

琵琶湖におけるアオコ毒素マイクロシスチンの動態と ELISA 法を用いた毒素分析に関する検討

山下尚之¹・松田知成²・清水芳久³・松井三郎⁴

¹工博 独立行政法人土木研究所 水循環研究グループ水質チーム (〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6)

²工博 京都大学助教授 地球環境学大学院地球環境学堂 (〒606-8501 京都市左京区吉田本町)

³Ph.D. 京都大学助教授 工学研究科附属環境質制御研究センター (〒520-0811 滋賀県大津市由美浜 1-2)

⁴Ph.D. 京都大学教授 地球環境学大学院地球環境学堂 (〒606-8501 京都市左京区吉田本町)

本研究では、近畿圏における重要な水道水源となっている琵琶湖においてサンプリングを実施し、琵琶湖におけるアオコ毒素マイクロシスチンとラン藻類の動態について考察を加えた。また、ELISA 法を用いた毒素分析の適用性に関して検討を行った。その結果、琵琶湖湖水およびそのろ液からマイクロシスチンが検出された。その濃度は、サンプリング地点により大きく異なっていたが、最高で2,200 pg/mL という値が示された。一方、琵琶湖周辺域において採取した水道水からマイクロシスチンは検出されず、浄水処理過程においてマイクロシスチンは分解除去されることが示唆された。また、湖水の全マイクロシスチンに対するろ液中マイクロシスチン割合の変動を調べたところ、湖水のマイクロシスチン濃度上昇とともに、ろ液中マイクロシスチン割合は低下する傾向が見られた。

Key Words : microcystin, hepatotoxin, Lake Biwa, seasonal variation, cyanobacteria, Microcystis, ELISA

1. はじめに

富栄養化した湖沼において夏期にアオコが発生し、世界各国で問題となっている。このアオコは、湖沼景観の悪化、異臭味の発生、魚類の大量斃死および浄水処理におけるろ過障害等、様々な問題を引き起こすが、深刻な問題の1つとして、アオコを形成するラン藻類の含有毒素の問題がある。アメリカやヨーロッパ、オーストラリアなど世界各国で、アオコによる家畜や野生動物の死亡事故が報告されている¹⁾。また、アメリカやイギリスなどで人が湖水を飲んだ後に、倦怠、吐き気、下痢などの症状が示されたことが報告されている¹⁾。1996年には、ブラジルにおいて人工透析の治療を受けていた患者に対して、ラン藻類により生産される毒素マイクロシスチンで汚染された水が使用され、50人もの患者が死亡するという事故が発生した。この事故は、ブラジルの Caruaru 市で起きた事故であることから、Caruaru シンドロームと呼ばれ、世界中に大きな衝撃として受けとめられた^{2,3)}。

ラン藻類の生産する毒素は、大きく分けて神経毒と肝臓毒の2つに分類される。それらの毒素のうちで、日本において主に問題となっているのは、マイクロシスチンと呼ばれる肝臓毒素である。マイクロシスチンの化学構造を Fig.1 に示す。マイクロシスチンの化学構造は、7個のアミ

ノ酸から成る環状のペプチドで、アミノ酸の種類の違いなどによって多くの同族体や誘導体が存在しており、現在までに60種類以上のマイクロシスチンが報告されている。マイクロシスチンの毒性は、マイクロシスチンタイプにより異なってくるが、マイクロシスチンLRの急性毒性は、マウスで32.5~100 µg/kg であると言われている^{4,5)}。その標的となる器官は主に肝臓であり、マイクロシスチンをマウスやラットに投与すると、その多くは肝臓に取り込まれ、肝不全が引き起こされて死亡する。また、マイクロシスチンは発ガンにも関与するとされており、藤木ら^{6,9)}は、マイクロシスチンに発ガンのプロモーター作用があることを報告している。中国では、肝臓ガンの発生率が他の地域に比べ高い地域が存在しているが、その原因の一つとしてアオコ毒素のマイクロシスチンが指摘され、調査が行われている^{9,10)}。したがって、アオコの発生している水域を飲料水の水源とする地域においては、マイクロシスチンの急性毒性とともに、発ガンへの関与を考慮した慢性的な影響についても注意を払う必要がある。

琵琶湖においては、南湖を中心として、近年毎年のように8月から9月にかけてアオコの発生が観察されている。琵琶湖におけるアオコは、Microcystis 属等のラン藻類によって形成されるが、これらラン藻類からはアオコ毒素マイクロシスチンの産出が報告されており¹¹⁻¹³⁾、夏期

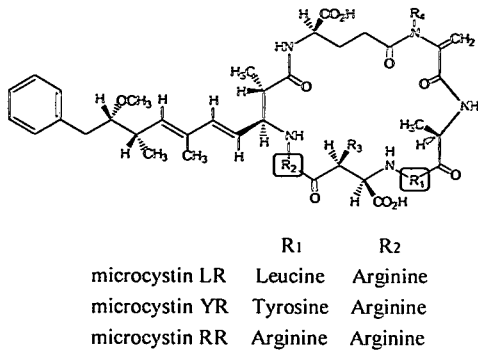


Fig.1 Chemical structure of microcystins

の琵琶湖におけるマイクロシスチンの動態が問題となる。一方、琵琶湖は、京都や滋賀など近畿圏における重要な水道水源として利用されており、アオコ発生期における水道水中マイクロシスチンの動態も重要な問題となる。そこで本研究では、マイクロシスチンの分析方法に関して検討を行った後、琵琶湖およびその周辺域において湖水サンプルを定期的に採取し、アオコ毒素マイクロシスチンとその原因となる有毒ラン藻類の動態について考察を加えた。また、琵琶湖をその水源とする水道水についてもサンプルの採取を行い、水道水中におけるマイクロシスチンの動態についても検討を行った。

