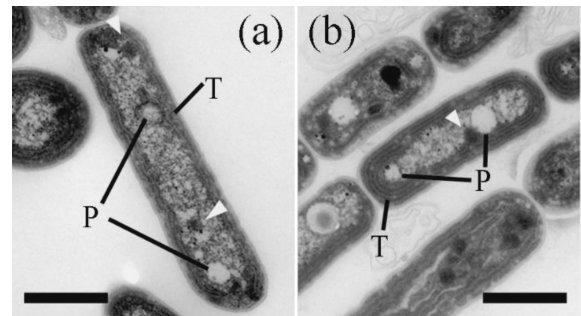


Fig. 7 Cross-sectional TEM images of PTG (a) and PTB cells (b). Note the presence of thylakoids (T), polyphosphate granules (P), carboxysomes (arrowheads). Scale bar is 1 μm .

TEM のためには、細胞懸濁液を遠心して得たペレットをグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで固定後、エタノール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で 2 重染色し、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM1400) を用いて観察した (80 kV)。

Fig. 7 に、PTG と PTB の断面の TEM 観察の結果を示す。化学固定により XM 像に比べ細胞が少し縮んでいるが、チラコイド膜、カルボキシソーム様構造体、ポリリン酸顆粒と思われる細胞内構造が確認できる。チラコイドの外側には細胞壁 (<50 nm) が存在し、PTB の細胞壁の方が PTG よりも厚かった。今回の条件では、粘質鞘を明確に確認できなかった。

LT/LV-SEM では、細胞懸濁液を、ミリポアフィルター上に滴下し、スラッシュ室素で凍結後、ALTO-1000 を装着した走査電子顕微鏡 (Hitachi, S-3400N) の鏡体内で水を昇華させ、無蒸着、低真空状態で、試料の反射電子像を観察した (15 kV, 80-90 Pa)。

Fig. 8 に、LT/LV-SEM 観察の結果を示す。PTG では、軟 XM 観察と同様に、桿菌状の細胞が連なった糸状構造が確認できた。粘質鞘は確認できない (Fig. 8(a))。細胞内に比較的大きな顆粒体が確認できた (Fig. 8(b) 囲み部)。この顆粒体について元素分析 (EDX) を行ったところ、リンとマグネシウムが細胞質に比べて多く存在していた³⁰。これより、顆粒体はポリリン酸顆粒体と同定した。

一方、PTB では、粘質鞘が明確に確認できる (Fig. 8(c))。鞘が細胞を取り囲み、細胞を直接観察することはできない。鞘が剥離した部分を観察すると、鞘の中に、軟 XM や TEM 観察と同様に、桿菌状の細胞と小さい顆粒体様構造体が確認できた (Fig. 8(d) 囲み部)。

TEM および LT/LV-SEM の観察結果から、軟 XM 観察で確認できた顆粒体構造は、カルボキシソームとポリリン酸顆粒体の可能性が高い。カルボキシソームは、シアノバクテリアなどの光合成細菌で見られる微細構造で、炭素源として細胞質に蓄積された重炭酸イオン (HCO_3^-) から二酸化炭素 (CO_2) を作る炭酸脱水酵素 (carbonic anhy-

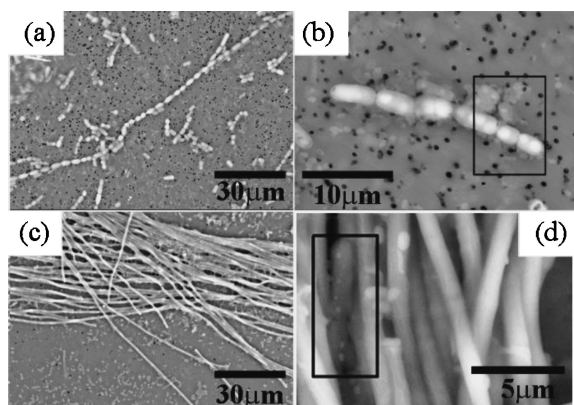


Fig. 8 LT/LV SEM images of PTG (a, b) and PTB (c, d). PTG cells contains several granules (see the boxed area in the (b)). PTB cells secrete a mucilaginous sheath. PTB cells under sheath also contain several granules (see the boxed area in the (d)).

drase) と、CO₂を固定して糖に変換する酵素ルビスコ (RubisCO) が集積したタンパク質の小構造体である。ポリリン酸は、微生物が合成したリンのポリマーで、O原子を共有して結合した四面体のPO₄を構造単位とし、顆粒状の構造体として微生物中で観察される。微生物がポリリン酸を蓄積するとき、2価の重金属イオンと結合することにより、重金属の蓄積を起こすことが知られている。カルボキシソームとポリリン酸顆粒は共にO元素との関連がある。カルボキシソームはルビスコを、ポリリン酸顆粒はポリリン酸を蛍光標識することで、識別することができる。現在、蛍光標識法と軟XMとの併用することで、顆粒体の同定を進めている。

