

## 伊豆沼湖畔の給餌池における大腸菌群の挙動

佐藤 歩<sup>1\*</sup>・小浜暁子<sup>1</sup>・有田康一<sup>1†</sup>・嶋田哲郎<sup>2</sup>・江成敬次郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 東北工業大学 〒982-8577 宮城県仙台市太白区八木山香澄町 35-1

E-mail ayumi-sato@tohtech.ac.jp

<sup>2</sup> 公益財団法人宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団 〒989-5504 宮城県栗原市若柳字上畠岡敷味  
17-2

<sup>3</sup> 東北工業大学工学部環境エネルギー学科 〒982-8577 仙台市太白区八木山香澄町 35-1

\*責任著者

キーワード: 大腸菌群 大腸菌 水鳥 給餌池 底泥

2013年2月6日受付 2013年7月24日受理

**要旨** 国内有数の水鳥の飛来地である伊豆沼畔に造成された給餌池では、1シーズンに10,000羽から90,000羽の水鳥が入込むことが確認されている。水鳥給餌池の水質は年々悪化しており、その原因として水鳥の排泄物が影響していると考えられる。しかし、その詳細は明らかではない。本研究では、水鳥の排泄物が給餌池の水質に与える影響に着目し、給餌池内における大腸菌群および大腸菌の挙動を把握することを目的とした。調査の結果、給餌池の水中において大腸菌群は夏季を中心に検出されたが、大腸菌はほとんど検出されなかった。水鳥の排泄物中からは大腸菌群および大腸菌が検出され、これが汚濁源になっている可能性が考えられた。また、給餌池の底泥からも大腸菌群および大腸菌が検出された。水鳥の排泄物や底泥から検出された大腸菌が環境水中からは検出されなかつた要因として、温度が影響している可能性が考えられた。

### はじめに

伊豆沼・内沼は、1985年(昭和60年)にラムサール条約の指定湿地として日本で2番目に登録された、国内有数の水鳥の飛来地である。そのため、条約基本理念である沼の「保全・再生」と「賢明な利用(ワイスユース)」、「交流・学習」に関する取り組みが行なわれてきた。しかしながら、毎年10月上旬から3月下旬にかけて越冬する多数のガン類・カモ類・ハクチョウ類の排泄物に由来する汚濁負荷に加えて、観光客による多種多様な給餌はともに管理が難しく、沼の水質悪化が懸念された。そこで、観光客による給餌

<sup>†</sup> 現所属:独立行政法人国立環境研究所 〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

場所を指定し、推奨する餌(ポン菓子)を用意することにより沼全域での人為的汚濁負荷の軽減をはかる取り組みがなされており、その一環として水生植物による浄化田を備えた給餌池が 1991 年に伊豆沼畔に造成された(江成ほか 1992).

給餌池においては公益財団法人宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団による組織的で質・量ともに管理された給餌が行なわれており、2007 年度 1 シーズンで給餌池へ入込んだ水鳥の総数は、約 90,000 羽であった(鳴田・藤本 2010, 鳴田哲郎 未発表). しかし、翌 2008 年度に秋田県や北海道でオオハクチヨウの死骸から鳥インフルエンザウイルスが検出されたことをうけ、水鳥の集中化による感染症の発生や拡大を予防するために給餌池における給餌活動は縮小された. その結果、給餌池へ入込む水鳥の総数は減少し 2008 年度と 2009 年度における 1 シーズンあたりの給餌池への入込数は 10,000 羽から 15,000 羽となった(鳴田・藤本 2010, 鳴田哲郎 未発表).

これまでの研究により、溶存有機態炭素濃度の上昇(中村・相崎 2007). 懸濁態物質(SS)や大腸菌群数の変動に影響を及ぼす(小浜ほか 2008, 小浜ほか 2009)など、水質悪化と水鳥の入込との関係が示されてきた. しかし、伊豆沼・内沼の持続的なワイルドユースを図るためにには、水鳥と共生しながら水環境の保全に取り組む必要がある.

そこで本研究では、衛生的な水辺を維持管理する上で重要な糞便汚染の指標となる大腸菌群ならびに大腸菌の挙動に着目し、水鳥が多く入込むことによる水環境への影響を調べることを目的とした.

まず給餌池水中における大腸菌群数の時季的変動を長期モニタリングし、水鳥の入込と大腸菌群数の変動との関係、水温と大腸菌群数の変動との関係、大腸菌数の季節変化を調査した. さらに、給餌池に入込む水鳥排泄物中ならびに給餌池底泥中の大腸菌群数および大腸菌数を調査した.

## 調査地点

調査地である給餌池の位置を図 1 に示す.

給餌池(南北約 50 m × 東西約 100 m、水深約 0.7 m)は構造上、伊豆沼から独立しており、池内にはヨシ、マコモおよびハス等の水生植物が生育しているが、岸の一部は矢板が設置され、植物群落はない. ハスは例年 6 月から 9 月にかけて池内に群生し、その後枯死する. また調査時における水鳥の入込は、2007 年度は 11 月 1 日から 3 月 27 日にかけて、2008 年度は 10 月 22 日から 2 月 4 日、2009 年度には 11 月 4 日から 3 月 17 日、2010 年度は 12 月 2 日から 1 月 6 日まで確認された.