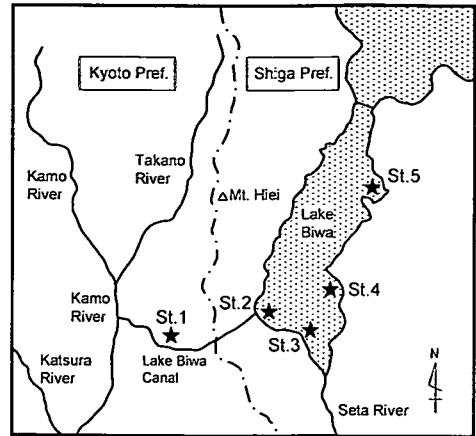
2. 調査および実験方法

(1) ELISA 法によるマイクロシスチン分析の検討

マイクロシスチンの分析方法としては、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いる方法が最も一般的であるが、近年、マイクロシスチンに対する抗体が作成され、その抗体を用いた ELISA 法 (Enzyme-linked immunosorbent assay) が開発されている。本研究では、ELISA 法を用いたマイクロシスチン分析の適用性について検討を行った。

マイクロシスチンの分析には、Nagata ^{14),15)} の作製したモノクローナル抗体を利用したマイクロシスチン ELISA キット (常盤化学工業製) を用いた。測定には、マイクロプレートリーダー モデル 550 (パイオラッド・ラボラトリー) を使用した。マイクロシスチンの標準品には、関東化学社製マイクロシスチン LR 標準液を、また次亜塩素酸ナトリウムおよびアスコルビン酸ナトリウムは、和光純薬製のものを用いた。ELISA 分析検討のための水道水サンプルについては、京都市、大津市、草津市の 3ヶ所から採取し、実験に供した。

塩素による ELISA 分析への影響実験については、遊離残留塩素濃度が 0.1~5 mg/L の濃度になるよう次亜塩素酸ナトリウムを蒸留水により希釈した後、ELISA 分析を



★ Sampling Station

St.1 : Yamashina, Kyoto City, St.2 : Hamaotsu, Otsu City, St.3 : Zeze, Otsu City, St.4 : Kilayamada, Kusatsu City, St.5 : Akanoi, Moriyama City

Fig.2 Map of sampling stations at Lake Biwa

行った。ELISA 分析検討用の水道水サンプルについては、サンプル採取後直ちに実験室に持ち帰り、実験に供した。採取した水道水サンプルについて 200 pg/mL の濃度となるようマイクロシスチン LR 標準液を添加した場合と添加しない場合の両方について、それぞれ ELISA 分析を行った。また、アスコルビン酸ナトリウムを 10 mg/L の濃度になるよう添加し、残留塩素を消去した場合についても検討を行った。

(2) 調査地点

有毒ラン藻類およびアオコ毒素マイクロシスチンの動態を調べるため、琵琶湖およびその周辺域において、湖水を定期的に採取した。調査地点を Fig.2 に示す。湖水サンプルは、St.1 京都市山科、St.2 大津市浜大津、St.3 大津市膳所、St.4 草津市北山田、St.5 守山市赤野井の 5ヶ所において、それぞれの地点の表面水を採取した。St.1 京都市山科については、京都市において琵琶湖疏水の水を採取した。琵琶湖疏水は、琵琶湖南湖から京都市にかけて人工的に作られた水路で、疏水の水は、京都市の重要な水道水源として利用されている。水道水については、St.6 京都市山科、St.7 大津市膳所、St.8 草津市北山田の 3ヶ所でサンプル採取を行った。それぞれの水道水は、琵琶湖疏水および琵琶湖の水をその水源としている。サンプリングは、1997年6月から10月にかけて、週1回の割合で行った。

(3) 分析方法

琵琶湖におけるマイクロシスチン動態調査のための湖水サンプルについては、WhatmanGF/F フィルターによりろ過を行い、湖水およびそのろ液それぞれについて -30℃で

凍結保存した。水道水のマイクロシスチン調査のために採取したサンプルについては、アスコルビン酸ナトリウムで残留塩素を消去した後、凍結保存を行った。

水中のマイクロシスチンについては、ELISA 法を用いて分析を行った。本法における検出限界は、20-50 pg/mL である^{14,15}。採取した湖水サンプルについては、2 回以上凍結融解を繰り返すことにより、ラン藻類の細胞内に保持されているマイクロシスチンを水中に溶出させた後、その溶出液を ELISA 分析に供した。

プランクトンカウントのサンプルについては、湖水にルゴール液を 5% の濃度になるよう添加して固定した後サンプルを濃縮し、顕微鏡下でプランクトンの計数を行った。群体を形成するラン藻類については、細胞数ではなく群体数のカウントを行った。群体の大きさから細胞数に変換する方法も考えられるが、作業の煩雑性や誤差の問題から今回は群体数のカウントを行った。プランクトンの同定については、琵琶湖のプランクトンデータ¹⁶ および廣瀬・山岸¹⁷を参照したが、ラン藻類の分類については渡辺¹⁸も参考にした。

3. 結果と考察

(1) ELISA 法によるマイクロシスチン分析の検討

ELISA 法を用いて水道水中マイクロシスチンの分析を行う場合、水道水に含まれる残留塩素が ELISA 分析の結果に影響を与えることが考えられる。そこでここでは、この残留塩素による ELISA 分析への影響について検討を行うとともに、ELISA 法を用いた水道水中マイクロシスチン分析の適用性について検討を行った。

まず、残留塩素の ELISA 分析に対する影響について検討を行った。遊離残留塩素濃度を 0.1~5 mg/L の間で変化させた場合の結果を Fig.3 に示す。Fig.3 において、ELISA 分析を行ったサンプルには、マイクロシスチンの添加は行っていない。Fig.3 より塩素濃度が 0.1~0.5 mg/L の場合には、その影響がほとんど見られなかったが、塩素濃度が 1 mg/L となった場合には、その影響が観察され始めた。塩素濃度が 2 mg/L 以上になると、大きな影響が観察されるようになり、塩素濃度が 5 mg/L になると、マイクロシスチンが添加されていないにもかかわらず、マイクロシスチン濃度が 800 pg/mL 近い濃度として検出された。これは、酸化剤の影響により、抗マイクロシスチン抗体およびマイクロプレートのウェル底面に固相化されているマイクロシスチンが分解等の影響を受けたためであると推察される。これらが影響を受けた場合には、マイクロシスチン濃度を過大評価してしまうことが考えられる。