PTBの鞘が、LT/LV-SEMでだけ観察することができた結果は非常に興味深い。鞘は、軟X線が透過するほど薄い。SEMの反射電子像は表面の凹凸情報と試料内部の組成の情報を含むことから、PTGとPTBは構造だけではなく、組成にも違いがあることは明白である。これらの結果は、PTGとPTBは異なる種類のシアノバクテリアである可能性を示唆しており、最新の分類が待たれる。

5. おわりに

水道水源地において、大増殖し、水道水に著しい異臭味障害(カビ臭)をもたらす細胞径が1~2 μmのシアノバクテリアを、迅速かつ確実に識別するため、軟XM法を応用する取り組みについて紹介した。

様々な藻類が混在する現地調査では、形質による識別法は必須である。しかし、形状が単純で、サイズも同じシアノバクテリアの場合、LMで形状の違いを捉えることは難しい。今回、未処理のPTGとPTBを軟XMで観察し、細胞径、細胞内顆粒径および分布の違いを見出し、識別の可能性を示した。しかし、このような取り組みは始まった

ばかりであり、TEMやSEMとの併用による構造同定も必須である。

今後、シアノバクテリアの観察法として、断面の数ナノメートルの構造を観察できるTEM、表面付の構造を観察できるLT/LV-SEMと並んで、内部のサブミクロンの構造をLMのような手軽さで観察できる軟XMとして認識されるよう、蓄積データが増やしていく必要がある。

謝辞

低真空クライオSEM観察およびEDXによる元素分析を行っていただいた株式会社日立ハイテクノロジーズの塩野正道様、西村雅子様に感謝申し上げます。シアノバクテリアの透過型電子顕微鏡観察において協力いただきました関西医科大学附属生命医学研究所総合研究施設の齊藤育氏に感謝申し上げます。

本研究は、文部科学省「ナノテクノロジーネットワーク」先端研究施設共用促進事業を利用して行われ、JSPS科研費(21540422, 24510039)、新技術開発財団植物研究助成(平成24~25年度)の支援を受けて行われたものである。

参考文献

- 1) 日本の水資源 H24年度版(国土交通省, 2012), 61.
- 2) 福田春雄, 藤田光一, 大沼克弘, 鈴木宏幸, 藤井都弥子, 野本岳志, 南山瑞彦, 山縣弘樹: 国総研プロジェクト研究報告 第12号(国総研, 2006).
- 3) 秋葉道宏, 岸田直裕, 下ヶ橋雅樹, 田中和明: 水道における生物障害対策に関するシンポジウム配布資料, 7 (2013). http://www.niph.go.jp/soshiki/suido/h25nuisance_documents.html
- 4) 厚生労働省: 水道原水の水質汚染事故等による水道の被害状況及び水道の異臭味被害状況, 5 (2012). <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kikikanri/03.html>
- 5) 厚生労働省: 「水道事業における高度浄水処理の導入実態及び導入検討等に関する技術資料」について, 12 (2009). <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/jousui/01.html>
- 6) 八木正一: 日本水処理生物学会誌, 24, 28 (1988).
- 7) 琵琶湖の総合的な保全のための計画検討調査委員会, 第1回委員会参考資料-1及び2 (2011). http://www.mlit.go.jp/crd/daisei/biwako_hozen/kentou1_06_sankoushiryou.pdf
- 8) 菊池 徹: Japan Analyst, 12, 1530 (1973).
- 9) 八木正一: 衛生科学 29, 16 (1983).
- 10) 淀川水質汚濁衛生防止連絡協議会: 琵琶湖のカビ臭(異臭)について (1970-1975, 1981-1984).
- 11) 淀川水質協議会琵琶湖測定点作業部会: 琵琶湖測定点観測報告書, 昭和58, 59, 60, 61年度 (1984-1987).
- 12) 中村寿子: 用水と廃水, 30, 872 (1988).
- 13) M. Kakimoto, T. Ishikawa, A. Miyagi, K. Saito, M. Miyaki, T. Asaeda, M. Yamaguchi, H. Uchimiya and M. Kawai-Yamada: J. Plant Physiol. J Plant Physiol. 171, 292 (2014).
- 14) 大久保智司: 植物科学の最前線 (BSJ-Review), 1, 43 (2010).
- 15) 辻 彰洋, 新山優子: 日本プランクトン学会報, 59, 30 (2012).
- 16) A. G. Michette, Optical Systems for Soft X-Rays (Plenum,

