シマトビケラ属幼虫のストレス応答物質の 個体サイズによる違いと季節変化

鈴木 準 平^{1),*}

中 野 大 助¹⁾
藤 田 昌 史²⁾

今 村 正 裕¹⁾

Change in Oxidative Stress Biomarkers in Stream Caddisfly, *Hydropsyche* spp., Larvae Depending on Size and Season

Jumpei SUZUKI^{1),*}, Daisuke NAKANO¹⁾, Masahiro IMAMURA¹⁾ and Masafumi FUJITA²⁾

¹⁾ River and Coastal Environment Sector, Central Research Institute of Electric Power Industry, 1646 Abiko, Abiko, Chiba 270-1194, Japan

²⁾ Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Ibaraki University, 4-12-1 Nakanarusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan

Abstract

Extensive marine environment monitoring has been performed using oxidative stress biomarkers. However, progress regarding the use of these biomarkers in river environment monitoring has been insufficient. When applying oxidative stress biomarkers in river aquatic organisms, it is important to take into consideration the natural fluctuation of these markers. In this study, we investigate the effect of body size and seasonal changes on oxidative stress biomarkers in stream caddisfly, *Hydropsyche* spp., which is one of the primary consumers in river ecosystems. Body sizes were classified into 4 classes in accordance with wet weight. Catalase activity, which is a type of antioxidant enzyme, tended to differ depending on the class. Catalase activity and the oxygen radical absorbance capacity had a significant correlation with wet weight. On the other hand, examining the seasonal change for the same size class, the catalase activity, oxygen radical absorbance capacity, and oxidative damage showed different responses. Furthermore, *Hydropsyche* spp. in August, in a survey conducted immediately after a flood, indicated low oxidative damage. *Hydropsyche* spp. was able to adequately remove the reactive oxygen species produced as a result of stress caused by the flood.

Keywords: Body size; Seasonal change; *Hydropsyche*; Oxidative stress

1. はじめに

汚染物質のモニタリングやその影響評価を目的として、ストレスに応答する生物体内物質（ストレスバイオマーカー）を用いた研究が数多く行われている^{1, 2)}。これらの手法は、海域生物への適用事例が多い^{3, 4)}。一方で、河川への適用例は少なく、中でも河川生態系における一次消費者として位置づけられる水生昆虫についての研究は限られており、例えば Sala *et al.* (2016) がシマトビケラ属の1種 (*Hydropsyche exocellata*) を対象に塩化物イオンおよび硫酸イオンに対する応答を調べた研究⁵⁾や Pradhan *et al.* (2016) が携巣型トビケラ (*Allogamus ligonifer*) を対象に銅ナノ粒子に対する応答を調べた研究⁶⁾のほかは、ほとんど研究がなされておらず、情報が不足している。また、自然由来の攪乱が大きな河川環境中⁷⁾において同手法を適用させる場合には、季節変動がストレスバイオマーカーに与える影響を把握することが重要である。

また、生物は、その成長段階によって汚染物質などの環境変動に対する影響の感受性や適応能力に違いが生じることが知られており^{8, 9)}、ストレスバイオマーカーについても、成長段階によってその応答が異なる可能性が高い。例えば、異なる成長段階のゼブラフィッシュに農薬の1種であるジフェノコナゾールを曝露した際に、ストレスバイオマーカーの1つであるカタラーゼ (CAT) や過酸化脂質 (LPO) の応答が異なることが報告されている¹⁰⁾。また、Ahmad *et al.*, (2011) は、異なる年齢の二枚貝 (*Scrobicularia plana*) に対して水銀を曝露した際にも、2年目の個体と比較して、3年目および5年目の個体の方がCAT, LPOが有意に高い値を示すことが報告されている¹¹⁾。同様に河川の水生昆虫においても成長とともに、ストレスバイオマーカーの量が変化すると考える。

そこで本研究では、河川底生生物のうち、日本全国に分布がみられる造網型の水生昆虫であるシマトビケラ属 (*Hydropsyche* spp.) 幼虫を対象として、まず成長段階と

1) 一般財団法人電力中央研究所水環境領域 〒270-1194 千葉県我孫子市我孫子 1646

2) 茨城大学大学院理工学研究科都市システム工学領域 〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