京都市、大津市、草津市において採取した水道水について、水道水にマイクロシスチン LR 標準液を添加しない

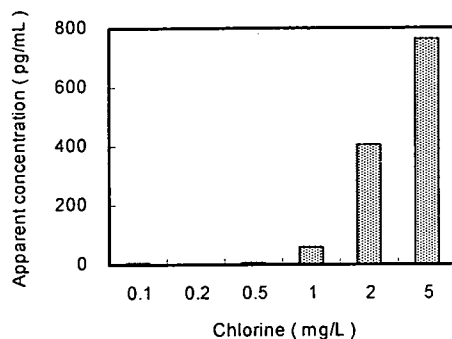
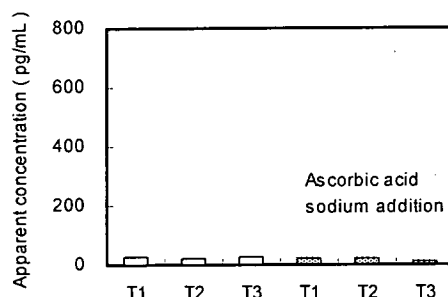
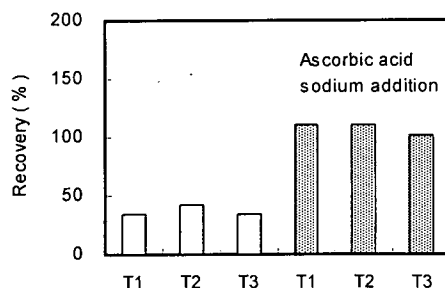


Fig.3 Effect of chlorine to ELISA analysis



T1 : Kyoto City, T2 : Otsu City, T3 : Kusatsu City

Fig.4 Application of ELISA method to tap water (No microcystin addition)



T1 : Kyoto City, T2 : Otsu City, T3 : Kusatsu City

Fig.5 Application of ELISA method to tap water (Microcystin addition, 200 pg/mL)

条件で、ELISA 分析を行った結果を Fig.4 に示す。Fig.4 には、採取した水道水をそのまま分析した場合と、残留塩素を消去するため、10 mg/L の濃度となるようアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合、両方の結果を示す。Fig.4 より、マイクロシスチンを添加していない場合のプランク値は十分に小さく、水道水中に残存する残留塩素による抗マイクロシスチン抗体等への影響は、ほとんど見られなかった。また、還元剤であるアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合についても、そのプランク値は十分に小さく、ELISA 分析に対してアスコルビン酸ナトリウ

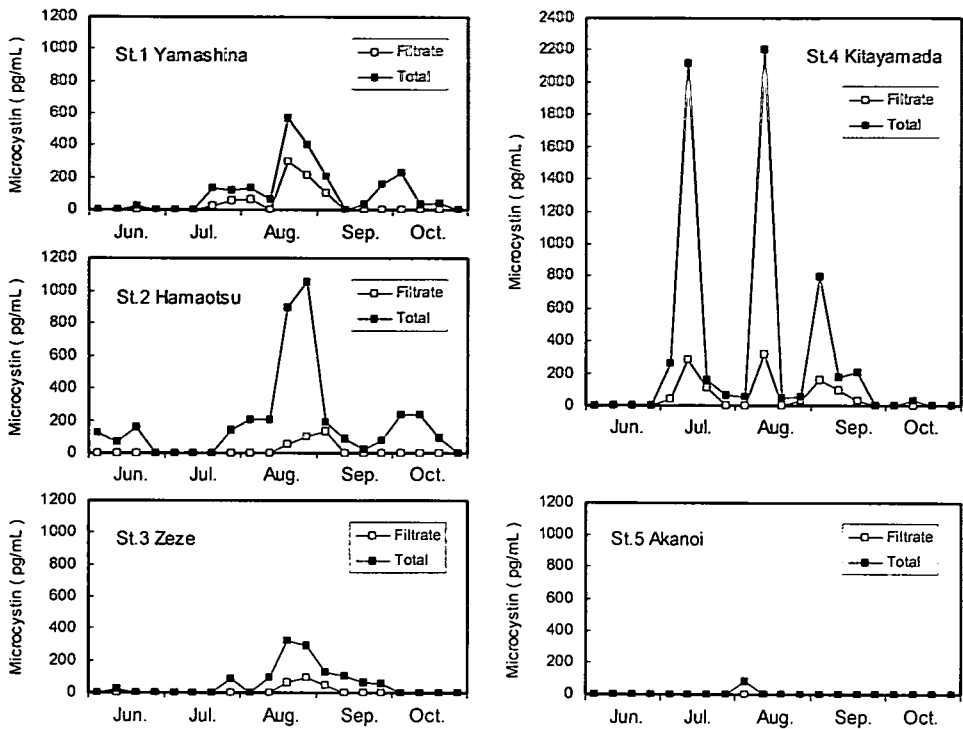


Fig.6 Seasonal variations of microcystin concentration in Lake Biwa (June-October, 1997)

ムの影響は、ほとんど観察されなかった。

次に、水道水に 200 pg/mL の濃度になるようマイクロシスチン LR 標準液を添加し、ELISA 分析を行った場合の結果を Fig.5 に示す。Fig.5 には、水道水にアスコルビン酸ナトリウムを 10 mg/L の濃度となるよう添加した場合と添加しない場合、両方の結果を示す。また、Fig.5 においては、蒸留水に 200 pg/mL となるよう添加したマイクロシスチン LR 標準液の回収率を 100% としてグラフに表示している。水道水にアスコルビン酸ナトリウムを添加しない場合については、マイクロシスチンの回収率が 34~43% となり、回収率が低下するという結果が得られた。この原因としては、水道水中の残留塩素により、添加したマイクロシスチンが分解を受けたことが考えられ、たとえ残留塩素が低濃度であっても、マイクロシスチンは除々に分解を受けることが分かる。一方、水道水にアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合については、マイクロシスチンの回収率は 102~111% となり、十分な回収率が得られた。これは、アスコルビン酸ナトリウムの添加により、水道水中の残留塩素が消去され、マイクロシスチンの回収率が改善されたものと考えられる。これらの結果より、ELISA 法によって水道水中のマイクロシスチンを分析する場合には、水道水中に含まれる残留塩素の影響を考慮して、還元剤であるアスコルビン酸ナトリウムの添加が有効であるものと考えられる。