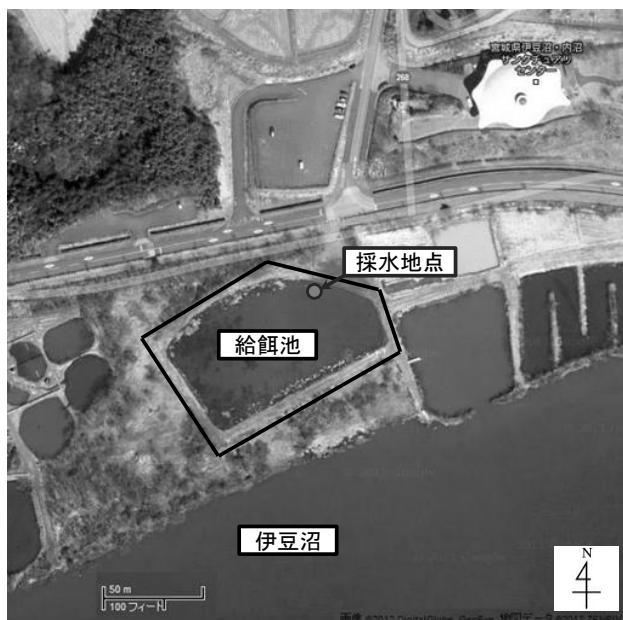


図 1. 給餌池の位置(Google マップ 2012 を基に作成).

## 調査方法

### 1) 給餌池における水質と大腸菌群数および大腸菌数の調査

給餌池における、水鳥の入込数および水質と大腸菌群数および大腸菌数の変動との関係、水温と大腸菌群数および大腸菌数との関係を明らかにするため、長期モニタリングを行なった。

採水は 2007 年 5 月 31 日から 2011 年 3 月 10 日まで行なった。採水頻度は 2007 年 5 月 31 日から 2009 年 3 月 25 日までは 2 週間に 1 度、2009 年 4 月 22 日から 2011 年 3 月 10 日までは 1 箇月に 1 度の頻度で、計 69 回の採水を行なった。

採水時刻を 10 時から 12 時の間とし、給餌池岸矢板部の解放水面 1 箇所において表層水を採取した。なお、測定用の試料は 1 mm メッシュ (20-GG, NRK) でろ過した後、SS と化学的酸素要求量 (COD<sub>Mn</sub>) 測定用試料として 1 L 容ポリ容器に採取した。大腸菌群数測定用試料は 100 mL 容滅菌容器に直接採取した。

測定項目を水温、SS、COD<sub>Mn</sub>、大腸菌群数および大腸菌数とした。水温は現地にてポータブル溶存酸素計 (TOADKK 社製 DO-24P) で、SS と COD<sub>Mn</sub> は JIS 法に基づき測定を行なった。なお COD<sub>Mn</sub> については、未濾過の試水を測定に供することで全 COD (T-COD) を、GF/C フィルター (Whatman 社製) による濾液を測定に供することで溶存態 COD (D-COD) をそれぞれ求めた。また大腸菌群の検出には、デゾキシコレート培地 (日本製薬株式会社製) による平板培養法を、大腸菌の検出には ECC 培地 (CHROMagar Microbiology 社製、以下 ECC 培地) をそれぞれ用いた。培養はそれぞれ 3 枚の寒天培地による混釀培養法とし、37°C 24 時間後に出現したコロニー数の平均値を結果とした。

ここで示す大腸菌群 (coliform bacteria) とは、グラム陰性菌の中の無芽胞性の桿菌であり、かつ乳糖を分解して酸とガスを生ずる、好気性または通性嫌気性の細菌群である (日本分析化学会北海道支部 1966)。従って、大腸菌群とは必ずしも大腸菌を指すわけではなく、排泄物汚染の指標となる一群の総称である。そこで本調査では、大腸菌群と大腸菌のコロニーを明瞭に区別することができる、ECC 培地を用いることにより、それを定量的に把握することとした (関東化学株式会社 2009、村岡・折目 2005)。

### 2) 水鳥排泄物中大腸菌群数および大腸菌数の調査

給餌池に入込む水鳥の排泄物に由来する大腸菌群および大腸菌の負荷源としての可能性を把握するため、給餌池に入込む割合が高い (図 2) ハクチョウ類およびオナガガモの排泄物単位湿潤重量あたりの大腸菌群数および大腸菌数を調査した。採取した試料の様子を表 1 に示す。

水鳥排泄物試料を 2010 年 2 月 10 日に、給餌池周辺で採取した。試料は滅菌処理した薬匙を用いて、50 mL 容ポリプロピレン製コニカルチューブ (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製 BLUE MAX™ 50 mL Polypropylene Conical Tube、以下 50 mL 容コニカルチューブ) に採取した。

