特集：諏訪湖の生物群集の研究

総説

諏訪湖におけるアオコ毒素 microcystin の動態

朴 虎東・横山 淳史・沖野外輝夫

摘 要

湖沼生態系におけるアオコ毒素ミクロキスチン (microcystin) の動態に関する研究が世界各国の研究者によって遂行されてきた。諏訪湖においてもいち早く microcystin の生産, 吸着, 物理化学的分解, 生物蓄積そして生物分解に関する研究が開始された。諏訪湖のアオコ毒素 microcystin の消長については, 1991年から1998年まで8年間に及ぶ長期観測が行われた。その結果, *Microcystis* のアオコ形成初期に見られる細胞の増殖期には細胞内 microcystin 濃度が高いが, アオコの衰退時には細胞外 microcystin の濃度が高いことが分かった。このようにアオコの衰退時期には *Microcystis* の細胞は分解が進み, 細胞から microcystin が溶出することにより湖水濾液中の microcystin の割合が高くなる。

諏訪湖産の淡水二枚貝, イシガイ (*Unio douglasiae*), ドブガイ (*Anodonta woodiana*), カラスガイ (*Cristaria plicata*) は microcystin を蓄積することが分かった。特に, 毒素の含有量が多いイシガイについて, 部位別の microcystin 含有率を示すと, 中腸腺が53%, 鰓と筋肉が34%, 生殖腺が6%, 消化管7%となり, microcystin の多くは貝の肝臓に当たる中腸腺に蓄積されていることが明らかにされた。諏訪湖の二枚貝における中腸腺の microcystin 最大蓄積量はイシガイが $420 \mu\text{g g}^{-1}$, カラスガイが $297 \mu\text{g g}^{-1}$, ドブガイが $12.6 \mu\text{g g}^{-1}$ で, 最大含有量は貝の種類により大きな差が見られた。また, 朴らは諏訪湖から microcystin-RR, -YR, -LR を特異的に分解する新属新種のバクテリアを単離することに成功した。このバクテリアは $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ の microcystin を数日ですべて分解することができる。Microcystin の分解速度は分解時の温度に強く影響され, 30℃で最も分解率が高いことを報告した。

水源池になっている湖沼におけるアオコ毒素の存在は健康被害の危険性をはらんでいることから, 浄水場には定期的なモニタリングのシステムを完備するなどの危機管理が必要である。また, microcystin 分解バクテリアの動態を明らかにし, microcystin 分解機構を詳細に解明することができれば, 水源池におけるアオコ毒素の処理に用いられる分解・除去方法に, その知見を応用することができると期待される。

キーワード：諏訪湖, microcystin, microcystin の動態, アオコ毒素

はじめに

諏訪湖は日本の代表的な富栄養湖である。諏訪湖でのアオコ発生報告は1948年に始まり, 現在まで数多くの研究が行われてきた。諏訪湖の富栄養化が極度に進行したのは1960年代始めで, 1970年代には過栄養状態に達した。その後1979年の下水道の一部稼働により水質は回復傾向に向かったが, 1986年頃からは横這い状態が続いている (Okino, 1990)。諏訪湖の夏季に形成されるアオコの主なラン藻類は *Microcystis aeruginosa* と *M. viridis* である。その細胞数は1948年には全植物プランクトン数の

60%を占めていたが, 1970年から1977年までは99%と圧倒的な占有率であった。その後, 1986年には65%まで減少したが (Okino, 1990), 1990年代に入ると再び90%を上回るようになった (Park et al., 1993a; 1998a)。

アオコを形成するラン藻の中には肝臓毒あるいは神経毒として作用するいくつかの毒素が含まれており, 諸外国においては以前からアオコを原因とする家畜や野生動物のへい死が報告されている (Skulberg et al., 1984)。日本でも1995年8～9月, 兵庫県西宮市の新池において約20羽のカルガモが死んだ事件が起きた。その年の1月17日に西宮市を襲った阪神大震災の際, 新池の上流にあ

る下水処理施設が破壊され、未処理下水が新池に直接流れ込んだことがアオコ発生の原因となり、*M. aeruginosa* が生産した毒素ミクロキスチン (microcystin) による野鳥の大量死が発生し、これがアオコによる野生動物被害の日本で最初の報告となった (Matsunaga et al., 1999)。アオコ毒素によるこのような動物の死亡は1870年代のオーストラリアでの *Nodularia spumigena* による報告 (Francis, 1878) を始め、最近カナダで起こっている野鳥の大量死 (Park et al., 2001a) まで数多い研究結果が報告されている。それにもかかわらず、これといった良い対策を立てている国はまだないのが現状である。そして、1996年2月ブラジルのカルアルにおいては水源でのアオコ毒素の混入が原因で、50人以上の透析患者が死亡するという事件が発生している (Jochimsen et al., 1998)。日本でも飲料水源である湖沼やダム湖において有毒ラン藻類が発生している例もあり、飲料水を介しての人体への影響が心配される。自然湖沼およびダム湖を上水道の水源としている国々では、水源水域での富栄養化の進行による有毒ラン藻類の発生に頭を悩ませているのが現状である。

飲料水中のラン藻毒素 microcystin についてのガイドラインを最初に設定した国はオーストラリアである。オーストラリアのラン藻毒素のガイドラインでは microcystin の飲料水中濃度で、短期暴露 (14日以上暴露) が $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 、長期暴露 (一生の暴露) が $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (*Microcystis* の細胞数で $500 \text{ cells mL}^{-1}$) と、二つの基準値を設けている (Falconer et al., 1994)。その後、世界保健機関 (WHO) では成人 (60 kg) 一人が毎日平均2リットルの水を飲むことと microcystin-LR の一日摂取許容量 ($0.04 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}$, Fawell et al., 1994) の研究結果を考慮し、飲料水中 microcystin-LR の濃度 $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ をガイドライン値として採択した (WHO, 1998)。

諏訪湖での主な microcystin 生産種は *M. aeruginosa*, *M. viridis* と *M. ichthyoblabe* である (Park et al., 1993a; 1998a)。湖水中のラン藻毒素量は様々な環境要因によって複合的な影響を受けるために、ラン藻の発生量と湖水中のアオコ毒素量との間には単純な比例関係は認められていないので、ラン藻毒素量に関する自然湖沼での現況を早急に把握しておくことは必要である。

アオコを作る有毒ラン藻類の中で *Microcystis* 属は世界各地の富栄養化された湖沼で最も頻繁に長期間観察される種類である。その毒素の化学構造はすでに明らかに

なっているが (Botes et al., 1984; 1985)、水界におけるアオコ毒素の挙動についてはまだ不明な点が多い。本報告では、諏訪湖での研究結果を中心にアオコ発生の機構、*Microcystis* が生産する毒素 microcystin の経年変化、魚介類における microcystin の蓄積、バクテリアによる microcystin の分解機構等に関する今までの知見をまとめた。

アオコ発生の機構

湖沼の富栄養化をもたらす原因は二つある。その一つは集水域からの河川を通しての栄養物質の流入であり、他の一つは土砂のような固形物の流入である。これらは湖沼の富栄養化にとって外因と呼べるものである。これら外因に対して湖沼自身の持っている内因は、湖内の生物活性を中心として生じる物質の循環、蓄積の機能である。流入河川を通じて流入する土砂のような固形物は湖沼を浅くし、窒素、リンなどの溶存物質の流入による湖沼生態系への栄養成分の蓄積は湖内の生物生産を複利的に増加させ、両者が車の両輪のように働いて湖沼の富栄養化が進行する。

自然湖沼では、夏期は水温が高くなるものの、春の珪藻類の増殖により水中の栄養が吸収、利用され、水中の栄養塩濃度は低下している。また、水温の成層によって底層からの栄養の補給も少なく、植物プランクトンの生産によって湖水の栄養状態は良くない。そのために夏期は藻類の増殖が少なくなるのが一般的な現象とされている。それに反して夏期にアオコ状態が形成される理由は、湖周辺からの連続的な栄養の補給があることによっている。すなわち、人間活動による連続的な栄養補給が行われることがアオコ発生に欠くことのできない条件である。温帯から亜寒帯にかけての浅い湖沼で発生するアオコが人為的な富栄養化の指標となる所以でもある。アオコの主体であるラン藻類の *Microcystis* が、何故そのように大量に発生するかを整理すると次の二つの要因に分けることができる。その一つはこれまでに述べてきた富栄養化した湖の持つ環境的要因であり、他の一つは *Microcystis* という藻類自体の生理・生態的特性である。生理・生態的特性としては以下のことが挙げられている。

①最大成長をもたらす最適水温が30℃付近にあり、リンの吸収速度も30℃付近で最大となる。また、岡田・須藤 (1980) によれば、リンは藻類の増殖を制限する重要な要因であるが、*Microcystis* によるリンの吸収速度は極めて速く、過剰に群体内に蓄積できる (Okino,

1973), という特性を有している。②栄養塩としての窒素, リンの最小必要濃度は回分培養の初期濃度で, 窒素では 13.6 mg L^{-1} , リンでは 0.18 mg L^{-1} と他の藻類に比較して高い傾向にある (Gerloff et al., 1952)。しかし, 現実の湖では連続培養的に栄養塩が河川から流入しているので, さらに低い濃度でも高い成長力を維持することが可能と考えられる。③リンばかりでなく, 他の元素 (鉄, マンガンなど) も過剰に蓄積する傾向があり, その含量は実験で得られた結果よりも, 野外で得られた分析結果の方が大きい (Gerloff and Skoog, 1957)。④窒素成分としてはアンモニア態よりも硝酸態の方を好み, 硝酸態窒素が流入する窒素の大半を占める, 人為的に富栄養化している湖の水質に適合している。⑤ Gerloff ら (1952) の実験によれば, 最大成長が得られる pH は 10 付近で, この時の成長速度は pH 7 の時の 10 倍となっている。Microcystis がアオコ状態となっている湖沼の pH は 9 前後である場合が多く, この点でも有利と言える。⑥細胞の形態は基本的には $3 \sim 7 \mu\text{m}$ の球形の単細胞生物であるが, 通常数百個の細胞からなる群体を形成しており, 群体の比重は他の藻類よりも軽く, 湖水の表面に浮きやすい。その浮上速度は $0.1 \sim 1.0 \text{ m sec}^{-1}$ と速い (Reynolds and Walsby, 1975)。この特性によって, 自然状態での Microcystis の鉛直分布は極端な表層集中型を呈するが, わずかな風による水の動きで, 周期的な浮上, 沈降を水温の躍層上部で繰り返すことができる。⑦光合成活性は他の藻類よりも高く, 内湾で「赤潮」現象を引き起こす海産珪藻の *Skelltonema costatum* に匹敵するか, それ以上の同化指数が得られている。また, 表層の強光下では光合成に対して強光阻害を誘起しやすいが, Microcystis の群体では他の藻類に比較して強光阻害が生じる光強度は高いという特徴がある。⑧湖沼生態系内での特性としては, アオコ状態を形成する最盛期には食物連鎖系から外れており, 直接 Microcystis を摂餌する動物プランクトンが少ないことも, 大量の現存量を得るうえでの生態的特性となっている (Okino, 1973)。また, 雑食性の魚類に食べられても消化されず, その糞として排出された Microcystis の光合成能はほとんど低下していないことが報告されている (Nakamoto and Okino, 1972)。

