原著 [Original article]

ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) における藍藻毒素 microcystin の蓄積とその毒素が天竜川生態系に及ぼす影響

片上 幸美¹⁾・田中 俊行¹⁾・本間 隆満¹⁾・横山 淳史¹⁾・朴 虎東¹⁾

Bioaccumulation of a cyanobacterial toxin, microcystin, on *Stenopsyche marmorata* and the ecological implications for its impact on the ecosystem of the Tenryu River, Japan

Yukimi KATAGAMI¹⁾, Toshiyuki TANAKA¹⁾, Takamitsu HONMA¹⁾, Atsushi YOKOYAMA¹⁾
and Ho-Dong PARK¹⁾

Abstract

The upstream region of the Tenryu River (the outflow river of the hypertrophic lake Lake Suwa) has the world's largest population of the net-spinning caddisfly, *Stenopsyche marmorata*. The river water often contains huge amounts of the toxic cyanobacteria *Microcystis* and hepatotoxin microcystin that originate from the lake during spring- to -autumn blooms. The seasonal changes in microcystin concentrations in *S. marmorata* larvae from the river and the bioaccumulation and depuration of microcystin in *S. marmorata* were investigated. The toxic contents of the larvae correlated with the toxicity of volatile suspended solids in the river water. The younger larvae of *S. marmorata* contained higher concentrations of microcystin than the older ones. This tendency is probably caused by the differences in their food preferences. The prepupae, pupae and adults of *S. marmorata* showed only low levels of microcystin. Furthermore, the results of excretion experiments suggested that microcystin remained in *S. marmorata* tissues throughout the experimental period. These findings indicate that *S. marmorata* is a vector of microcystin in the river ecosystem, and that there is the potential for a transition of the cyanobacterial toxin to higher levels in the aquatic food chain and terrestrial habitat.

Key words : aquatic insect, *Stenopsyche marmorata*, microcystin, bioaccumulation, depuration

摘 要

富栄養湖である諏訪湖に端を発する天竜川の上流域では、造網性トビケラ的一种、ヒゲナガカワトビケラ *Stenopsyche marmorata* が多数生息している。春から秋にかけて諏訪湖で発生した有毒藍藻の *Microcystis* や、その細胞に含まれる肝臓毒 microcystin が大量に天竜川に流下することがある。天竜川に生息するヒゲナガカワトビケラ幼虫の microcystin 濃度の季節変化と、ヒゲナガカワトビケラからの microcystin の排出について研究を行った。幼虫の microcystin 含有量は、河川水に含まれる有機懸濁物質中の microcystin 濃度と相関を示した。また若齢個体ほど microcystin 含有量が高い傾向が見られた。これは幼虫の成長に伴う食性の変化と関係していると考えられる。さらに前蛹、蛹、成虫からも低濃度ながら microcystin が検出された。Microcystin 排出実験では、5 日間 microcystin が幼虫の組織内に残留した。これらの結果は河川生態系においてヒゲナガカワトビケラが microcystin のベクターとなり、さらに陸上生態系へも microcystin が移行する可能性を示唆している。

キーワード：水生昆虫、ヒゲナガカワトビケラ、microcystin、蓄積、排出

(2003年8月14日受付；2003年12月14日受理)

¹⁾ 信州大学理学部物質循環学科 〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1. Department of Environmental Sciences, Faculty of Science, Shinshu University, Matsumoto 390-8621, Japan (E-mail: pparkhd@gipac.shinshu-u.ac.jp)