-
- 1986), 2.
- 17) B. L. Henke, E. M. Gullikson and J. C. Davis: *At. Data Nucl. Data Tab.*, **54**, 181 (1993).
- 18) B. L. Henke: The data set of Henke *et al.* (Henke, et al., 1993) can be obtained on Internet using http://www-cxro.lbl.gov/optical_constants (1996).
- 19) G. Schmahl, D. Rudolph, B. Niemann, P. Guttman, J. Thieme, G. Schneider, C. David, M. Diehl and T. Wilhein: *Optik*, **93**, 95 (1993).
- 20) J. Kirz, C. Jacobsen and M. Howells: *Q. Rev. Biophys.*, **28**, 33 (1995).
- 21) A. Hirai, K. Takemoto, K. Nishino, N. Watanabe, E. Anderson, D. Attwood, D. Kern, M. Hettwer, D. Rudolph, S. Aoki, Y. Nakayama, and H. Kihara: *J. Synchrotron Rad.*, **5**, 1102 (1998).
- 22) A. Hirai, K. Takemoto, K. Nishino, B. Niemann, M. Hettwer, D. Rudolph, E. Anderson, D. Attwood, D. Kern, Y. Nakayama, and H. Kihara: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **38**, 274 (1999).
- 23) H. Iwasaki, Y. Nakayama, K. Ozutsumi, Y. Yamamoto, Y. Tokunaga, H. Saisho, T. Matsubara, and S. Ikeda: *J. Synchrotron Rad.*, **5**, 1162 (1998).
- 24) M. Hettwer and D. Rudolph: *X-Ray Microscopy and Spectromicroscopy* (Springer-Verlag, 1998) IV21.
- 25) B. Niemann, D. Rudolph, and G. Schmahl: *Opt. Commun.*, **12**, 160 (1974).
- 26) A. G. Michette: *Optical Systems for Soft X-Rays* (Plenum, 1986) 176.
- 27) T. Ohigashi, H. Fujii, K. Usui, H. Namba, H. Mizutani, K. Takemoto, and H. Kihara: *AIP Conf. Proc.*, **1365**, 124 (2011).
- 28) M. Kimura, K. Takemoto, Y. Ohashi, T. Ohigashi, K. Nakanishi, H. Namba, and H. Kihara: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **50**, 026601-1 (2011).
- 29) K. Usui, T. Ohigashi, H. Namba, K. Takemoto, H. Kihara: *Mem. SR Cent. Ritsumeikan Univ.*, **13**, 207 (2011).
- 30) 竹本邦子, 山本章嗣, 水田 剛, 一瀬 論, 吉村真史, 難波秀利, 木原 裕: *日本水処理生物学会誌*, **48**, 157 (2012).
- 31) 竹本邦子, 一瀬 論, 大東琢治, 池谷仁里, 難波秀利, 木原 裕: *日本水処理生物学会誌*, **47**, 131 (2011).
- 32) H. Ris and R. N. Singh: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 63 (1961).
- 33) E. Gantt and S. F. Conti: *J. Bacteriol.*, **97**, 1486 (1969).
- 34) M. R. Edwards and E. Gantt: *J. Cell Biol.*, **50**, 896 (1971).
- 35) E. J. Thomas and M. S. Linda: *J. Bacteriol.*, **106**, 683 (1971).
- 36) Y. Asato and H. S. Ginoza: *Nature New Biol.*, **244**, 132 (1973).
- 37) M. R. Thomas and E. K. Kirston: *Cell*, **9**, 551 (1976).
- 38) D. F. Savage, B. Afonso, A. H. Chen and P. A. Silve: *Science*, **327**, 1258 (2010).

著者紹介

**竹本邦子**

関西医科大学医学部物理学教室准教授
E-mail: takemoto@hirakata.kmu.ac.jp
専門：X線顕微鏡学，バイオイメージング学

【略歴】

1995年9月東京工業大学大学院理工学研究科博士後期課程早期終了(博士(工学))。1995年10月関西医科大学医学部物理学教室助手，1999年5月関西医科大学医学部物理学教室講師，2010年11月より現職。

**吉村真史**

立命館大学総合科学技術研究機構専門研究員
E-mail: m-yosimu@fc.ritsumei.ac.jp
専門：固体物理学

【略歴】

2010年3月奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科博士後期課程研究指導認定退学。博士(理学)。2010年4月より現職