最近の研究では溶藻菌など, Microcystis を選んで溶かす菌類や原生動物などの存在が知られるようになり (山本, 1998), Microcystis の活性が衰える秋から冬,あるいは冬から春にかけては腐食連鎖系を経て, 湖沼の物質循環系に乗ると理解されつつある。

Microcystis の発生している水域の環境特性としては次のことが挙げられる。

①窒素, リンなどの栄養塩濃度が高く, 連続的にこれらの栄養塩が河川を経由して湖外から供給されている。②人為的な干渉度が高く, 都市排水として有機物汚染が認められる, 閉鎖性の強い水域である。この有機物の存在がアオコ発生の引き金になっているという説もあるが, 物質として明らかにされていない。むしろ, アオコの生産に必要となる炭素源としての役割が大きいと言えるが, アオコ発生の主因とは考えにくい。③平均水深が 10 m 以下の浅い湖盆を有し, 夏期の底層水温が 20°C を上回ることが多い。④発生量を左右する気象的要因としては, 日照, 降雨量, 風がもっとも基本的なものであり, 結果としての水温と pH の上昇の時期が大きく関係している。

以上に挙げた Microcystis の生理・生態的特性と発生水域の環境特性が複合してアオコ現象が生じるが, その発生水域に認められる特徴的な現象としては以下のものが挙げられる。①透明度は極めて低く, 局所的には 0 m を記録することもある。②湖水表面に緑色のマット状被膜, またはペンキを流したような状況を出現させる。昼間の強光条件下ではこの緑色が黄色に変色し, 刺激臭が感じられる場合もある。③アオコ状態の時には水中の無機態窒素が吸収され, 測定限界以下にまで低下する。この時期の湖の生産力は窒素によって制限されている。そのために, 一時期水中に無機態のリンの残存が観測されることがある。④アオコ状態の出現により, 湖の底層の酸素は不足し, 貧酸素層が形成される場合が多く, 底生の生物に被害が生じることが多い。しかし, 浅い, 過度の富栄養湖の場合には表層に存在する大量のアオコによる光合成の結果, 底層までその酸素が供給され一時的に底層の貧酸素状態が緩和されることもある。

以上をまとめると, 諏訪湖のようにアオコが発生する水域は一樣に浅く, 自然的にも富栄養化が進行している, 閉鎖性の強い水域であることが分かる。そこへ人為的な有機汚染の排水と窒素, リンといった栄養成分の流入が重なり, 本来温水を好む Microcystis にとって好適な環境が整えられ, その生理・生態的特性によって増殖が助長されるという経緯となる。

アオコ毒素

有毒ラン藻類によって生産されている毒素は, 大きく神経毒素 (anatoxin-a, anatoxin-a (s), saxitoxin,

Fig. 1. Structures of neurotoxins.

Fig. 1) と肝臓毒素 (microcystin, nodularin, cylindrospermopsin, Fig. 2) に分けられる (Table 1)。日本の湖沼で問題となっているラン藻毒素は主に microcystin である (Park et al., 1993b)。現在, microcystin を生産すると報告されているラン藻は *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *M. ichthyoblabe*, *M. wesenbergii*, *Nostoc rivulare*, *Oscillatoria agardhii*, *O. tenuis*, *Anabaena flos-aquae* などである (Carmichael, 1992)。このようにアオコには様々な毒性物質を生産するラン藻が含まれていることが知られている。microcystin の構造は7つのアミノ酸からなる環状ペプチドであり, 構成アミノ酸の違いなどにより現在62種類 (分子量909 ~ 1115, Table 2) の microcystin が構造決定されている (Rinehart et al., 1994, Park et al., 2001a)。様々な microcystin を用いて行われた動物実験結果をまとめた Rinehart ら (1994) は, microcystin の構造の違いによって毒性が大きく異なることを示唆した (Table 3)。マウス・ラットを用いた動物実験から得られた microcystin の LD₅₀ 値 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) は, >1200 ~ 50の値をとり, microcystin の構造の違いにより, 毒性は20倍以上も異なった。さらに microcystin の毒性と

Fig. 2. Structures of hepatotoxins; nodularin, cylindrospermopsin and microcystins.

毒性影響を判断する際には, 実験動物の種類により microcystin に対する感受性が大きく異なることも考慮すべきである。現在までに microcystin は動物プランクトン, 昆虫, 魚, 鳥, 哺乳動物, 植物などの生物に急性毒性を示すことが報告されている (Table 4)。しかし, 急性毒性を示す毒素の濃度は実際の湖沼では考えにくいほど高い濃度であるので, 更なる急性・慢性毒性に関する研究を行う必要があると思われる。Thostrup and Christoffersen (1999) が行った, microcystin 生産株 (*M. aeruginosa*, CYA228/1) を餌として *Daphnia magna* に与えた実験では, microcystin 生産株の細胞濃度依存的・指数関数的に摂食速度が減少し, また microcystin 生産株を餌として与えた *Daphnia* の方が, 緑藻・酵母を餌として与えたものや, 天然の湖水で飼育したものよりも生存率が低かった。さらに有毒 *Microcystis* を与えた全ての実験区で *Daphnia* から microcystin が検出された (最高値: $24.5 \mu\text{g g}^{-1}$)。

Table 1. Cyanotoxins and toxin producing algae summarized from Carmichael (1992).

Cyanotoxin	Compound type (molecular weight)	LD ₅₀ (μg/kg) Mouse i.p.	Toxic species
Hepatotoxins			
Microcystin-LR	cyclic heptapeptide (MW 994)	50	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i> , <i>M. wesenbergii</i> , <i>Oscillatoria agardhii</i> , <i>O. tenuis</i> , <i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>Nostoc rivulare</i>
Nodularin	cyclic pentapeptide (MW 824)	50	<i>Nodularia spumigena</i>
Cylindrospermopsin	hydroxymethyluracil tricyclic guanidine (MW 415)	500	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> <i>Umezakia natans</i>
Neurotoxins			
Anatoxin-a	secondary amine alkaloid (MW 165)	200	<i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>O. agardhii</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>M. aeruginosa</i>
Anatoxin-a (S)	cyclic N-hydroxy guanidine methyl-phosphate ester (MW 252)	20	<i>Anabaena flos-aquae</i>
Aphantoxin I	purine alkaloid (neosaxitoxin, MW 315)	10	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>
Aphantoxin II	(saxitoxin, MW 299)	10	<i>Anabaena circinalis</i>
Cytotoxins			
Scytophycin A & B	methylformamide (Scytophycin A, MW 821) (Scytophycin B, MW 819)	650	<i>Scytonema pseudohofmanni</i> <i>Scytonema pseudohofmanni</i> <i>Scytonema hofmanni</i>
Cyanobacterin	chlorinated diaryllactone		<i>Hapalosiphon fontinalis</i>
Hapalindole A	substituted indole alkaloid		<i>Oscillatoria acutissima</i>
Acutiphycin	macrolide		<i>Tolypothrix byssoidea</i>
Tubercidin	pyrrolopyrimidine nucleoside		
Dermatotoxins			
Debromoaplysiatoxin	phenol (MW 560)		<i>O. nigroviridis</i> , <i>Schizothrix calcicola</i>
Oscillatoxin A	phenol (MW 560)		<i>O. nigroviridis</i> , <i>S. calcicola</i>
Lyngbyatoxin A	indole alkaloid (MW 435)		<i>Lyngbya majuscula</i>

Table 2. Microcystins identified from cyanobacteria reported from 1984 to 2001.

Microcystin	Molecular weight	Formular	Reference
1 Microcystin-LA	909	C ₄₆ H ₆₇ N ₇ O ₁₂	Botes <i>et al.</i> (1984)
2 Microcystin-LAba	923	C ₄₇ H ₆₈ N ₇ O ₁₂	Gathercole & Thiel (1987)
3 Microcystin-AR	952	C ₄₆ H ₆₈ N ₁₀ O ₁₂	Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
4 Microcystin-YA	959	C ₄₉ H ₆₈ N ₇ O ₁₃	Botes <i>et al.</i> (1985)
5 [D-Asp ³ , Dha ⁷]Microcystin-LR	966	C ₄₇ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₂	Harada <i>et al.</i> (1991)
6 [D-Asp ³ , Dha ⁷]Microcystin-EE(OMe)	969	C ₄₆ H ₆₃ N ₇ O ₁₆	Namikoshi <i>et al.</i> (1998)
7 [D-Asp ³]Microcystin-LR	980	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂	Krishnamurthy <i>et al.</i> (1989)
8 [Dha ⁷]Microcystin-LR	980	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂	Harada <i>et al.</i> (1991)
9 [DMAdda ⁸]Microcystin-LR	980	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂	Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
10 [D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]Microcystin-LR	980	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂	Sano and Kaya (1998)
11 [D-Asp ³ , Dha ⁷]Microcystin-E(OMe)E(OMe)	983	C ₄₇ H ₆₈ N ₇ O ₁₆	Namikoshi <i>et al.</i> (1998)
12 [Dha ⁷]Microcystin-EE(OMe)	983	C ₄₇ H ₆₈ N ₇ O ₁₆	Namikoshi <i>et al.</i> (1998)
13 Microcystin-LF	985	C ₅₂ H ₇₁ N ₇ O ₁₂	Azevedo <i>et al.</i> (1994)
14 Microcystin-LR	994	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	Botes <i>et al.</i> (1985)
15 [D-Asp ³ , D-E(OMe) ⁸]Microcystin-LR	994	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	Sivonen <i>et al.</i> (1992)
16 [(6Z)-Adda ⁸]Microcystin-LR	994	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	Harada <i>et al.</i> (1990)
17 [Dha ⁷]Microcystin-E(OMe)E(OMe)	997	C ₄₈ H ₆₇ N ₇ O ₁₆	Namikoshi <i>et al.</i> (1998)
18 [L-Ser ⁷]Microcystin-LR	998	C ₄₈ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃	Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
19 Microcystin-LY	1001	C ₅₂ H ₇₁ N ₇ O ₁₃	Stoner <i>et al.</i> (1989)
20 [D-Asp ³ , L-Ser ⁷]Microcystin-E(OMe)E(OMe)	1001	C ₄₇ H ₆₇ N ₇ O ₁₇	Namikoshi <i>et al.</i> (1998)
21 [L-Ser ⁷]Microcystin-EE(OMe)	1001	C ₄₇ H ₆₇ N ₇ O ₁₇	Namikoshi <i>et al.</i> (1998)
22 Microcystin-HilR	1008	C ₅₀ H ₇₈ N ₁₀ O ₁₂	Namikoshi <i>et al.</i> (1994)
23 [D-Asp ³ , ADMAdda ⁸]Microcystin-LR	1008	C ₄₉ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃	Namikoshi <i>et al.</i> (1990)

Table 2. Continued.