* 連絡先: jumpei@criepi.denken.or.jp

して湿重量に応じて分類したクラスとストレスバイオマーカーとの関係を調べた。そして、異なる時期に（2月，5月，8月，10月）に採取したシマトビケラについて調べることで，ストレスバイオマーカーの季節変化を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1 サンプルの採取

サンプルの採取は，埼玉県北西部の小鹿野町を流れる赤平川（N 36° 0′ 56″，E 139° 0′ 16″）において2016年2月26日，5月25日，8月28日，10月14日に行った。赤平川の流域面積は，流域面積 123.6 km²であり，その土地利用割合は森林が88.7%，耕作地が6.3%，住宅地が2.3%と森林が大部分を占める流域である（国土交通省国土政策局国土情報課 国土数値情報 平成26年土地利用細分メッシュデータ）。赤平川流域の雨量（気象庁アメダスデータ，秩父）および水位（秩父県土整備局，小判沢）の1時間毎の時系列データを Fig. 1 に示す。2016年2月26日，5月25日，10月14日におけるサンプルの採取は，コドラート付きサーバーネットによる定量サンプリング（各箇所での採取面積 = 0.063 m²，9箇所）を行い，生息密

度，現存量およびストレスバイオマーカー用のサンプルとした。ただし，定量サンプリングにて十分な個体数を得ることが出来なかった，10月14日については，定性サンプリングも行い各分析用のサンプルを採取した。サンプリングは，平均流速 $67.2 \pm 20.3 \text{ cm s}^{-1}$ かつ平均水深 $12.3 \pm 2.8 \text{ cm}$ の瀬を対象に行った。8月28日は出水直後であり流量が大きく，定量サンプリングができなかったため，上記の物理条件外となる岸際での定性サンプリングのみによりサンプルを採取した。また，サンプル採取時に，プロベラ式流速計（Kenek VR-301，VR3T-2-20N）および折れ尺を用いて横断的に測定した流速および水深から算出した流量および簡易水質観測装置（Hydrolab MS5）で計測した水質と 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した河川水中の3態窒素濃度（イオンクロマト法）を Table 1 に示す。ただし，2月26日と5月25日については，簡易水質観測装置による測定が行えなかったため，測定日が最も近い2月18日および5月24日の値を示す。

採取したサンプルは，現地にてドライアイスにて即座に凍結して実験室に持ち帰り，分析まで -80 °C で保存した。

Fig. 1 Time course of rainfall at Chichibu and water level at Kobanzawa in Akahira river.

Table 1 Discharge and water quality of Akahira river.

Date	Discharge m ³ s ⁻¹	Water Temperature °C	EC μS cm ⁻¹	DO mg L ⁻¹	Chl.a μg L ⁻¹	NH ₄ mg-N L ⁻¹	NO ₂ mg-N L ⁻¹	NO ₃ mg-N L ⁻¹
2016/2/18 15:20	0.31	5.9	175.4	11.9	ND*	0.0	0.0	8.0
2016/5/24 16:20	0.45	21.4	213	8.6	1.5	0.0	0.0	3.4
2016/8/28 16:20	5.09	19.0	141.1	8.5	1.2	0.0	0.0	6.7
2016/10/14 15:00	1.75	17.0	163.9	9.9	1.1	0.0	0.0	3.1

* ND: No data

2.2 サンプルの処理

採取したサンプルは、吸水ろ紙で体表面の水分を拭き取った後、電子天秤を用いて湿重量を測定した。最も湿重量の小さかった6.6 mgを基準とした6 mg以上から6 mgずつクラス分けを行い、6 mg以上12 mg未満、12 mg以上18 mg未満、18 mg以上24 mg未満、24 mg以上の4つのクラスに分類した。湿重量を測定した後、Pradhan *et al.* (2016)の方法と同様に頭部のみを切除し、体部を分析に使用した⁶⁾。体部は、10 mmol L⁻¹ トリスヒドロキシメチルアミノメタン溶液および1 mmol L⁻¹ EDTAを混合したTEバッファー (pH 8.0) 1 mL中でホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルのうち、200 μ Lは、後述するLPO分析のため、別の容器に移し-80 $^{\circ}$ Cで保存した。残りのホモジナイズサンプルは、遠心分離 (10000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) し、得られた上澄液をタンパク、CAT、総抗酸化力 (ORAC) の分析試料とした。