はじめに

富栄養化が進行した湖沼では、夏季を中心に藍藻の異常発生現象“アオコ”が観察されることがある（朴ら，2001）。アオコを形成する藍藻の中には肝臓毒や神経毒を産生するものがあり、藍藻毒による家畜や野生生物の斃死といった被害が世界各地で報告されている（Steffensen et al., 1999）。藍藻毒 microcystin は主に *Microcystis* 属によって生産される肝臓毒である（Carmichael, 1992）。日本でも1995年に兵庫県西宮市で microcystin が原因と思われるカモの大量死（約20羽）が報告されている（Matsunaga et al., 1999）。1996年にブラジルの人工透析センターで透析患者 50 名の死亡事故が起こった。この事故原因として、透析に使用された水が microcystin に汚染されていた可能性が指摘されている（Jochimsen et al., 1998）。また、microcystin は発ガンプロモーターとしての作用を示すことが知られている（Nishiwaki-Matsushima et al., 1991; Nishiwaki-Matsushima et al., 1992）。中国ハイメン市では原発性肝臓ガンが多発しており、その原因について Ueno et al. (1996) や Harada et al. (1996) は *Microcystis* に汚染された水路の水を長期間にわたって飲用したことによる慢性毒性の可能性のあることを指摘した。水産資源の藍藻毒汚染に関する情報も世界各地から報告されている（Lirás et al., 1998; Vasconcelos, 1999; Magalhães et al., 2001; Sipä et al., 2001a, b; Zimba et al., 2001）。以上のことから、microcystin の水道水への混入や、水産資源に microcystin が移行することが懸念されている（Pitois et al., 2000; Van Buynder et al., 2001）。また藍藻毒は食物連鎖を通して高次消費者に移行していくことが示唆されており（Lauren-Määtä et al., 1995; Engström-Öst et al., 2002），高次消費者に被害を及ぼす可能性がある。カナダの Nanaimo 沿岸域では、タイセイヨウサケ *Salmo salar* の養殖が行われているが、この地域では Netpen Liver Disease (NLD) という肝臓障害によるサケの被害が深刻化しており、NLD に罹患したサケから microcystin が検出されている（Andersen et al., 1993）。Williams et al. (1997a) は、養魚場に生息しているアメリカイチョウガニ *Cancer magister* の幼生が microcystin のベクターとなり、このカニ幼生をサケが摂食することによってNLDを発症すると考察している。

本研究の対象である天竜川は、本州中部に位置する諏訪湖からの流出河川である。水源である諏訪湖はわが国の代表的な富栄養湖であり、夏季に藍藻 *Microcystis* 属の大量発生（ブルーム）が見られる（Park et al., 1993）。こ

の時期には湖水や水中懸濁物質（Suspended solids: SS）から高濃度の microcystin が検出され（Watanabe et al., 1989; Park et al., 1993, 1998），二枚貝に microcystin が蓄積することが確認されている（Watanabe et al., 1997; Yokoyama and Park, 2002）。天竜川においても、夏季には諏訪湖の流出口である釜口水門からの放流水中に大量の *Microcystis* 細胞が含まれ、河川水から *Microcystis* 細胞および microcystin が検出されている（Kim et al., 2001a; 片上ら，2003）。

天竜川上流部ではかつて、ウルマーシマトビケラ *Hydropsyche orientalis* が優占していたが（小松，1974），現在ではヒゲナガカワトビケラ *Stenopsyche marmorata* が圧倒的に優占している（天竜川上流工事事務所，1991）。西村ら（2001）が行った西日本各地の河川における調査結果と比べると、その個体群密度は非常に高く、天竜川上流域の河川生態系におけるヒゲナガカワトビケラの重要性がうかがわれる。ヒゲナガカワトビケラはトビケラ目ヒゲナガカワトビケラ科に属する昆虫で、日本産のトビケラのなかでは大型の部類に属する。幼虫は水中の石面に固着巣を作り、捕獲網を張って上流から流れてきた藻類などを捕食している。天竜川では *Microcystis* が諏訪湖から流下していることから、ヒゲナガカワトビケラが捕獲網にかかった *Microcystis* を摂食し体内に microcystin を取り込んでいる可能性が高い。しかし、水生昆虫における microcystin の蓄積に関する研究はきわめて少なく、蓄積例も報告されていない（Kotak et al., 1996; 朴ら，2001）。また天竜川上流域では水生昆虫を採取し、佃煮にして食する文化がある（鳥居，1957）。食品の安全性という点からも、ヒゲナガカワトビケラを研究対象とすることは重要である。本研究は、ヒゲナガカワトビケラの microcystin 蓄積の有無とその動態を解析することを目的として行われた。

材料と方法

天竜川の概要と試料採集

天竜川は、諏訪湖を起点とし遠州灘へと流入する全長 213 km の一級河川である。河床勾配は源流から河口までほぼ一定しており、上流域においても平均河床勾配の値に近い 1/250 である。上流域の生態的区分から見た河川形態は Bb 型（中流型）に属し、淵→早瀬→平瀬→淵と連続する河床形態が安定してみられる（浜，1999）。試料の採集は、諏訪湖から約 9 km 下流の地点（St. A）において行った（Fig. 1）。

Fig.1. Map of Tenryu River showing *Stenopsyche marmorata* sampling site.