	Microcystin	Molecular weight	Formular Reference
24	[D-E(OMe) ⁶]Microcystin-LR	1008	C ₅₀ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂ Sivonen <i>et al.</i> (1992)
25	[D-Asp ³ , ADMAdda ⁵ , Dhb ⁷]Microcystin-LR	1008	C ₄₉ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃ Beattie <i>et al.</i> (1998)
26	Microcystin-LHArg	1008	C ₅₀ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂ Brittain <i>et al.</i> (2000)
27	[D-Asp ³ , Dha ⁷]Microcystin-RR	1009	C ₄₇ H ₇₁ N ₁₃ O ₁₂ Krishnamurthy <i>et al.</i> (1989)
28	[L-MeSer ⁷]Microcystin-LR	1012	C ₄₈ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₃ Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
29	[Dha ⁷]Microcystin-FR	1014	C ₅₁ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂ Luukkainen <i>et al.</i> (1993)
30	[L-Ser ⁷]Microcystin-E(OMe)E(OMe)	1015	C ₄₈ H ₆₉ N ₇ O ₁₇ Namikoshi <i>et al.</i> (1998)
31	[ADMAdda ⁵]Microcystin-LR	1022	C ₅₀ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃ Namikoshi <i>et al.</i> (1990)
32	[D-Asp ³ , ADMAdda ⁵]Microcystin-LHar	1022	C ₅₀ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃ Sivonen <i>et al.</i> (1992)
33	[D-Asp ³]Microcystin-RR	1023	C ₄₈ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₂ Meriluoto <i>et al.</i> (1989)
34	[Dha ⁷]Microcystin-RR	1023	C ₄₈ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₂ Kiviranta <i>et al.</i> (1992)
35	[D-Asp ³ , Dhb ⁷]Microcystin-RR	1023	C ₄₈ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₂ Sano and Kaya (1995)
36	Microcystin-FR	1028	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂ Gathercole and Thiel (1987)
37	Microcystin-M(O)R	1028	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃ S Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
38	[Dha ⁷]Microcystin-HphR	1028	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂ Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
39	[D-Asp ³ , Dha ⁷]Microcystin-HtyR	1030	C ₅₁ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₃ Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
40	[Dha ⁷]Microcystin-YR	1030	C ₅₁ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₃ Sivonen <i>et al.</i> (1992)
41	[D-Asp ³]Microcystin-YR	1030	C ₅₁ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₃ Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
42	Microcystin-YM(O)	1035	C ₅₁ H ₆₉ N ₇ O ₁₄ S Botes <i>et al.</i> (1985)
43	[ADMAdda ⁵]Microcystin-LHar	1036	C ₅₁ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₃ Namikoshi <i>et al.</i> (1990)
44	[D-Leu ¹]Microcystin-LR	1036	C ₅₂ H ₈₀ N ₁₀ O ₁₂ Park <i>et al.</i> (2001a)
45	Microcystin-RR	1037	C ₄₈ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂ Kusumi <i>et al.</i> (1987)
46	[(6Z)-Adda ⁵]Microcystin-RR	1037	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂ Harada <i>et al.</i> (1990)
47	[D-Ser ¹ , ADMAdda ⁵]Microcystin-LR	1038	C ₅₀ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₄ Sivonen <i>et al.</i> (1992)
48	[ADMAdda ⁵ , MeSer ⁷]Microcystin-LR	1040	C ₅₀ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₄ Sivonen <i>et al.</i> (1992)
49	[L-Ser ⁷]Microcystin-RR	1041	C ₄₈ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₃ Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
50	[D-Asp ³ , MeSer ⁷]Microcystin-RR	1041	C ₄₈ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₃ Luukkainen <i>et al.</i> (1993)
51	Microcystin-YR	1044	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃ Botes <i>et al.</i> (1985)
52	[D-Asp ³]Microcystin-HtyR	1044	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃ Harada <i>et al.</i> (1991)
53	[Dha ⁷]Microcystin-HtyR	1044	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃ Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
54	[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]Microcystin-HtyR	1044	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃ Sano and Kaya (1998)
55	Microcystin-(H ₂)YR	1048	C ₅₂ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₃ Namikoshi <i>et al.</i> (1994)
56	[D-Asp ³ , ADMAdda ⁵ , Dhb ⁷]Microcystin-RR	1051	C ₄₉ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₃ Beattie <i>et al.</i> (1998)
57	[D-E-OC ₂ H ₅ (CH ₃)OH ²]Microcystin-LR	1052	C ₅₂ H ₈₀ N ₁₀ O ₁₃ Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
58	Microcystin-HtyR	1058	C ₅₃ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃ Harada <i>et al.</i> (1991)
59	[L-Ser ⁷]Microcystin-HtyR	1062	C ₅₂ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃ Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
60	Microcystin-WR	1067	C ₅₄ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₂ Namikoshi <i>et al.</i> (1992)
61	[D-Asp ³ , ADMAdda ⁵ , Dhb ⁷]Microcystin-HtyR	1072	C ₅₃ H ₇₂ N ₁₁ O ₁₄ Beattie <i>et al.</i> (1998)
62	[L-MeLan ⁷]Microcystin-LR	1115	C ₅₂ H ₈₁ N ₁₁ O ₁₆ S Namikoshi <i>et al.</i> (1994)

Daphnia 単位体積当たりの microcystin 濃度と、体長や抱卵数のあいだには負の相関があり、有毒 *Microcystis* を与えた実験区の *Daphnia* は抱卵数が非常に少なく、未熟個体や死亡個体が多く観察された。このような *Daphnia* に対する *Microcystis* の負の影響の原因について、これまでの研究では、*Microcystis* の栄養価が低いためのものか、*Microcystis* に摂食を阻害する性質があるためのものか、*Microcystis* に含有される microcystin もしくはそれ以外の物質による毒性影響によるものなのか、限定することが難しかった。しかし Thostrup and Christoffersen (1999) の実験では、*Daphnia* の成長・生殖と体内 microcystin 濃度の負の相関から、*Microcystis* 細胞から *Daphnia* 体内へ吸収された microcystin が *Daphnia* の PPase を阻害するこ

とにより、毒性影響が現れる可能性を示唆した。

最近、*M. aeruginosa* から発見された microcystin 合成酵素遺伝子をノックアウトすることにより、microcystin を生産する株と生産しない変異株が得られた。この microcystin 生産株と非生産株は microcystin 生産性の違いを除けば全く同じ形質を持つので、純粋に microcystin の影響を調べることが可能になった。Rohrlack ら (1999) は *M. aeruginosa* の microcystin 生産株 (PCC7806) と PCC7806 株の microcystin 合成酵素遺伝子 (mcyB) をノックアウトした非生産株を用いて、*Daphnia galeata* に対する microcystin の影響について実験を行った。その結果、microcystin 生産株・非生産株に対する摂食速度には有意差が見られなかったが、microcystin 生産株 (PCC7806) が投与された

Table 3. Toxicity of some microcystins and nodularins based upon intraperitoneal lethal dose 50% response (LD₅₀) in laboratory mice or rat injections (from Rinehart et al. 1994).

Toxin	LD ₅₀ (μg kg ⁻¹)
Nodularin	050
[D-Asp ¹]nodularin	075
[DMAdda ³]nodularin	150
[(6Z)-Adda ³]nodularin	>2000
[D-Glu-OCH ₃ ⁴]nodularin dihydronodularin	>1200
[D-MeAbu ⁵]nodularin	150
[L-MeAbu ⁵]nodularin	150
Microcystin-LR	050
Microcystin-LA	050
Microcystin-YR	070
Microcystin-RR	600
Microcystin-AR	250
Microcystin-LY	090
Microcystin-FR	250
Microcystin-WR	150-200
Microcystin-YM(O)	056
Microcystin-M(O)R	700-800
Microcystin-HtyR	80-100
Microcystin-HilR	100
[D-Asp ³]microcystin-LR	050
[D-Asp ¹]microcystin-RR	250
[D-ha ⁷]microcystin-LR	250
[L-MeSer ⁷]microcystin-LR	150
[L-MeLan ⁷]microcystin-LR	1000
[D-Glu-OCH ₃ ⁴]microcystin-LR	>1000
[D-Glu-OC ₂ H ₅ (CH ₃)OH ⁴]microcystin-LR	>1000
[DMAdda ³]microcystin-LR	90-100
[ADMAdda ³]microcystin-LR	060
[D-Asp ³ , ADMAdda ³]microcystin-LR	160
[ADMAdda ³]microcystin-LHar	060
[6(Z)-Adda ³]microcystin-LR	>1200
[6(Z)-Adda ³]microcystin-RR	>1200
dihydromicrocystin-LR	085
[L-MeAla ⁷]microcystin-LR	100
[D-MeAla ⁷]microcystin-LR	

Daphnia においてのみ、急性毒性（半数致死時間1.2～2日）と遊泳阻害が観察された。以上の実験結果から Rohrlack らは、microcystin には *Microcystis* を捕食する動物プランクトンを排除する機能があると述べている。実際に有毒 *Microcystis* が優占している湖沼では *Daphnia* の現存量が低く、microcystin が影響している可能性も考えられる。

