

琵琶湖におけるアオコ藻体中のマイクロシスチン分析結果

中村忠貴・津田泰三・一瀬諭・若林徹哉・原良平

要 約

2003年9月～10月にかけて琵琶湖で発生したアオコ藻体に含まれるマイクロシスチンRR, YR, LRを、LC/MS法を用いて分析を行った。その結果、各マイクロシスチンの含有量は最大でRR 826 $\mu\text{g/g-dry}$, YR 174 $\mu\text{g/g-dry}$, LR 506 $\mu\text{g/g-dry}$, またTotalでの最大では1242 $\mu\text{g/g-dry}$ で、他の国内の湖沼並であり、RR, LR, YRの割合も平均で53%, 10%, 37%で他の国内湖沼と同程度の割合であった。また、マイクロシスチン含有量はアオコの発生初期の段階で多くなる傾向がみられた。その中でもマイクロキスティス属の多い検体でマイクロシスチン含有量がより多くなる傾向が見られた。オシラトリアカワムラエの優占時期では、発生初期でマイクロキスティス属が3600群体/ml・7200群体/mlと多く混在している2検体 (Total 34 $\mu\text{g/g-dry}$, 229 $\mu\text{g/g-dry}$) を除いた10検体でマイクロシスチンTotal含有量が15 $\mu\text{g/g-dry}$ 以下であることから、オシラトリアカワムラエがマイクロシスチンを産生したとしてもその量は少ないものと考えられた。

1. はじめに

湖沼の富栄養化に伴い、藍藻類の異常繁殖いわゆるアオコが各地で発生している。アオコはカビ臭や浄水施設のろ過障害などの原因となり、さらにマイクロシスチン (肝臓毒) に代表される藍藻毒を産生するものもあり、アオコの発生抑制およびアオコ毒素の生成・分解メカニズムの解明が重要な課題となっている。

琵琶湖でも1983年度以降1984年を除いて、藍藻類によるアオコ (水の華) が毎年確認されており、2003年度から2004年度にかけても、南湖を中心に複数の種類 (マイクロキスティス、アナベナ、オシラトリア等) によるアオコが確認される状況であり、アオコやアオコの毒素が環境に与える影響についての調査はますます重要性を増している (滋賀県, 2004)。

マイクロシスチンを産生すると報告されている藍

藻類は、マイクロキスティス属のエルギノーサ、ピリディス、イクチオブラーベ、ベーゼンベルギー、アナベナ属のフロスアクア、オシラトリア属のアガルディ、テヌイなどがある (Carmichael, 1992) が、エルギノーサでも株によって毒素を産生するものとしらないものがあることが知られており (彼谷, 1995)、更に、琵琶湖で頻繁に出現するオシラトリアカワムラエ等についてはマイクロシスチンの有無は不明である (山下ら, 2003)。

よって、琵琶湖へのアオコによる影響を調査する上では、実際に琵琶湖で発生する個々のアオコが持つ毒素産生の潜在性を調査することが重要であり、本研究はそれに資することを目的として、実際に2003年度に琵琶湖で発生したアオコの藻体中の各マイクロシスチン量を測定し、アオコ優占種・発生時期・発生場所・水温・発生規模との関係について考察を行った。

マイクロシスチンの分析方法については、HPLC法（日本薬学会，1997；上水試験法，2001）、LC/MS法（梅谷ら，1996；上水試験法，2001）、ELISA法（Nagata et al.，1995；山下ら，2003）等が主に用いられているが、アオコから主に産生されるマイクロシスチンRR，YR，LRはそれぞれ毒性が異なり（彼谷，1995）、特に毒性の高いLRの割合が問題となるため、毒性の異なるマイクロシスチンRR，YR，LRを個々に分析できることが重要である。本研究では、マイクロシスチンRR，YR，LRを個々に分析でき、感度も高く、夾雑物の影響も低いLC/MS法を用いて分析を行った。

2. 調査方法

滋賀県でアオコ発生時期に毎年実施されている水の華監視体制（アオコパトロール）で、2003年度に発見・採取され、表1の方法で群体数を計測したアオコ藻体を含む水約100mlを凍結乾燥して保存し、その0.050gを秤量して5%（v/v）酢酸水溶液中で15分間超音波ホモジナイズしてアオコ藻体中のマイクロシスチンを抽出した。