**大東琢治**

分子科学研究所極端紫外光研究施設助教
E-mail: ohigashi@ims.ac.jp
専門：X線光学

【略歴】

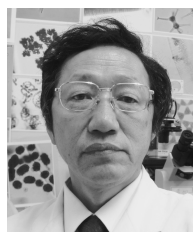
2003年筑波大学大学院博士課程修了(工学博士)。筑波大学理工学研究科講師，東北大学多元物質科学研究所研究支援者，高輝度光科学研究センター協力研究員，立命館大学総合理工学研究機構ポスドクトラルフェローを経て2011年8月より現職。

**山本章嗣**

長浜バイオ大学教授
E-mail: a_yamamoto@nagahama-i-bio.ac.jp
専門：細胞生物学，電子顕微鏡学

【略歴】

1981年3月京都大学大学院理学研究科植物学専攻博士課程終了。理学博士。1982年4月日本学術振興会奨励研究員。1984年1月関西医科大学医学部(生理学第一講座部)助手，1988年4月より同講師，2003年4月より現職。

**一瀬 諭**

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター専門員
E-mail: ichise-satoshi@pref.shiga.lg.jp
専門：環境生態工学(浮遊生物)

【略歴】

1977年4月滋賀県立衛生環境センター水質課勤務，水産技師。2005年4月滋賀県琵琶湖環境科学研究センター勤務，環境監視部門専門員・主任専門員・参事。2013年4月より現職。

東北大学大学院工学研究科環境生態工学研究室博士課程卒業(工学博士)。皇居外苑水質管理検討委員(環境省委員)。排水(環境水)管理のバイオアッセイ技術検討委員(環境省委員)。2013年より日本水処理生物学会副会長。

**難波秀利**

立命館大学理工学部教授
E-mail: namba@se.ritsumei.ac.jp
専門：表面物性，放射光科学

【略歴】

1977年3月学習院大学大学院自然科学研究科博士課程満期退学，理学博士。1977年4月学習院大学理学部助手。1981年3月東京大学物性研究所，日本学術振興会特定領域奨励研究員。1983年12月東京大学理学部助手。1996年4月より現職。

**木原 裕**

学校法人・日ノ本学園理事長，姫路日ノ本短期大学学長，名古屋大学シンクロトロン光研究センター客員教授，立命館大学SRセンター顧問，関西医科大学名誉教授
E-mail: kiharah1234@gmail.com
専門：生物物理学，X線顕微鏡学

【略歴】

1972年3月東京大学大学院理学系研究科物理学専門課程単位取得退学，1979年3月理学博士(論文博士)，1972年4月より自治医科大学医学部講師，1987年4月より自治医科大学看護短期大学教授，学長補佐，1993年8月より関西医科大学教授，2012年3月同定年退職，2012年4月より名古屋大学シンクロトロン光研究センター客員教授，立命館大学SRセンター顧問。2013年8月より学校法人日ノ本学園理事長，2014年4月より姫路日ノ本短期大学学長を併任。

Soft X-ray micro imaging of musty-odor producing filamentous cyanobacteria isolated from Lake Biwa

Kuniko TAKEMOTO	Department of Physics, Kansai Medical University 2-5-1, Shinmachi, Hirakata, Osaka, 573-1010, Japan
Masashi YOSHIMURA	The SR Center, Ritsumeikan University 1-1-1, Noji-Higashi, Kusatsu, Shiga, 525-8577, Japan
Takuji OHIGASHI	UVSOR Facility, Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Science 38 Nishigo-Naka, Myodaiji, Okazaki, Aichi, 444-8585, Japan
Akitsugu YAMAMOTO	Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, 1266 Tamura-cho, Nagahama, Shiga, 526-0829, Japan
Satoshi ICHISE	5-34, Yanagasaki, Otsu, Shiga, 520-0022, Japan
Hidetoshi NAMBA	Department of Physical Sciences, Ritsumeikan University 1-1-1, Noji-Higashi, Kusatsu, Shiga, 525-8577, Japan
Hiroshi KIHARA	The SR Center, Ritsumeikan University 1-1-1, Noji-Higashi, Kusatsu, Shiga, 525-8577, Japan

Abstract Soft X-ray microscopy was applied to identify the type of *Phormidium tenue* (*Pseudanabaena* sp.) producing musty odor which have frequently occurred in Lake Biwa. While musty odor producing strain (PTG) was composed of thick cells, non-producing strain (PTB) was composed of slender cells. Although several granules were observed in both strains, size and the size distribution of the granules were different between PTG and PTB. Soft X-ray microscope is expected to be a new appropriate observation tool of micro-cyanobacteria, together with a transmission electron microscope and a low temperature/low vacuum scanning electron microscope.