Microcystis 属は多数の球形細胞（3～7μm）が多糖類の粘質物を分泌し、不定形、球形、樹枝形のようなコロニー（群体）を形成する。コロニーの大きさは成長時期によって変異を示し、野外では数mmになる場合もある。日本における *Microcystis* 属の分類は Komárek (1958) による形態学的分類システムを用いる研究者が多く、さらに彼自身の分類により日本の湖沼に6つの形態種が存在することが報告されていた

(Komárek, 1991)。その後、*M. flos-aqua* の細胞配列が *M. ichthyoblabe* と同じであるとして5形態種が用いられるようになった（渡辺眞之, 1996）。16SrDNA の塩基配列に基づく15株の *Microcystis* (*M. aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *Microcystis* spp.) の系統解析では、全ての株において、99%以上の相同性が示された（Otsuka et al., 1998）。さらに Otsuka ら（1999）は、24株の *Microcystis* を使用して、詳細な種レベルの系統解析に有用とされる16S-23S internal transcribed spacer region の塩基配列に基づく系統解析を行った。その結果、*Microcystis* は3つの分類群に分けられ、分類群Ⅰには有毒株と無毒株が含まれ、分類群Ⅱには有毒株のみが、分類群Ⅲには無毒株のみが含まれた。このように、これらの3つの分類群と *Microcystis* の microcystin 生産性には遺伝的な背景があると推察された。しかしながら、従来の形態分類は分子系統分類学的手法によって得られた結果とは一致しなかった。さらに *Microcystis* コロニーを培養系で連続的に観察した結果から、*Microcystis* は複数のコロニー形態を有するが、1属1種であることが示唆された（Otsuka et al., 2000）。しかし我々は、*Microcystis* のコロニーの形態には何らかの生態学的な意味があると考えている。したがって、本文中では従来の形態分類方法を適用した。

日本のアオコ毒素の分布

今まで、アオコ毒素の分布に関する研究は数多く報告されている。しかし、その結果を整理して見ると研究者の多い先進国に報告が集中しているのが分かる（Sivonen and Jones, 1999）。このことからアオコ毒素の分布傾向を研究報告の地域性から論ずることは困難であると言えよう。しかし、おおよその傾向は、北欧と北米では *Anabaena* 属によるアオコ発生によりアナトキシン-a（anatoxin-a）とアナトキシン-a（s）のような神経毒素が多く、それより南の地域では肝臓毒素 microcystin が主体となっていることがうかがえる。日本においても似たような傾向で、北海道および東北地方のような比較的寒いところでは *Anabaena* 属、関東地方より南では *Microcystis* 属が優占種である場合が多い（Park et al., 1993b）。

日本の湖沼を対象にしたアオコ毒素の定性分析結果によると、microcystin 4種類（microcystin -RR, -YR, -LR, desmethyl-7- microcystin -LR）と anatoxin-a が

Table 4. Toxicity of microcystins against various organisms.

Organisms	Species	Toxicity	Reference
Copepod	<i>Diaptomus birgei</i>	0.45-1 μ g/ml ^a	DeMott <i>et al.</i> (1991)
Cladocera	<i>Daphnia pulicaria</i>	21.4 μ g/ml ^a	Yasuno and Sugaya (1991)
	<i>Daphnia hyalina</i>	11.6 μ g/ml ^a	
	<i>Daphnia pulex</i>	9.6 μ g/ml ^a	
	<i>Daphnia magna</i>	>8 μ g/ml ^b	
	<i>Moina macrocopa</i>	0.98 μ g/ml ^b	
Mosquito	<i>Aedes aegypti</i>	1.6 mg/ml ^c	Kiviranta <i>et al.</i> (1991)
House fly	<i>Musca domestica</i>	0.48 mg/kg ^d	Delaney and wilkins (1995)
Cotton Leafworm	<i>Spodoptera littoralis</i>	4.72 mg/kg ^d	Lee <i>et al.</i> (1999)
Butterfly larvae	<i>Pieris brassicae</i>	3.93 mg/kg ^d	
Brine shrimp	<i>Artemia salina</i>	22.3 μ g/ml ^d	
Fish	<i>Carassius auratus</i>	2.27 mg/kg ^e	Sugaya <i>et al.</i> (1990)
	<i>Cyprinus carpio</i> L.	550 μ g/kg ^f	
Bird	<i>Japanese quail</i>	256 μ g/kg ^g	Takahashi and Kaya (1993)
Mammal	<i>mouse</i>	70 μ g/kg ^f	Watanabe <i>et al.</i> (1989)
	<i>rat</i>	122 μ g/kg ^f	Miura <i>et al.</i> (1991)
Mustard	<i>Sinapis alba</i> L.	8 μ g/ml ^h	Kos <i>et al.</i> (1995)

^a 48 hr. LC₅₀ of microcystin-LR, ^b 48 hr. LC₅₀ of microcystin-RR, ^c 48 hr. LC₅₀ of extracts of *Microcystis aeruginosa*

^d 24 hr. LC₅₀ of microcystin-LR, ^e 48 hr. LD₅₀ of microcystin-RR, ^f LD₅₀ of microcystin-LR, ^g LD₅₀ of microcystin-RR,

^h IC₅₀ of microcystin-LR

検出されている。アオコ毒素の定量分析には microcystin/anatoxin-a 同時分析法 (Park *et al.*, 1993 b), または, microcystin 単独分析法 (アオコの単位乾燥重量当たりの microcystin の分析法 (Harada *et al.*, 1988) と湖水体積当たりの microcystin の細胞中および細胞外へ放出された microcystin の分析法 (Park *et al.* 1998a)) を用いている (Fig. 3)。今までの湖沼におけるラン藻毒素に関する研究の大半は, アオコの乾燥重量当たりの毒素量で毒性を評価しているのが現状である。しかし, これらの方法では水源池におけるラン藻毒素の飲料水への影響, および水生生物に対する毒性を評価することは極めて困難である。むしろ, 湖水単位容積当たりの毒素量を測定する方法を用いる方が, 水界生態系におけるアオコ毒素の挙動をより明確に把握することが可能である。

朴ら (1993b) は1989年以来アオコが発生する日本の富栄養水域を中心にアオコ毒素の調査を行ってきた。その結果, アオコの中に含まれているラン藻由来毒素のほとんどが肝臓毒素, microcystin であり (30-2100 μ g g⁻¹), 神経毒素である anatoxin-a は微量であった (0.3-16 μ g g⁻¹)。主な毒素の種類は microcystin-RR, -LR の2種で, 諏訪湖と霞ヶ浦では microcystin-YR が, Desmethyl-7-microcystin-LR は霞ヶ浦から少量検出されている。日本の湖沼と他国の湖沼の大きな相異点は anatoxin-a の含有量である。韓国の忠州湖, 長城湖, 榮山江, 永朗湖のアオコ試料からは, 北欧・北米の湖沼よりは低い, anatoxin-a が検出された (Park *et al.*,

Fig. 3. System for analysis of total microcystin in lake water. I.MC: Intracellular microcystin, E.MC: Extracellular microcystin.

1998b)。また, フィンランドの湖沼の調査結果では, 生物毒性試験により215試料中35試料に神経毒としての作用が確認されており, さらに化学分析を行った結果ではほぼ半分の試料から anatoxin-a が検出された。また, その anatoxin-a の含有量は12から4,360 μ g g⁻¹ である

ことが報告されている (Sivonen et al., 1989)。諏訪湖の microcystin に関しては単位乾燥重量当たりの含有量 ($<1-2260 \mu\text{g g}^{-1}$) も、湖水単位容積当たりの毒素量 ($<1-184 \mu\text{g L}^{-1}$) も、諏訪湖の方が韓国の湖沼よりも高濃度で検出されている (Park et al., 1998b)。このように単位乾燥重量当たりの毒素含有量が湖沼により異なる理由としては、アオコを形成する種または株によって、ラン藻の毒素生産能力に差があることがあげられる (朴・林, 1996)。さらに、採取する際のアオコの増殖時期により毒素の含有量が異なることも一因であると考えられる。また、湖水単位容積当たりの毒素量が高い理由は、有毒ラン藻の毒素の生産能力以外にも有毒アオコの湖水単位容積当たりの現存量そのものが高くと当然ながら容積当たりの毒素量が高くなることである。

アオコ毒素の季節変化と経年変化

諏訪湖におけるアオコ毒素の最初の研究は渡辺らによって1977年から行われたものであり、マウスを用いた生物試験法を利用してその毒性を評価した (Watanabe and Oishi 1980)。その後 microcystin の化学構造が明らかにされ、microcystin の分析方法も開発された。この分析方法の開発により、過去に採取し凍結乾燥して保管されていた試料が分析可能になり、Table 5に示されているように過去の毒素含有量を知ることができた。Table 5に示された1971年から1998年までのアオコ毒素含有量の変動をみると、二つの傾向が認められる。その一つは、1990年代に入ってからアオコ毒素の含有量が高くなったこと、二つめには年度により毒素量の変動が大きいことである。

これまでの湖沼におけるアオコ毒素の研究の大半は、前述のようにアオコの乾燥重量当たりの毒素量で毒性を評価する方法を主に用いていた。さらに、世界各地の湖沼から報告されているアオコ毒素の現状の多くは、各湖沼で夏季に1回だけ調査・分析した結果に基づいている。しかし、水源池における毒素のモニタリングと生態系におけるアオコ毒素の挙動の解析、または水生生物に対するアオコ毒素の影響などを評価・判断するには長期的な調査結果が必要となる。そのために最近ではアオコ毒素の季節的変動、あるいは経年変化を長期間継続して調査する湖沼が増えている。朴ら (1998a) も諏訪湖において本格的なアオコ毒素の季節変化を1991年から調べ始め、現在も継続している。その結果を Fig.4 に示す。諏訪湖におけるアオコ毒素も経年的にみると大きく変動してい

Table 5. Concentrations of microcystins in samples of *Microcystis* species obtained from Lake Suwa in the years 1971-1998.

