— 原 著 論 文 —

琵琶湖磯漁港のアイガモ斃死試料中の藍藻毒素 microcystin-LR の蓄積

中村剛也^{1,*}・渡邊琴文¹・石川可奈子²・熊谷道夫²・宮原裕一³・犬塚良平³・
横田憲治⁴・小熊恵二⁴・朴 虎東¹

¹ 信州大学大学院総合工学系研究科 〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1

² 琵琶湖環境科学研究センター 〒520-0022 滋賀県大津市柳が崎 5-34

³ 信州大学山岳総合研究所山地水環境教育研究センター 〒392-0027 長野県諏訪市湖岸通り 5-2-4

⁴ 岡山大学大学院医歯科学総合研究所 〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

(2013 年 2 月 7 日受付；2013 年 7 月 6 日受理)

キーワード：アイガモ斃死, *Anas platyrhynchos* var. *domestica*, ミクロシスチン LR, ボツリヌス毒素, 琵琶湖.

日本鳥学会誌
Japanese Journal of
Ornithology
© The Ornithological Society
of Japan 2013

Koya NAKAMURA¹, Kotomi WATANABE¹, Kanako ISHIKAWA², Michio KUMAGAI²,
Yuichi MIYABARA³, Ryohei INUZUKA³, Kenji YOKOTA⁴, Keiji OGUMA⁴, Ho-Dong
PARK¹. 2013. Accumulation of microcystin-LR in dead domestic duck at Iso harbor, Lake
Biwa, Japan. Jpn J Ornithol 62: 153–165.

Abstract. In Iso harbor, which is located in the north basin of Lake Biwa, 22 of 30 domestic duck (*Anas platyrhynchos* var. *domestica*; a crossbreed between Mallard *A. platyrhynchos* and domestic duck) died during August and September 2007. The deaths were not the result of botulism because there were no signs of acute toxicity. Microcystin (MC)-RR and Microcystin-LR were detected in water samples from the harbor. Liver tissues from the dead duck contained 560 ng g⁻¹ DW (178 ng g⁻¹ FW) of MC-LR. MC-LR is a high toxic cyanotoxin produced by cyanobacteria, and the duck liver tissue contents were high compared with previous studies. Therefore, we suggest the duck died from MC-LR levels having been exposed to toxic cyanobacteria. This is the first case in which cyanotoxin has been identified in dead waterfowl in Japan.

Key words: Dead domestic duck, *Anas platyrhynchos* var. *domestica*, Microcystin-LR, Botulinum toxin, Lake Biwa.

¹ Interdisciplinary Graduate School of Science and Technology, Shinshu University, 3-1-1 Asahi, Matsumoto, Nagano 390-8621, Japan.

² Lake Biwa Environmental Research Institute, 5-34 Yanagasaki, Otsu, Shiga 520-0022, Japan.

³ Institute of Mountain Science, Shinshu University, Research and Education Center for Inlandwater Environment Shinshu University, 5-2-4 Kogandori, Suwa, Nagano 392-0027, Japan.

⁴ Department of Bacteriology, Medical School, Okayama University, Okayama, Japan 2-5-1, Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan.

はじめに

* E-mail: ko_nakamura@pref.ibaraki.lg.jp

** 現所属：茨城県霞ヶ浦環境科学センター
〒300-0023 茨城県土浦市沖宿町 1853
doi:10.3838/jjo.62.153
JOE:JST.JSTAGE/jjo/62.153

富栄養化が進んだ湖沼では、夏季にしばしば浮遊性藍藻が大量に増殖して、ブルームを形成する。この現象はアオコ現象として広く一般に知られており、この現象の原因となる浮遊性藍藻は肝臓毒

や神経毒を産生する。藍藻の産生する肝臓毒として最も一般的な毒素は microcystin (MC) である (渡辺ら 1994)。MC は 80 種以上の異性体を持ち (佐野 2012)、日本では MC-RR, MC-LR, MC-YR および MC-RR, MC-LR のデスメチル体が microcystin 異性体として検出されている (渡辺ら 1994)。マウスの腹腔内投与試験による MC-RR, MC-LR, MC-YR の急性毒性 (LD_{50} 値) は、それぞれ $600 \mu\text{g kg}^{-1}$, $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, $70 \mu\text{g kg}^{-1}$ と高い。藍藻が産生する神経毒では anatoxin-a が知られており、その毒性は $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ である (渡辺ら 1994)。このような毒素を産生する藍藻の摂取によって家畜や野生動物が死亡するという現象が起きている。藍藻毒素 (Cyanotoxin) による家畜や野生生物の被害は 1878 年から報告されており (Francis 1878)、有毒藍藻によると考えられる水鳥の斃死が 1990 年代以降にカナダ (Park et al. 2001) やアフリカ (Krienitz et al. 2003, 2005; Melcalf et al. 2006) で報告されている。

野生水鳥類斃死の一原因として、ボツリヌス菌による中毒が指摘されている (坂井ら 1975; Roche & Friend 1999; Murphy et al. 2000)。ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum* や *C. argentinense*) は、芽胞をつくるグラム陽性の偏性嫌気性細菌であり、菌が産生する毒素の抗原性によって A 型から G 型の 7 型に分類される (坂口 1981)。野鳥の大量斃死は、C 型や D 型、E 型のボツリヌス菌によって引き起こされている (Roche & Friend 1999; Murphy et al. 2000)。国内では、C 型のボツリヌス菌によって、コガモ *Anas crecca crecca* やカルガモ *A. poecilorhyncha zonorhyncha*, オナガカモ *A. acuta* など 115 羽が斃死している (坂井ら 1975)。

琵琶湖は日本において最も大きな湖沼であり、湖盆は北湖 (表面積: 616 km^2 , 平均水深: 43 m)、南湖 (表面積: 58 km^2 , 平均水深: 4 m) に区分され、近畿地方 1,400 万人の飲料水源となっている。1950 年代から琵琶湖は富栄養化し、北湖・南湖の両湖盆で夏季に *Anabaena*, *Microcystis* のブルーム (アオコ現象) が確認されている (Kumagai & Robarts 1996; Watanabe et al. 2000; Ozawa et al. 2005)。Ozawa et al. (2005) は、1998 年から 2000 年の琵琶湖北湖における最大 MC 濃度が、乾燥重量あたり $3.28 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ (Dry Weight; DW) に達することを示している。したがって、琵琶湖に生息する野生生物は藍藻毒素の曝露を受けている可能性がある。また、琵琶湖やその流入河川から C 型や E 型などのボツリヌス菌が検出されている (林