図1. 天竜川におけるヒゲナガカワトビケラ採集地。

1999年4月, 6月から2000年10月にかけて, 月1回または2回採集した。1999年4月, 6月から11月までは, 河床に生息する5齢幼虫を採集し microcystin 含有量の分析に用いた。1999年12月から2000年10月にかけては水温を測定し, 25×25 cmのサーバーネット (NGG40, mesh size 471 μm, 離合社) を用いて, 早瀬及び平瀬の任意の3~8箇所において幼虫, 前蛹および蛹をすべて採集し, 個体群密度, 年齢組成および microcystin 含有量を調べた。幼虫の年齢は頭長を測定して推定した (御勢, 1970)。

1999年12月から2000年10月にかけては, ヒゲナガカワトビケラの採集と同時に河川水を採取した。100 mLのポリビンに採水し, 現地に直ちにホルムアルデヒドを最終濃度2%になるように添加・固定し, *Microcystis* 細胞数の計数に用いた。また河川水を実験室に持ち帰り, 水中懸濁物質 (SS), 灼熱減量 (Volatile suspended solids : VSS) の測定および microcystin の分析に用いた。

Microcystis 細胞数および SS, VSS の計測

ホルマリン固定試料について, 光学顕微鏡 (OBH-2, Olympus, Japan) 下で血球計数板 (Fuchs-Rosenthal) を用いて *Microcystis* 細胞数を計数した。SS は, あらかじめ

450℃の電気炉中で30分間乾燥させ秤量したガラス繊維濾紙 (GF/C, Whatman, UK) を用いて試水をろ過し, 70℃で48時間乾燥させた後, 再び秤量し, ろ過前後の重量差から算出した。VSS は, SS の測定に用いた GF/C を520℃の電気炉中で15分間焼き, 再度秤量して重量減少分から算出した。

河川水および VSS 中の microcystin 濃度の定量

試水を GF/C で適量ろ過し凍結乾燥させた後, 5%酢酸を加えて GF/C ごとガラス乳鉢を用いてすりつぶした。スターラーで30分間攪拌しながら抽出した後, 4,000 rpm で20分間遠心分離し上清を採取した。この抽出作業を3回繰り返し, 採取した上清をメタノール10 mL と蒸留水10 mL で前処理した ODS (octadecylsilane; C₁₈) カートリッジ (500 mg, Bakerbond SPE 7020-03, J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) に添加した。蒸留水10 mL と20%メタノール15 mL で洗浄した後, 0.1% TFA メタノール20 mL で microcystin をカートリッジから溶出させた。この溶出液をロータリーエヴァポレーターを用いて減圧濃縮させ, 得られた残渣を5 mL のメタノールに溶解させメタノール10 mL で前処理したシリカゲルカートリッジ (Silica plus 0.69 g, Sep-Pak, Waters, Milford, MA, USA) に添加しクリーンアップを行った。15 mL のメタノールで洗浄した後20 mL の70%メタノールで溶出させ, 溶出液をエヴァポレーターで再び減圧濃縮させた。この残渣をメタノールに溶解させたものを高速液体クロマトグラフィー (島津高速液体クロマトグラフィー LC-9A S-I システム) に5 μL 注入し microcystin を定量した。分析条件は, カラム Cosmosil 5C₁₈-AR 150 × 4.6 mm, 移動相はメタノール : 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 3) = 58 : 42, 流速 1 mL min⁻¹, 検出器はフォトダイオードアレイで検出波長は238 nm である。定量結果から河川水1 Lあたりの microcystin 濃度および VSS 1 gあたりの microcystin 量を算出した (Park et al., 1998)。