Date	Microcystins ($\mu\text{g g}^{-1}$ dried algae)			
	RR	YR	LR	Total MC
15/08/71	350	N.D. ^a	80	430
24/07/78	30	N.D.	40	70
12/08/80 ^b	380	N.D.	440	820
28/08/81 ^b	230	N.D.	60	290
10/08/82 ^b	130	N.D.	250	380
23/08/82 ^b	170	N.D.	290	460
08/08/84 ^b	120	N.D.	130	250
13/08/85	630	N.D.	250	880
28/06/86 ^b	200	90	290	580
31/07/86	450	N.D.	240	690
25/07/89 ^c	460	N.D.	330	790
03/07/90 ^c	514	34	341	889
14/08/90 ^c	12	N.D.	13	25
11/08/90 ^c	36	N.D.	31	67
20/07/91 ^c	1210	98	816	2124
20/08/91 ^c	148	N.D.	182	330
10/09/91 ^c	413	N.D.	304	717
20/10/92	740	N.D.	540	1280
03/08/93	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18/07/94	N.D.	N.D.	39	39
02/08/94	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
29/09/94	1360	N.D.	898	2258
21/06/95	203	N.D.	454	657
16/09/95	91	N.D.	182	273
03/10/95	N.D.	N.D.	53	53
07/06/96	973	112	812	1897
15/07/96	1080	100	554	1734
13/08/96	74	65	251	390
04/06/97	217	N.D.	73	290
27/08/97	63	N.D.	60	123
22/10/97	249	N.D.	79	328
17/06/98	241	N.D.	144	385
29/07/98	316	N.D.	151	467
25/09/98	724	N.D.	247	971

^aN.D.: Toxins not detected. (^bWatanabe et al., 1989; ^cPark et al., 1993a, 1998a).

ることが分かる。諏訪湖ではラン藻の種類およびラン藻細胞内・外の microcystin 量の季節変化についても調べられており、ラン藻類の種レベルでの構成比、環境要因、microcystin 量の関係がどのようになっているのかが解析されている (Amemiya et al., 1990, Park et al., 1993a; Park et al., 1998a)。

Microcystin が湖内の他の生物に及ぼす影響、および水源池におけるラン藻毒素の影響を評価する上で、湖水中の毒素を定量することが最も重要である。そこで、諏訪湖での定期観測による水質測定と合わせて、microcystin 量の変動を1991年から追跡してきた。諏訪湖における *Microcystis* 乾燥重量当たりの microcystin 量は1993年がもっとも少なかった。1993年は例年に比べ降水量が多く、日射量は少なく、気温も低かったことか

Fig. 4. Seasonal changes of microcystin concentrations in lake water containing *Microcystis* cells collected from Lake Suwa at ten days intervals from June to October (1991-1998).

ら、アオコの発生量も少なかった。結果として、microcystinの乾燥重量当たりの含量は1993年の前後の年に比べて1/10以下であった。また湖水中のDINがアオコに消費されず大量に残されたことから、DON/DIN比は例年に比べて低く、逆にTN/TP比(原子比)が極端に高くなった。Smith (1983)はTN/TP比が29以上になるとアオコはほとんど発生しないと報告している。諏訪湖の場合も1993年と1995年の7月のアオコ発生量は少なく、この時のTN/TP比は29を越えており、Smith (1983)の報告と一致した結果となっている。Takamuraら(1992)は、霞ヶ浦において1987年以降夏に*Microcystis*属の優占するアオコから*Oscillatoria*属、*Raphidiopsis*属、また最近では*Phormidium*属、*Lyngbya*属のような糸状ラン藻に変化したことを報告した。*Microcystis* spp. から*Oscillatoria agardhii*への優占種の変化の原因は、主に霞ヶ浦の夏季のTN/TP

比の増加と関連している。これは*Microcystis* spp.の最適N/P比(重量比で4.1)が*O. agardhii* (12.0)より低いためである。ワシントン州のSteilacoom湖でも*Microcystis aeruginosa*の遷移によるアオコ毒素の生産には低いN/P比と低い硝酸・アンモニア濃度が関与していることが報告されている(Jacoby et al., 2000)。また*Microcystis*の細胞内N/P比及びmicrocystin量は培地中の窒素・リン量の影響を受けることも知られている(Lee et al., 2000)。*Microcystis*細胞の増殖が窒素制限を受けている場合は細胞当たりのmicrocystin量が増殖速度に依存しているため、細胞当たりのmicrocystin量は細胞の最大増殖速度から推測することができる(Long et al., 2001)。Longら(2001)の結果では*Microcystis*の増殖速度の上昇に伴い細胞サイズは小さくなり、microcystinを多く含有することが示され、毒性を強めることによって動物プランクトンの摂食に対して耐性を持つ可能性が示された。反対にリン制限下では増殖速度が遅いほど細胞当たりのmicrocystin含有量が多くなることが報告されており、動物プランクトンの捕食を回避する可能性が示唆されている(Lee et al., 2000)。これらの違いは、増殖の制限要因が窒素とリンでは細胞の乾燥重量に与える影響が異なることによるものであると考えられる(Ahlgren, 1985; Long et al., 2001)。

水温はアオコの発生時期と発生量に大きく影響する要因の一つである。諏訪湖でも6月の表層水温が20℃以上にならないとChl.a濃度は $50 \mu\text{g L}^{-1}$ を越えないことから明らかに、水温がアオコ発生を左右していることが経験的に知られている(Park et al., 1998a)。

一方、1992年と1994年は乾燥重量当たりのmicrocystin含量は高く、1992年の最高値は $1280 \mu\text{g g}^{-1}$ 、1994年は $2258 \mu\text{g g}^{-1}$ であった(Table 5)。しかし、乾燥重量当たりのmicrocystin含量は季節的にも大きく変動する。この原因は外的要因としては*Microcystis*の発生に関連する環境要因が季節的に変化することが挙げられ、内的要因としては*Microcystis*の種組成の変化、増殖状況の変動などが挙げられる。特に毒素生産種である*M. aeruginosa*と*M. viridis*が共存している時期にはmicrocystinの生産量が高い傾向にある。このように、湖水中のmicrocystin含量は*Microcystis*の発生状況に大きく左右されている。そのことは1994年の湖水中のmicrocystin濃度の変動がアオコ乾燥重量当たりの含量の変動と似た傾向を示していることから推測できる。しかし、1992年の湖水中のmicrocystin濃度の傾向は他

の年と大きく異なっている。その原因は湖水中の *Microcystis* 細胞数の変化が大きかったことと、藻体中の microcystin 含有量の差によるものと推測される。1991年からの Park ら (1998a) の調査における湖水中の microcystin 濃度の最高値は、1994年に観測された $184 \mu\text{g L}^{-1}$ であった (Fig. 4)。アオコ毒素の経年変化に影響を与えている環境要因と湖水中のアオコ毒素との因果関係を大胆に整理すると Fig.5のような流れが推測できる。

このように湖水中のラン藻毒素量は様々な環境要因によって複合的な影響を受けるために、ラン藻の発生量と湖水中のアオコ毒素量との間には単純な比例関係は認められていないが、1996年にアオコ毒素、主に microcystin について世界保健機関 (WHO) が飲料水中の濃度の基準値を定めていることから水源池になっている湖沼におけるラン藻毒素濃度に影響する諸要因を早急に把握しておくことがアオコ毒素のモニタリングに必要となるだろう。

水生生物によるアオコ毒素蓄積

アオコによって生産された microcystin が海洋・湖沼の水生生物に蓄積される例がいくつか報告されている。Table 6に野外調査と室内 microcystin 蓄積実験におけ

る動物プランクトン及び魚介類の microcystin 最大蓄積濃度を示した。動物プランクトンの microcystin 含有量は、実測値および計算値で $24.5 \sim 1387 \mu\text{g g}^{-1}$ (乾燥重量)、魚介類では $0.02 \sim 337 \mu\text{g g}^{-1}$ (乾燥重量または湿重量) であった。特に水産資源となる海洋性二枚貝 (イガイ科) では、microcystin の蓄積について幾つかの研究で実験的に証明されている (Vasconcelos, 1995; Williams et al., 1997b; Amorim and Vasconcelos, 1999)。また海洋ではカニの幼生がベクターとなり、食物連鎖を通して microcystin がより高次の栄養段階 (魚類) に移行する可能性が示されている (Andersen et al., 1993; Williams et al., 1997a)。

そこで渡辺ら (1997) は microcystin が食物連鎖系を経て、他の生物に移行、蓄積される可能性を検討するために、諏訪湖で夏に採集された水生生物について microcystin 含量の測定を行った。Microcystin の定量分析に用いた水生動物は1992年から1998年までの、6月から11月の間に諏訪湖において採集されたものである。採集された水生動物はイシガイ (*Unio douglasiae*)、ドブガイ (*Anodonta woodiana*)、カラスガイ (*Cristaria plicata*)、コイ (*Cyprinus carpio*)、ワカサギ (*Hypomesus transpacificus nipponensis*)、ウキゴリ (*Chaenogobius urotaenia*)、スジエビ (*Palaemon paucidens*)、アメリカザリガニ (*Cambarus clarkii*)、オ

Fig. 5. Factors on the seasonal variation of microcystin concentration in Lake Suwa.

Table 6. Concentrations of microcystins in aquatic organisms quantified by various analysis methods reported in the scientific literature.