1992)。2007 年、琵琶湖北湖の港内 (滋賀県米原市に位置する磯漁港、以下「磯漁港」とする) において、アイガモ *A. platyrhyncha* var. *domestica* の斃死が発生した。本研究は、アイガモ斃死に対する要因として有毒藍藻の影響を明らかにすることを目的とした。また、野鳥斃死の原因として挙げられるボツリヌス菌による疾病についても検討した。

材料と方法

1) 調査および調査地の概要

琵琶湖北湖の磯漁港 ($35^{\circ}18'02''\text{N}$, $136^{\circ}15'03''\text{E}$) で飼育されていたアイガモ *A. platyrhyncha* var. *domestica* の 30 羽中 22 羽が斃死した。2007 年 8 月 21 日から 22 日に水質悪化による悪臭が確認され、その対策として閉鎖されている水門上流側からポンプを用いて河川水を導入した。アイガモの斃死は 8 月 25 日から 9 月 21 日にかけて発生し、1 日に最大 3 羽の死亡が確認された。また、生き残った 8 羽のうち数羽は、活動性の低下や異常姿勢などを示していた。

磯漁港には流入河川があるが、水門によって上流部と隔離されている (図 1)。アイガモは水門から磯漁港までの範囲を移動域としていたため、調査地点は磯漁港 (St.1)、水門上流部 (St.2)、ポンプによる導水部 (St.4)、港と導水部の中間点 (St.3) の 4 地点とした (図 1)。これら 4 地点において、2007 年 9 月 22 日に水試料と斃死したアイガモ試料を採取した。採取した湖水試料は、藍藻ブルーム形成種の現存量の測定と藍藻毒素 MC の定量に用いた。藍藻ブルーム形成種の現存量測定用の試料は、採水後、直ちに中性ホルマリンで固定した (最終濃度 1% v/v)。斃死したアイガモ試料は、肝臓組織を MC 含有量の定量に使用し、消化管内容物をボツリヌスの毒性試験に使用した (図 2)。アイガモ斃死試料は、解剖後凍結保存し、分析の直前に凍結乾燥を行った。また、10 月 13 日に琵琶湖北湖 (St.5) において水深 15 m まで 5 m 間隔 (0, 5, 10, 15 m) で湖水を採取し、藍藻現存量および藍藻毒素 MC の定量を行った。

2) 藍藻ブルーム形成種の現存量測定

藍藻ブルーム形成種の同定は、Komárek & Anagnostidis (1998)、渡邊 (2007) に従って行った。*Microcystis* の細胞密度は、試料の一部を超音波により群体を崩壊させた後に、Fuchs-Rosenthal 血球計数盤 (Fujiston, Japan, Osaka) を用いて計数する

図1. 磯漁港とサンプリング地点の概要. 磯漁港: 琵琶湖北湖東部に位置 ($35^{\circ}18'29''\text{N}$, $136^{\circ}15'36''\text{E}$). アイガモ飼育範囲: St.1 から St.3. St.1: 磯漁港, St.2: St.1 と 2 の中間点. St.3: 水門下流側. St.4: 水門上流側. 水門: 常に封鎖. 星印 (St.5): 北湖サンプリング地点.
Fig. 1. Map of Iso harbor and sampling sites. Iso harbor is located in the eastern north basin of Lake Biwa ($35^{\circ}18'29''\text{N}$, $136^{\circ}15'36''\text{E}$). Water samples were collected in St. 1–4. Domestic duck were farmed in Sts. 1–3. Dead duck were collected in St. 1. St. 1: Iso harbor, St. 2: mean station between St. 1 and St. 3: lower site of water gate, St. 4: upper site of water gate. The water gate was usually closed. The star symbol mark (St.5) where samples were collected from the north basin of Lake Biwa.

ことで求めた。Microcystis の種組成は、試料毎に最低 100 コロニーについて種同定と細胞数の計数を行い、全細胞数に対する種毎の割合から求めた。

3) 湖水試料・アイガモ肝臓組織からの microcystin の抽出

湖水中の MC の検出のために、MC 合成酵素 (microcystin synthetase gene; *mcy*) 遺伝子をターゲットとした PCR 分析を実施した。PCR 分析によって

mcy 遺伝子が確認され、MC を産生する可能性がある藍藻が確認された試料については MC の定性・定量を行った。MC の抽出は、Park et al. (1998) に従って行った。MC の精製は、コンディショニングを行った 0.5 g Oasis HLB カートリッジ (Waters, USA) に抽出液を通し、5% (v/v) メタノール (MeOH) を用いた洗浄した後、100% MeOH で溶出させることで行った。

肝臓組織中の MC の抽出・精製は Xie & Park

(2007)の方法に従って行った。約 50 mg の肝臓試料から、3 分の超音波処理 (60 W, 20 kHz, Digital Sonifier Model 250, Branson, USA) によって BuOH: MeOH: H₂O = 1: 4: 15 (v/v/v) の溶媒 10 mL に MC を抽出した後、4,000 rpm (3,200 × g), 20 min で遠心分離して上清を採取した。この操作を 3 回繰り返した上清をコンディショニングした 0.5 g Oasis HLB カートリッジに通した。HLB カートリッジで精製した分画をコンディショニングを行った Silica gel (2 g)/ plus Silica gel (0.69 g) カートリッジ (SepPak, USA) に通し MeOH で洗浄することで MC を精製した。

湖水・アイガモ試料内の MC 同定・定量には、ポンプ PU-980, カラム Inertsil® ODS-3 (2.1 × 150 mm), 検出波長 238 nm に設定した検出器 UV-970 を接続した HPLC (NANOSPACE SI-2 series; Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan)/ESI-MS/MS (API3000™ LC/MS/MS system; Applied biosystems, CA, USA) を使用した。イオン源には ESI (Electro-Spray Ionization) を使用し、ESI ポジティブイオンモードで m/z 50

から 1,200 までスキャンした。霧化ガスは N₂ であり、流速は 1.5 L min⁻¹ に設定した。CDL (Curved Desolvation Line) 温度、電圧は 200°C, 1.5 kV であり、試料は MeOH に溶出させ 20 μL を注入した。移動相は 0.1% 酢酸 (A) およびアセトニトリル (B) であり、流速は 0.2 mL sec⁻¹ に設定した。グラディエントは 5 分後から B を 40% から 100% に 20 分間で変動させ、B を 5 分間維持させた。試料中 MC の定性と定量は Wako 製の標準物質を利用して行った。

4) アイガモ検体におけるボツリヌス毒の影響評価

斃死したアイガモの消化管内容物を対象として、ボツリヌス毒素の毒性試験 (農林水産省 2013) を行った。ボツリヌス菌が存在する可能性のある胃等の内容物を 3 mL から 5 mL の PBS (pH = 6.0) で洗浄し、4,000 rpm (3,200 × g), 20 min で遠心分離を行った。上清 0.5 mL を直接マウスに腹腔内投与し、ボツリヌス毒素の急性毒性を試験した (図 2)。また、残りの上清は、他のバクテリアの増殖を抑

図 2. アイガモ試料における microcystin 含有量およびボツリヌス毒の毒性試験の概略図。

Fig. 2. Systematic procedure for analysis of microcystin and botulinus toxicity in domestic duck.