2.3 ストレスバイオマーカーの評価

以下に、タンパクおよびストレスバイオマーカーであるCAT、ORAC、LPOの分析方法を示した。

2.3.1 タンパク

溶解性タンパクの分析は、Bradford法により行い¹²⁾、10倍希釈した上澄み試料10 μ LにCBB溶液 (ナカライテスク) 190 μ Lを加え、10分間振盪した。その後、25 $^{\circ}$ Cで10分間静置し、マイクロプレートリーダー (TECAN, infinite F200PRO) を用いて測定波長595 nmで吸光度を測定した。標準物質にはウシ血清アルブミン (Wako, ウシ血清由来 脂肪酸/IgG/プロテアーゼ不含 生化学用) を用いた。

2.3.2 カタラーゼ (CAT)

CATは、体内で生成されるH₂O₂をH₂Oに変換する抗酸化酵素の1つである¹³⁾。体内においてH₂O₂自身は、酸化力が強いものの、鉄などの遷移金属の存在化で最も酸化力の強いヒドロキシラジカルに変換され、脂質やタンパクにダメージを与えることが知られている¹⁴⁾。その前段階で酸化物質を抑制するCATは、重要な役割を担う酵素の1つである。CATの分析は、Cohen (1970)を参考に、以下の方法で行った¹³⁾。

25 $^{\circ}$ Cにした100 mM PBS (pH 7.0) 100 μ Lに10倍希釈した上澄み試料10 μ Lを添加し、30 sec振盪した。その後、25 $^{\circ}$ Cに保った過酸化水素水 (75.6 mM) を100 μ L添加後、5 sec振盪し、マイクロプレートリーダーを用いて、25 $^{\circ}$ Cを保ちながら10 sec間隔で2 minにわたり240 nmで吸光度を測定した。標準物質には、ウシ肝臓由来カタラーゼ (Wako, 生化学用) を用いた。

2.3.3 総抗酸化力 (ORAC)

ORACは、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素種 (ROS) が細胞内物質と反応することによって生じた脂質ペルオキシラジカルを含むアルキルペルオキシラジカルを除去する抗酸化物質の総量を測定するものである¹⁵⁾。そのため、ORACは、水生生物の酸化ストレスに対する感受性や還元状態を表す指標とされている¹⁵⁾。ORACは、以下に示す方法で分析した¹⁶⁾。

10倍希釈した上澄み試料10 μ Lに100 mM PBS (pH 7.2) に溶解したフルオレセイン (600 nM) を160 μ L添加し、30 sec振盪した。その後、ラジカル開始剤AAPH (100 mM) を30 μ L添加後、再び30 sec振盪し、マイ

クロプレートリーダーを用いて、37 $^{\circ}$ Cを保ちながら3 min間隔で3 hrにわたり励起波長485 nm、測定波長528 nmで蛍光強度を測定した。標準物質にはトロロックス (Wako, 細胞生物学用) を用いた。

2.3.4 過酸化脂質 (LPO)

LPOは、過剰に生成されたROSによって主に細胞膜に含まれる脂質が酸化されることによって生じる¹⁷⁾。本論文におけるLPOは、過酸化脂質の最終生産物であるマロンジアルデヒドを分析することによって評価した¹⁸⁾。ホモジナイズサンプル100 μ Lにブチルヒドロキシトルエン (90 μ M) を18 μ L、8.1% SDS 45 μ L、チオバビツール酸 (55 μ M) を含むpH 3.5に調整したトリクロロ酢酸 (20% v/v) 溶液を337 μ L添加し、よく混合した。この混合液を、92 $^{\circ}$ Cで30 min保った後、氷冷した。氷冷したサンプルを室温に戻し、ブタノール400 μ Lを添加し、良く混合した後、遠心した (4000 $\times$ g, 10 min)。上澄みについて、マイクロプレートリーダーを用いて、励起波長530 nm、測定波長560 nmで蛍光強度を測定した。標準物質には、1,1,3,3-テトラメトキシプロパン (Wako, 一級) を用いた。

2.4 統計解析

酸化ストレスバイオマーカーであるCAT、ORAC、LPOの分析は、1サンプルにつき2回行い、その平均値を分析結果とした。得られた分析結果は、対数変換したのちTukey-Kramer法により各クラスおよび各採取日時の間の母平均の検定を行った。ただし、10月14日のクラス3については、2サンプルしか採取できなかったため、平均値のみを示し、参考とした。