	Organism	Organ	Toxin	Concentration *	Analysis method	Location	Reference
Mollusc							
Gastropoda	<i>Helisoma trivolvis</i>	Whole	MCYST-LR	37 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L ^b . Driedmeat, Alberta, Canada	Kotak <i>et al.</i> 1996
		Whole	MCYST-LR	40 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Little Beaver, Alberta, Canada	Zurawell <i>et al.</i> 1999
	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Whole	MCYST-LR	96 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Driedmeat, Alberta, Canada	Kotak <i>et al.</i> 1996
		Whole	MCYST-LR	140 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Steele, Alberta, Canada	Zurawell <i>et al.</i> 1999
	<i>Physa gyrina</i>	Whole	MCYST-LR	121 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Driedmeat, Alberta, Canada	Kotak <i>et al.</i> 1996
			MCYST-LR	129 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Driedmeat, Alberta, Canada	Zurawell <i>et al.</i> 1999
Bivalvia	<i>Mytilus edulis</i>	Whole	MCYSTs	0.022 $\mu\text{g/g WW}$	PPase assay	Campbell River, B. C., Canada	Williams <i>et al.</i> 1997 b
		Whole	MCYSTs	63.4 $\mu\text{g/g WW}$	Remieux Oxidation GC/MS	Campbell River, B. C., Canada	Williams <i>et al.</i> 1997 b
		Whole	MCYSTs	0.204 $\mu\text{g/g WW}$	PPase assay	Laboratory experiment	Williams <i>et al.</i> 1997 b
		Whole	MCYSTs	336.9 $\mu\text{g/g WW}$	Remieux Oxidation GC/MS	Laboratory experiment	Williams <i>et al.</i> 1997 b
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Whole	MCYST-LR	10.5 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	Laboratory experiment	Vasconcelos 1995
		Digestive tract	MCYST-LR	27.6 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	Laboratory experiment	Vasconcelos 1995
		Whole	MCYSTs	16 $\mu\text{g/g DW}$	ELISA	Laboratory experiment	Amorim and Vasconcelos 1999
	<i>Anodonta cygnea</i>	Whole	Oscillatoria toxin	30 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	Laboratory experiment	Lindholm <i>et al.</i> 1989
		Whole	Oscillatoria toxin	70 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	Laboratory experiment	Eriksson <i>et al.</i> 1989
		Hepatopancreas	Oscillatoria toxin	136 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	Laboratory experiment	Eriksson <i>et al.</i> 1989
	<i>Anodonta grandis simpsoniana</i>	Whole	MCYST-LR	1.35 $\mu\text{g/g DW}$	PPase assay	L. Driedmeat, Alberta, Canada ^c	Prepas <i>et al.</i> 1997
	<i>Anodonta woodiana</i>	Hepatopancreas	MCYST-RR	0.2 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Suwa, Japan	Watanabe <i>et al.</i> 1997
		Hepatopancreas	MCYSTs-RR, -LR	12.6 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Suwa, Japan	Yokoyama and Park (Submitted)
	<i>Cristaria plicata</i>	Hepatopancreas	MCYSTs-RR, -LR	297 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Suwa, Japan	Yokoyama and Park (Submitted)
<i>Unio douglasiae</i>	Hepatopancreas	MCYSTs-RR,-LR	2.7 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Suwa, Japan	Watanabe <i>et al.</i> 1997	
	Hepatopancreas	MCYSTs-RR, -LR	420 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Suwa, Japan	Yokoyama and Park (Submitted)	
Arthropoda	<i>Zooplankton</i>	Whole	MCYST-LR	66 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	L. Driedmeat, Alberta, Canada	Kotak <i>et al.</i> 1996
	<i>Daphnia magna</i>	Whole	MCYSTs	24.5 $\mu\text{g/g DW}$	ELISA	Laboratory experiment	Thostrup & Christoffersen 1999
	<i>Bosmina fatalis</i>	Whole	MCYSTs	1387 $\mu\text{g/g DW}$	Estimation	L. Kasumigaura, Japan	Watanabe <i>et al.</i> 1992
	<i>Chaoborus larvae</i>	Whole	MCYST-LR	<3.9 $\mu\text{g/g DW}$	Estimation	Laboratory experiment	Lauren-Maatta <i>et al.</i> 1995
	<i>Cancer magister (larvae)</i>	Whole	MCYST-LR	5.52 ng/g WW	PPase assay	Cypress Island, B. C., Canada	Williams <i>et al.</i> 1997 a
			MCYSTs	84.1 $\mu\text{g/g WW}$	Remieux Oxidation GC/MS	Cypress Island, B. C., Canada	Williams <i>et al.</i> 1997 a
	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Hepatopancreas	MCYST	trace	HPLC	Laboratory experiment	Liras <i>et al.</i> 1998
Fish	<i>Atlantic salmon</i>	Liver	MCYST-LR	— ^d	"HPLC, PPase assay"	Nanaimo, B. C., Canada	Andersen <i>et al.</i> 1993

*, maximum concentration of toxin in the literature expressed as $\mu\text{g/g}$ dry weight (DW) or wet weight (WW) ; ^b, Lake ; ^c, sample of field experiment ; ^d, not quantified

オユスリカ (*Chironomus plumosus*), 動物プランクトン (オナガミジンコ *Diaphanosoma brachyurum*, ヤマトヒゲナガケンミジンコ *Eodiaptomus japonicus*, ニセゾウミジンコ *Bosmina fatalis*) である。その結果, microcystin-RR と -LR が二枚貝から検出された (Watanabe et al., 1997; Yokoyama and Park, 投稿中)。それ以外の生物に関しての microcystin 含有量は検出限界以下であった。1992年の7月に採集したイシガイの中腸腺では $2.72 \mu\text{g g}^{-1}$, 10月では7月の2倍の濃度の microcystin が検出された。1995年からは抽出方法の改善と解剖方法を変更したので1992年の結果との直接比較は困難であるが, 1995年9月のイシガイの鰓と筋肉で $21 \mu\text{g g}^{-1}$, 中腸腺を含む内蔵では $35 \mu\text{g g}^{-1}$ 以上の microcystin が検出された。特に, 毒素の含有量が多いイシガイについて, 部位別の microcystin 含有率を示すと, 中腸腺が53%, 鰓と筋肉が34%, 生殖腺が6%, 消化管7%となり, microcystin の多くは貝の肝臓に当たる中腸腺に蓄積されていることが明らかにされた。諏訪湖の二枚貝における中腸腺の microcystin 最大蓄積量はイシガイが $420 \mu\text{g g}^{-1}$, カラスガイが $297 \mu\text{g g}^{-1}$, ドブガイが $12.6 \mu\text{g g}^{-1}$ で, その microcystin 最大含有量は貝の種により大きな差が見られた (Table 6)。哺乳動物を用いた急性・慢性毒性実験でも, microcystin は強い肝臓毒性を持つことが知られており, microcystin 投与後, その殆どが肝臓に集まることから, 貝の肝臓に当たる中腸腺に全体の半分以上の microcystin が存在することは説明できる。また諏訪湖で採集したイシガイを microcystin が無い条件で3ヶ月間飼育すると, その microcystin 含有量は最初の1割程度に減少することが分かった。他生物への microcystin の蓄積・移行・生物濃縮についてはさらに多くの検体について測定し, その実態を明らかにすることが今後必要である。

バクテリアによるアオコ毒素の分解

Microcystin は構造的に非常に安定な物質であり, 物理・化学的には分解されにくい物質である。しかし, 1992年から1994年までの諏訪湖における microcystin の挙動から, ほとんどの microcystin は藻体中に存在しており, 水中に溶存する microcystin 量は藻体中の含有量に比べて微量 (数 $\mu\text{g L}^{-1}$ 以下) であることが確認された。また, 溶存態の microcystin 濃度は, アオコブルームの崩壊期においても微量に保たれていた (Park et al., 1998a)。これらの結果は, 湖水中において何らかの

microcystin 分解機構が働いている可能性を示唆している。朴ら (2001b) はバクテリアによる microcystin の分解に注目し, 諏訪湖から単離, 同定したバクテリア16株を用いて microcystin の分解能力の有無について確認を行った。その結果, 14株の microcystin 分解率は20日間で最大約20%であったのに対し, 新属新種であることが明らかとなった Y2株は $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ の microcystin を6日間ですべて分解した (Park et al., 2001b; Fig. 6)。この実験から, 次のような microcystin 分解機構が湖沼では存在すると考えられる。つまり, 湖沼において発生した *Microcystis* によって生産された microcystin は, 細胞の自己分解, またはバクテリアによる溶藻作用

Fig. 6. Degradation of microcystins-RR(a) and -LR(b) over a 20-day period with the strain Y2 isolated from Lake Suwa. Control indicates culture medium without bacteria. The initial concentration of microcystins was adjusted to 20 mg L^{-1} of the NB medium at 27°C in the dark. Initial cell density was $2.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$.

(Yamamoto et al., 1993) により湖水中に溶出した後、Y2株を含むある種のバクテリア群集によって速やかに分解されると考えられる (Fig. 7)。

これまでのアオコ毒素の水界生態系における挙動に関する研究結果について Fig. 8にまとめた。諏訪湖におけるアオコ毒素の季節変動と経年変化の研究結果からは、microcystin 濃度値の上限と下限の範囲について検討ができる。また、湖水中の microcystin のほとんどが *Microcystis* の細胞内に存在し、溶存態の microcystin は微量であることが明らかになった。これはバクテリア群集による分解機構の存在によって説明できる。諏訪湖

Fig. 7. Degradation process of microcystin in a lake ecosystem.

底泥に含まれる microcystin の存在の有無については、これまでのところ確認されていない。しかしながら、底泥に microcystin が吸着されることが室内実験から確認されている。底泥への microcystin の吸着率は、底泥に microcystin を添加する方法によって測定した。その結果、底泥における microcystin の最大吸着量は、microcystin -RR で $1860 \mu\text{g g}^{-1}$ 、microcystin -LR では $640 \mu\text{g g}^{-1}$ であり、microcystin -RR は microcystin -LR の約3倍も多いことが分かった。底泥に吸着した microcystin を再現性よく脱離するのは困難であり、定性・定量分析が難しいことから、新たな分析方法の検討が必要である。二枚貝がアオコ毒素を蓄積・濃縮するという事実は、貝以外の水生生物への蓄積と生物濃縮の可能性についても今後の研究課題として注目する必要があることを示している。また、朴らはアオコ毒素を特異的に分解する細菌を諏訪湖から単離している (Park et al., 2001b)。これらの菌を用いて microcystin 分解細菌の動態を明らかにし、microcystin 分解機構を詳細に解明することができれば、水源地におけるアオコ毒素の処理に用いられる分解・除去方法にその知見を応用することが期待される。

アオコ発生の防止対策

アオコ発生の防止は、その発生原因となっている湖外から流入する栄養塩としての窒素、リンの削減が基本である。諏訪湖でも、他の水域でも湖沼への負荷発生源へ

Fig. 8. Dynamics and interaction of microcystin in a lake ecosystem.