あらかじめ重量を量った生理食塩水 (0.85 w/t% 食塩水) 10 mL をいれた試験管に採取した排泄物試料を薬匙でひとくさい (0.16 g ~ 1.93 g) 添加した後、重量を計測し、その差し引きで排泄物試料の湿潤重量を算出した。その後、試験管ミキサー (SIBATA 社製 TEST TUBE MIXER TTM-1) で 10 秒攪拌し、3 枚の寒天培地に混釀して 37°C で 24 時間培養した。出現コロニーの平均値から排泄物湿潤重量 1 gあたりの大腸菌群数もしくは大腸菌数に換算した。

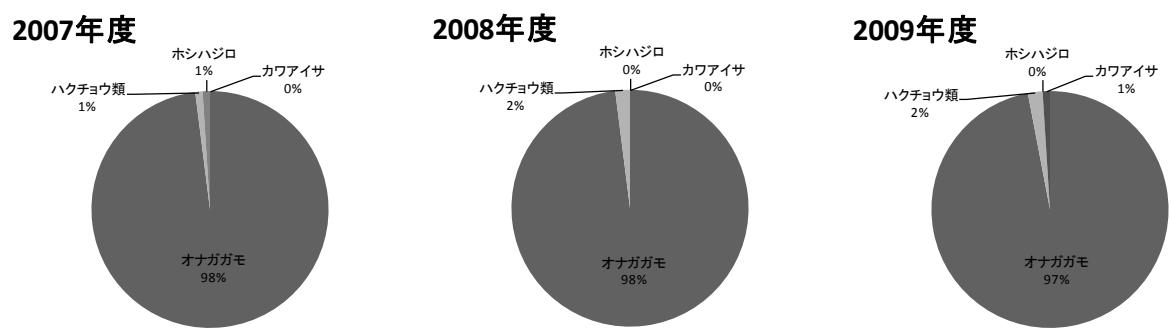
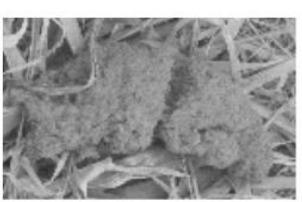


図2. 2007年度から2009年度における給餌池に入込んだ水鳥の割合(嶋田哲郎 未発表).

表1. 採取した排泄物の様子.

試料名	試料名
No.1 ハクチョウ類	No.6 オナガガモ
	
No.2 ハクチョウ類	No.7 オナガガモ
	
No.3 ハクチョウ類	No.8 オナガガモ
	
No.4 ハクチョウ類	No.9 オナガガモ
	
No.5 ハクチョウ類	No.10 オナガガモ
	

換算式は、以下の通りである。換算式にある試料量は生理食塩水(10 mL)と添加した排泄物試料量(mL)の合計を用いるのが正確であるが、ここでは便宜上 10 mLとした。

$$\text{大腸菌群数(CFU/wt g)} = \text{コロニー数(CFU/mL)} \times (\text{試料量(10 mL)}) / (\text{重量(wt g)})$$

なお、大腸菌群の検出にはデゾキシコレート培地を、大腸菌の検出には ECC 培地をそれぞれ使用した。

### 3) 水鳥給餌池底泥中における大腸菌群数および大腸菌数の調査

給餌池水中における大腸菌群数および大腸菌数の変動要因として、給餌池底泥の巻き上げの影響が考えられる。そこで、給餌池底泥中の大腸菌群数および大腸菌数を把握することを目的とし、以下の調査を行なった。

給餌池では 2010 年 4 月中旬から 5 月中旬にかけて断続的に水抜きが行なわれ、最終的に通常満水期の 1/3 程度の水位となった。この期間に採泥を行なった。

採泥地点は、給餌池内の特徴的な環境を呈する 4 地点とした(図 3, 表 2)。すなわち、地点 1

は定期調査における採水地点付近である。この場所は、岸の一部が矢板となっており植物群落はない。地点 2 も同様に、植物群落はないが、地点 1 に比べて浮遊する植物片などが溜まりやすい場所である。地点 3 は、冬場に浮マコモが吹き寄せている場所である。地点 4 は、ヨシなどの水生植物が群生している場所である。

調査は地点 1 については 2010 年 4 月 25 日に、地点 2、地点 3、地点 4 については 2010 年 4 月 18 日に実施した(図 3)。採泥は直径約 50 mm、全長約 500 mm の金属製柱状採泥器を用いて行ない、各地点でそれぞれ 1 コアずつ採取した。

採取した底泥コア試料は暗所(20°C)で 1 日静置させた後、直上水を約 100 mL 採取し、さらに滅菌処理を施した薬匙を用いてコア表面からひどくいの底泥を採取して 50 mL 容コニカルチューブに収容し、測定用試料とした。

大腸菌群数の測定にはデゾキシコレート培地を用い、大腸菌数の測定には ECC 培地をそれぞれ用いた。培養温度は、鳥類の体温と給餌池の水温条件とを考慮して 4 段階に設定した。すなわち、培養最高

