研究論文

タイワンシジミが生息する河川における 大腸菌指標の有効性

廣谷博史*

要 旨

外来種の二枚貝であるタイワンシジミ (*Corbicula fluminea*) が近年生息圏を広げている。二枚貝はろ過摂食を行う懸濁物食者であるため、植物プランクトンをはじめ、細菌やウイルスを取り込み消化または体内に蓄積すると考えられる。そこで、タイワンシジミを大和川水系から採取し、河川水の糞便汚染指標である大腸菌と水系感染をおこすウイルスのモデルとしてバクテリオファージ MS2 をそれぞれ除去することが可能であるかを調べた。その結果、タイワンシジミは、水中ならびに砂間隙水の大腸菌は除去することができたが、MS2 は除去できなかった。この違いは細菌細胞とバクテリオファージ粒子の大きさに原因があると考えられた。以上のことから、タイワンシジミによって環境中の指標細菌の計数値を減少させることが可能であり、病原細菌は同時に除去されることが期待できるが、ウイルスについては除去されない場合があることが明らかとなった。その場合は細菌指標の有効性が低下することに留意しなくてはならない。

キーワード：二枚貝、指標細菌、外来種、大和川、水系感染

1. はじめに

1990年代初めより進められてきた多自然（型）川づくりを基本構想とした河川整備は、もはや当たり前のこととなり、各地で河川が本来有している多様な河川環境の保全あるいは創出が行われている。そのため河川は瀬や淵からなる多様な流れを形成し、土砂が川岸や河床に堆積するように計画され¹⁾、さまざまな生物の生息環境を確保できるようになった。

しかし、生物の環境は完全に復元できるものではなく、復元されたニッチに旧来と同一の生物種が回帰するという保証はない。その原因のひとつには外来生物の侵入をあげることができる。わが国の淡水域には、マシジミ (*Corbicula leana*) が広く分布していたが、1980年代の後半から外来の二枚貝の生息が観察されるようになり²⁾、現在では各地でタイワンシジミ (*C. fluminea*) の生息が認められている³⁻⁶⁾。わが国では他にセタシジミ (*C. sandai*)、ヤマトシジミ (*C.*

japonica) の生息がもともと認められていたが⁷⁾、前者は琵琶湖及び流出河川の固有種であり、後者は汽水域に生息する。今後、特に都市域の河川では、中州など砂地の出現により国外移入種であるタイワンシジミが定着し、マシジミと入れ替わってしまうことが懸念されている^{3, 8)}。新たに構築された多自然河川では、レッドリスト⁹⁾に掲載されているマシジミが回復するよりもタイワンシジミが生息域を拡大する可能性が考えられる。本研究で試料を採取した大和川水系において、2003年の報告ではタイワンシジミは認められていない³⁾が、2007年には生息が報告⁸⁾されている。

マシジミとタイワンシジミとは非常に似通っており、そもそも種としての独立性についても疑問が持たれているものの、貝殻形態で一応の区別は可能である^{8, 9)}。両者の殻表面の色や色斑の有無は水質など生息環境の影響を受けるため、外見からは両者の区別をつけるのは困難である。しかし、殻内面については、マシジミでは周縁部が紫で中心が白くなるのに対して、タイワ

* 大阪教育大学教育学部 Hiroshi HIROTANI

2010年4月28日受付
2010年6月28日受理

ンシジミでは紫または乳白色の単色となっている¹⁰⁾。

二枚貝はろ過摂食を行う懸濁物食者¹¹⁾とされ、その高いろ過能力によって、汽水域または沿岸域の植物プランクトンを除去する働きが注目されてきた¹²⁻¹⁵⁾。また、周囲のウイルスを取り込み中腸腺に蓄積することが知られる¹⁶⁾。近年では淡水域の植物プランクトンを除去して水質を改善する試みも行われている¹⁷⁾が、流水環境における細菌やウイルスの取り込みについて研究が行われた例は筆者の知る限りない。

新たな外来種が生息域を拡大した際には、その影響についてさまざまな角度から検証を行うことが望ましい。タイワンシジミが新たに構築された河川環境で生息域を拡大した場合に、どのような影響を持つものか、中州などに定着したことを想定し、水質の糞便汚染指標である大腸菌やウイルスに与える影響について検討を行った。