の対策がもっとも主要なものとして行われており、適切な手段と言える。しかし、その効果は投資の割には上がっていないのも確かである。その理由は湖沼生態系が流入したものを蓄積し、再利用する機能を持っていることによる。特に、底泥への栄養成分の蓄積は一度人為的に富栄養化した湖沼の回復を遅らせる原因の一つとなっている。しかし、だからと言って闇雲に湖沼の底泥を全面的に浚渫、除去するような対策が適切とは言えない。

現状の湖沼を見ると、特に日本の多くの湖沼では沿岸部の人工化が進み、本来の湖沼の景観となっていた水生植物帯が欠損している場合が多いことに気がつくはずである。自然の状態での富栄養化の場合には、湖沼が浅くなるにつれて沿岸域への水生植物の侵入が起こり、植物プランクトンによる水の華現象は見られないのが普通である。水の華現象が見られるのは水生植物が少ない、開水面の広い池のような状態である。むしろ、水生植物の存在は植物プランクトンの発生を制御している例が多い。その内容としては湖外から流入する栄養塩を沿岸域で吸収し、沖合へ直接流入させない、陸域と沖合との緩衝域としての役割、水生植物から出される物質によるアレロパシーなどが挙げられている。

このような観点からすれば、アオコ発生の防止には湖沼沿岸域を富栄養湖としての正常な状態に修復することが、日本の場合にはまずは必要と言えよう。最近湖沼沿岸域の重要性についても量的な評価が行われるようになり、その修復工事も事業化されるようになった。もっとも人工的に改変され、アオコ発生を助長していた諏訪湖でも沿岸域の修復が実行に移されている。アオコ発生の機構とは直接関係がないようにみえる沿岸域の修復が、実はアオコの発生に大きく関係していたことを理解する必要がある。同様に、集水域からの栄養塩類の流入には山地の人為的な開発が大きく関係しており、アオコ発生の防止には水源地の森林、河川の河畔林の保全も重要な対策であることを認識することが必要である。

文 献

- Ahlgren, G. (1985): Growth of *Oscillatoria agardhii* in chemostat culture 3. Simultaneous limitation of nitrogen and phosphorus. *British Phycological Journal*, 20: 249-161.
- Amemiya Y., T. Okino and O. Nakamura (1990): Factors possibly affecting dominance of *Microcystis aeruginosa* species. *Japanese Journal of Limnology*, 51: 9-13.
- Amorim, A. and V. Vasconcelos (1999): Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 37: 1041-1052.
- Andersen, R. J., H.A. Luu, D.Z.X. Chen, C.F.B. Holmes, M.L. Kent, M.L. Blanc, F.J.R. 'Max' Taylor and D.E. Williams (1993): Chemical and biological evidence links microcystins to salmon 'netpen liver disease'. *Toxicon* 31: 1315-1323.
- Azevedo, S.M.F.O., W.R. Evans, W.W. Carmichael and M. Namikoshi (1994): First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 6: 261-265.
- Beattie, K.A., K. Kaya, T. Sano and G.A. Codd (1998): Three dehydrobutyryne (Dhb)-containing microcystins from cyanobacterium *Nostoc* sp.. *Phytochemistry*, 47: 1289-1292.
- Botes, D.P., A.A. Tuinman, P.L. Wessels, C.C. Vijoen, H. Kruger, D.H. Williams, S. Santikarn, R.J. Smoth, and S.J. Hammond (1984): The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *J. Chem. Soc. Perkin Transactions*, 1: 2311-2318.
- Botes, D.P., P.L. Wessels, H. Kruger, M.T.C. Runnegar, S. Santikarn, R.J. Smith, J.C.J. Barna, and D.H. Williams (1985): Structural studies on cyanoginosins -LR, -YR, -YA and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*, *J. Chem. Soc. Perkin Transactions*, 1: 2747-2448.
- Bourne, D.G., G.J. Jones, R.L. Blakeley, A. Jones, A.P. Negri and P. Riddles (1996): Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4086-4094.
- Brittain, S., Z.A. Mohamed, J. Wang, V.K.B. Lehmann, W.W. Carmichael and K.L. Rinehart (2000): Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. *Toxicon*, 38:1759-1771.
- Carmichael, W.W. (1992): Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins, *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 445-459.
- Delaney, J.M. and R.M. Wilkins (1995): Toxicity of microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. *Toxicon*, 33: 771-778.
- DeMott, W.R., Q.-X. Zhang and W.W. Carmichael (1991): Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 36: 1346-1357.
- Eriksson, J.E., J.A.O. Meriluoto and T. Lindholm

- (1989): Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the fresh-water mussel *Anodonta cygnea*. *Hydrobiologia*, 183, 211-216.
- Falconer, I.R., M.D. Burch, D.A. Steffensen, M. Choice and O.R. Coverdale (1994): Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pig, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9: 131-139.
- Fawell, J.K., C.P. James and H.A. James (1994): Toxic from blue-green algae: Toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water. Water research center, Medmenham, UK, 1-46.
- Francis, G. (1878): Poisonous Australian lake. *Nature* (London), 18: 11-12.
- Gathercole, P.S. and P.G. Thiel (1987): Liquid chromatographic determination of the cyanoginsins, toxins produced by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Chromatography*, 408: 435-440.
- Gerloff, G.C., G.P. Fitzgerald and F. Skoog (1952): The mineral nutrition of *Microcystis aeruginosa*. *American Journal of Botany*, 39: 26-39.
- Gerloff, G.C. and F. Skoog (1957): Availability of iron and manganese in southern Wisconsin Lakes for the growth of *Microcystis aeruginosa*. *Ecology*, 35: 348-353.
- Harada, K.-I., K. Matsuura, M. Suzuki, H. Oka, M.F. Watanabe, S. Oishi, A. Dahlem, V.R. Beasley and W.W. Carmichael (1988): Chemical analysis of toxic peptides produced by cyanobacteria. *Journal of Chromatography*, 448: 275-238.
- Harada, K.-I., K. Matsuura, M. Suzuki, M.F. Watanabe, S. Oishi, A.M. Dahlem, V.R. Beasley and W.W. Carmichael (1990): Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins-LR and -RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon*, 28: 55-64.
- Harada, K.-I., Ogawa, K., Matsuura, K., Nagai, H., Murata, H., Suzuki, M., Itezono, Y., Nakayama, N., Shirai, M., Nakano, M., (1991): Isolation of two toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon* 29: 479-489.
- Jacoby J.M., D.C. Collier, E.B. Welch, F.J. Hardy and M. Crayton (2000): Environmental factors associated with a toxic bloom of *Microcystis aeruginosa*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 231-240.
- Jochimsen, E.M., W.W. Carmichael, J. An, D.M. Cardo, S.T. Cookson, C.E.M. Holmes, B.C. Antunes, D.A.M. Filho, T.M. Lyra, V.S.T. Barreto, S.M.F.O. Azevedo and W.R. Jarvis (1998): Liver failure and death after exposure to microcystins at hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, 338: 873-878.
- Kiviranta, J., M. Namikoshi, K. Sivonen, W.R. Evans, W.W. Carmichael and K.L. Rinehart (1992): Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. *Toxicon* 30: 1093-1098.
- Kiviranta, J., K. Sivonen and S.I. Niemelä (1991): Detection and toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 423-426.
- Komárek, J. (1958): Die taxonomische revision der planktischen Blaualgen der Tschechoslowakei, p. 10-206. In J. Komárek and H. Ettl (eds.), *Algologische Studien*. Nakl. Cechoslov.
- Komárek, J. (1991): A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. *Archiv Hydrobiology, Supplement* 64, *Algological Studies*, 64: 115-127.
- Kós P., G. Gorzo, G. Suranyi and G. Borbely (1995): Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry*, 225: 49-53.
- Kotak, B.G., R.W. Zurawell, E.E. Prepas and C.F.B. Holmes (1996): Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 1974-1985.
- Krishnamurthy, T., L. Szafraniec, D.F. Hunt, J. Shabanowitz, J.R. Yates, C.R. Hauer, W.W. Carmichael, O. Skulberg, G.A. Codd and S. Missler (1989): Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 86: 770-774.
- Kusumi, T., T. Ooi, M.M. Watanabe, H. Takahashi and H. Kakisawa (1987): Cyanoviridin RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis viridis*. *Tetrahedron Letter*, 26: 4695-4698.
- Laurén-Määttä, C., J. Hietala, M. Reinikainen and M. Walls (1995): Do *Microcystis aeruginosa* toxins accumulate in the food web: a laboratory study. *Hydrobiologia*, 304: 23-27.
- Lee, S.J., M.-H. Jang, H.S. Kim, B.-D. Yoon and H.-M. Oh (2000): Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 323-329.
- Lee, T.-H., Y.-M. Chen and H.-N. Chou (1999):

- Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. *Acta Zoologica Taiwanica*, 10: 1-8.
- Lindholm, T., J.E. Eriksson and J.A.O. Meriluoto (1989): Toxic cyanobacteria and water quality problems - examples from a eutrophic lake on Åland, south west Finland. *Water Research*, 23: 481-486.
- Lirås, V., M. Lindberg, P. Nystrom, H. Annadotter, L.A. Lawton and B. Graf (1998): Can ingested cyanobacteria be harmful to the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*)?. *Freshwater Biology*, 39: 233-242.
- Long, B.M., G.J. Jones and P.T. Orr (2001): Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 278-283.
- Luukkainen, R., K. Sivonen, M. Namikoshi, M. Färdig, K.L. Rinehart and S.I. Niemelä (1993): Isolation and identification of eight microcystins from 13 *Oscillatoria agardhii* strains: structure of a new microcystin. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2204-2209.
- Matsunaga, H., K.-I. Harada, M. Senma, Y. Ito, N. Yasuda, S. Ushida and Y. Kimura (1999): Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinimiya, Japan: Sudden appearance of toxic cyanobacteria. *Natural Toxins*, 7:81-84.
- Meriluoto, J.A.O., Sandström, A., Eriksson, J.E., Remand, G., Craig, A.G., Chattopadhyaya, J., (1989): Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Toxicon* 24, 1021-1034.
- Miura, G.A., N.A. Robinson, W.B. Lawrence and J.G. Pace (1991): Hepatotoxicity of microcystin LR in fed and fasted rat. *Toxicon*, 29: 337-346.
- Nakamoto, N. and T. Okino (1972): Activity of phytoplankton excreted by fish. *Bulletin of The Plankton Society of Japan*, 19: 1-4.
- Namikoshi, M., K.L. Rinehart, R. Sakai, K. Sivonen and W.W. Carmichael (1990): Structures of three new cyclic hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green algae) *Nostoc* sp. Strain 152. *Journal of Organic Chemistry*, 55: 6135-6139.
- Namikoshi, M., Rinehart, K.L., Sakai, R., Stotts, R.R., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W., Evans, W.R., (1992): Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins *Journal of Organic Chemistry*, 57: 866-872.
- Namikoshi, M., B.W. Choi, R. Sakai, F. Sun, K.L. Rinehart, W.W. Carmichael, W.R. Evans P. Cruz, M.H.G. Munro and J.W. Blunt (1994): New nodularins, A general method for structure assignment. *Journal of Organic Chemistry*, 59: 2349-2357.
- Namikoshi, M., Yuan, M., Sivonen, K., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., Rouhiainen, L., Sun, F., Brittain, S., Otsuki, A., (1998): Seven new microcystins possessing two L-glutamic acid units, isolated from *Anabaena* sp. strain 186. *Chemical Research of Toxicology*, 11: 143-149.
- 岡田光正・須藤隆一 (1980): 藻類増殖とリン. 用水と廃水, 22: 891-906.
- Okino, T. (1973): Studies on the blooming of *Microcystis aeruginosa* I. *Japanese Journal of Botany*, 20: 381-402.
- Okino, T. (1990): Present study of lake environment in Shinshu, Water management and monitoring of Lake Suwa, *Japanese Journal of Limnology*, 51(1): 17-22.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto and M.M. Watanabe (1998): 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerthrin. *FEMS Microbiology Letters*, 164: 119-124.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto and M.M. Watanabe (1999): Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 172: 15-21.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, S. Matsumoto and M.M. Watanabe (2000): Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *Journal of Genetics and Applied Microbiology*, 46: 39-50.
- Park, H.-D., M.F. Watanabe, K.-I. Harada, M. Suzuki, H. Hayashi and T. Okino (1993a): Seasonal variations of *Microcystis* species and toxic heptapeptide microcystins in Lake Suwa. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8: 425-435.
- Park, H.-D., M. F. Watanabe, K.-I. Harada, H. Nagai, M. Suzuki, M. Watanabe and H. Hayashi (1993b): Hepatotoxin (Microcystin) and neurotoxin (Anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters, *Natural toxins*, 1: 353-360.
- 朴虎東・林秀剛 (1996): *Microcystis* 属とミクロシチン. アオコその出現と毒素, 渡辺真利代・原田健一・藤木博太 (編): 75-99. 東京大学出版会, 東京.
- Park, H.-D., C. Iwami, M. F. Watanabe, K.-I. Harada, T. Okino and H. Hayashi (1998a): Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-