(2) 琵琶湖におけるマイクロシスチンの季節変化

琵琶湖から採取したサンプルについて分析を行った結果、湖水およびそのろ液からラン藻類に含有される毒素マイクロシスチンが検出された。琵琶湖湖水およびそのろ液に関するマイクロシスチン濃度の季節変化を Fig.6 に示す。

St.1 京都市山科においては、6 月および 7 月の前半はマイクロシスチンが検出されなかったが、7 月後半以降マイクロシスチンが検出された。8 月の下旬にはマイクロシスチン濃度の上昇が見られ、570 pg/mL という値になった。また、そのろ液からもマイクロシスチンは検出され 300 pg/mL という値が示された。St.1 京都市山科のサンプリング地点は、琵琶湖疏水において京都市蹴上浄水場の取水口付近に位置している。この地点においてマイクロシスチンが検出されたことから、水道水の原水にマイクロシスチンが混入することが懸念される。St.2 大津市浜大津においてもこれと同時期の 8 月後半にマイクロシスチン濃度の大きな上昇が見られ、その濃度は 1,050 pg/mL という値になった。8 月の下旬には、この大津市浜大津において *Microcystis* の群体の増殖が観察されたが、これと同調して湖水中マイクロシスチン濃度も上昇した。St.2 浜大津のサンプリング地点は、京都へと通じている琵琶湖疏水の湖水取水口部に位置している。従って、琵琶湖においてラン藻類により生成されたマイクロシスチンは、琵琶湖

疏水を経由し京都にまで流れて行ったと推察される。St.3 大津市膳所においても同様に、8月から9月にかけてマイクロシチンが検出された。その濃度は最高で 330 pg/mL という値で、他の地点と比較し低い値であった。一方、St.4 草津市北山田において、6月についてはマイクロシチンは検出されなかったが、7月以降マイクロシチンが検出され、7月中旬にはマイクロシチン濃度が大きく上昇し、2,120 pg/mL という値となった。また、8月の中旬にもマイクロシチン濃度の上昇が見られ、2,200 pg/mL に達した。マイクロシチン濃度の上昇時には、サンプリング地点の北山田においてアオコの発生が観察されており、アオコの発生とともにマイクロシチン濃度の大きな上昇が見られた。St.3 大津市膳所と St.4 草津市北山田のサンプリング地点は、それぞれ大津市膳所浄水場および草津市北山田浄水場の近傍に位置している。これらの地点の湖水よりマイクロシチンが検出されたことから、これら浄水場の原水にマイクロシチンが混入する可能性がある。St.5 守山市赤野井においては、8月にわずかにマイクロシチンが検出されたが、それ以外では検出されなかった。この赤野井は、流域から窒素・リンを豊富に含んだ農業排水や生活排水が流れ込んでいる場所であり、そのため近年、アオコの発生が頻繁に見られている。しかし、今回のサンプリングではアオコの発生は見られず、そのため湖水からマイクロシチンはほとんど検出されなかった。

Ueno ら¹⁹⁾は、ELISA 法を用いて、タイ、ドイツ、日本等において採取したサンプルについて、マイクロシチン濃度の測定を行っている。タイにおいては、貯水池や養魚池からサンプルを採取しており、マイクロシチンは 76~354 pg/mL の範囲で検出され、その平均濃度は 161 pg/mL であったと述べている。ドイツでは、レクリエーションに使われている湖においてサンプルを採取しており、マイクロシチンは 66~476 pg/mL の範囲で検出され、その平均濃度は 257 pg/mL であったとしている。日本においては、霞ヶ浦、相模湖、津久井湖などからサンプルを採取しており、マイクロシチンは、55~1,300,000 pg/mL と広範囲で検出され、特に霞ヶ浦において 1,300,000 pg/mL と高い濃度が示されたと述べている。また、Park ら²⁰⁾は、日本の諏訪湖においてマイクロシチン濃度の季節変化を調べている。それによると、マイクロシチン濃度は、サンプリング時期によって大きく変動するが、諏訪湖において最大 184,000 pg/mL という値が検出されている。本研究では、琵琶湖において6月から10月にかけて湖水からマイクロシチンを検出した。その濃度は、サンプリング地点によって大きな違いが見られたが、St.4 草津市北山田において最大 2,200 pg/mL という値を検出した。この値は、諏訪湖や霞ヶ浦など高濃度でアオコが発生する湖と比較すると低い値となっているが、タイや

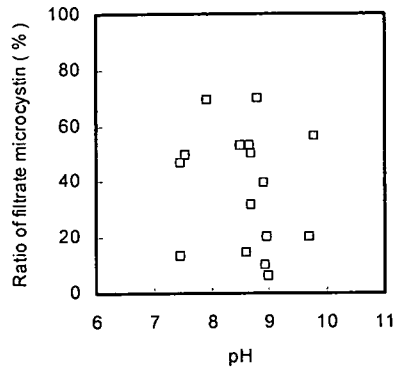


Fig.7 Relationship between pH and ratio of filtrate microcystin

ドイツの湖で観測されたマイクロシチン濃度より高い値が示された。

Park ら²⁰⁾は、諏訪湖においてプランクトンネットで捕集された浮遊物質中のマイクロシチン含有量について言及している。その値は、サンプリングを行った時期によって大きな違いが見られるが、1.8~226 µg/100mg の間で変化したと報告している。今回のサンプリングについて、琵琶湖におけるマイクロシチン含有量を湖水中の浮遊物質濃度より計算した結果、その値は 0.5~50 µg/100mg の間で変化した。また、マイクロシチン含有量の値は、湖水中マイクロシチン濃度の上昇とともに高くなる傾向が見られた。琵琶湖におけるマイクロシチン含有量は、諏訪湖における値と比較すると低い値が示されており、諏訪湖で観測されたマイクロシチン含有量の約4分の1という値となった。琵琶湖においては、湖水中にマイクロシチンを生産するラン藻類とともに、珪藻類の *Melosira* 属等の藻類が混在していることが多く、その結果、マイクロシチン含有量の値が低くなるものと考えられる。