以降、中村ら（2004）の分析方法を基に図1の分析フローおよび分析条件に従って固相抽出を行い、LC/MSによりマイクロシスチンRR，YR，LR含有量を分析した。

この分析方法によるマイクロシスチンRR，YR，LR標準試料の定量限界は0.05mg/ℓ、検出限界は0.02mg/ℓであった（n=5）。

また、0.05mg/ℓのマイクロシスチン標準試料1ml（図1のフローではアオコ乾燥藻体中濃度1μg/g-dryに相当）を5%（v/v）酢酸100mlに添加し、図1のフローで添加回収実験を行ったところ、82%から98%と良好な回収率を得られた（n=5）。

LC/MS法では実サンプルの標準ピークには夾

表1 アオコの計数方法

種名	群体数の計測単位	1群体あたりの細胞数	1細胞あたりの容積(μm ³)	1群体あたりの容積総量(μm ³)
マイクロキステイス エルギノーサ	直径100μmの球を1群体とする	500	65	32500
マイクロキステイス ベーゼンベルギー	直径100μmの球を1群体とする	200	110	22000
マイクロキステイス ビリディス	直径100μmの球を1群体とする	200	90	18000
マイクロキステイス ノバセッキ	直径100μmの球を1群体とする	200	100	20000
マイクロキステイス イクチオブラーベ	直径100μmの球を1群体とする	1000	50	50000
アナベナスピロイデス パークラッサ	1巻きを1群体とする	20	300	6000
オシロトリア カワムラエ	長さ1mm(1000μm)を1群体とする	200	18000	3600000

雑物によるピークの重なりは殆ど確認されなかった（図2）。また、高濃度サンプルで、マトリックスによるイオン化比への影響により定量ピークが高くなる傾向があったが、適切な希釈倍率で定量ピークと確認ピークの比率が標準試料とほぼ等しくなったことから、希釈によりマトリックスによる影響が大幅に低減されたと考えられる（中村ら，2004）。