制するために、加熱処理（80°C, 10 min or 80°C, 20 min）もしくはエタノール処理（最終濃度80%）したものを嫌氣的条件で培養し、急性毒性試験に使用した（図2）。これらの試験で陽性を示した場合において、ボツリヌス菌の型を同定する毒素中和試験などの更なる試験を行うこととした。

結 果

1) 磯漁港および琵琶湖北湖における藍藻ブルーム形成種の現存量

表1に磯漁港および琵琶湖北湖における藍藻ブルーム形成種の細胞密度を示した。磯漁港（図1；St.1）において *Microcystis aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *Oscillatoria kawamurae* が確認され、それぞれの細胞密度は 4.6×10^4 cells mL⁻¹, 5.4×10^3 cells mL⁻¹, 450 cells mL⁻¹ であった。また、その他の藻類として *Euglena* 等の鞭毛藻が見られた。St.2 において藍藻は計数限界以下であり、緑藻の *Spirogyra* やミジンコ類が多く確認された。St.3 においては *O. kawamurae* が 20 cells mL⁻¹ 確認され、水門上流部の St.4 では 39 cells mL⁻¹ の *M. aeruginosa* が確認された。

琵琶湖北湖沖（図1；St.5）の表層では、*M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*,

Anabaena crassa が確認された。*M. aeruginosa*, *M. wesenbergii* が優占する傾向であったが、いずれの種においても 100 cells mL⁻¹ 以下を維持していた（表2）。また、各水深においても大きな変動はなく、水深 15 m まではほぼ均一に分布していた。

2) 磯漁港および琵琶湖北湖における microcystin 濃度

MC 合成酵素遺伝子（*mcy* 遺伝子）による PCR 分析において、MC は St.1 のみで検出され、その他の調査区においては検出限界以下であった。そのため、MC の定性・定量は St.1 の試料において実施した。MC-RR および LR の標準物質を LC/MS で分析した結果、MC-RR は 520.10 (m/z) に MC-LR は 498.55 (m/z) にピークが検出された（図3 a, b, c）。したがって、これら MC の検出には MC-RR [M+2H⁺] 510.10, MC-LR [M+2H⁺] 498.55 の SIM m/z で行った。琵琶湖磯漁港（St.1）における湖水サンプルから MC-RR および LR の標準物質と同保持時間にピークが確認されたため（図3 d）、これらのピークを MC-RR および LR であると同定した。外部標準による濃度検量線から算出したそれぞれの MC 濃度は、MC-RR: 3.74, MC-LR: 2.95 μg L⁻¹ (Total MC: 6.69 μg L⁻¹) であった（表3）。また、MC を乾燥重量あたりに計算すると、

表 1. 磯漁港（St.1-4）における藍藻の細胞密度。
Table 1. Cyanobacteria concentration at Iso harbor (St. 1-4).

磯漁港 Iso harbor	St. 1 cells mL ⁻¹	St. 2 cells mL ⁻¹	St. 3 cells mL ⁻¹	St. 4 cells mL ⁻¹
<i>Microcystis aeruginosa</i>	4.6×10^4	N.D.	N.D.	39.0
<i>Microcystis wesenbergii</i>	5.4×10^3	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Oscillatoria kawamurae</i>	450	20.0	N.D.	N.D.
<i>Oscillatoria sp.</i>	30.0	N.D.	N.D.	N.D.
計 Total	5.2×10^4	20.0	N.D.	39.0

表 2. 琵琶湖北湖（St.5）における藍藻細胞密度の鉛直分布。
Table 2. Vertical distribution of cyanobacteria concentration in the northbasin of Lake Biwa (St. 5).

琵琶湖北湖（St.5） North basin of L. Biwa (St.5)	0 m cells mL ⁻¹	5 m cells mL ⁻¹	10 m cells mL ⁻¹	15 m cells mL ⁻¹
<i>Microcystis aeruginosa</i>	42.2	31.6	41.4	75.0
<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	37.6	8.50	17.9	0.00
<i>Microcystis wesenbergii</i>	6.70	13.2	5.90	5.90
<i>Microcystis viridis</i>	0.30	0.00	0.20	0.00
<i>Anabaena crassa</i>	0.00	0.10	0.00	0.00
計 Total	86.8	53.4	65.4	80.9

図3. Microcystin 標準試料および湖水・アイガモ試料の LC/MS 分析結果. a) : microcystin-RR, LR の 238 nm におけるクロマトグラム, b) : MC-RR のマススペクトル, c) : MC-LR のマススペクトル, d) : 磯漁港湖水試料における m/z 520.10, 498.55 のクロマトグラム, e) : アイガモ肝臓試料中の m/z 520.10 のクロマトグラム, f) : アイガモ肝臓試料中の m/z 498.55 のクロマトグラム.

Fig. 3. Results of LC/MS analysis on microcystin STD, lake water and domestic duck liver. a): at 238 nm on STD of microcystin-RR, LR, b): mass chromatogram of MC-RR, c): mass chromatogram of MC-LR, d): m/z 520.10 and 498.55 mass chromatogram of lake water samples at Iso harbor, e): m/z 520.10 mass chromatogram of liver samples from dead domestic duck, f): m/z 498.55 mass chromatogram of liver samples of dead domestic duck.

表 3. St.1 から St.5 における microcystin 濃度. St.5 においては有光層内の MC の鉛直分布を示した. N.D.: 未検出.

Table 3. Microcystin concentrations and composition from St.1 to St.5. At St.5, microcystin concentrations showed vertical distribution in limnetic zone. N.D.: Not Detected.