また、湿重量と各酸化ストレスバイオマーカーとの相関分析は、ピアソンの積率相関分析により行った。このとき、各酸化ストレスバイオマーカーは、全てのサンプルデータの平均値と標準偏差を用いて標準化した値を使用した。ただし、2クラスしか分類出来なかった8月については、相関分析の検討から除外した。

3. 結果・考察

3.1 生息量および個体サイズの季節変化

本研究において、種レベルまでの分類を行わなかったため、採取したシマトビケラ属には、複数種が混在している可能性がある。本研究では、採取したシマトビケラ属全てについてまとめて検討を行った。定量サンプリングによって得られた、各季節の生息密度と湿重量ベースのバイオマスをTable 2に示す。2月や5月において、生息密度および現存量が高いことが示された。また、各月のサンプルについて、湿重量について4分類したクラス毎の個体数をTable 3に示す。2月、5月には、湿重量の小さい個体から大きな個体まで数多く生息していた。一方、8月および10月には小さな個体しか確認されなかった。谷田 (1980) が夏場の日平均水温が18 $^{\circ}$ C以下の山地溪流で調べた研究において、シマトビケラ属のうちウルマーシマトビケラ (*H. tsudai*) やギフシマトビケラ (*H. gifuana*) は、年1世代ないし2世代で構成され、5~6月に羽化期があると報告している¹⁹⁾。また、Mackay (1979) は、シマトビケラ属のうち*H. betteni*, *H. slossonae*, *H. sparna*が多世代になる条件として、夏場の高水温とエサ資源が多いことが影響するとしている²⁰⁾。本研究の

Table 2 Density and biomass (Average $\pm$ SD) of *Hydropsche* spp.

Date	Density	Biomass
	individual m ⁻²	g-wet weight m ⁻²
2016/2/26	197.3 $\pm$ 162.8	3.6 $\pm$ 3.0
2016/5/25	224.0 $\pm$ 315.9	3.4 $\pm$ 4.9
2016/8/28	ND*	ND*
2016/10/14	35.6 $\pm$ 23.7	0.46 $\pm$ 0.30

* ND: No data

Table 3 Number of individuals for analysis in each wet weight class of *Hydropsche* spp.

Class	Wet Weight x (mg)	Number of Individuals			
		Feb. 26	May. 25	Aug. 28	Oct. 14
1	6 $\leq$ x < 12	10	12	14	18
2	12 $\leq$ x < 18	20	32	10	16
3	18 $\leq$ x < 24	13	17	0	2
4	24 $\leq$ x	21	5	0	0

対象とした流域に接する秩父市内を流れる荒川本流の夏場の水温は、24.1 $^{\circ}$ C（水文水質データベース，正喜橋，2016年8月3日）であり，また同日および8月の平均気温はどちらも26.1 $^{\circ}$ C（気象庁，寄居，2016年8月3日）であった。一般に水温は，気温と相関があり，また気温に比べて水温は，数度低いことが知られている^{21, 22)}。また，谷田（1980）が対象とした山地溪流は，河畔林によって河道が覆われているのに対し，本研究の対象とした赤平川は，河道が河畔林によって覆われているところが少ない。河畔林によるカバーがある場合，河畔林によるカバーがない場合と比較して水温が低くなることが報告されている²³⁾。これらのことから，本研究の対象とした赤平川は，谷田（1980）の対象とした山地溪流よりも水温が高いと推察される。したがって，赤平川において採取したシマトビケラ属についても，年1世代ないし年2世代で構成されていると推察され，特に5月のクラス1やクラス2の個体は，春先の産卵から成長した非越冬個体である可能性がある。

Statzner *et al.* (1999) は，シマトビケラ属の1種 (*H. siltalai*) の個体の乾燥重量は湿重量の16%程度であると報告している²⁴⁾。また，谷田（1980）は，最終齢期である5齢幼虫の乾燥重量が *H. tudai* について2.5~8 mg 程度，*H. gifuana* について5~22 mg 程度であることを示している。本研究で用いたクラス3とクラス4の乾燥重量の推定値は，概ねこれらの範囲内に入る。したがって，クラス3やクラス4の個体については，5~6月に羽化して河川から抜け出ており，8月には大きな個体が確認されなかったと考えられる。