表 2. 採泥地点および採取した底泥の概要。

地点名	地点選定理由	採取日	底質	色	備考
地点1	定期調査採水地点付近	2010年4月25日	粘土質	褐色	-
地点2	植物群落はないが浮遊する植物片などが溜まりやすい場所	2010年4月18日	砂質	褐色	植物遺骸が混ざっていた
地点3	冬場に浮マコモが吹き寄せている場所	2010年4月18日	砂質	褐色	-
地点4	ヨシなどの抽水植物が群生している場所	2010年4月18日	粘土質	灰色	植物遺骸が混ざっていた

温度は鳥類の体温付近(フランクほか 2007)である 37°C とし, 納餌池における最高水温付近の 25°C, および平均水温付近である 15°C, ならびに最低水温付近の 5°C とした. それぞれの温度に設定したインキュベータ内にて 24 時間培養し, 出現したコロニー数を計数した. 培養にはそれぞれ 2 枚の寒天培地を使用し, その平均値を結果とした.

## 結果

### 1) 納餌池水中における大腸菌群数および大腸菌数の変動

調査を行なった納餌池において池水中の大腸菌群は, 水温に伴って変動する傾向を示し, 冬季(11 月から 3 月)には  $10^0\text{--}10^1$  CFU/mL, 夏季(6 月から 8 月)には  $10^2\text{--}10^3$  CFU/mL のオーダーでそれぞれ検出された(図 4). しかしながら, 多くの水鳥が入込んだ 2007 年度は冬季にも大腸菌群数の増加が確認され, 2008 年 1 月 24 日には水温が 5°C 以下であるにもかかわらず, 水温が 15°C 以上となる 5 月や 9 月に観察された値に匹敵する  $7.4 \times 10^1$  CFU/mL にまで達した. このとき同時に SS や T-COD も高くなる傾向が示され(図 4), それぞれ 150 mg/L, 30 mg/L に達した. SS は調査期間を通して最大値であり, T-COD は春季や秋季の値に相当した.

一方, 調査期間を通して大腸菌は, ほとんど検出されなかった(データは示していない).

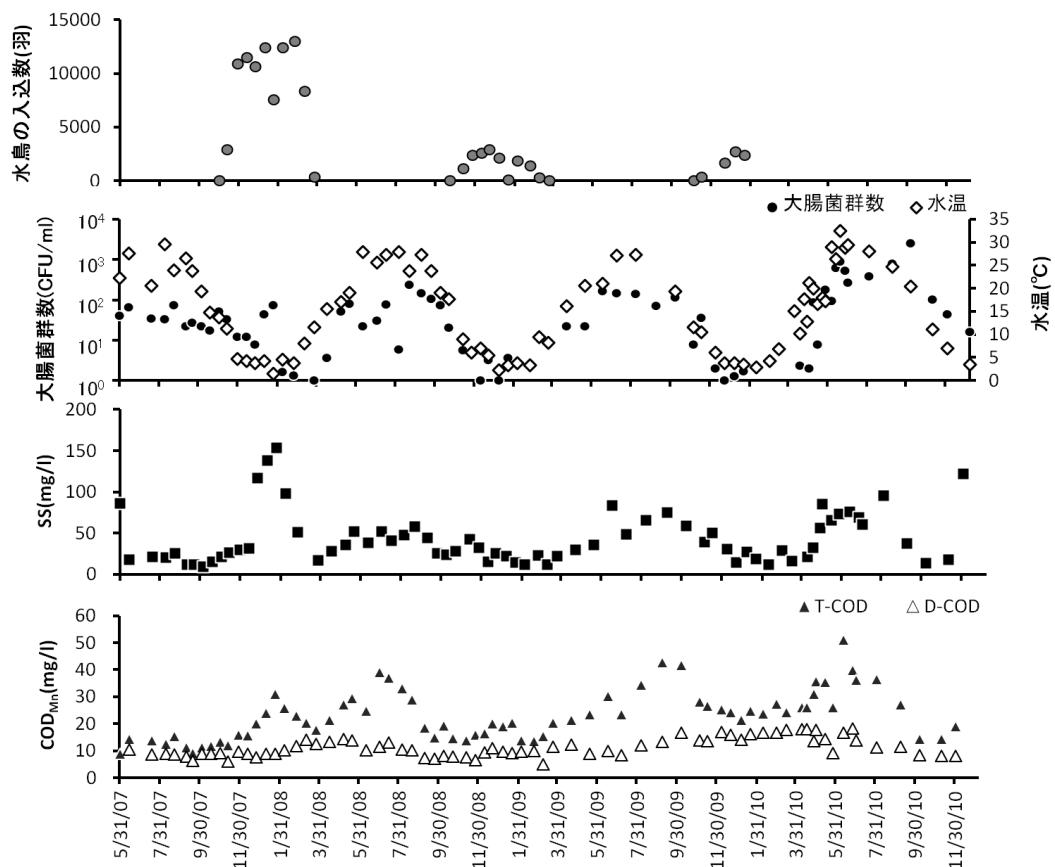


図 4. 納餌池における水鳥の入込数, 大腸菌群数, 水温, SS, COD<sub>Mn</sub> の経時変化.