2. 材料と方法

2.1 タイワンシジミの採取

タイワンシジミは、大阪府柏原市にて大和川右岸から分流する平野川から採取した。厳密な分類を行えば、採取した貝にマシジミが含まれていた可能性もあるが、両者のろ過能力には大きな違いはないと考え、形態的な同定に基づき全てをタイワンシジミとして扱った。分流後およそ100mの地点の河床に堆積した砂を直接採取し、その中に生息するタイワンシジミを採取した。採取したタイワンシジミは、底に砂を敷いた8Lポリバケツに河川水を入れ、60L/hの通気を行い室温で飼育した。2～3日ごとに、半量の水を学内の人工池の水と入れ替えた。

採取したタイワンシジミの殻長の平均と標準偏差は 20.8 ± 5.1 mmであった。この中で、おおむね殻長のそろった個体を選別し、実験に用いた。

2.2 大腸菌及びバクテリオファージの測定

大腸菌 ATCC15597株は、Tryptic soy broth (TSB, Difco) にて37℃で一晩培養をしたものを1/10倍 TSBで適宜希釈し用いた。大腸菌密度は、コロニー数と濁度(660nm)との関係をあらかじめ調べておいた上で、試料水の濁度を測定し求めた。

バクテリオファージ MS2はあらかじめ作成したストック溶液を適宜希釈して用いた。MS2の力価は、大腸菌 ATCC15597を宿主とした重層寒天法により形成されたプラーク数から求めた。

2.3 水中の微生物の除去

タイワンシジミが水中の大腸菌を除去するか否かを調べるために、滅菌した100mL ビーカーに大腸菌希釈液とタイワンシジミ 3 個体を入れて10, 20, または27℃に保ち、0, 6, 12, 18時間後の大腸菌数を調べた。温度により大腸菌の増殖が認められたので、タイワンシジミを入れない対照区との割合から除去率を求めた。大腸菌の初期濃度は 4.6×10^7 個/mLであり、対照区においては18時間で最大 1.4×10^8 個/mLまで増加した。

MS2についても同様の実験を行いタイワンシジミによる経時的な除去率を求めたが、実験は20℃のみで行った。ファージの初期濃度は 2.5×10^5 pfu/mLであり対照区においては大きな変動は認められなかった。また、MS2の除去に対する凝集剤の影響を調べるため、 $Al_2(SO_4)_3$ を4 mg/L となるよう添加した実験区を設けた。溶液は炭酸ナトリウムで中和して使用した。

2.4 微生物除去への砂の影響

砂の存在がタイワンシジミによる水中の微生物除去に影響を持つか否かを調べるため、100mL ビーカーに砂40 gを大腸菌希釈液とともに入れ、20℃で静置し、0, 6, 12, 18時間後の大腸菌除去量を調べた。MS2については、0, 18時間後の除去量を調べた。用いた砂は、大和川国豊橋の下に堆積したものを採取したもので、ふるいにより粒径を0.06～2 mmに揃えた後、洗浄、滅菌を行った。

2.5 砂を通過する水中の微生物除去

水が砂を通過する際に大腸菌を除去するかどうかを調べた。内径8 cmのブフナー型漏斗の目皿を外したものに砂105 gを入れ、タイワンシジミを3 個体埋めた。そこに大腸菌希釈液30mLを入れ、流出量を調節して1時間かけて自然流下させた。さらに、同じ流速で滅菌水を150mL 通過させた。流出した試料水は全て回収しその中の大腸菌数を調べた。対照としてタイワンシジミを入れずに同様の操作をした。実験は20℃で行った。

同じ条件でMS2の除去が行われるかどうかについても調べた。

3. 結 果

3.1 水温と大腸菌除去の関係

タイワンシジミが水中の大腸菌を除去することが可能かどうか、またその際の水温との関係について調べた(図1)。各処理時間においてタイワンシジミを入

図1 タイワンシジミによる大腸菌除去と水温の関係

れない対照区 (C_t) に対する実験区の大腸菌密度 (N_t) の割合の対数を除去率として調べたところ、10℃と20℃においては、18時間にわたり時間とともにタイワンシジミの存在によって水中の大腸菌の割合が減少した。除去率は20℃のほうが高かった。27℃では当初6時間までは、除去率が高かったがその後除去率は減少に転じた。このことより、タイワンシジミの存在により水中の大腸菌が除去されることが確認された。最終的な除去率は20℃が最も高かったので、以降の実験は20℃で行うことにした。