3.2 個体サイズとストレスバイオマーカーとの関係

湿重量あたりのタンパク保有量は，8月および10月においてクラス間で有意な差が見られなかった（**Fig. 2 A**）。一方，2月においてクラス1は，クラス2およびクラス3と比較して有意に低く，またクラス4は，クラス3と比較して有意に低かった。また，5月についても，クラ

ス1はクラス3と比較して有意に低かった。淡水の二枚貝について Shetty *et al.* (2013) は，個体サイズによって，重量あたりのタンパク保有量が異なることを示している²⁵⁾。Shetty *et al.* (2013) によると，個体サイズが大きいほど，乾燥重量あたりのタンパク保有量が多い傾向にあるものの，季節によっては中程度の個体の方が大きい個体よりも高いタンパク保有量を持つことも示している。このとき，Shetty *et al.* (2013) は，タンパク保有量に違いが生じた要因として，餌条件の違いや生殖サイクルによる影響があった可能性を指摘している。本研究において対象としたシマトビケラ属についても，季節間の違いにより，個体サイズによってタンパク保有量に違いが生じたのかもしれない。

抗酸化酵素の1つであるCATについては，シマトビケラ属の大きいクラスほど高い傾向を示し（**Fig. 2 B**），2月と5月については湿重量とCATの間に有意な相関が見られた（**Fig. 3**）。酸化ダメージの1つであるLPOは，5月についてのみ大きいクラスほど低い傾向を示した（**Fig. 2 D, Fig. 3**）。ゼブラフィッシュを対象にし，仔魚と成魚の2段階の比較した研究で，Mu *et al.* (2015) は，仔魚と比較して成魚のCATが高く，LPOが低いことを報告している¹⁰⁾。このことから，本研究において対象にしたシマトビケラ属のCATについても，成長することで高い値を示した可能性が考えられる。また，5月について湿重量の小さい個体でLPOが高いが，一方の湿重量の大きな個体については，CATが高いことからROSの発生を抑制することが出来たため，ROSによって生じる酸化ダメージ¹⁴⁾を抑えることが出来たのかもしれない。しかしながら，Guerra *et al.* (2012) がホタテ (*Argopecten ventricosus*) について経時的にCATやLPOを測定した際には，湿重量が高い個体ほどCATとLPOがともに低く，本研究とは異なる傾向を示した²⁶⁾。Guerra *et al.* (2012) の示すCATとLPOは，湿重量当たりの値を示しているため直接的な比較は出来ないものの，生物種の

Fig. 2 Seasonal change in (A) protein content, (B) CAT, (C) ORAC, and (D) LPO in whole soft tissue of *Hydropsyche* spp. Error bars indicate 95% confidential interval. Different letters indicate significant differences between classes within the sampling date (Tukey-Kramer method, $p < 0.05$). Typographical symbols (* and †) indicate significant differences between sampling dates within the class (Tukey-Kramer method, $p < 0.05$).

Fig. 3 Correlations between wet weight and standardized oxidative stress biomarker (CAT, ORAC and LPO) in whole soft tissue of *Hydropsyche* spp. Heights of right angled triangle are the slope of the regression lines. Dark grey triangles indicate positive slope and gray triangles indicate negative value. White triangles with dot lines indicate that there are no significant correlations.

違いによってCATやLPOの応答機構が異なる可能性が示され、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

生物体内の酸化還元状態の指標とされるORAC¹⁵⁾については、シマトビケラ属のクラスによる影響は小さかったが(Fig. 2 C)、2月と10月については、湿重量とORACとの間に有意な相関が見られた(Fig. 3)。Winston *et al.* (2004) は、初期発達段階のグラスシュリンプについて、ORACと類似した原理を用いて分析されるTOSCが、発達段階が高いほど高い傾向があることを示した²⁷⁾。その他の種について成長とORACとの応答を調べた研究はないものの、本研究においても、個体サイズの成長とともに

にORACが高い値を示す可能性が示された。谷田(1980)が示すように、シマトビケラ属のうち、*H. tudai*と比較して*H. gifuana*は、乾燥重量の増加速度や乾燥重量の最大値が高いこと¹⁹⁾を踏まえると、湿重量の差に種の違いが影響していた可能性がある。今後は、種の違いについても考慮することによって、より詳細な個体サイズとストレスバイオマーカーとの関係を明らかにすることが出来るようになる。