## 2) 水鳥排泄物中における大腸菌群数および大腸菌数の調査

ハクチョウ類とオナガガモの排泄物に由来する大腸菌群と大腸菌の検出結果を図5に示した。ハクチョウ類においては5つのサンプルすべてから大腸菌群が検出され、平均  $1.4 \times 10^2$  CFU/wt g であったが、単位湿潤重量あたりの検出数は最大で1桁バラついた。一方、オナガガモにおいては4サンプルから平均  $3.4 \times 10^4$  CFU/wt g の大腸菌群が検出されたが、検出数は大きくバラつき  $6 \times 10^0$ – $1.7 \times 10^5$  CFU/wt g であった。

また大腸菌についてはともに検出率が低下し、ハクチョウ類では1サンプルから  $10^0$  CFU/wt g オーダーで検出されるにとどまり、オナガガモでは2サンプルからそれぞれ  $1.1 \times 10^2$ ,  $3.5 \times 10^3$  CFU/wt g 検出された。

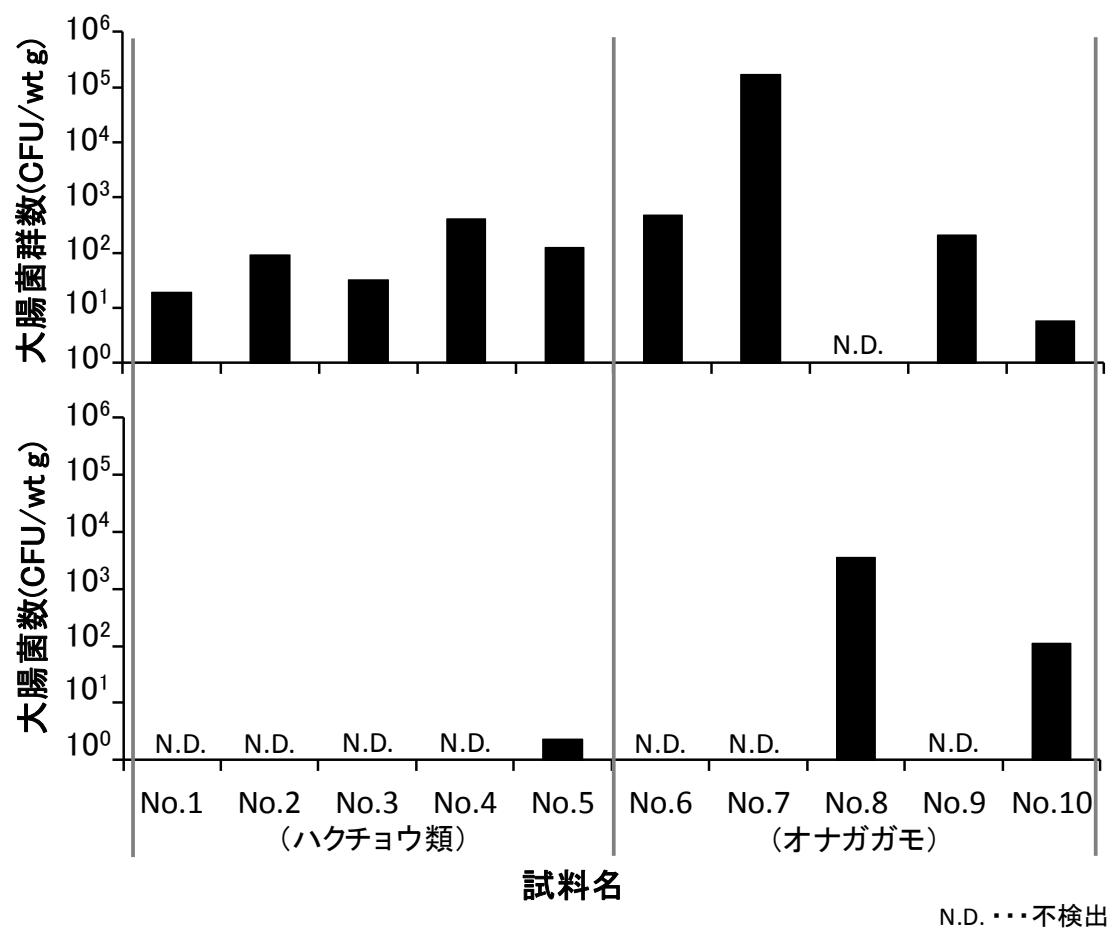


図5. ハクチョウ類とオナガガモの排泄物中大腸菌群数および大腸菌数。

## 3) 水鳥給餌池底泥中における大腸菌群数および大腸菌数の調査

供試底泥を採取した2010年4月における池水中の大腸菌群は  $10^0$ – $10^1$  CFU/mL オーダーであったのに対して(図1), 底泥からは  $10^1$ – $10^2$  CFU/wt g オーダーの大腸菌群が検出された(図6)。37°Cおよび25°C培養区においてはすべての採泥地点から大腸菌群が検出され、それぞれ  $7.1 \times 10^1$ – $1.2 \times 10^4$  CFU/wt g(平均  $3.2 \times 10^3$  CFU/wt g),  $1.9 \times 10^2$ – $1.6 \times 10^4$  CFU/wt g(平均  $4.4 \times 10^3$  CFU/wt g)であった。また、15°C培養区では採泥地点によらず大腸菌群は検出されなかった。