次に、タイワンシジミが水中のバクテリオファージを除去することが可能かどうかを調べた (図2)。当初には幾分の減少が認められたが、最終的にはタイワンシジミの存在によるバクテリオファージの除去は認められなかった。凝集剤を添加して実験を行ったところ、無添加の場合に比べ除去率が上昇した。タイワンシジミは懸濁物をろ過摂食する際に微生物をろ過し除去すると考えられる。凝集剤添加により除去率が上昇したことから、MS2の粒径ではタイワンシジミによるろ過が生じにくいと考えられた。

3.2 砂存在下の大腸菌除去

タイワンシジミは、通常砂の中に生息し、入水管と出水管を水の中に出して、水を取り込み吐き出す。そこで、砂が存在することにより、タイワンシジミによる大腸菌の除去へどのような影響があるかを調べた (図3)。タイワンシジミが水中に静置された場合に比べ、砂が存在していると除去率は高くなった。しかし、タイワンシジミを入れず、砂のみが存在していた場合も大腸菌は減少した。この実験ではタイワンシジミは必ずしも砂に潜った状態にはならなかった。結局、砂

図2 タイワンシジミによる MS2ファージ除去と凝集剤添加の影響

図3 タイワンシジミによる大腸菌除去における砂の影響

図4 タイワンシジミによる MS2除去における砂の影響

が与える影響は不明であった。

3.3 砂存在下のファージ除去

MS2は砂やタイワンシジミの有無にかかわらず、減少は全く認められなかった (図4)。MS2は砂に吸着されることもなく、砂に含まれる夾雑物により凝集されることもなかったと考えられた。本実験のウイルス

の初期濃度は環境中の濃度よりも高いと考えられ、低濃度ではある程度の除去が生じたとしても、高濃度では吸着座が飽和し、砂粒子表面への吸着による除去率が算出できなかった可能性もある。

3.4 砂を通過する大腸菌、ファージの除去

砂を底部に敷き静置した水の微生物を浄化させる代わりに、微生物を含む水を砂層に浸透させ、通過後の大腸菌または MS2 の増減率を調べた (表)。大腸菌希釈水を、タイワンシジミを含まない砂のみの層を通過させた際に大腸菌数はやや増加した。しかし、これは誤差の範囲と考えられ、実際には砂への大腸菌への吸着はおきなかったと考えるのが妥当であろう。砂層中にタイワンシジミを入れ同様の操作を行うと、通過前に比べ 85% ($-0.81 \log$) の減少が認められ、大腸菌がタイワンシジミにより除去されたと考えられた。

MS2 については、タイワンシジミの有無にかかわらず、砂層へ流入させたウイルス粒子数と流出した粒子数に大きな違いは認められなかった。

4. 考 察

タイワンシジミは水中の大腸菌を浄化し、その浄化力は 20℃ のときに高く、低温 (10℃) でも高温 (27℃) でも低下した。二枚貝のろ過量の極大を示す水温は種によって異なり 20℃ から 32.5℃ まで分布する¹⁵⁾ ことから、タイワンシジミのろ過量が極大を示すのは 20℃ 近傍であることが推定された。二枚貝類の流入管から吸収された水は、えら器官で酸素が吸収されるのと同時に、えさとなる固形物が物理的にろ過されて、その後排出管から外部に排出される。この過程で固形物が取り除かれることを応用し、有機汚濁の浄化への利用が考えられている^{11-14, 17)}。本研究において大腸菌が除去されたことも同様の機構が働いていたと考えられる。

タイワンシジミによる大腸菌の除去効率を、報告されている二枚貝のろ過水量 0.25 L/個体/日 (15℃)¹⁸⁾ から推定すると、低めに見積もって 40% の細菌がろ過