調査点		試料 採取日	採水深度 Depth	ミクロシスチン RR 濃度 MC-RR		ミクロシスチン YR 濃度 MC-YR		ミクロシスチン LR 濃度 MC-LR		全ミクロシスチン濃度 Total MC	
Station		Date	m	ng L ⁻¹	fg cell ⁻¹	ng L ⁻¹	fg cell ⁻¹	ng L ⁻¹	fg cell ⁻¹	ng L ⁻¹	fg cell ⁻¹
磯漁港 Iso harbor	St.1	2007 年	0	3.74 μg	74.8	N.D.	N.D.	2.95 μg	59.1	6.69 μg	134
	St.2	9 月 21 日	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	St.3	21-Sep	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	St.4	2007	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
琵琶湖 L. Biwa	St.5	2007 年	0	7.5	86.8	11.7	135	17.9	207	37.1	428
		10 月 13 日	5	0.8	15.5	N.D.	N.D.	20.4	382	21.2	398
		13-Oct	10	6.2	95.2	N.D.	N.D.	16.2	248	22.4	343
		2007	15	3.4	42.0	N.D.	N.D.	15.4	190	18.8	232

MC-RR: 52.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, MC-LR: 41.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW (Total MC: 93.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) であり, 細胞あたりに換算すると, MC-RR: 74.8 fg cell⁻¹, MC-LR: 59.1 fg cell⁻¹ (Total MC: 134 fg cell⁻¹) であった.

北湖では 18.8 ng L⁻¹ から 37.1 ng L⁻¹ の低濃度の MC が検出された (表 3). また, MC-RR, -YR, -LR が検出されたが, 表層においてのみ MC-YR が確認された. MC-LR が全 MC の 50% 以上を占め, 5 m 以深では 70% 以上に達した. 細胞あたりの MC は 232 fg cell⁻¹ から 428 fg cell⁻¹ で変動し, 最高濃度は表層で検出された.

3) アイガモ肝臓組織内の microcystin 含有量

死亡したアイガモ肝臓組織中の 520.10 (m/z) のクロマトグラムを図 3e に示した. 死亡したアイガモ肝臓組織中からは MC-RR と同保持時間にピークは確認されなかった (図 3e). そのため, アイガモ肝臓組織中の MC-RR 含有量は検出限界以下であったと判断した.

死亡したアイガモ肝臓組織中の 498.55 (m/z) のクロマトグラムを図 3f に示した. MC-LR の標準物質と同保持時間にピークが確認された. 外部標準による濃度検量線から算出した MC-LR 含有量は, 乾燥重量あたり, 湿重量あたりでそれぞれ 560 ng g⁻¹ DW, 178 ng g⁻¹ FW (Fresh Weight: FW) であった (表 4). MC-LR 含有量と肝臓組織の重量から, 7.25 $\mu\text{g liver}^{-1}$ DW (2.30 $\mu\text{g liver}^{-1}$ FW) の MC-LR が死亡したアイガモの肝臓組織に蓄積されていたことが示された.

4) アイガモ試料のボツリヌス毒性試験

胃や腸の内容物洗浄液を遠心分離した上清を用いて, マウスに対する急性毒性試験を行った. ア

イガモの斃死がボツリヌス毒素による中毒死であれば, 菌体外毒素であるボツリヌス毒素が上清に含まれ, マウスはボツリヌス毒素によって急性毒性を示すことが考えられた. また, ボツリヌス菌もしくは芽胞が存在していた場合, 上清培養液がマウスに対する急性毒性を示すことが想定された. しかしながら, ボツリヌス毒素の急性毒性試験, 培養後の急性毒性試験共に, マウスは死亡することにはなかった. 両試験が陰性であったため, ボツリヌス菌の型を決定する試験等は実施しなかった.

考 察

1) アイガモの斃死に対する藍藻毒素の影響

鳥類の斃死の要因として, 有毒藍藻以外に感染症やその他の要因による疾病による影響を考慮する必要がある. 2007 年は, H5N1 型鳥インフルエンザウイルスによる養鶏や野生のクマタカの斃死が発生する被害が日本で起きている (農林水産省 2007). 死亡したアイガモに対して, 滋賀県家畜保健衛生所が鳥インフルエンザウイルスに対する調査を行ったが, アイガモ検体からは鳥インフルエンザウイルスを確認することはできなかった. また, 水鳥の斃死を引き起こす要因の 1 つとしてボツリヌス菌の産生するボツリヌス毒素による中毒が指摘されている (Murphy et al. 2000). Murphy et al. (2000) は, カナダのプレーリーにおいて C 型のボツリヌス菌による野鳥の斃死が発生し, 深刻な問題となっていることを指摘している. また, 林 (1992) は, 琵琶湖やその流入河川の調査から, 流入河川では河口域, 湖内では湖底より湖岸域においてボツリヌス菌の検出率が高まることと, 琵琶湖では年間を通じてボツリヌス菌が検出される

表 4. 水鳥の組織内における藍藻毒素含有量. 2 検体以上の測定が行われた報告は最小, 平均, 最大値を示した. N.D.: 未検出, N.A.: 未分析.
 Table 4. Cyanotoxin content in tissue of water birds. Where more than two samples were analyzed, the toxin data represent minimum, median and maximum concentrations. N.D.:
 Not Detected, N.A.: Not Analyzed.