3. 調査結果

2003年度は9/1～10/27にかけてアオコが発生した。発生場所は北湖では長浜港、南湖では雄琴、

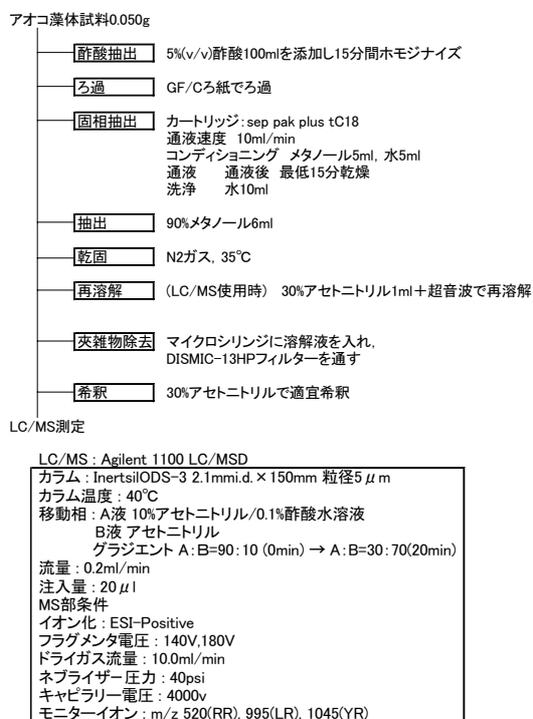


図1 アオコ藻体中のマイクロシスチン分析フロー

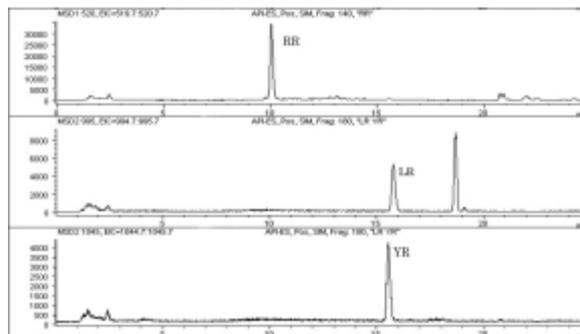


図2 LC/MSでの各マイクロシスチンピーク

際川、浜大津、文化館、膳所公園、赤野井であった(表2, 図3, 図4, 図5)。

アオコの発生時期は9月上旬、9月中旬、10月中旬の3期に分けられ、アオコの優占種については、9月上旬はミクロキスティス属(エルギノサ、バーゼンベルギー、ノバセッキ)が主な優占種であったが、9月中旬ではオシラトリアカワムラエが主な優占種となり、10月中旬ではアナベナスピロイデス、パークラッサが主な優占種となり、各発生時期毎に主な優占種が変化した。

ミクロシスチン含有量はアオコ藻体の乾燥重量あたり最大でRR 826 $\mu\text{g/g-dry}$ 、YR 174 $\mu\text{g/g-dry}$ 、LR 506 $\mu\text{g/g-dry}$ 、Totalでの最大では1253 $\mu\text{g/g-dry}$ で、1994年のアオコ大量発生時に北湖で初めて観測され、ミクロシスチンが測定された長浜港のアオコの結果より全体的に少なく(RR1250 $\mu\text{g/g-dry}$ 、YR 100 $\mu\text{g/g-dry}$ 未満、LR 770 $\mu\text{g/g-dry}$)、他の国内の湖沼の最大値(諏訪湖(1980~1991): 2124 $\mu\text{g/g-dry}$ 、霞ヶ浦(1990): 952 $\mu\text{g/g-dry}$ 、日本の4湖沼(1989~91): 1125 $\mu\text{g/g-dry}$) (Christoffersen, 1996)と同程度であった。

RR, LR, YRの割合は平均で53%, 10%, 37%で、他の国内湖沼に近い割合であった。(RR53%, YR14%, LR29%, その他のミクロシスチン4%) (彼谷, 1995)

また、各アオコ発生時期の発生初期の段階でミクロシスチンが多く測定される傾向がみられた。

具体的には、9月上旬では、長浜港と北際川で共に出始めの9月1日、9月3日が高く、その後は低く推移しており、9月中旬では出始めの9月12日で大津港、文化館と赤野井では低いものの、膳所公園と北際川で9月中旬としては高い値が測定され、その後はどの場所も低く推移しており、10月中旬では出始めの10月9日で文化館・大津港とともに高い含有量であった。ただしこの文化館については、翌日の10月10日まで高い値が継続していた。

更に、発生初期の段階の検体を詳細に見ると、同じ派生初期段階でも、ミクロキスティス属の群体数/mlが多い程ミクロシスチンの量が多い傾向が見られた。

具体的には、ミクロシスチンTotal含有量が500 $\mu\text{g/g-dry}$ 以上の検体は4検体(10月10日の文化館含む)あったが、これらはミクロキスティス属が3500~12000群体/ml計数された。

一方9月3日の北際川はやや低く(53 $\mu\text{g/g-dry}$)、12日の大津港・文化館・赤野井では少量しかミクロシスチンが測定されていない(15, 1, 4 $\mu\text{g/g-dry}$)が、これらはミクロキスティス属がそれぞれ780, 240, 90, 80群体/mlであった。同じ12日でもミクロキスティス属が3600, 7600群体/mlと多い膳所公園と北際川は33, 229 $\mu\text{g/g-dry}$ であった。