により除去されることになる。アサリによる渦鞭毛藻の除去効率を既報のデータ¹⁹⁾ から推定すると 52% となり、条件が異なることを考慮する必要があるものの、大型の植物プランクトンに比べ細菌の除去効率がやや低めとなることを示唆している。このことは、二枚貝の食餌への寄与のほとんどがケイソウを主とする大型の植物プランクトンが占め²⁰⁾、細菌類の寄与は非常に低いことと関係があると推定される。実際、細菌よりもさらに粒径が小さいバクテリオファージ MS2 においては、凝集剤を添加しない限りタイワンシジミによる除去がほとんど認められなかった。

沿岸域で生育したカキを通じてウイルスがヒトへ感染することが懸念されている¹⁶⁾。沿岸域の海水にはプランクトンをはじめさまざまな懸濁物質が存在するため、よりサイズの大きい懸濁物質に付着し取り込まれたウイルスが濃縮されることができると考えることができる。あるいは、凝集剤の添加により割合としては少ないもののファージ除去が認められたことから考えると、環境中に存在する荷電を帯びた物質によりウイルスが凝集することがあるのかもしれない。

底部に砂が存在した際には、タイワンシジミが存在しなくても上部水相の大腸菌数が減少した。この原因としては、水相が攪拌される要因がなかったため大腸菌が水相周縁部に局在していたことか、底部の砂質に緩やかに吸着していたため試料採取を行った水相中央部の大腸菌密度が下がっていたことなどが考えられる。実際、ブフナー型漏斗に砂を充填し、砂中に水を通させた場合には砂による大腸菌の減少は認められなかった。

水層に直置きしたヤマトシジミよりも、底質中に潜っていたものの方が高い濾水率を示すことが報告されている²¹⁾。本研究にて行った砂を底部に敷いた実験ではタイワンシジミは砂に潜らず砂の上で生息することが多く観察された。砂が底部に存在したほうが大腸菌の除去量が増加した理由として、砂の除去量とタイ

表 砂またはタイワンシジミによる浸透水からの大腸菌または MS2 の除去

	処理条件	流入 (総菌数または粒子数)	流出 (総菌数または粒子数)	増減率 ($\log$ 流出数/流入数)
大腸菌	砂のみ	1.25×10^9	1.66×10^9	0.13
	砂とタイワンシジミ		1.92×10^8	-0.81
MS2	砂のみ	1.13×10^7	1.10×10^7	-0.01
	砂とタイワンシジミ		1.10×10^7	-0.01

ワンシジミの除去量が単に合計されたか、砂によりタイワンシジミの生理状態が変化したか、あるいは砂に含まれる成分により大腸菌が凝集したかなどいくつかの原因の可能性があるが、いずれかであるかは不明である。

ブフナー型漏斗に砂とタイワンシジミを入れ、大腸菌を通過させた場合には、相当量の大腸菌が除去された。この実験では時間が短いこともあり、タイワンシジミは砂に潜って存在した。河床に堆積した砂質の中で生息しているタイワンシジミのそばを伏流した河川水が通過する際には、河川水に存在する大腸菌の減少が期待される。しかし、タイワンシジミが存在しない砂だけの状態では、大腸菌は除去されず流下してしまうと考えられる。

MS2は、砂だけでも、またタイワンシジミの存在によっても除去されなかった。MS2は粒径が $27\text{nm}^{22)}$ とウイルスのなかでも小さい部類に入るので、病原ウイルスのモデルとしては、タイワンシジミのろ過によっては除去が困難な部類に入ると思われる。しかし、たとえばノロウイルスの粒径は $30\text{nm}^{22)}$ であるように、問題とされる病原性ウイルスの中にもほぼ同等な粒径を持つものが存在し、それらがタイワンシジミによっては十分に除去されないこともあり得る。

本研究の結果については2通りの観点からとらえることができる。すなわち、タイワンシジミを大腸菌および病原微生物の除去に利用可能であるかという点と、大腸菌が除去された場合に大腸菌が水質指標として意味を持つかという点である。水浴場水質判定基準²³⁾の衛生的な項目として、わが国では糞便性大腸菌群が採用されている。糞便性大腸菌群は、高温により大腸菌の選択性を高めることにより、自然界に存在する細菌によって生じる偽陽性を大腸菌群より減少させたものである。そのため、タイワンシジミが生息することにより大腸菌が減少するのであれば、糞便性大腸菌群の計数値も減少すると考えられ、その結果、より水浴に適した区分として当該の水浴場の水質は判定されることになる。