(3) 湖水ろ液中におけるマイクロシチンの動態

琵琶湖において湖水のろ液中からも、マイクロシチンは検出されたが、湖水中の全マイクロシチンに対するろ液中マイクロシチンの割合は、変動が見られた。ここでは、ろ液中マイクロシチンの動態に関して検討を加えた。

Maagd ら²¹⁾によれば、マイクロシチンのオクタノール/水分配率は pH により変化し、pH が高くなるに従いその値は低下すると報告している。これは、マイクロシチンの持つカルボキシル基など官能基の解離が影響しているためであると考えられるが、湖水の pH が高くなりアルカリ側に傾くことにより、マイクロシチンは水相へと移行する傾向のあることを意味する。そこで、ろ液中マイクロシチン割合に影響を及ぼす要因の1つとして pH を考え、pH と湖水中の全マイクロシチン濃度に対するろ液

中マイクロシスチン濃度の割合 (%) との関連を調べた。その結果を Fig.7 に示す。ここでは、ELISA 法における検出限界等を考慮し、マイクロシスチン濃度が 50 pg/mL 以上のデータについて検討を行っている。Fig.7 より、琵琶湖において得られたデータについては、pH とろ液中マイクロシスチン割合との間には明確な関係は認められなかった。ろ液中マイクロシスチンの割合については、湖水の pH のみならず、マイクロシスチンを生産するラン藻類の増殖や死滅など、その他の要因も大きく影響してくると思われる。このため、実際の湖沼においては、pH とろ液中マイクロシスチン割合との間には明確な関係が見られなかったものと推察される。

Fig.8 に水中の全マイクロシスチン濃度とろ液中マイクロシスチン割合との関係を示す。サンプリング地点のうち、St.1 京都市山科の琵琶湖疏水データについては、他の地点のデータと比較して、若干異なる傾向が見られたため、図中のマークを変えて示している。Fig.8 において、琵琶湖疏水データについては、ズレのある場合が見られるものの、全マイクロシスチン濃度とろ液中マイクロシスチン割合の間には関連が見られた。すなわち、全マイクロシスチン濃度が高い場合には、ろ液中マイクロシスチン割合は低い値となるが、全マイクロシスチン濃度が低下するに従い、ろ液中マイクロシスチン割合は上昇する傾向が見られた。マイクロシスチンを生産するラン藻類が増殖し、水中の全マイクロシスチン濃度が上昇した場合には、マイクロシスチンの多くは、細胞内に保持されていると考えられる。しかし、ラン藻類が死滅等のために減少し、水中のマイクロシスチン濃度が低下した場合には、細胞内のマイクロシスチンは、水中へと放出されると考えられる。このため、湖水中の全マイクロシスチン濃度の低下に伴い、ろ液中のマイクロシスチン割合が低下する傾向があるものと推察される。

(4) 水道水中におけるマイクロシスチンの動態

水道水については、St.6 京都市山科、St.7 大津市膳所、St.8 草津市北山田の3ヶ所において6月から10月までの間サンプリングを行い、マイクロシスチンの分析を行った。採取した水道水は、それぞれ京都市蹴上浄水場、大津市膳所浄水場、草津市北山田浄水場から供給される水道水である。これら浄水場において、京都市蹴上浄水場は、琵琶湖疏水により琵琶湖から導水された水、大津市膳所浄水場および草津市北山田浄水場は、膳所および北山田沖の琵琶湖湖水をその水源としている。また、基本的な浄水処理方式については、京都市蹴上浄水場および大津市膳所浄水場は急速ろ過方式、草津市北山田浄水場は、緩速ろ過方式を採用している。

これら浄水場からの水道水について、ELISA 法によりマイクロシスチンの分析を行った結果、6月から10月まで

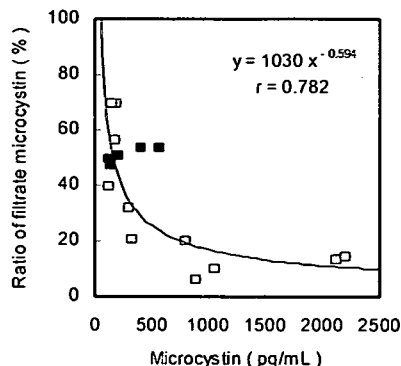


Fig.8 Relationship between total microcystin concentration and ratio of filtrate microcystin (■ Lake Biwa Canal data)

の調査期間において、いずれの浄水場からの水道水についてもマイクロシスチンは検出されなかった。湖水サンプリング地点の St.4 草津市北山田などでアオコが発生し、マイクロシスチン濃度の大きな上昇が見られた8月の中旬においても、水道水からマイクロシスチンは検出されなかった。

前述したように、ラン藻類の増殖が活発になりマイクロシスチン濃度が上昇した場合には、マイクロシスチンの多くは、ラン藻類の細胞内に保持され、水中に溶出しているマイクロシスチンの割合は少ない傾向がある。マイクロシスチンを生産する *Microcystis* 属などのラン藻類は、通常は群体を形成しており、前塩素処理等を行わない条件では、浄水処理過程における凝集沈殿一砂ろ過により、その多くが除去されると考えられる。このため、ラン藻類の細胞内に保持されているマイクロシスチンについては、通常の浄水処理過程において、ある程度の除去が期待される。一方、ラン藻類の細胞から溶出したマイクロシスチンについては、浄水処理過程における凝集沈殿一砂ろ過ではほとんど除去されないと推察される。Himberg ら²²⁾は、いくつかの水処理方式について、ラン藻類から抽出した毒素の除去効率を調べている。それによると、浄水処理方法として一般的に用いられている凝集沈殿一砂ろ過処理ではマイクロシスチンは十分除去できないとしている。一方、水中に溶解したマイクロシスチンの分解に対して、酸化剤である塩素が有効であるとの報告がいくつかなされている²³⁾²⁰⁾。梅谷ら²³⁾は、塩素によるマイクロシスチンの分解特性を調べているが、それによると、1 mg/L の遊離塩素によってマイクロシスチンは2時間で消失したと述べている。Nicholson ら²⁴⁾も、マイクロシスチンの塩素による分解性について検討しており、0.5 mg/L 以上の塩素濃度によって水中のマイクロシスチンはほぼ分解されたと報告している。