ヒゲナガカワトビケラの microcystin 含有量の定量

採集したヒゲナガカワトビケラを生きたまま実験室に持ち帰り, 凍結乾燥させて乾重量を測定した後, ガラス乳鉢を用いてすりつぶした。試料 (0.2 g) に1-ブタノール : メタノール : 蒸留水 (1 : 4 : 15) の混合溶媒を加え24時間攪拌して microcystin を抽出し, 18,000 rpm で1時間遠心分離し上清を採取した。この抽出作業を3回繰り返し, 採取した抽出液をメタノール50 mL と蒸留水50 mL で前処理した ODS シリカゲルカートリッジ (5 g,

Chromatorex ODS, Fuji Silysia Chemical) に添加し蒸留水 50 mL と 20 % メタノール 100 mL で洗浄後, 90 % メタノール 100 mL により microcystin を溶出させた。この溶出液をエヴァポレーターで減圧濃縮し, 得られた残渣を再び 5 mL のメタノールに溶解させ, シリカゲルカートリッジ (2 g, Sep-Pak, Waters, Milford, MA, USA) を用いて前述と同様の方法でクリーンアップし, 高速液体クロマトグラフィーに注入し microcystin を定量した (Yokoyama and Park, 2002)。分析条件は前述と同様である。

5 齢幼虫の消化管内容物排泄実験および microcystin 排出実験

ヒゲナガカワトビケラの組織内に蓄積された microcystin を評価するためには, 消化管内容物に由来する microcystin を除外しなければならない。そこで幼虫の消化管内容物がすべて排泄され空胃になるまでの時間を調べた。消化管内容物排泄実験は, 1999 年 12 月 17 日に採集した 5 齢幼虫を用いた。脱塩素処理した水道水を満たしたプラスチックバットに 5 齢幼虫を 15 個体入れ, エアレーションしながら 4 日間絶食飼育した。飼育水は毎日取り替え, 秤量済みの GF/C を用いて飼育水をろ過し, GF/C を凍結乾燥し排泄物の重量を求めた。

ヒゲナガカワトビケラにおける microcystin の残留性を確認するため, microcystin 排出実験を 2000 年 8 月と 9 月の 2 回行った。2000 年 8 月 18 日に採集した 5 齢幼虫を前述と同様にプラスチックバットに入れ実験を行った。実験期間の 8 日間, 幼虫を絶食飼育し, 実験開始から 1, 3, 5, 8 日後に 4 ~ 6 個体の幼虫を任意に取って凍結乾燥し, 前述と同様の方法で microcystin 含有量を測定した。飼育水は毎日取り替えた。同様の実験を 9 月 22 日にも行い, 実験開始時から 3 日間, 幼虫を絶食飼育し, 実験開始から 1, 3 日後の microcystin 含有量を測定した。

結 果

河川水中の SS および VSS 量

2000 年 6 月から 10 月までの河川水中の SS および VSS 量を Table 1 に示す。SS 量は 8 月および 10 月に高くなったが, VSS 量は 8 月に 32.5 mg L^{-1} となった他は $3.3 \sim 9.2 \text{ mg L}^{-1}$ であった。SS 中の VSS の割合は 8 月に 89% と高く, 10 月は 36% に低下した。その他の時期は 50% 程度であった。

河川水中の *Microcystis* 細胞密度

1999 年 12 月から 2000 年 10 月までの河川水中の *Microcystis* 細胞密度を Fig. 2a に示す。1999 年 12 月から 2000 年 4 月までは河川水中に *Microcystis* 細胞は観察されなかった。5 月に入ると *Microcystis* が観察されるようになり, 7 月まで $0.5 \sim 1.3 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ で推移した。8 月になると急激に増加し, 観測期間中最高の $1.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ を記録した。9 月以降は減少し, 10 月には $1.6 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ となった。

河川水および VSS 中の microcystin 量

1999 年 12 月から 2000 年 10 月までの河川水および VSS 中の microcystin 量を Figs. 2b, 2c に示す。1999 年 12 月から 2000 年 5 月までは, 河川水から microcystin は検出されなかった。6 月に入ると $0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ 検出され, 7 月に一度減少したが, 8 月に入ってから急激に増加し, この年最高の $0.66 \mu\text{g L}^{-1}$ を記録した。9 月には $0.38 \mu\text{g L}^{-1}$ まで減少し, 10 月になるとさらに減少し $0.22 \mu\text{g L}^{-1}$ となった (Fig. 2b)。

VSS 中の microcystin は, 1999 年 12 月から 2000 年 5 月まで検出されず, 6 月に入ってから $26.0 \mu\text{g g}^{-1}$ 検出された (Fig. 2c)。この値は 7 月, 8 月, 10 月とほぼ同じであったが, 9 月は $48.4 \mu\text{g g}^{-1}$ で観測期間中最も高い値となった。

Table 1. Suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS) concentrations in the Tenryu River from June 16 to October 17, 2000.