タイワンシジミは、外来生物法により飼育や野外に放つことが規制される特定外来生物には指定されていないものの、要注意外来生物リスト²⁴⁾に「被害に係る知見が不足しており、引き続き情報の集積に努める外来生物」として掲載されている。むやみに個体数を増加させることは望ましいとはいえないが、河床への

砂質の堆積などが生じた場合には固有種のマシジミの代わりに出現するタイワンシジミによって糞便性大腸菌群数が低下し、より水浴に適した水質となることが期待できる。このとき、指標細菌と大きさの似通った病原細菌も除去されれば、タイワンシジミによって水質は向上したといえることができる。マシジミが優占する環境を作り出すことができればそれに越したことはないが、その場合でも両者は非常に近縁の種であるので同様の効果が期待できる。

一方、糞便性大腸菌群もしくは大腸菌がタイワンシジミによって減少したとしても、必ずしもそのことが水質の向上を意味しない場合がある。環境中でウイルスが凝集するか他の物質に吸着して存在していない限り、タイワンシジミによって細菌指標が除去されてもウイルスは除去されずに残存することになる。この場合、病原性を持つウイルスの水系感染リスクには変化がなくても、水浴により適していると判定されてしまう可能性がある。このように、細菌指標が汚染と整合しない場合もあることは、水に親しむ河川空間を創造する上で留意しておくべき点である。これは、指標として糞便性大腸菌群の代わりに大腸菌が利用²⁵⁾されるようになったとしても同じことである。ウイルスを問題とする際にはバクテリオファージを利用した指標などが望まれる。

河川環境の保全活動により、野生生物の新たな生息環境が創設される。しかし、その環境には必ずしもわが国固有の生物種が復活するとは限らず、代わりに外来生物種が出現し定着する可能性がある。外来生物を極力排除することは、生物の多様性を保つための有力な方策のひとつであるかもしれない。しかし、より環境への適応力が高い外来種が増加する現実を前に、それらがどのような環境に対する影響を持ち、ヒトがそれらといかに共生するかという道を模索することも今後必要であると考えられる。

5. ま と め

タイワンシジミは大腸菌を除去することが確認された。また、タイワンシジミが潜った砂の中を水が通過する状態ではより高い効果が認められた。すなわち、河床に堆積した砂の中にタイワンシジミが出現した場合には、河川水の大腸菌を減少させ低い指標値を示す可能性がある。しかし、タイワンシジミは粒子径の小さいウイルスは除去しないので、細菌指標値が減少し

たからといっても、ウイルスの水系感染リスクが減少するわけではない点に注意が必要である。

謝辞：タイワンシジミの採取、同定、飼育に際しご助言をいただきました大阪教育大学 近藤高貴氏に感謝いたします。実験に精力的に取り組んだ大阪教育大学卒業生 矢敷香織、吉井稔智両氏に謝意を表します。