Barata *et al.* (2005) は、大型のシマトビケラ属の1種(*H. exocellata*)の水質汚染に対するストレス応答についての研究を行っているが、分析に湿重量31~73 mgの個

体を使用していた¹⁷⁾。このとき、抗酸化物質の1つであるCATやGSTについて、地点間の有意な差異が見られたものの、必ずしも汚染の高い地点において応答していたわけではなかった。本研究で示されるように個体サイズに応じた検討を行うことで、より詳細な汚染の影響を検出出来た可能性がある。

3.3 ストレスバイオマーカーの季節変化

季節変化については、全ての時期で採取が可能だった、クラス1およびクラス2について検討する。タンパク保有量は、両方のクラスにおいて2月および5月が概ね20~30 mg-Protein g⁻¹-Wet Weightであったのに対し、8月および10月が40 mg-Protein g⁻¹-Wet Weight程度と有意に高かった (Fig. 2 A)。Shetty *et al.* (2013) や宮園・中野 (2000) は、二枚貝を用いた検討によって、季節的なエサ資源の変動や生活パターンによってタンパク保有量が異なることを示している^{25, 28)}。また、宮園・中野 (2000) は、ホタテ貝がエサ量の豊富な時期にグリコーゲンやタンパクを貯蓄することを示しており²⁸⁾、加えてエネルギー貯蔵物質の消費の際に、グリコーゲンは早くから消費されるが、タンパクは最終的に利用される物質とされる²⁹⁾。つまり、赤平川においてシマトビケラ属の高いタンパク保有量がみられた8月と10月は、エサ供給が高く、体内に十分なエネルギーを貯蓄することが可能な時期だったかもしれない。

10月においてCATは、両クラスともに非出水期と比較して有意に高い値を示した (Fig. 2 B)。一方、総抗酸化力ORACや酸化ダメージLPOは、クラス1およびクラス2ともに5月においてのみ高い傾向を示した (Fig. 2 C, D)。これは、前述の越冬個体および非越冬個体である違いが影響したのかもしれない。一般に、造網型のトビケラの非越冬個体は、春から夏にかけて急激に成長し、成虫の個体サイズも越冬個体と比較して小さいことが知られている^{19, 30)}。つまり、非越冬個体と越冬個体とでは、生活史サイクルが異なるため、摂食によって得たエネルギーの配分などが異なる可能性がある。例えば、ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) の越冬個体と非越冬個体では、酵素の一つであるカルボキシルエステラーゼの含有量が異なることが報告されている³¹⁾。同様に、越冬個体と非越冬個体や成長速度の違いがORACやLPOの差異に影響した可能性がある。ここで、出水直後の調査であった8月については、どちらのクラスについてもCATが2月および5月と同程度であり、またORACが2月および10月と同程度であった。CATやORACによって十分にROSを抑制出来なかった場合に生じるLPOについても、低い値を示したことから、出水による影響が小さかったと考える。

以上のことから、河川水生昆虫のうちシマトビケラ属は、個体サイズによってストレスバイオマーカーの量に変動すること、またそれが季節によって異なることが示された。また、出水直後でもCATやORACの増加が見られず、LPOも低いことから、シマトビケラ属は、出水によるストレスに対する耐性を有する可能性が示唆された。今後、本研究において重要性が示された流下有機物などのエサ条件や脱皮・羽化などを含めた種ごとの生活史のデータを合わせることで、より詳細なバイオマーカーの挙動を把握することができ、現地において採取した

サンプルに含まれる誤差要因を小さくすることが可能になるものとする。

4. まとめ

本研究では、河川水生昆虫を対象として、個体サイズおよび季節変動が抗酸化ストレスバイオマーカーに与える影響を調べた。得られた知見を以下に示す。

- 1) シマトビケラ属は、概ね湿重量が大きいほど、抗酸化酵素の1つであるCATや生物体内の酸化還元状態の指標とされるORACが高い傾向が示された。また、その関係は季節によって応答が異なることが示された。
- 2) 同じサイズクラスで比較をしたところ、季節的に変化することが示された。出水直後であっても、ダメージの指標であるLPOも低いことから、出水というストレスによって生じたROSを十分に除去する能力を有していたことが示唆された。

謝 辞

本研究は、公益財団法人 河川財団の運営する河川基金の助成(助成番号28-5311-007)を受けたものである。また、水位データに関しては、埼玉県秩父県土整備事務所から提供いただいた。ここに記し、謝意を表する。