今回サンプリングを行った水道水について、その基本

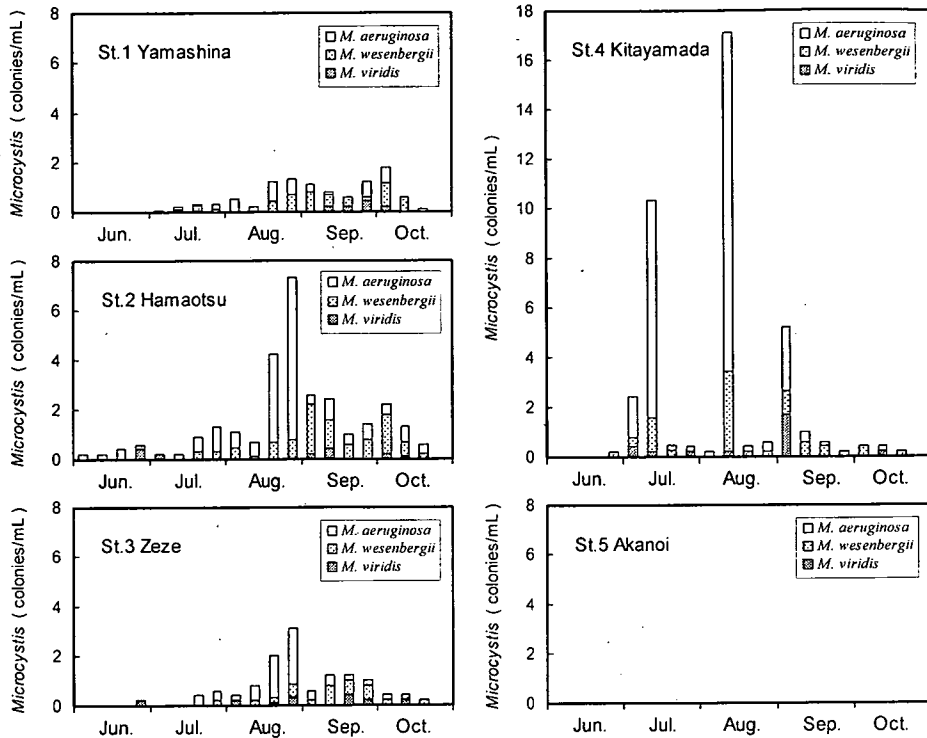


Fig.9 Seasonal variations of *Microcystis* colonies number in Lake Biwa (June-October, 1997)

的な浄水処理方式は、急速ろ過方式および緩速ろ過方式という異なった2つのタイプがあるが、いずれの浄水場においても、配水管末端において残留塩素が存在するよう、十分量の塩素が添加され配水が行われている。したがって、たとえ浄水場の原水中にミクロシスチンが混入していたとしても、水中のミクロシスチンは浄水処理過程により分解除去されるものと予想される。しかしながら、浄水処理過程において、その管理が十分なされていない場合には、注意が必要である。前述した1996年にブラジルのCaruaru市で起きた透析患者の死亡事故も、透析に用いた水に関して、浄水処理の不備が指摘されている²⁾。浄水処理のなかでも特に、塩素による処理は、ミクロシスチンの除去には重要なプロセスであると考えられ、その適切な管理が必要とされる。

(5) ラン藻類の季節変化とミクロシスチンとの関連

琵琶湖においては、ラン藻類、緑藻類、珪藻類、渦鞭毛藻類といった藻類が出現した。ラン藻類については、*Microcystis*属の*M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *M. viridis*, *Anabaena*属では、*A. spiroides* var. *crassa*, *A. affinis*, *A. macrospora*, *Oscillatoria*属では*O. tenue*, *O. kawamurae*といったラン藻類が見られた。ラン藻類以外の藻類については、珪藻類の*Melosira*, *Fragilaria*, *Synedra*属、緑藻類の*Closterium*, *Staurastrum*, *Pediastrum*属、また、渦鞭

毛藻類の*Ceratium*属といった藻類が主に出現した。

ラン藻類としては、*Microcystis*属、*Anabaena*属および*Oscillatoria*属の出現が見られたが、そのなかでも*Anabaena*属および*Oscillatoria*属は比較的少なく、出現したラン藻類の多くは*Microcystis*属であった。Fig.9に琵琶湖における*Microcystis*属群体数の変化を示す。St.1京都市山科においては、7月から10月にかけて*Microcystis*属の群体が見られたが、*Microcystis*属の大きな増加は観察されなかった。St.2大津市浜大津においては、8月後半に*Microcystis*属群体数の増加が見られたが、それに伴い湖水中のミクロシスチン濃度も上昇した。8月後半には、*Microcystis*属のなかでも*M. aeruginosa*の割合が高く、全*Microcystis*属群体数のうち約90%占めていた。一方、9月から10月にかけては、*M. wesenbergii*が多く出現し、*Microcystis*属のなかにも占めるその割合は高くなった。St.4草津市北山田においては、他のサンプリング地点と比較して*Microcystis*属群体数は最も多くなった。特に、7月および8月の中旬に*Microcystis*属群体数の大きな増加が観察されたが、それに伴い湖水中ミクロシスチン濃度も大きく上昇し、2,000 pg/mLを超える値が示された。このとき、*Microcystis*属のなかでも特に*M. aeruginosa*の群体が最も多く出現し、全*Microcystis*属群体数の80%以上を占めた。この*Microcystis*属の増加は長くは維持されず、数日のうちに*Microcystis*属群体数は大きく減少し、湖水

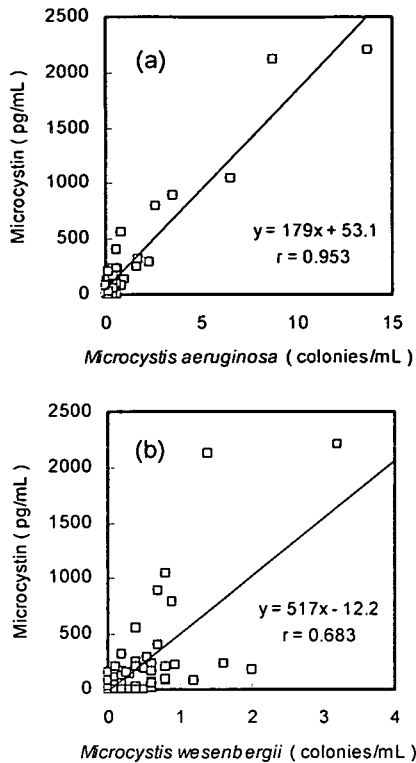


Fig.10 Relationships between *Microcystis* colonies number and microcystin concentration
 (a) *Microcystis aeruginosa*
 (b) *Microcystis wesenbergii*