鳥類種 Species	分析組織 Organs	湖 沼 Location	ミクロシスチン or ノドュラリン 含有量 Microcystin or Nodularin		アナトキシン-a 含有量 Anatoxin-a		引用文献 Reference
			$\mu\text{g g}^{-1}$ FW	$\mu\text{g g}^{-1}$ DW	$\mu\text{g g}^{-1}$ FW	$\mu\text{g g}^{-1}$ FW	
アイガモ Domestic Duck <i>Anas platyrhynchos domestica</i>	肝臓 Liver	琵琶湖 L. Biwa	0.178 (MC-LR)	0.560 (MC-LR)	N.A.	本研究 This Study	
コフラミンゴ Lesser Flamingo <i>Phoenicopterus minor</i>	肝臓 Liver	ボゴリア湖 L. Bogoria	N.D.-0.200-0.900 (MCs)		N.D.-0.100-4.60	Krienitz et al. (2003)	
	肝臓 Liver	ナクール湖 L. Nakuru	N.D.-0.200-0.400 (MCs)		N.D.-0.030-5.80	Krienitz et al. (2005)	
	胃／腸 Stomach/ intestine	ボゴリア湖 L. Bogoria	0.040-0.120-0.200 (MCs)		0.800-2.55-4.30	Krienitz et al. (2003)	
	死亡検体 Dead Sample	ナクール湖 L. Nakuru	0.030-0.050-0.200 (MCs)		0.040-0.100-0.200	Krienitz et al. (2005)	
	頭部羽毛 Head Feather	ボゴリア湖 & ナクール湖 L. Bogoria & L. Nakuru	N.D.		N.D.	Metcalf et al. (2006)	
マガモ Mallard <i>Anas platyrhynchos</i>	翼部羽毛 Wing Feather	ボゴリア湖 & ナクール湖 L. Bogoria & L. Nakuru	1.35-3.06-5.00 (MCs)		0.140-0.482-1.01	Metcalf et al. (2006)	
	胸部羽毛 Breast Feather	ボゴリア湖 & ナクール湖 L. Bogoria & L. Nakuru	N.D.-1.06-3.08 (MCs)		N.D.	Metcalf et al. (2006)	
	肝臓 Liver	太 湖 L. Taihu		0.031 (MC-RR, -YR, -LR)	N.A.	Chen et al. (2009)	
ゴイサギ Black-crowned Night Heron <i>Nycticorax nycticorax</i>	肝臓 Liver	太 湖 L. Taihu		0.018 (MC-RR, -YR, -LR)	N.A.	Chen et al. (2010)	
	肝臓 Liver	バルト海 Baltic Sea		0.003-0.028-0.052 (Nodularin)	N.A.	Sipiä et al. (2008)	
ケワタガモ Eiders <i>Somateria mollissima</i>	羽毛 Feather	バルト海 Baltic Sea		0.008-0.026-0.044 (Nodularin)	N.A.	Sipiä et al. (2008)	
	肝臓 Liver	曝露実験 Exposed experiment	0.044 (MCs)		N.A.	Skocovska et al. (2007)	

ことを示している。また、琵琶湖で検出されるボツリヌス菌は鳥類の大量斃死をもたらすことで知られる C 型や E 型の検出率が高いことも指摘されており (林 1992), ボツリヌス菌が大量に増殖すればアイガモが斃死する可能性がある。ボツリヌス症の知見として, アヒルやカモでは夏から秋にかけて流行すること, 発症すれば高い致死性を示すこと, 頸を垂れる症状 (頸垂れ症) となることなどが挙げられている (農林水産省 2013)。今回の死亡したアイガモでみられた症状の中には, ボツリヌス菌による疾病の可能性を支持する症状が確認された。しかしながら, 本研究では, アイガモの消化管内容物からボツリヌス毒素およびボツリヌス菌もしくはその芽胞の存在を裏付ける結果は得ることはできなかった。したがって, 詳細な検討を行っていないものの, 毒性試験の結果からはアイガモの斃死がボツリヌス中毒死によるものではないと推察された。

1995 年に 20 万羽のガンカモが斃死した Pakowki 湖では水鳥の斃死が 1998 年まで報告され, 藍藻サンプルから MC-LR と同程度の高い毒性を示す新規の MC である [D-Leu¹] MC-LR が検出されている (Park et al. 2001)。また, 水鳥の斃死が確認された五大湖の 1 つであるオンタリオ湖のハミルトン湾 (Murphy et al. 2003) やコフラミンゴ *Phoenicopterus minor* が斃死したボゴリア湖やナクール湖 (Krienitz et al. 2003, 2005; Melcalf et al. 2006), カルガモ *A. poecilorhyncha zonorhyncha* の斃死が起きた新池 (Matsunaga et al. 1999) において湖水中から高濃度の MC が検出されている。したがって, 藍藻毒素が水鳥の斃死に関わっていることが示唆されている。しかし, 有毒藍藻が原因であると指摘する報告の多くは, 鳥類斃死時における湖内の cyanotoxin 濃度や遺骸の解剖所見などを基として議論されており (Matsunaga et al. 1999; Park et al. 2001; Murphy et al. 2003), 鳥類の体組織中の cyanotoxin 含有量も測定して議論した研究は少ない。

鳥類の体組織中の cyanotoxin 含有量を測定した知見 (表 4) から, 有毒藍藻の曝露を受けた鳥では, 肝臓や胃腸に加えて, 心臓や腎臓等の 12 の臓器や羽毛からも藍藻毒素が確認されている (Krienitz et al. 2003, 2005; Melcalf et al. 2006; Sipiaet al. 2008; Chen et al. 2009)。コフラミンゴが大量死したボゴリア湖およびナクール湖において, コフラミンゴ遺骸の肝臓組織から肝臓毒 MC と神経毒 anatoxin-a が検出され, それぞれの平均含有量は湿重量あたり MC: 200 ng g⁻¹ FW, anatoxin-a: 70.0 ng g⁻¹ FW

であった (Krienitz et al. 2003, 2005)。湖沼を生息域としている鳥類からは, 最大 52.1 ng g⁻¹ DW の MC や nodularin などの cyanotoxin が検出されており (Sipiaet al. 2004, 2006; Karlsson et al. 2005; Chen et al. 2009), 本研究におけるアイガモ肝臓組織中の MC-LR 含有量 (表 4) は, これら生存している個体から報告される含有量のおよそ 10 倍から 200 倍に達した。また, MC-RR, MC-YR, MC-LR を含む藍藻懸濁液を 10 日間経口投与 (225 μg kg⁻¹ day⁻¹) されたニホンウズラの肝臓組織内の MC 含有量 (Skocovska et al. 2007) と比較すると, 本研究のアイガモの MC 含有量は約 3 倍であった。したがって, 本研究で示された肝臓組織内の MC-LR は, 生きていた個体の cyanotoxin 含有量より斃死した検体の cyanotoxin 含有量に近く, cyanotoxin の高濃度蓄積が磯漁港のアイガモに起きていたと考えられた。

Cyanotoxin の急性毒性試験はマウスに対する腹腔内投与で実施されており, 肝臓毒である MC-LR, MC-YR, nodularin の LD₅₀ 値は 50 μg kg⁻¹, 70 μg kg⁻¹, 50 μg kg⁻¹ と高い。MC-RR は MC 異性体の中では LD₅₀ 値が低く (600 μg kg⁻¹), 神経毒 anatoxin-a は 200 μg kg⁻¹ である (渡辺ら 1994)。また, 哺乳類と鳥類では急性毒性や症状が異なることが指摘されている (Takahashi & Kaya 1993)。Takahashi & Kaya (1993) は, MC-RR をニホンウズラに腹腔内投与した場合の LD₅₀ 値が 256 μg kg⁻¹であることを示しており, 鳥類は哺乳類より MC に対する感受性が高くより低濃度で中毒症状を示す可能性がある。Chen et al. (2009) は, マガモの肝臓組織中の MC が MC-RR, MC-YR, MC-LR で構成され (表 4), MC-RR が約 50% を占めることを示している。また, 本研究のアイガモの試料からは MC-LR が単独で検出されている (表 4)。したがって, 同じ MC 含有量であったとしても, 他の異性体を含む報告と比較して, アイガモに対して高い毒性を示した可能性がある。