表 1. 2000 年 6 月 16 日から 10 月 17 日までの天竜川における SS および VSS 量.

Date	SS	VSS	VSS/SS
	(mg L ⁻¹ River water)		(%)
16-Jun	12.4	5.8	47
18-Jul	6.8	3.3	49
18-Aug	36.7	32.5	89
22-Sep	13.4	7.9	59
17-Oct	25.9	9.2	36

ヒゲナガカワトビケラの個体群密度と年齢組成

1999年12月から2000年10月までのヒゲナガカワトビケラ（幼虫・前蛹・蛹）の個体群密度を Fig. 3a に示す。1999年12月から2000年3月までは $435 \sim 533 \text{ inds. m}^{-2}$ の個体群密度で推移した。4月には 344 inds. m^{-2} まで減少

Fig. 2. Seasonal changes in: (a) *Microcystis*, (b) microcystin concentrations in river water, and (c) concentrations in volatile suspended solids (VSS) at Tenryu River St. A from December 1999 to October 2000. ND: not detected.

図 2. 1999年12月から2000年10月にかけての天竜川 St.A における (a) *Microcystis*, (b) 水中 microcystin 濃度および (c) 灼熱減量 (VSS) 中の microcystin 濃度. ND: 検出限界以下.

したが、その後増加し7月には観測期間中最高値の $1,434 \text{ inds. m}^{-2}$ となった。8月になると 696 inds. m^{-2} に減少し、10月まで大きな変化なく推移した。各観測時のヒゲナガカワトビケラの年齢組成を Fig. 2b に示す。1999年12月には5齢幼虫が61%を占めていたが、その後次第に減少し、3月に入ると21%まで減少した。反対に前蛹の割合は12%に増加した。4月になると蛹の割合が28%に増加した。5月には、4月に大きな割合を占めていた蛹や4齢、3齢の幼虫が減少し、個体群はほぼ5齢幼虫(57%)と2齢幼虫(41%)で構成された。6月には4齢、3齢幼虫の割合が大きくなったが、7月、8月は再び5齢幼虫が50%近くを占めた。9月に入ると4月と同様に5齢幼虫の割合が減少し(26%)、蛹の割合が増加した(18%)。10月は4齢幼虫が大きな割合を占め、2齢幼虫の割合も増加した。蛹の出現時期や2齢幼虫の割合から、天竜川における羽化期は越冬世代で4月、非越冬世代で9月が中心であると考えられる。

5 齢幼虫の microcystin 含有量の季節変化

ヒゲナガカワトビケラ5齢幼虫の microcystin 含有量の季節変化を Fig. 4 に示す。1999年4月から microcystin が検出され、6月には $1.7 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ (dry weight: 乾燥重量) の microcystin が5齢幼虫に含有されていた。7月から9月にかけても検出され、その濃度は $4 \sim 6 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ で推移した。10月3日には観測期間中最高の $29.9 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ を記録した。10月13日には $4.6 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ まで減少し、11月に $2.3 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ となった後、12月には5齢幼虫からは検出されなくなった。Microcystin が検出されない状態は2000年の5月まで続いたが、6月に入ると再び検出されるようになり、8月まで $3 \sim 6 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ で推移した。9月になると、観測期間中2番目に高い $15.8 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ を記録したが、10月には $5.5 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ まで減少した。

ヒゲナガカワトビケラの各生長段階の microcystin 含有量

ヒゲナガカワトビケラの年齢別 microcystin 含有量を Table 2 に示す。6月16日の試料では、蛹、前蛹は $1 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ でほぼ同じ値であったが、5齢幼虫は $5.6 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ 、4齢幼虫は $10.1 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ 、3齢幼虫は $11.2 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ で、若齢の個体ほど含有量が高い傾向がみられた。この傾向は他の試料についても見られ、8月18日は4齢幼虫の方が5齢幼虫より約2倍含有量が高かった。9月22日も蛹で最も含有量が少なく ($1.1 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$)、5齢幼虫では $15.8 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ 、4齢幼虫では $25.7 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$

Fig. 3. Seasonal changes in *S. marmorata* population density (a) and each relative abundance of instars of *S. marmorata* (b) in Tenryu River site A. Values in parentheses are population densities (inds. m⁻²). * no standard deviation.