のマイクロシスチン濃度も低下した。また、*Microcystis* 属群体数の増加の直後には、湖水中に橈脚類 *Eodiaptomus japonicus* の増加が観察された。一方、St.5 守山市赤野井においては、湖水中に *Microcystis* 属群体の出現は見られなかった。

琵琶湖において、夏期に *Microcystis* 属群体数の増加が見られたが、それに対応して水中マイクロシスチン濃度の上昇が見られた。Fig.10 に *M. aeruginosa* および *M. wesenbergii* 群体数とマイクロシスチン濃度の相関関係を示す。相関係数は、それぞれ 0.953 および 0.683 となり、*M. aeruginosa* 群体数とマイクロシスチン濃度の間には、強い正の相関関係が認められた。一方、*M. wesenbergii* 群体数とマイクロシスチン濃度については、*M. aeruginosa* の場合と比較して、弱い相関関係であった。ラン藻類に含有されている毒素マイクロシスチンは *Microcystis* 属では *M. aeruginosa* や *M. viridis*, *M. ichthyoblabe* に含有されると言われている。今回のサンプリングでは、*M. viridis* 群体等の出現はわずかであり、湖水中マイクロシスチンの大半は *M. aeruginosa* に由来すると考えられ、その結果、*M. aeruginosa* 群体数とマイクロシスチン濃度の間には明瞭な正の相関関係が見られたと考えられる。

一方、琵琶湖においてアオコ発生時には、*Microcystis* 属のラン藻類とともに *Anabaena* 属および *Oscillatoria* 属のラン藻類も多く出現する場合がある。これらのラン藻類において、*Anabaena* 属の *A. flos-aquae* や *Oscillatoria* 属の *O. agardhii* からはマイクロシスチンの含有が報告されている^{27),30)}。しかし、琵琶湖において頻繁に出現する *Anabaena* 属の *A. affinis*, *A. macrospora* 等については、マイクロシスチンの有無に関して研究が行われていない。また近年、琵琶湖において *Oscillatoria kawamurae* の増殖が顕著で、この種を主体としたアオコの発生が、一瀬ら³¹⁾ によって報告されているが、この種についてもマイクロシスチンの有無は不明である。したがって、これらのラン藻類についてもマイクロシスチンの含有について調査する必要があるものと考えられる。

4. まとめ

本研究では、ELISA 法によるマイクロシスチンの分析方法について検討を行うとともに、琵琶湖およびその周辺域において湖水サンプルを採取して分析を行い、アオコ毒素マイクロシスチンとその原因となる有毒ラン藻類の動態について考察を加えた。その結果、以下のようことが分かった。

- 1) ELISA 法によるマイクロシスチン分析の適用性について検討を行ったところ、サンプル中の遊離残留塩素濃度が 1 mg/L 以上となった場合には、塩素による ELISA 分析への影響が観察された。ELISA 法により水道水サンプルを分析する場合には、還元剤であるアスコルビン酸ナトリウムの添加が有用であることが示された。
- 2) 琵琶湖において湖水サンプルを定期的に採取しマイクロシスチンの測定を行ったところ、琵琶湖湖水およびそのろ液からマイクロシスチンが検出された。その濃度は、サンプリング地点により大きく異なっていたが、夏期にラン藻類の群体が観察された水域においてマイクロシスチン濃度は大きく上昇し、最大で 2,200 pg/mL という値が示された。
- 3) 湖水中の全マイクロシスチンに対するろ液中マイクロシスチンの割合の変動について調べたところ、湖水の全マイクロシスチン濃度が高い場合には、ろ液中マイクロシスチン割合は低くなるが、全マイクロシスチン濃度が低下するにつれ、その割合は上昇するという傾向が認められた。一方、湖水の pH とろ液中マイクロシスチン割合との間には明確な関連は見られなかった。
- 4) 琵琶湖をその水源としている水道水を定期的に採取し、マイクロシスチンの測定を行ったところ、琵琶湖

においてラン藻類群体の発生が観察された場合においても、水道水中からミクロシスチンは検出されなかった。

- 5) 琵琶湖において、夏期には *Microcystis* 属群体の増殖が見られたが、*M. aeruginosa* 群体数と湖水中のミクロシスチン濃度の間には正の相関関係が見られ、*M. aeruginosa* 群体数の増加に伴い、ミクロシスチン濃度の上昇が見られた。

参考文献

- 1) 渡辺真利代, 原田健一, 藤木博太: アオコ・その出現と毒素, 東京大学出版, pp.55-73, 1994.
- 2) Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E. M., Antunes, B. C., Filho, D. A., Lyra, T. M., Barreto, V. S. T., Azevedo, S. M. F. O. and Jarvis, W. R.: Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil, *New Eng. J. Med.*, 338, pp.873-878, 1998.
- 3) Pouria, S., De Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R. L., Barreto, V. T. S., Ward, C. J., Preiser, W., Poon, G. K., Neild, G. H. and Codd, G. A.: Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil, *Lancet*, 352, pp.21-26, 1998.
- 4) 彼谷邦光: 藍藻毒ミクロシスチン (Microcystin) の化学と毒性, 環境化学, 2, pp.457-477, 1992.
- 5) 彼谷邦光: アオコの有毒物質の毒性について, 水環境学会誌, 17, pp.551-556, 1994.
- 6) Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M., Harada, K., Ichihara, A., Carmichael, W. W. and Fujiki, H.: Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 116, pp.609-614, 1990.
- 7) Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W. W. and Fujiki, H.: Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118, pp.420-424, 1992.
- 8) Ohta, T., Nishiwaki, R., Yatsunami, J., Komori, A., Suganuma, M. and Fujiki, H.: Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes, *Carcinogenesis*, 13, pp.2443-2447, 1992.
- 9) Harada, K., Oshikata, M., Uchida, H., Suzuki, M., Kondo, F., Sato, K., Ueno, Y., Yu, S. Z., Chen, G. and Chen, G. C.: Detection and identification of microcystins in the drinking water of Haimen City, China, *Natural Toxins*, 4, pp.277-283, 1996.
- 10) Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M. F., Park, H.-D., Chen, G. C., Chen, G. and Yu, S. Z.: Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver

cancer in China, *Carcinogenesis*, 17, pp.1317-1321, 1996.