MC の曝露を受けたマウス生体内では, MC がグルタチオン (GSH) やシステイン (Cys) と結合して抱合体を形成し, 毒性の低下や体外排出促進が誘導される (Kondo et al. 1992)。前述した Skocovska et al. (2007) の曝露試験では, ニホンウズラの肝臓組織内の MC 含有量が 10 日後から 30 日後で減少することを示しており, 鳥類にも哺乳類と同様に MC の代謝機構があることを示唆している。しかし, 本研究では, アイガモ肝臓組織から MC-LR が抱合体を形成しない形態で確認さ

れていた。したがって、解毒能力以上の MC 曝露を受けていたと推定される。

Chen et al. (2009) は、太湖に飛来する食性の異なる 2 種の鳥類において、有毒藍藻を直接摂食しやすいマガモ肝臓組織内の MC 含有量が、動物食であるゴイサギより高いことを示している (表 4)。また、雑食性のケワタガモと比較しても、マガモ肝臓組織内の MC 含有量が高い (Sipiä et al. 2008; Chen et al. 2009)。彼らの結果は、動物食であるゴイサギより有毒藍藻を直接摂食しやすいマガモで、高濃度の MC が肝臓内に蓄積することを示唆するものである。天野ら (未発表) は、*Microcystis* の遺伝子をターゲットとした PCR 分析をカモ類のフンに対して実施し、藍藻ブルームが通常消滅している冬季においても、*Microcystis* の遺伝子が確認できることを示している。これらのカモ類と同様に、アイガモも主に植物食であり、表面に集積する有機物を主な餌資源としている。本研究においては、死亡したアイガモの胃内容物に *Microcystis* のコロニーが確認され、摂餌時に有毒藍藻を取り込んでいたことが示唆された。有毒藍藻による大量死が報告されているコフラミングは約 72 g DW day^{-1} の藍藻を濾過摂食する (Vareshi 1978)。大量死が起きたボゴリア湖の平均 MC は $145 \mu\text{g g}^{-1} \text{ DW}$ であるため (Krienitz et al. 2003, 2005)、コフラミングは約 10.4 mg day^{-1} の MC 曝露を受けていたと考えられる。一方、アイガモは表層に集積する水草等の有機物を $126 \text{ g DW day}^{-1}$ の速度で摂取するため (山梨県 2002)、磯漁港において飼育されたアイガモは *Microcystis* を餌資源と共に摂取し、 11.7 mg day^{-1} ($93.0 \mu\text{g g}^{-1} \text{ DW}$ で計算) の MC に曝露されていた可能性がある。したがって、アイガモは食性からも有毒藍藻を摂取しやすいことが推察された。

2) 磯漁港における有毒藍藻ブルームの発生機構

アイガモ斃死の要因が有毒藍藻の摂取である場合、高い毒素産生能力をもつ藍藻が大量に増殖して、ブルームを形成していたことが想定される。磯漁港で確認された *Microcystis* は代表的な MC 産生者であるが、*O. kawamurae* は MC を産生しない (朴 私信)。したがって、MC は *Microcystis* によって産生されたものと示唆される。有毒藍藻の細胞あたりの MC は $10.0 \text{ fg cell}^{-1}$ から 500 fg cell^{-1} であると報告されている (Orr & Jones 1998; Long et al. 2001; Kameyama et al. 2002)。磯漁港 (2007 年 9 月 21 日) および北湖 (2007 年 10 月 13 日) の MC はそれぞれ 134 fg cell^{-1} (MC-RR: 58.5%, MC-LR:

41.5%)、 428 fg cell^{-1} (MC-RR: 20.2%, MC-YR: 31.5%, MC-LR: 48.3%) であった。したがって、琵琶湖の *Microcystis* は細胞内により多くの MC を保持していることが示唆される。また、琵琶湖から分離した *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii* は MC 産生能力をもつことが指摘されており (Ozawa et al. 2005)、*Microcystis* がブルームを形成すれば、非常に高濃度の MC が産生される可能性がある。

琵琶湖のような大きな湖沼では、沖帯より沿岸帯で *Microcystis* などのブルームが発生している (Watanabe et al. 2000; Ozawa et al. 2005; 石川ら 2003)。これは、沖帯では *Microcystis* が底泥から回帰できないこと (Tsujimura et al. 2000)、沿岸帯では沖帯に比べ栄養塩が高濃度存在すること (Ishikawa et al. 2002) が要因であると考えられている。また、長浜港などの港湾部で特に *Microcystis* の細胞密度が高い (Ozawa et al. 2005)。これは、港湾部は流出部が狭く、閉鎖的な水塊を形成していることが要因である。このような水塊が安定しやすい環境では、有光層以深への沈降を回避でき、有光層以深の栄養塩も鉛直運動で利用できる *Microcystis* は強い競争者となる (Reynolds 1981)。磯漁港の *Microcystis* 細胞密度 (Table 1) は、事件発生約 1 ヶ月後においても、沖帯 (Table 2; 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 2007a) より高い密度を維持していた。磯漁港では、流入河川と漁港の間に水門が建設されており、水門は常に封鎖されている。そのため、流入河川は磯漁港の北東部 1.5 km の地点で琵琶湖に流入しており、通常河川水の流入は磯漁港にはない。したがって、磯漁港は閉鎖性が高く、*Microcystis* がブルームを形成しやすい環境であったことが考えられた。実際に、アイガモ斃死と同時期の南湖大津付近の港湾部では $10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 以上に達する藍藻のブルームが確認されており (滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 2007b)、複数の条件が揃えば、磯漁港においても藍藻ブルームが形成されていたことが推察される。

アイガモの斃死の数日前から水門上流側から河川水がポンプで磯漁港に導入されていた。水門上流部からの導水は磯漁港に栄養塩を供給し、*Microcystis* の増殖を高めた可能性がある。降雨の強度やパターンと有毒藍藻ブルームの関係を示した Reichwaldt & Ghadouani (2012) は、降雨が大きな水塊の攪拌や希釈効果をもたらさないと、供給された栄養塩などの影響で有毒藍藻ブルームを