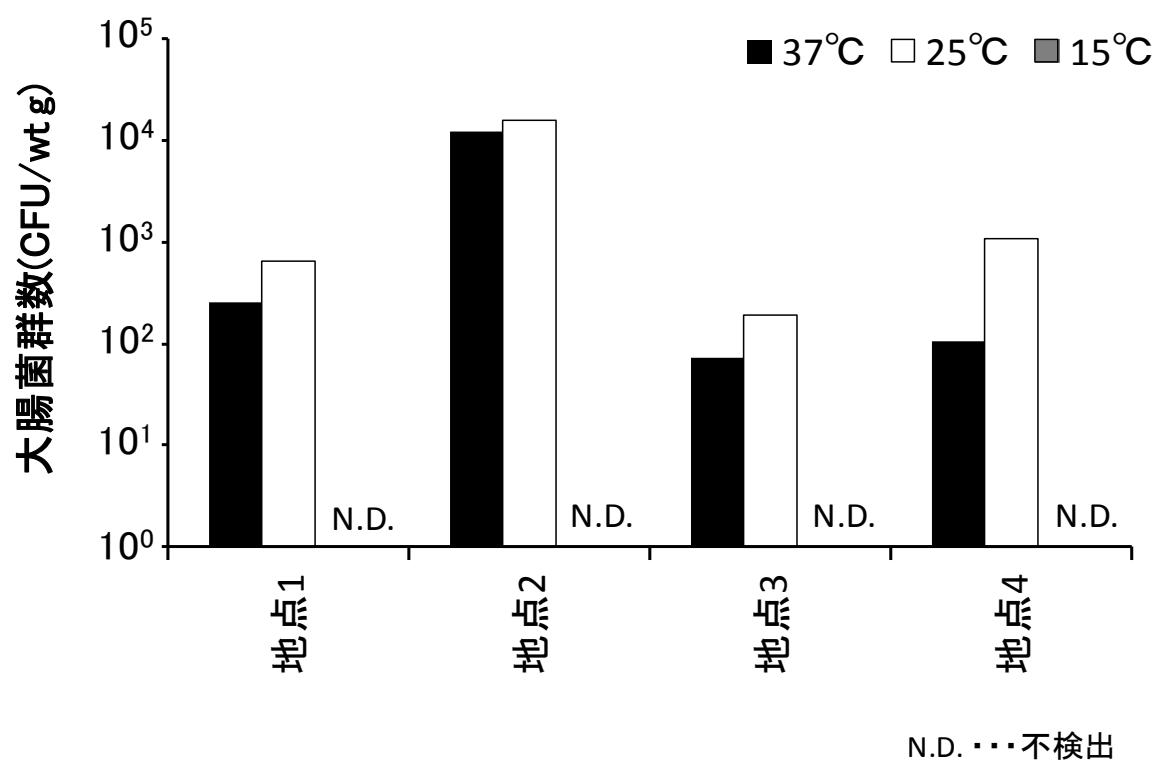


図 6. 各採泥地点における底泥中大腸菌群数と培養温度.