また、この9月12日の2検体が他の発生初期のミクロキスティス3500群体/ml以上の検体に比べ

表2 2003年度アオコ藻体中(乾燥重量中)のミクロシスチン分析結果

採取日	採取場所	規模(LxW)	水温	ミクロシスチン ($\mu\text{g/g-dry}$)				Total	ミクロキスティス属 (群体/ml)		オシラトリア属 (群体/ml)		アナベナス属 (群体/ml)		アファニゾメノン属 (群体/ml)	
				RR	YR	LR	計		カワムラエ	その他	スピロイデス	パークラッサ	その他	計		
H15.9.1	長浜港	2x13.4x13	31.5,29.5	429	174	506	1109	3500								0
H15.9.2	長浜港	2x20.1x6	30.0,30.6	1			1	370					8			0
H15.9.3	北際川	3x12	31.5	26	4	23	53	780	1500				20			10
H15.9.3	長浜港	1x5.1x6	29.1,28.6	15	5	14	34	7700								0
H15.9.4	北際川	1x10	30.0	2			2	260	2100							10
H15.9.5	北際川	1x10	30.3	2			2	200	830							0
H15.9.12	大津港	2x50	30.8	9		6	15	240	1100				20			0
H15.9.12	文化館	10x15	31.5	1			1	90	4300							0
H15.9.12	膳所公園	1x8	32.5	23	1	10	33	3600	5700				100			0
H15.9.12	北際川	2x1000	32.5	89	43	97	229	7600	5200							0
H15.9.12	赤野井	5x50	31.0	2		2	4	80	1800	20						0
H15.9.17	大津港	2x50	28.2	7	1	5	12	1800	16000				20			0
H15.9.17	文化館	2x10	28.0	5	1	4	10	790	5600	10			280			0
H15.9.18	北際川	2x10	31.7	2	1	3	6	440	640				75			0
H15.9.18	文化館	10x15	29.6	1		1	2	80	680				120			0
H15.9.19	北際川	5x20	29.1	1		1	3	270	390				20			0
H15.9.19	文化館	10x15	28.8	4		3	7	320	130				4			0
H15.10.9	文化館	4x3	21.0	304	59	155	518	7500				80000	20000			0
H15.10.10	大津港	10x20	21.3	826	72	355	1253	8800				50000	1700			0
H15.10.10	文化館	5x10	21.9	785	125	302	1212	12000				20000				0
H15.10.27	雄琴港	5x20	18.1	23		8	31	18				8300	70			84

てマイクロシスチン含有量が低いのは、次のような理由が考えられる。

9月中旬のオシラトリアカワムラエの優占時期では、発生初期かつマイクロキスティス属が3600群体/ml・7600/ml群体と多く混在しているこの2検体を除いた10検体では発生初期か否かを問わずマイクロシスチンTotal含有量が15 μ g/g-dry以下である。これより、この時期オシラトリアカワムラエがマイクロシスチンを産生する量は、あったとしても少ないものと考えられ、さらにオシラトリアカワムラエの細胞の体積・質量が他のアオコに対して非常に大きく、検体の総質量に占めるオシラトリアの割合も大きい物となるので、当の2検体も総質量中のマイクロシスチン含有量としては他の発生初期のマイクロキスティス3500群体/ml以上の検体に比べて、マイクロシスチン含有量が低くなったものと考えられる。

アナベナスピロイデスパークラッサについては、10月上旬で20000~80000群体/mlと大量に発生したが、同時期にマイクロキスティス属が大量発生し

ていることと、アナベナの群体数/mlとマイクロシスチン含有量に明確な相関関係が見られないことから、どの程度マイクロシスチンを産生しているかは不明であった。

マイクロキスティス属の各種別ごとでは、2003年度では、マイクロキスティスエルギノーサ、ノバセッキ、ベーゼンベルギーが全期間を通じて混在して発生しており、またマイクロキスティスイクチオブラーベも割合が若干低いもののほぼ全時期で発生が確認され、マイクロキスティスピリディスは全時期を通じて殆ど発生していなかった。(図6)

このように、どれか一つが優占になることもなく、全期間で複数種が混在している状況のため、特定の種別毎のマイクロシスチンへの産生量の違いは不明であった。

また、水温および発生規模とマイクロシスチン含有量は特に相関は見られなかった。

4. まとめ

(1) 2003年度に発生したアオコ藻体中のマイクロシ



図3 アオコ発生場所・優占種とマイクロシスチン含有量の結果 (2003年9月上旬)