- 1994). Environmental Toxicology and Water Quality, 13: 61-72.
- Park, H.-D., B. Kim, E. Kim and T. Okino (1998b): Hepatotoxin microcystins and neurotoxic anatoxins in cyanobacterial blooms from Korean lakes. Environmental Toxicology and Water Quality, 13: 225-234.
- Park, H.-D., M. Namikoshi, S.M. Brittain, W.W. Carmichael and T. Murphy (2001a): [D-Leu¹] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. Toxicon, 39: 855-862.
- Park, H.-D., Y. Sasaki, T. Maruyama, E. Yanagisawa, A. Hiraishi and K. Kato (2001b): Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. Environmental Toxicology, 16(4): (in press).
- Prepas, E.E., B.B.G. Kotak, L.M. Campbell, J.C. Evans, S.E. Hrudey and C.F.B. Holmes (1997): Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54: 41-46.
- Reynolds, C. S. and A. E. Walsby (1975): Water-Blooms. Biological Reviews, 50: 437-481.
- Rinehart, K.L., M. Namikoshi and B.W. Choi (1994): Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). Journal of Applied Phycology, 6: 159-176.
- Rohrlack, T., E. Dittmann, M. Henning, T. Borner and J.-G. Kohl (1999): Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium. Applied Environmental Microbiology, 65: 737-739.
- Sano, T. and K. Kaya (1995): A 2-amino-2-butenic acid (Dhb)-containing microcystin isolated from *Oscillatoria agardhii*. Tetrahedron Letters, 36: 8603-8606.
- Sano, T. and K. Kaya (1998): Two new (E)-2-amino-2-butenic acid (Dhb)-containing microcystins isolated from *Oscillatoria agardhii*. Tetrahedron Letters, 54: 463-470.
- Sivonen, K., K. Himberg, R. Luukkainen, S. I. Niemela, G. K. Poon, and G. A. Codd (1989): Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland, Toxicity Assessment, 4: 339-352.
- Sivonen, K., M. Namikoshi, W.R. Evans, M. Färdig, W.W. Carmichael and K.L. Rinehart (1992): Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, from *Nostoc* sp. strain 152. Chemical Research of Toxicology, 5: 464-469.
- Sivonen, K. and G.J. Jones (1999): Cyanobacterial toxins. In Toxic cyanobacteria in water-A guide to their public health consequences, monitoring and management, I. Chorus and J. Bartram (eds.): 41-111. E & FN Spon, London and New York.
- Skulberg, O.M., G.A. Codd and W.W. Carmichael (1984): Toxic blue-green algae blooms in Europe. A growing problem, Ambio, 13: 244-247.
- Smith, V.H. (1983): Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. Science, 221: 669-671.
- Stoner, R.D., W.H. Adams, D.N. Slatkin and H.W. Siegelman (1989): The effects of single L-amino acid substitutions on the lethal potencies of the microcystin. Toxicon, 27: 825-828.
- Sugaya, Y., M. Yasuno and T. Yanai (1990): Effects of toxic *Microcystis viridis* and isolated toxins on goldfish. Japanese Journal of Limnology, 51: 149-153.
- Takahashi, S. and K. Kaya (1993): Quail spleen is enlarged by microcystin RR as a blue-green algal hepatotoxin. Natural toxins, 1: 283-285.
- Takamura N., A. Otsuki, M. Aizaki and Y. Nojiri (1992): Phytoplankton species shift accompanied with transition from nitrogen dependence to phosphorus dependence of primary production in Lake Kasumigaura, Japan. Archiv Hydrobiology, 124: 129-148.
- Thøstrup, L. and K. Christoffersen (1999): Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*. Archiv Hydrobiology, 145: 447-467.
- Vasconcelos, V.M. (1995): Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology, 32: 227-237.
- Watanabe, M.F. and S. Oishi (1980): Toxicities of *Microcystis aeruginosa* collected from some lakes, reservoirs, ponds and a moat in Tokyo and adjacent regions, Japanese Journal of Limnology, 41: 5-9.
- Watanabe, M.F., K.-I. Harada, K. Matsuura, H. Kawai and M. Suzuki (1989): Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species. Toxicity Assessment, 4: 487-497.
- Watanabe, M.F., H.-D. Park, F. Kondo, K.-I. Harada, H. Hayashi and T. Okino (1997): Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. Natural Toxins, 5: 31-35.
- 渡辺眞之 (1996): 水の華をつくる藍藻. アオコその出現と毒素, 渡辺真利代・原田健一・藤木博太 (編): 25-53. 東京大学出版会, 東京.
- Watanabe, M.M., K. Kaya and N. Takamura (1992): Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (cyanobacteria) in a hypertrophic lake. Journal of Phycology, 28: 761-767.

- WHO (1998): Guidelines for drinking water quality, Second edition, addendum to volume 2, Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva.
- Williams, D.E., M. Craig, S.C. Dawe, M.L. Kent, C.F.B. Holmes and R.J. Andersen (1997a): Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and dungeness crab larvae. *Chemical Research of Toxicology*, 10: 463-469.
- Williams, D.E., S.C. Dawe, M.L. Kent, R.J. Andersen, M. Craig and C.F.B. Holmes (1997b): Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and *in vivo* evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon*, 35: 1617-1625.
- Yamamoto, Y., S. Nizuma, N. Kuroda and M. Sakamoto (1993): Occurrence of heterotrophic bacteria causing lysis of cyanobacteria in a eutrophic lake. *Japanese Journal of Phycology*, 41: 215-220.
- 山本鎔子 (1998): アオコを溶解する微生物. *海洋と生物*, 115: 117-124.
- Yasuno, M. and Y. Sugaya (1991) Toxicities of *Microcystis viridis* and the isolated hepatotoxic polypeptides on cladocerans. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 24: 2622-2626.
- Zurawell, R.W., B.G. Kotak and E.E. Prepas (1999): Influence of lake trophic status on the occurrence of microcystin-LR in the tissue of pulmonate snails. *Freshwater Biology*, 42: 707-718.

朴 虎東: 〒390-8621 松本市旭3-1-1, 信州大学理学部
物質循環学科

横山淳史: 〒390-8621 松本市旭3-1-1, 信州大学理学部
物質循環学科

沖野外輝夫: 〒390-8621 松本市旭3-1-1, 信州大学理学部
物質循環学科

(受付: 2001年5月18日; 受理: 2001年7月2日)

Fate of microcystin in Lake Suwa

Ho-Dong PARK, Atsushi YOKOYAMA and Tokio OKINO

Department of Environmental Sciences, Faculty of Science,
Shinshu University, Matsumoto 390-8621, Japan

Abstract

The fate of microcystin in the aquatic ecosystem has been investigated by many researchers throughout the world. Possible pathways of microcystins in Lake Suwa were studied from five perspectives: production, adsorption, physiochemical decomposition, bioaccumulation and biodegradation. Temporal variability in the concentration of microcystin was investigated during the warm seasons of eight years (1991-1998) in the lake. High concentrations of intracellular microcystin were found during the exponential growth phase of the blooms, whereas concentrations of extracellular microcystin were highest at the end of the blooms. However, concentrations of extracellular microcystin remained very low compared to the levels of intracellular microcystin. The relatively high percentages of microcystin in filtered lake water at the end of blooms suggests that the release of microcystin from cells occurs during senescence and the decomposition period of *Microcystis* cells.

Freshwater unionid bivalves, *Anodonta woodiana*, *Cristaria plicata* and *Unio douglasiae*, bioaccumulated the microcystins into mussels in the lake. Microcystins were detected in the hepatopancreas (53% of total microcystin in the mussel), gill and muscle (34%), gonad (6%) and gut (7%) of *U. douglasiae*. The maximum concentration of microcystin in the hepatopancreas of bivalves, was 12.6 (*A. woodiana*), 297 (*C. plicata*), and 420 (*U. douglasiae*) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight, respectively. A bacterium, a new species or even a new genus capable of degrading microcystins-RR, -YR and -LR, was isolated from the lake. When the bacterium was added to microcystins present in a culture medium, the microcystins were degraded thoroughly in a few days. The degradation rate was strongly dependent on temperature the maximum rate was at 30°C.

The presence of a cyanobacterial toxin can be a potential threat, and therefore water treatment requires more attention. A complete understanding of the mechanism of microcystin degradation in the ecosystems requires more intensive study, including a quantitative enumeration of microcystin-degrading bacteria. This should be done in conjunction with a study on the microbial ecological mechanism of the degradation of cyanobacteria itself.

Key words: Lake Suwa, microcystin, fate of microcystin, cyanotoxin

E-mail (H.-D. Park): pparkhd@gipac.shinshu-u.ac.jp