(原稿受付 2018年5月28日)

(原稿受理 2018年8月9日)

参 考 文 献

- 1) Regoli, F., Nigro, M., Chiantore, M., Winston, G.W., 2002. Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Science of The Total Environment* 289, 205-211.
- 2) Tsangaris, C., Hatzianestis, I., Catsiki, V.A., Kormas, K.A., Stroglyoudi, E., Neofitou, C., Andral, B., Galgani, F., 2011. Active biomonitoring in Greek coastal waters: Application of the integrated biomarker response index in relation to contaminant levels in caged mussels. *Science of The Total Environment* 412-413, 359-365.
- 3) Cruz, D., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Wrona, F.J., Soares, A.M., Figueira, E., Freitas, R., 2016. Caffeine impacts in the clam *Ruditapes philippinarum*: Alterations on energy reserves, metabolic activity and oxidative stress biomarkers. *Chemosphere* 160, 95-103.
- 4) 池田雄, 町田裕貴, 鈴木準平, 藤田昌史, 2016. 都市下水に対する汽水性二枚貝ヤマトシジミの軟体部と鰓の総抗酸化力の応答. *水環境学会誌* 40(6), 252-260.
- 5) Sala, M., Faria, M., Sarasúa, I., Barata, C., Bonada, N., Brucet, S., Llenas, L., Ponsá, S., Prat, N., Soares, A.M.V.M., Cañedo-Argüelles, M., 2016. Chloride and sulphate toxicity to *Hydropsyche exocellata* (Trichoptera, Hydropsychidae): Exploring intraspecific variation and sub-lethal endpoints. *Science of The Total Environment* 566-567, 1032-1041.
- 6) Pradhan, A., Silva, C.O., Silva, C., Pascoal, C., Cássio, F., 2016. Enzymatic biomarkers can portray nanoCuO-induced oxidative and neuronal stress in freshwater shredders. *Aquatic Toxicology* 180, 227-235.
- 7) Lytle, D.H., Poff, N.L., 2004. Adaptation to natural flow regimes. *Trends in Ecology & Evolution* 19(2), 94-100.
- 8) Mensah, P.K., Muller, W.J., Palmer, C.G., 2011. Acute toxicity of Roundup® herbicide to three life stages of the freshwater shrimp *Caridina nilotica* (Decapoda: Atyidae). *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 36 (14-15), 905-909.
- 9) García, M.E., Rodríguez Capitullo, A., Ferrari, L., 2010.