文 献

- 1) 吉川勝英；従来の多自然型川づくりを越えて，学芸出版社，2007.
- 2) 増田修，波部忠重；岡山県倉敷市にすみついたカネツケシジミ，ちりばたん，**19**，39-40，1988.
- 3) 石橋亮，古丸明；琵琶湖淀川水系，大和川水系におけるタイワンシジミの出現状況，VENUS，**62**，65-70，2003.
- 4) 園原哲司；相模川水系におけるタイワンシジミの侵入状況とシジミ亜科分類の変遷，Actinia，**16**，11-19，2005.
- 5) 石綿進一，守屋博文，齋藤和久；外来の河川底生動物，丹沢大山総合調査学術報告書，340-343，2007.
- 6) 玉井直樹，新井範子，稲本安恵，柴部佳子，柴田洋，家山博史；淡水産二枚貝マシジミ属 *Corbicula* の教材化，愛媛大学教育学部紀要，**55**，97-103，2008.
- 7) 波部忠重，斧足類，上野益三編『日本淡水生物学』，331-342，図鑑の北隆館，1973.
- 8) 大阪市立自然史博物館；大和川の自然，東海大学出版会，59-108，2007.
- 9) 近藤高貴；“淡水産貝類のレッドリスト”，大阪教育大学，(オンライン)，入手先〈<http://www.osaka-kyoiku.ac.jp/~kondo/redlist.html>〉，(参照2010.04.06).
- 10) 園原哲司，吉田直史；相模川水系におけるタイワンシジミの出現状況と神奈川県内のマシジミの生息状況，神奈川自然誌資料，**26**，103-108，2005.
- 11) 山口啓子，幸内綾子，藤岡克己；ヤマトシジミへの給餌と軟体部増加に関する実験，LAGUNA，**15**，49-55，2008.
- 12) 中田喜一郎，畑恭子；沿岸干潟における浄化機能の評価，水環境学会誌，**17**，158-166，1994.
- 13) 木村賢史，土屋隆夫，稲森悠平，奥富重幸，西村修，須藤隆一；東京都内湾における付着動物の分布と水質浄化機能，水環境学会誌，**21**，35-40，1998.
- 14) 相崎守弘，福地美和；ヤマトシジミを用いた汽水性汚濁水域の浄化，用水と廃水，**40**，894-898，1998.
- 15) 磯野良介，中村義治；二枚貝による海水濾過量の推定とそれによぼす温度影響の種間比較，水環境学会誌，**23**，683-689，2000.
- 16) 佐野大輔，植木洋，渡部徹；水中病原ウイルスによる水環境汚染の実態，モダンメディア，**52**，115-124，2006.
- 17) 田中仁志，金主鉉，鈴木章，星崎寛人，渡辺真利代，渡邊定元；既存生態系を活用したバイオマニピュレーション手法による汚濁湖沼の水質改善に関する研究，埼玉県環境科学国際センター報，**5**，128-134，2004.
- 18) 東怜；セタシジミの汙過水量，摂餌量および消化率について，滋賀大学紀要，**15**，79-83，1965.
- 19) 田中秀典，大塚泰介；アサリ (*Ruditapes philippinarum* (A. Adams et Reeve)) による赤潮 (*Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller) の除去について，LAGUNA，**7**，77-79，2000.
- 20) 森淳；安定同位体を用いたマツカサガイの食性の解析，平成21年度農業農村工学会大会講演会概要集，117，2009.
- 21) 相崎守弘，森岡美津子，木幡邦夫；ヤマトシジミを利用した汽水域の水質浄化に関する基礎的研究，用水と廃水，**40**，142-147，1998.
- 22) 今西二郎；看護微生物学第3版，医師薬出版，96-126，2010.
- 23) 環境省；“水浴場水質判定基準”，(オンライン)，入手先〈http://www.env.go.jp/press/file_view.php?serial=4745&hou_id=4223〉，(参照2010.04.06).
- 24) 環境省；“要注意外来生物リスト：無脊椎動物（一覧）”，(オンライン)，入手先〈http://www.env.go.jp/nature/intro/loutline/caution/list_mu.html#10〉，(参照2010.04.06).
- 25) 廣谷博史；河川の糞便汚染指標に対する河床環境の影響，平成18年度河川整備基金助成事業報告書，1-25，2007.

Effectiveness of *Escherichia coli* as an Indicator in the Mitigation of Contaminated Urban Waterways by Asian Clam (*Corbicula fluminea*)

Hiroshi HIROTANI*

* Osaka Kyoiku University, Department of Arts and Sciences

ABSTRACT

An exotic freshwater clam, the Asian clam (*Corbicula fluminea*), native to Southeast Asia, has been expanding its habitat in Japan in recent years. Clams are filter-feeders that are known to ingest bacteria and viruses as well as phytoplankton, which will either be digested or accumulated in their bodies. The potential for the Asian clams to remove *Escherichia coli*, a microbial indicator of fecal contamination, and bacteriophage MS2, a model of pathogenic viruses causing waterborne infections, was investigated in the following study. The clams collected from the Yamato River removed *E. coli* in water and in interstitial water between sands, but they were not able to remove MS2. The difference in size of the bacterial cells and bacteriophage particles was deduced to be responsible for the difference in removal. It is suggested that it is possible to decrease indicator counts of *E. coli* using freshwater clams, even though viruses can still remain in the environment.

Key Words : freshwater clam, microbial indicator, exotic species, Yamato River, waterborne infection