図 3. 天竜川St.Aにおけるヒゲナガカワトビケラの個体密度の季節変化 (a) および各々の齢組成 (b). カッコ内数字はヒゲナガカワトビケラ個体群密度 (inds. m⁻²) を示す. * 標準偏差なし.

Fig. 4. Seasonal changes in water temperature (solid circles) and microcystin concentrations (solid bars) in *S. marmorata* larvae (5th instar) collected from Tenryu River site A from June 16, 1999 to October 17, 2000. ND: not detected.

図 4. 水温 (折れ線グラフ) と天竜川 St.A において採集したヒゲナガカワトビケラ (5 齢幼虫) の microcystin 含有量 (棒グラフ) の季節変化. ND: 検出限界以下.

ヒゲナガカワトビケラにおける藍藻毒素 microcystin の蓄積

Table 2. Microcystin levels in *S. marmorata* (2000).

表 2. ヒゲナガカワトビケラの齢別 microcystin 含有量 (2000).

Date	Microcystin concentration ($\mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$)					
	3rd instar	4th instar	5th instar	prepupae	pupae	adult
16-Jun	11.2	10.1	5.6	1.0	1.1	
18-Aug		8.5	4.5			
31-Aug			2.8	0.67	0.48	0.51
22-Sep		25.7	15.8		2.2	

であった。

8月31日の試料では、蛹、前蛹、5齢幼虫の他に成虫の microcystin 含有量を測定した。成虫からは蛹、前蛹とほぼ同程度の $0.5 \mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$ の microcystin が検出された。また他の時期と同様に最も若齢であった5齢幼虫で含有量が最も高かった ($2.8 \mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$)。

5 齢幼虫の消化管内容物排泄実験および microcystin 排出実験

消化管内容物排泄実験に用いた実験個体の採集時の水温は 6.1°C であった。絶食飼育した15個体のヒゲナガカワトビケラ5齢幼虫から、0～24時間までに 4.66 mg 、24～48時間の間に 0.95 mg の排泄物が得られた。それ以降、排泄物は観察されなかった。実験開始時点で1個体当たり、 0.38 mg の消化管内容物量を保持していたことになる。

ヒゲナガカワトビケラ5齢幼虫の microcystin 排出実験の結果を Table 3 に示す。8月18日に開始した排出実験において、実験開始0日目の5齢幼虫の含有量は $4.5 \mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$ であった。1日後には $2.9 \mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$ まで減少し、

3日で90.2%の microcystin が排出されたが、実験開始から5日目まで検出された。8日目には検出限界以下になった。9月22日に開始した実験では3日目までしか測定していないが、実験終了時においても $3.6 \mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$ の microcystin を幼虫から検出した。

考 察

ヒゲナガカワトビケラ5齢幼虫の microcystin 含有量の季節変化

ヒゲナガカワトビケラ5齢幼虫の microcystin 含有量には大きな季節変化があり (Fig. 4), 主に夏季から秋季にかけて microcystin が検出された。1999年12月から2000年5月の越冬世代では検出されなかった。Fig. 2b をみると、河川水から microcystin が検出された2000年6月から10月は、幼虫から microcystin が検出された時期と一致していた。河川水と5齢幼虫の microcystin 濃度の相関は $r=0.56$ ($P<0.05$, $n=9$) であった。しかしながら、5齢幼虫の含有量と河川水中濃度の季節変化は単純に同調しておらず (Figs. 2b, 4), microcystin が検出された期間内に、一時的に幼虫体内の含有量が多くなる時期があった。例えば2000年9月22日の含有量は他の月の約3倍高かった (Fig. 4)。この要因として餌に含まれる microcystin 量の影響が指摘できる。VSS 中 microcystin 量と5齢幼虫の microcystin 濃度の相関は高く ($r=0.96$, $P<0.001$, $n=9$), 二枚貝と同様に (Yokoyama and Park, 2002), filter-feeder であるヒゲナガカワトビケラ幼虫においても、microcystin の蓄積濃度は餌粒子の毒素含有量に左右されることを示唆している。Yokoyama and Park (2002) は、filter-feeder (二枚貝) にとって餌粒子が十分に存在する環境下では、毒素の取り込み速度は餌粒子の毒素含有量に律速されると述べている。10月にはSS中のVSSの割合が低下したが (Table 1), これは秋季の天竜川の流量増加 (天竜川上流工事事務所, 1999; 片上ら,