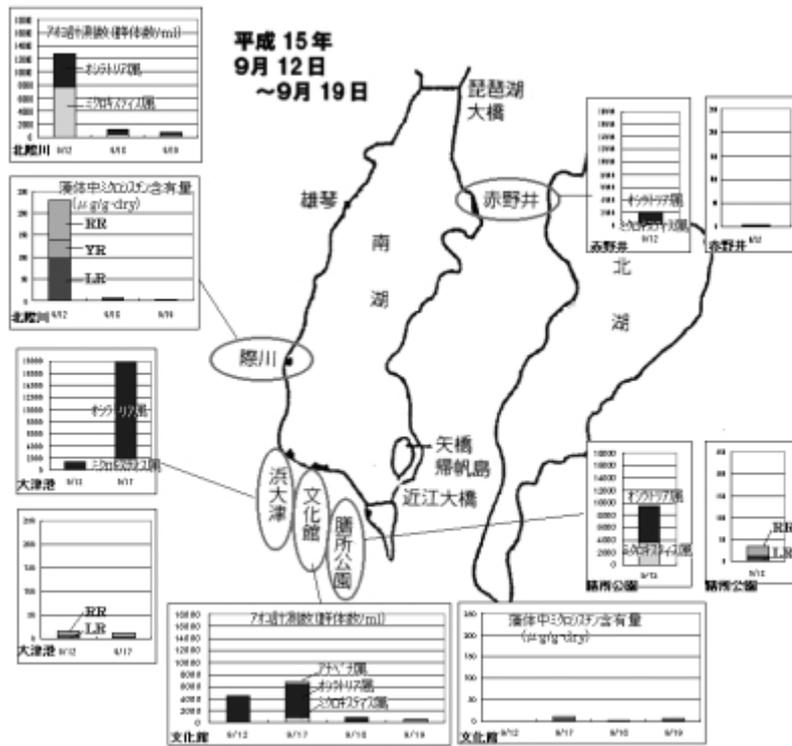


図 4 アオコ発生場所・優占種とミクロシスチン含有量の結果 (2003年 9 月中旬)

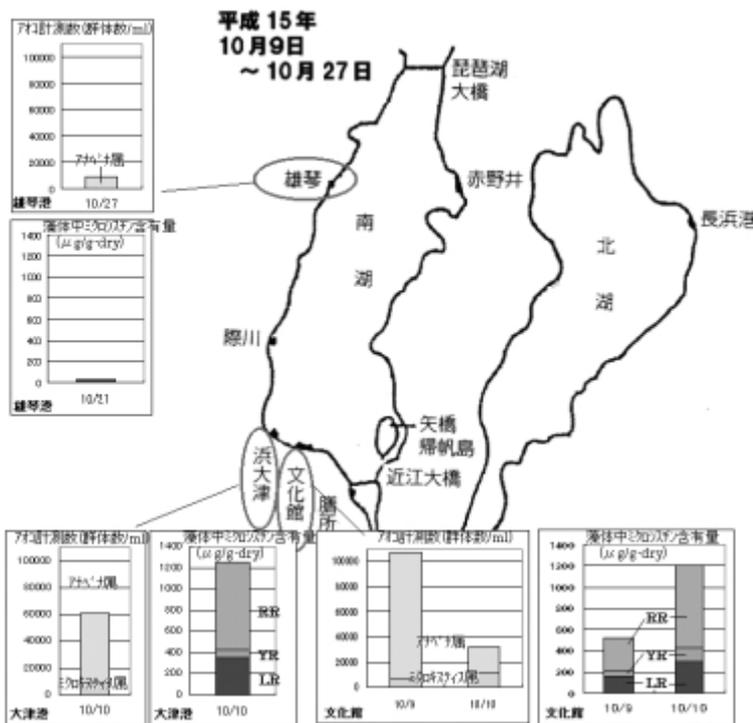


図 5 アオコ発生場所・優占種とミクロシスチン含有量の結果 (2003年10月)

梅谷友康, 森實圭二 (1996) : 水道協会雑誌, 742, 26-33.

Nagata, S., Soutome, H., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Sekijima, M., Harada, K., Suganume, M., Ueno, Y. (1995) : *Natural Toxin*, 3, 78.

中村忠貴, 津田泰三, 一瀬諭, 若林徹哉, 加賀爪敏明 (2004) : 滋賀県立衛生環境センター所報, 39, 133-135.

K, Christoffersen (1996) : *Phycologia*, 35, 42-50.