- Age-related differential sensitivity to cadmium in *Hyaella curvispina* (Amphipoda) and implications in ecotoxicity studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(5), 771-778.
- 10) Mu, X., Chai, T., Wang, K., Zhang, J., Zhu, L., Li, X., Wang, C., 2015. Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio reio*) during different life stages. *Aquatic Toxicology* 160, 57-68.
 - 11) Ahmad, I., Mohmood, I., Miei, C.L., Coelho, J.P., Pacheco, M., Santos, M.A., Duarte, A.C., Pereira, E., 2011. Lipid peroxidation vs. antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury — organ specificities and age effect. *Aquatic Toxicology* 103, 150-158.
 - 12) Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
 - 13) Cohen, G., Dembiec, D., Marcus, J., 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* 34, 30-38.
 - 14) Nonell, S., Flors, C., 2016. Singlet oxygen: Applications in biosciences and nanosciences, Volume.1. Royal Society of Chemistry, London, UK, pp. 1-21.
 - 15) Regoli, F., Winston, G.W., Mastrangelo, V., Principato, G., Bompadre, S., 1998. Total oxyradical scavenging capacity in mussel *Mytilus* sp. as a new index of biological resistance to oxidative stress. *Chemosphere* 37, 2773-2783.
 - 16) Suzuki, J., Imamura, M., Nakano, D., Yamamoto, R., Fujita, M., 2018. Effects of water turbidity and different temperatures on oxidative stress in caddisfly (*Stenopsyche marmorata*) larvae. *Science of The Total Environment* 630, 1078-1085.
 - 17) Barata, C., Lekumberri, I., Vila-Escalé, M., Prat, N., Porte, C., 2005. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the trichoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic Toxicology* 74, 3-19.
 - 18) Knight, J.A., Pieper, R.K., McLellan, L., 1988. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clinical Chemistry* 34, 2433-2438.
 - 19) 谷田一三, 1980. 貴船川におけるシマトビケラ属3種の生活史と分布, 特に生活環境の変異と密度と幼虫の成長との関係について. *陸水学雑誌* 41(2), 95-111.
 - 20) Mackay, R.J., 1979. Life history patterns of some species of *Hydropsyche* (Trichoptera: Hydropsychidae) in southern Ontario. *Canadian Journal of Zoology* 57(5), 963-975.
 - 21) 生田理弘, 大熊孝, 大川秀雄, 神立秀明, 中村一郎, 1991. 河川水温と気温等の相関に関する研究—信濃川水系魚野川を例に—. *水文・水資源学会誌* 4(1), 39-45.
 - 22) Harvey, R., Lye, L., Khan, A., Paterson, R., 2011. The Influence of Air Temperature on Water Temperature and the Concentration of Dissolved Oxygen in Newfoundland Rivers. *Canadian Water Resources Journal* 36(2), 171-192.
 - 23) 中村太士, 百海琢司, 1989. 河畔林の河川水温への影響に関する熱収支的考察. *日本森林学会誌* 71(10), 387-394.
 - 24) Statzner, B., Arens, M.F., Champagne, J.Y., Morel, R., Herouin, E., 1999. Silk-producing stream insects and gravel erosion: Significant biological effects on critical shear stress. *Water Resources Research* 35(11), 3495-3506.
 - 25) Shetty, S., Tharavathy, N.C., Lobo, R.O., Nannu, S., 2013. Seasonal changes in the biochemical composition of freshwater bivalves, *Parreysia* spp. From Tungabhadra river, Karnataka. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)* 4(5), 94-99.
 - 26) Guerra, C., Zenteno-Savín, T., Maeda-Martínez, A.N., Philipp, E.E., Abele, D., 2012. Changes in oxidative stress parameters in relation to age, growth and reproduction in the short-lived catarina scallop *Argopecten ventricosus* reared in its natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 162(4), 421-430.
 - 27) Winston, G.W., Lemaire, D.G., Lee, R.F., 2004. Antioxidants and total oxyradical scavenging capacity during grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 139(4), 281-288.
 - 28) 宮園章, 中野広, 2000. 北海道オホーツク海沿岸域における地まきホタテガイの閉殻筋中のタンパク質量とグリコーゲン量の季節変化. *北海道水産試験場研究報告* 58, 23-32.
 - 29) 山田茂, 跡見淳子, 富野士良, 原田邦彦, 岩垣丞恒, 渡邊雅之, 堤達也, 平田耕造, 1990. 運動生理生化学. 培風館, 東京.
 - 30) Nishimura, N., 1966. Ecological studies on the net-spinning caddis-fly, *Stenopsyche griseipennis* MCLACHLAN (Trichoptera, Stenopsychidae). 1. Life history and habit. *Mushi* 39, 103-114.
 - 31) 林義雄, 馬場和彦, 1996. 野外におけるヒゲナガカワトビケラ(トビケラ目, ヒゲナガカワトビケラ科) 幼虫のカルボキシルエステラーゼ活性について. *陸水学雑誌* 57(4), 333-336.

【論文要旨】

ストレス応答物質を用いた環境モニタリングは、河川での適用例が少ない。河川の生物への適用に際し、ストレス応答物質の自然変動を明らかにすることが重要である。本研究では、河川に生息するシマトビケラ属の幼虫を対象に、個体サイズと季節変化(2016年2月, 5月, 8月, 10月)がストレス応答物質に与える影響を調べた。個体サイズは、湿重量に応じて4つのクラスに分類した。その結果、抗酸化酵素の1つであるカタラーゼは、大きいクラスほど高い傾向を示した。また、カタラーゼと総抗酸化力は、湿重量との有意な相関が示された。一方、同じサイズクラスを対象に季節変化を調べたところ、カタラーゼや総抗酸化力、酸化ダメージが異なる応答を示した。また、出水直後の調査であった、8月については、酸化ダメージである過酸化脂質が低く、シマトビケラ属は出水によるストレスによって生じた活性酸素種を十分に除去できていたことが示唆された。

キーワード: 成長段階; 季節変化; シマトビケラ; 酸化ストレス