Table 3. Depuration of microcystin from the 5th instar *S. marmorata* larvae during excretion experiments.

表 3. 排出実験期間におけるヒゲナガカワトビケラ5齢幼虫の microcystin 含有量.

Time (day)	Microcystin concentration ($\mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$)	
	18-25 Aug	22-25 Sep
0	4.5	15.8
1	2.9	7.4
3	0.44	3.6
5	0.10	
8	ND	

ND: not detected.

2003) によって河床の砂等が多く懸濁したためであり、その結果河川水中の懸濁有機物は相対的に減少したと考えられる。これは捕獲網による有機懸濁粒子の捕獲効率が低下することを意味する。しかしながら10月のVSS量(9.2 mg L^{-1})は8月に次いで多く、ヒゲナガカワトビケラは10月も十分な量の餌を確保できたと考えられる。したがって10月にヒゲナガカワトビケラのmicrocystin含有量が低下した原因は餌の減少ではなく、VSS中のmicrocystin量の低下によるものであると推定される。

ヒゲナガカワトビケラの生長段階によるmicrocystin含有量の違い

ヒゲナガカワトビケラに含有されるmicrocystin量は若齢幼虫ほど高かった (Table 2)。この要因として幼虫の成長に伴う食性と捕獲網のメッシュサイズの変化が挙げられる。西村 (1964) は、ヒゲナガカワトビケラ幼虫が捕獲網に捕獲されたデトリタス、珪藻、緑藻等を捕食しており、また偶然捕獲されたカゲロウ類やトビケラ類の若齢幼虫からなる動物質も摂食すると報告している。新名 (1995) は、ヒゲナガカワトビケラ 5 齢幼虫の消化管内容物組成がデトリタス 68.8%, 珪藻 4.2%, 糸状緑藻 2.0%, 動物質 24.9%であることを報告した。また新名 (1995) は、同じ造網性トビケラのウルマーシマトビケラでは、4 齢と 5 齢幼虫の間に顕著な食性の変化が見られ、特に 5 齢幼虫では肉食化傾向が強まることを指摘している。これは 5 齢幼虫が蛹化に近づくとも栄養価の高い動物質を好むようになることが一因かもしれない。Georgian and Wallace (1981) は、北アメリカの 6 種の造網性トビケラの捕獲網と SS 粒子の捕獲効率について考察し、動物質のような大型で良質な餌を効果的に獲得するには、より大きいメッシュサイズの捕獲網を張って大量の水を濾過する必要があることを示唆した。造網性トビケラであるシマトビケラ科の幼虫は高齢幼虫ほど大きいメッシュサイズの捕獲網を張ることが知られている (Georgian and Wallace, 1981; Rossiter, 1989)。ヒゲナガカワトビケラでは齢別の捕獲網のメッシュサイズを調べた研究は報告されていないが、シマトビケラと同様に幼虫の成長に伴い捕獲網のメッシュサイズが粗くなっていくことが推測される。以上のことから、ヒゲナガカワトビケラの 5 齢幼虫が若齢幼虫よりも microcystin 量が低かったのは、肉食化傾向が強まったことにより、相対的に有毒 *Microcystis* の摂食量が減少したためであると考えられる。またヒゲナガカワトビケラの巣は部分によりメッシュサイズが異なり、特に摂餌を行う部分のメッシュサイズは他に比べ細くなっている (松井, 1972)。採集時

の観察では、一つの固着巣内に異なった齢の幼虫が複数生息していることが確認された。高齢幼虫の固着巣内に生息しているこのような若齢個体はメッシュサイズの細かい部分に捕獲された *Microcystis* の小コロニーや細胞などの微細な餌を摂食し、毒素を取り込みやすい状況にある可能性がある。このことが若齢幼虫からより高濃度の microcystin を検出した一因であると考えられる。