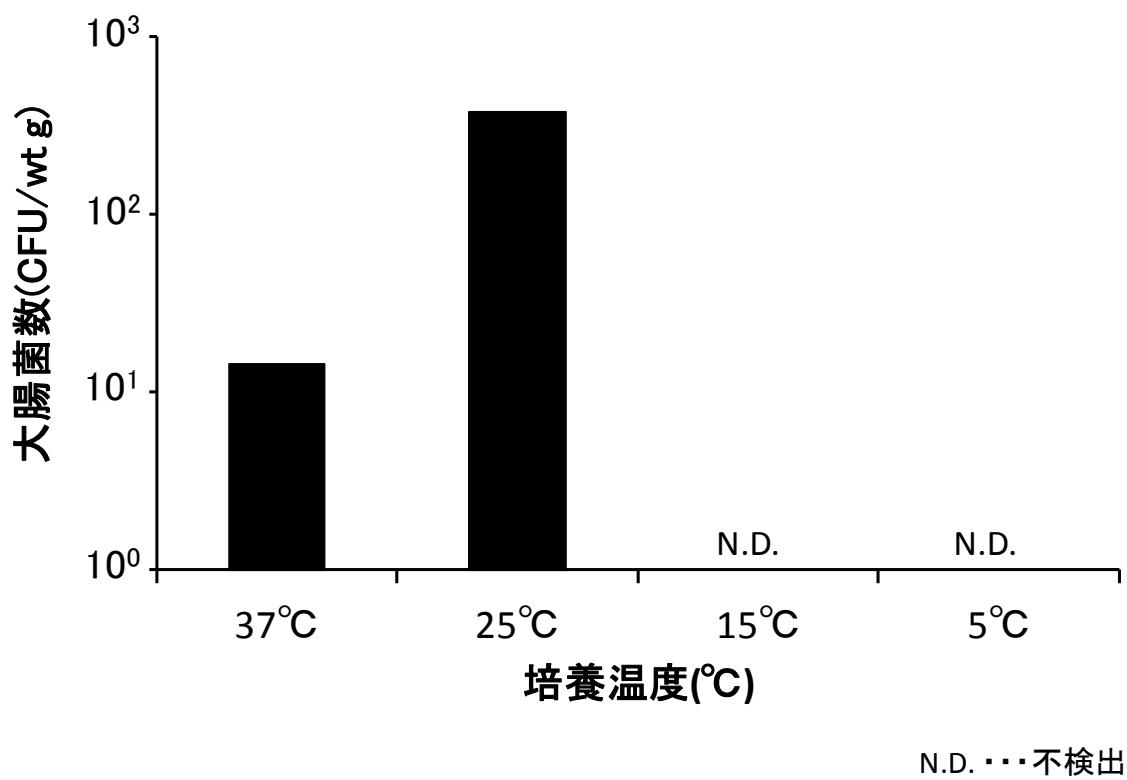


図 7. 地点 2 における底泥中大腸菌数と培養温度との関係.

一方、大腸菌は採泥日の池水中からは全く検出されず、底泥からも地点2においてのみ検出された。また、大腸菌群と同様に15°C以下では不検出だったのに対し、25°C培養区においては37°C培養区よりも2倍以上多く検出され、10<sup>2</sup> CFU/wt gオーダーであった(図7)。

## 考察

大腸菌群数の時季的変動を長期モニタリングした結果、水温変動に大きく依存して変動する傾向にあることが明らかとなった。すなわち水温が5°C未満となる冬季(11月から3月)には大腸菌群数は不検出もしくは10<sup>0</sup>–10<sup>1</sup> CFU/mLのオーダーで推移した後、水温上昇とともに増加し、15°C以上となる5月には10<sup>1</sup>–10<sup>2</sup> CFU/mLのオーダーとなった。さらに、20–25°Cとなる夏季(6月から8月)に10<sup>2</sup>–10<sup>3</sup> CFU/mLのオーダーで変動してピークを形成した後、水温低下とともに大腸菌群数も低下した。

ところが、1シーズンあたりの給餌池への水鳥入込総数が約90,000羽となった2007年度の冬季においては、水温が5°C以下であるにもかかわらず大腸菌群数が増加し、同年5月の値に匹敵した。このことから、水温以外の要因も大腸菌群数の変動に寄与している可能性が考えられた。そこで、水鳥が過剰に入込むことにより増加したと考えられる排泄物の汚濁負荷としての可能性について検証した。

ハクチョウ類の排泄物とオナガガモの排泄物とでは検出傾向に違いは見られるものの、大腸菌群は10<sup>0</sup>–10<sup>5</sup> CFU/wt gのオーダーで、大腸菌は10<sup>0</sup>–10<sup>3</sup> CFU/wt gのオーダーでそれぞれ排泄物中に存在することが明らかとなった。しかしながら、前述の2007年度以外の冬季には池水中の大腸菌群は不検出となることから、排泄物に由来する両者が直接、水中で増殖する可能性は低いものと考えられた。

そこで給餌池底泥の大腸菌群数および大腸菌数を調べた結果、池水中に比べて底泥中には両者が約10倍多く存在していることが明らかとなった。さらに採泥地点ごとに異なるものの、底泥中には温度によって増殖活性が異なる大腸菌群および大腸菌が生育している可能性が示された。すなわち、鳥類の体内温度付近(フランクほか2007)である37°Cよりも、給餌池における最高水温付近である25°Cでより増殖し、15°C以下では十分に増殖できないために冬季の低温期には底泥中で不活性化している可能性が考えられた。

以上より、水鳥の排泄物中や給餌池底泥に存在する大腸菌群および大腸菌が汚濁負荷となる可能性が示された。さらに、温度により増殖活性が異なることが明らかとなったことから、その変動と水温変動との関係が改めて確認された。したがって、水鳥が多く入込んだ2007年度冬季における池水中大腸菌群数の増加現象については、低水温下で増殖した可能性は低く、同時に増加していたSSやT-CODとの関係性が考えられた。すなわち、水鳥の過剰な入込に伴う排泄物の懸濁ならびに底泥の巻き上げにより、それぞれに存在する大腸菌群が検出された可能性が強く示唆された。

水鳥と共生しながら水環境を保全し、伊豆沼・内沼の持続的なワизユースを図るために、給餌池における管理手法の開発・確立が役立つものと考えられる。2007年度春には給餌池の池干しが実施され、本研究開始時に伊豆沼とつながる隣の池から導水されたのち、2010年度春に行なわれた減水操作以外の環境管理は実施されていない。そのため、2007年度の春から秋にかけてT-COD濃度は他年度に比