誘導することを指摘している。この原因として、栄養塩が供給された環境において有毒株が無毒株より高い増殖を示すこと (Vézie et al. 2002; Davis et al. 2009) が考えられる。さらに、DIN (Dissolved Inorganic Nitrogen 溶存無機窒素) が供給されると MC の産生が高まること (Orr & Jones 1998; Long et al. 2001; Yoshida et al. 2007) も指摘されている。したがって、水門上流部からの導水によって *Microcystis* の増殖と共に MC 産生が促進され、河川水導入直後は測定した MC 濃度 ($93.0 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) よりはるかに高い濃度であった可能性がある。

以上のように、磯漁港におけるアイガモの斃死は cyanotoxin の中でも特に毒性の高い MC-LR の蓄積が要因の 1 つである可能性が本研究で示された。アイガモは MC に対する感受性が高いと考えられる鳥類であり、表面の浮遊物を摂食しやすいという食性をもつために、発生した有毒藍藻のブルームを選択的に摂取し、高濃度の MC 曝露を受けたと考えられる。また、琵琶湖の *Microcystis* は高い MC 産生性をもつため、有毒藍藻ブルームが表層に集積しブルームを形成すれば、このような曝露を受けた可能性がある。一方で、鳥類に対する MC を含めた cyanotoxin の毒性や蓄積に関する知見は少ない。加えて、斃死した鳥類遺骸から cyanotoxin 蓄積量を示した報告は更に少なく、本研究で測定された MC-LR 含有量がアイガモを斃死させることに十分であったかを評価するには情報が不足していた。また、神経系の症状であると考えられる頸垂れ症の要因として、本研究ではボツリヌス菌に対する影響が否定された。そのため、藍藻が産生する anatoxin-a などの神経毒もしくは肝不全や循環器系の障害に関連して神経系の症状を示すことがある MC が関与していた可能性がある (渡辺ら 1994)。しかしながら、本研究では神経性の cyanotoxin の分析を実施していないことや MC の鳥類に対する毒性発現が哺乳類と異なる可能性が指摘されていること (Takahashi & Kaya 1993) から、この症状に対する原因を特定することは困難と考えられる。したがって、高い MC-LR の蓄積がアイガモ斃死の直接的な原因であったという仮説の証明には、鳥類に対する MC-LR の影響を明らかとする更なる研究が必要となると考えられる。

本研究を行うに際して、この事件を滋賀県立大学環境科学部環境生態学科 准教授浜端悦治先生に教えて頂いた。調査においては、琵琶湖環境科学研究センターに所

属する方々に多大なご協力を頂いた。また、鳥インフルエンザの試験においては滋賀県家畜保健衛生所で行って頂いた。この場を借りて、深い感謝の意を表する。

摘 要

2007 年の 8 月から 9 月に琵琶湖北湖に位置する磯漁港で飼育していたアイガモ 30 羽のうち 22 羽が斃死亡した。鳥類斃死の要因として鳥ボツリヌス症も検討したが、ボツリヌス毒素の急性毒性は確認できなかった。磯漁港の水試料から MC-RR, LR が確認され、アイガモ肝臓組織から 560 ng g^{-1} DW (178 ng g^{-1} FW) という高濃度の MC-LR が検出された。MC-LR は藍藻毒素の中でも特に毒性が高く、肝臓組織含有量は先行研究と比較して高いことから、アイガモの斃死に藍藻毒素 MC-LR の高濃度の蓄積が関わっていたことが推察された。本研究は日本において斃死した水鳥遺骸から藍藻毒素 MC の蓄積量を示した最初の研究である。

引用文献

- Chen J, Zhang D, Xie P, Wang Q & Ma Z (2009) Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Sci Total Environ* 407: 3317–3322.
- Davis TW, Berry DL, Boyer GL & Gobler CJ (2009) The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8: 715–725.
- Francis G (1878) Poisonous Australian lake. *Nature* (London) 18: 11–12.
- 林 賢一 (1992) 琵琶湖周辺におけるボツリヌス菌に関する生態学的研究。広島大学博士論文。
- Ishikawa K, Kumagai M, Vincent WF, Tsujimura S & Nakahara H (2002) Transport and accumulation of bloom-forming cyanobacteria in a large, mid-latitude lake: the gyre-*Microcystis* hypothesis. *Limnology* 3: 87–96.
- 石川可奈子・辻村茂男・中原紘之・熊谷道夫 (2003) アオコの空間的分布と集積特性—琵琶湖南湖北山田漁港での調査事例—。 *陸水学雑誌* 64: 171–183.
- Kameyama K, Sugiura N, Isoda H, Inamori Y & Maekawa T (2002) Effect of nitrate and phosphate concentration on production of microcystins by *Microcystis viridis* NIES 102. *Aquat Ecosys Health Manag* 5: 443–449.
- Karlsson KM, Spoof LEM & Meriluoto JAO (2005) Quantitative LC-ESI-MS analyses of microcystins and nodularin-R in animal tissue—matrix effects and method validation. *Environ Toxicol* 20: 381–389.
- Komárek J & Anagnostidis K (1998) *Cyanoprokaryota 1. Teil/Part I: Chroococcales*. Spektrum Akademischer Verlag, Germany.
- Kondo F, Ikai Y, Oka H, Okumura M, Ishikawa N, Harada K,