- 11) Watanabe, M. F., Oishi, S., Harada, K.-I., Matsuura, K., Kawai, H. and Suzuki, M.: Toxins contained in *Microcystis* spp. of cyanobacteria (blue-green algae), *Toxicon*, 26, pp.1017-1026, 1988.
- 12) Namikoshi, M., Rinehart, K. L., Sakai, R., Stotts, R. R., Dahlem, A. M., Beasley, V. R., Carmichael, W. W. and Evans, W. R.: Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: Nine new microcystins, *J. Org. Chem.*, 57, pp.866-872, 1992.
- 13) Park, H.-D., Watanabe, M. F., Harada, K., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M. and Hayashi, H.: Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters, *Natural Toxins*, 1, pp.353-360, 1993.
- 14) Nagata, S., Soutome, H., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Sekijima, M., Sugamata, M., Harada, K., Suganuma, M. and Ueno, Y.: Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity, *Natural Toxins*, 3, pp.78-86, 1995.
- 15) Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M. and Ueno, Y.: Determination of microcystin in environmental water by highly sensitive immunoassay, *Japan J. Toxicol. Environ. Health*, 41, 10, 1995.
- 16) 滋賀県衛生環境センター: 琵琶湖のプランクトンデータ集 1990-1993, 1995.
- 17) 廣瀬弘幸, 山岸高旺: 日本淡水藻図鑑, 内田老鶴圃, 1977.
- 18) 渡辺眞之: 水の華をつくる藍藻, アオコ・その出現と毒素, 東京大学出版, pp.25-54, 1994.
- 19) Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Yoshida, F., Suttajit, M., Mebs, D., Puetsch, M. and Vasconcelos, V.: Survey of microcystins in environmental water by a highly sensitive immunoassay based on monoclonal antibody, *Natural Toxins*, 4, pp.271-276, 1996.
- 20) Park, H.-D., Iwami, C., Watanabe, M. F., Harada, K., Okino, T. and Hayashi, H.: Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic Lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994), *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 13, pp.61-72, 1998.
- 21) Maagd, P. G. J., Hendriks, A. J., Seinen, W. and Sijm, D. T. H. M.: pH-dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR, *Water Res.*, 33, pp.677-680, 1999.
- 22) Himberg, K., Keijola, A. M., Hiisvirta, H. and Sivonen, K.: The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: A laboratory study, *Water Res.*, 23, pp.979-984, 1989.
- 23) 梅谷友康, 森實圭二: 高速液体クロマトグラフ-質量分析計を用いたミクロシスチン定量方法の開発, 水道協会雑誌, 742, pp.26-34, 1996.

- 24) Nicholson, B. C., Rosiano, J. and Burch, M. D. : Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine, *Water Res.*, 28, pp.1297-1303, 1994.
- 25) Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M. F., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H. and Harada, K. : Stability of microcystins from cyanobacteria - IV. Effect of chlorination on decomposition, *Toxicon*, 35, pp.1033-1041, 1997.
- 26) 北澤弘美, 五味謙之, 亀崎新一, 安田英幸, 国包章一 : *Microcystis viridis* が生産するミクロシスチンの塩素処理及び UV 照射による分解, 第 49 回全国水道研究発表会講演集, pp.578-579, 1998.
- 27) Harada, K., Ogawa, K., Kimura, Y., Murata, H., Suzuki, M., Thom, P. M., Evans, W. R. and Carmichael, W. W. : Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC525-17, *Chem. Res. Toxicol.*, 4, pp.535-540, 1991.
- 28) Sivonen, K., Skulberg, O. M., Namikoshi, M., Evans, W. R., Carmichael, W. W. and Rinehart, K. L. : Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1, *Toxicon*, 30, pp.1465-1471, 1992.
- 29) Meriluoto, J. A. O., Sandstrom, A., Eriksson, J. E., Remand, G., Graig, A. G. and Chattopadhyaya, J. : Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*, *Toxicon*, 24, pp.1021-1034, 1989.
- 30) Luukkainen, R., Sivonen, K., Namikoshi, M., Fardig, M., Rinehart, K. L. and Niemela, S. I. : Isolation and identification of eight microcystins from 13 *Oscillatoria agardhii* strains: structure of a new microcystin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, pp.2204-2209, 1993.
- 31) 一瀬 諭, 若林徹哉, 水嶋清嗣, 藤原直樹, 野村 潔 : 琵琶湖における水の華発生状況について - *Oscillatoria kawamurae* の増殖 1998 -, 滋賀県衛生環境センター所報, 34, pp.84-90, 1999.

(2002. 8. 12 受付)

FATE OF CYANOBACTERIAL TOXIN, MICROCYSTIN IN LAKE BIWA AND EXAMINATION OF THE TOXIN ANALYSIS USING ELISA METHOD

Naoyuki YAMASHITA, Tomonari MATSUDA, Yoshihisa SHIMIZU and Saburo MATSUI

In this research, the fate of cyanobacterial toxin, microcystin in Lake Biwa were investigated. And we also examined the toxin analysis using ELISA method. Microcystin was detected in the Lake Biwa water and its filtrate. The concentration was varied depending upon the sampling stations, and increased to 2,200 pg/mL in the maximum with the coincidence of the water bloom. Microcystin was not detected in the tap water from Lake Biwa, which suggested that the microcystin would be removed in the water treatment process. The ratio of filtrate microcystin to total microcystin was varied. Although the ratio of microcystin in filtrate decreased with increase of total microcystin concentration, relationship between the ratio and the pH value of lake water was not observed.