べて低濃度で推移していたが、水鳥が入込む冬に急激に上昇した後、年度を経るにつれて濃度は上昇していった。また、2007年度の大腸菌群数最大値は  $10^1$  CFU/mL オーダーであったのに対し、調査最終年度である2010年度には  $10^3$  CFU/mL オーダーにまで達していた。これらの水質変動は、給餌池への水鳥入込数が減少していく中で記録されたことから、池内に汚濁源が蓄積されていった結果と考えられた。したがって、組織的で質・量ともに管理された給餌による水鳥入込数の調整と、定期的な池干しと底泥の掻き出しは、観光客が利用する給餌池を衛生的に維持管理する上で効果的であると同時に、伊豆沼・内沼への汚濁負荷量軽減の一助となることが期待された。

## 謝辞

本研究は、調査にあたり公益財団法人宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団の多大なるご支援を得ました。そして、2007年度、2008年度、2009年度および2010年度江成・小浜研究室の皆様の協力を得ました。また、文部科学省科学研究費補助金(若手研究(B)(課題番号 19710069))の一環として行なわれました。ここに記して謝意を表します。

## 引用文献

- 江成敬次郎・斎藤孝市・中山正与・柴崎 徹・佐々木久雄・鈴木 淳. 1992. 伊豆沼に設置された給餌池の汚濁負荷削減効果についての調査研究. 環境システム研究 20: 386-390.
- フランク, B. G. 2007. 鳥類学第3版. 山岸 哲(監修)・山階鳥類研究所(訳). 新樹社, 新宿.
- 関東化学株式会社 HP. <http://www.kanto.co.jp/rinsyo/saikin.html>, 参照 2009-10-06.
- 小浜暁子・有田康一・江成敬次郎・藤田光則. 2009. 伊豆沼畔における水鳥給餌池の水質変動特性. 第43回日本水環境学会年会講演集: 131.
- 小浜暁子・藤田光則・有田康一・江成敬次郎. 2008. 伊豆沼給餌池における大腸菌群数の変動. 平成19年度土木学会東北支部技術研究発表会講演概要集. VII-20.
- 村岡麻衣子・折目孝子. 2005. 酵素基質培地による下水処理水の大腸菌群数測定の検討. 第42回下水道研究発表会講演集: 10-12.
- 中村雅子・相崎守弘. 2007. 水鳥の多く飛来する池沼の水質保全に関する研究. 平成16-18年科学研究費補助費(基盤研究(C))研究成果報告書: 14-20.
- 日本分析化学会北海道支部 (編). 1966. 水の分析第3版. pp. 391. 化学同人, 京都.
- 嶋田哲郎・藤本泰文. 2010. 伊豆沼・内沼におけるガンカモ類への給餌縮小の影響. 伊豆沼・内沼研究報告 4: 1-7.

## Seasonal changes of the behavior of coliform bacteria in the waterfowl feeding pond

Ayumi Sato<sup>1\*</sup>, Akiko Kohama-Inoue<sup>1</sup>, Koichi Arita<sup>1†</sup>, Tetsuo Shimada<sup>2</sup> & Keijiro Enari<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Tohoku Institute of Technology, 35-1 Kasumi-cho, Yagiyama, Taihaku-ku, Sendai, Miyagi 982-8577, Japan E-mail ayumi-sato@tohtech.ac.jp

<sup>2</sup> The Miyagi Prefectural Izunuma-Uchinuma Environmental Foundation, 17-2 Shikimi, Wakayanagi, Kurihara, Miyagi 989-5504, Japan

<sup>3</sup> Department of Environment and Energy, Tohoku Institute of Technology, 35-1 Kasumi-cho, Yagiyama, Taihaku-ku, Sendai, Miyagi 982-8577, Japan

\* Corresponding author

**Abstract** Lake Izunuma-Uchinuma is a famous migratory and wintering ground for swans. During the time when swans and other waterfowl are at this location people regularly come to feed them. Because leftover feed and waterfowl droppings were thought to be contributing to water pollution in Lake Izunuma, a feeding pond was constructed near the lake in 1991. The water quality of the feeding pond became worse year after year. It is thought that waterfowl feces caused an increase in water pollution in the pond, however, the details have not been clarified. The objective of this study was to understand the behavior of coliform bacteria in the feeding pond. The results are as follows. The number of coliform bacteria changed with variations in the water temperature of the pond. It is also probable that the concentration of *Escherichia coli* (*E. coli*) in the pond was affected by temperature, although this was not conclusive. Even though *E. coli* was hardly detected in the pond water, *E. coli* were detected in samples from the pond sediment. Considering that coliform bacteria and *E. coli* were detected in feces of waterfowl, it seems likely that waterfowl feces were a major source of water pollution.

**Keywords:** coliform bacteria, *Escherichia coli*, waterfowl, feeding pond, sediment

Received: February 6, 2013/ Accepted: July 24, 2013

---

† Present address: National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba-City, Ibaraki 305-8506, Japan