- Matsuura K, Murata H & Suzuki M (1992) Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem Res Toxicol* 5: 591–596.
- Krienitz L, Ballot A, Casper P, Codd GA, Kotut K, Metcalf JS, Morrison LF, Pflugmacher S & Wiegand C (2005) Contribution of toxic cyanobacteria to massive deaths of Lesser Flamingos at saline-alkaline lakes of Kenya. *Verh Internat Verein Limnol* 29: 783–786.
- Krienitz L, Ballot A, Kotut K, Wiegand C, Pütz S, Metcalf JS, Codd GA & Pflugmacher S (2003) Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiol Ecol* 43: 141–148.
- Kumagai M & Robarts R (1996) Biwako transport experiment'93. *Jpn J Limnol* 57: 367–558.
- Long BM, Jones GJ & Orr PT (2001) Cellular Microcystin Content in N-Limited *Microcystis aeruginosa* Can Be Predicted from Growth Rate. *Appl Environ Microbiol* 67: 278–283.
- Matsunaga H, Harada KI, Senma M, Ito Y, Yasuda N, Ushida S & Kimura Y (1999) Possible Cause of Unnatural Mass Death of Wild Birds in a Pond in Nishinomiya, Japan: Sudden Appearance of Toxic Cyanobacteria. *Nat Toxins* 7: 81–84.
- Metcalf JS, Morrison LF, Krienitz L, Ballot A, Krause E, Kotut K, Pütz S, Wiegand C, Pflugmacher S & Codd GA (2006) Analysis of the cyanotoxins anatoxin-a and microcystins in Lesser Flamingo feathers. *Toxicol Environ Chem* 88: 159–167.
- Murphy T, Irvine K, Quo J, Davies J, Murkin H, Charlton M & Watson SB (2003) New microcystin concerns in the Lower Great Lakes. *Water Qual Res J Can* 38: 127–140.
- Murphy T, Lawson A, Nalewajko C, Murkin H, Ross L, Oguma K & McIntyre T (2000) Algal Toxins - Initiators of Avian Botulism? *Environ Toxicol* 15: 558–567.
- 農林水産省 (2007) 2007 年に発生した高病原性鳥インフルエンザの感染経路について. 農林水産省. (オンライン) <http://www.maff.go.jp/syouan/douei/tori/pdf/report2007.pdf>, 参照 2013-04-01.
- 農林水産省 (2013) 病性鑑定マニュアル 第3版 鶏ボツリヌス症. 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所. (オンライン) http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_byosei-kantei/chicken-diseases/chi-botulinus.html, 参照 2013-04-01.
- Orr PT & Jones GJ (1998) Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol Oceanogr* 43: 1604–1614.
- Ozawa K, Fujioka H, Muranaka M, Yokoyama A, Katagami Y, Honma T, Ishikawa K, Tsujimura S, Kumagai M, Watanabe MF & Park H-D (2005) Spatial distribution and temporal variation of *Microcystis* species composition and microcystin concentration in Lake Biwa. *Environ Toxicol* 20: 270–276.
- Park H-D, Namikoshi M, Brittain SM, Carmichael WW & Murphy T (2001) [D-Leu¹] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. *Toxicon* 39: 855–862.
- Reichwaldt ES & Ghadouani A (2012) Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: between simplistic scenarios and complex dynamics. *Water Research* 46: 1372–1393.
- Reynolds CS, Jaworski GHM, Cmiech HA & Leedale GF (1981) On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin. *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol Sci* 293: 419–477.
- Rocke TE & Friend M (1999) Chapter 38 Avian Botulism. In: Friend M & Franson JC (eds) *Field Manual of Wildlife Disease—General Field Procedures and Diseases of Birds*: 271–282. US Geological Survey, Washington D.C.
- 坂口玄二 (1981) ボツリヌス菌. 坂崎利一 (編) 食中毒: 358–408. 中央法規. 東京.
- 坂井千三・伊藤 武・岡沢久美子・善養寺 浩・辺野喜正夫 (1975) 東京都内の中川流域で発生したカモのボツリヌス中毒に関する疫学的ならびに細菌学的検討. 東京衛生研報: 14–19.
- 佐野友春 (2012) 第1章 第2節 3-1 ラン藻の毒素 (ミクロシスチン, ノジュラリン). 渡邊 信 (編) 藻類ハンドブック: 243–250. エヌ・ティー・エス, 東京.
- 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター (2007a) 植物プランクトン調査結果. 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター. (オンライン) <http://www.lberi.jp/asp/bkcc/plankton/bkccPlanktonKekkaJoken.asp>, 参照 2013-04-01.
- 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター (2007b) アオコ調査結果. 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター. (オンライン) <http://www.lberi.jp/asp/bkcc/Aoko/bkccAokoKekkaJoken.asp>, 参照 2013-04-01.
- Sipiä VO, Karlsson KM, Meriluoto JAO & Kankaanpää, HT (2004) Eiders (*Somateria mollissima*) obtain nodularin, a cyanobacterial hepatotoxin, in Baltic Sea food web. *Environ Toxicol Chem* 23: 1256–1260.
- Sipiä VO, Neffling MR, Metcalf JS, Nybom SMK, Meriluoto JAO & Codd GA (2008) Nodularin in feathers and liver of eiders (*Somateria mollissima*) caught from the western Gulf of Finland in June–September 2005. *Harmful Algae* 7: 99–105.
- Sipiä V, Sjövall O, Valtonen T, Bamaby DL, Codd GA, Metcalf JS, Kilpi M, Mustonen O & Meriluoto J (2006) Analysis of nodularin-R in eider (*Somateria mollissima*), roach (*Rutilus rutilus* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) liver and muscle samples from the western Gulf of Finland, northern Baltic Sea. *Environ Toxicol Chem* 25: 2834–2839.
- Skovska S, Hilscherova K, Babica P, Adamovsky O, Bandouchova H, Horakova J, Knotkova Z, Marsalek B, Paskova V & Pikula J (2007) Effects of cyanobacterial biomass on the Japanese quail. *Toxicon* 49: 793–803.
- Takahashi S & Kaya K (1993) Quail spleen is enlarged by microcystin RR as a blue-green algal hepatotoxin. *Nat Toxins* 1: 283–285.
- Tsujimura S, Tsukada H, Nakahara H, Nakajima T & Nishino M (2000) Seasonal variations of *Microcystis* populations in sediments of Lake Biwa, Japan. *Hydrobiologia* 434: 183–192.

- Vareshi E (1978) The ecology of Lake Nakuru (Kenya): I Abundance and feeding of the Lesser Flamingo. *Oecologia* 32: 11–35.
- Vézic C, Rapala J, Vaitomaa J, Seitsonen J & Sivonen K (2002) Effect of nitrogen and phosphorus on growth of Toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microb Ecol* 43: 443–454.
- 渡辺真利代・原田健一・藤木博太 (1994) アオコ その出現と毒素. 東京大学出版会, 東京.
- Watanabe MF, Park HD & Nakajima T (2000) Composition of *Microcystis* and microcystins in Lake Biwa. *Verh Internat Verein Limnol* 27: 2899–2903.
- 渡邊眞之 (2007) 日本アオコ大図鑑. 誠文堂新光社. 東京.
- WHO (2011) Guidelines for drinking water quality, fourth edition: 344–346.
- Xie LQ & Park HD (2007) Determination of microcystins in fish tissues using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction. *Aquaculture* 271: 530–536.
- 山梨県 (2002) アイガモの試料供与方法の違いが³発育性及び飼料費に及ぼす影響. 山梨県. (オンライン) <http://www.pref.yamanashi.jp/chikushi/documents/14-aigamo.pdf>, 参照 2013-04-01.
- Yoshida M, Yoshida T, Takashima Y, Hosoda N & Hiroishi S (2007) Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiol Lett* 266: 49–53.