Table 2で示されているように、ヒゲナガカワトビケラは 5 齢幼虫から前蛹になる間に microcystin 濃度が減少した。ヒゲナガカワトビケラは前蛹になると摂餌が停止するので前蛹以降の生活段階では毒素の取り込みがなくなり、蓄積された毒素は代謝・分解のみを受けるはずである。したがって前蛹以降の生活段階では、5 齢幼虫よりも蓄積濃度が低下する傾向にあると考えられる。

ヒゲナガカワトビケラにおけるmicrocystinの蓄積と残留性

夏季から秋季にかけてヒゲナガカワトビケラから microcystin が検出されたが、この microcystin は組織内に蓄積されたものなのか、消化管内に存在していた *Microcystis* 細胞に由来するものなのかは明らかでない。したがって幼虫の消化管内容物の保持量・通過時間を確認する必要がある。消化管内容物排泄実験の結果、ヒゲナガカワトビケラ幼虫は48時間以内に全ての消化管内容物を排泄した。過去の研究例では、ヒゲナガカワトビケラ幼虫が空胃になる時間は約 5～7 時間 (御勢, 1959; 伊藤, 1970)、低水温 ($5 \sim 9^{\circ}\text{C}$) では 29～45 時間 (水野・田中, 1969) と報告されている。本研究では消化管内容物の排泄実験を12月に行ったことから、空胃になるまでの時間は低水温で行われた水野・田中 (1969) の結果に類似していた。また冬季には 5 齢幼虫の消化管内容物が減少することから (津田, 1971)、消化管内容物量も $0.38 \text{ mg ind.}^{-1}$ と少なかったと考えられる。

8 月に行った microcystin 排出実験においては実験開始から 5 日目まで、また 9 月に行った実験においても 3 日目まで、ヒゲナガカワトビケラ幼虫から microcystin が検出された (Table 3)。消化管内容物の排泄実験結果から遅くとも 2 日目までには幼虫は空胃になっていたと推測され、その後に検出された microcystin は消化管内容物由来ではなく、組織中に蓄積されたものであると考えられる。

Microcystin の排出は、0～1 日目までの急激な減少とそれ以後の緩やかな減少の 2 相性を示した (Table 3)。実験初期の急激な減少が消化管内容物の排泄によるものであり、それ以後の緩やかな減少がヒゲナガカワトビケラ

の組織内に蓄積した microcystin が代謝されたことによるものと仮定し、ヒゲナガカワトビケラの microcystin 排出速度定数と生物学的半減期を算出した (Spacie and Hamelink, 1980; Yokoyama and Park, 2003)。その結果、3 日目以後のヒゲナガカワトビケラの microcystin 排出速度定数は 0.251 day^{-1} ($R^2=0.97$)、生物学的半減期は 2.8 日でこれは水温 25°C における二枚貝の microcystin 排出速度定数に近い値であった (Yokoyama and Park, 2003)。ヒゲナガカワトビケラ幼虫は水温が 4°C 以下になると摂食を止め、生長が停止することから (御勢, 1970)、天竜川の水温が $3\sim 6^\circ\text{C}$ まで低下する冬期間は全般的に代謝活性が低下し、二枚貝と同様に microcystin の排出速度が低下すると推測される。したがって秋季に microcystin を高濃度に蓄積した越冬世代においては microcystin が長期間残留する可能性がある。実際、諏訪湖でまだ有毒 *Microcystis* が発生していなかった 1999 年 4 月 21 日に採集された越冬世代の 5 齢幼虫から $3.1 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ の microcystin が検出された (Fig. 4)。この前年の 1998 年は諏訪湖・天竜川で高濃度の microcystin が検出されていることから (Kim et al., 2001a, b; Yokoyama and Park, 2002)、1998 年秋季に越冬世代の 5 齢幼虫に高濃度の microcystin が蓄積し、低水温期を通じて 4 月まで毒素が残留した可能性がある。

また、本研究からヒゲナガカワトビケラの蛹・成虫における microcystin の残留性に関する知見が得られた。Nishimura (1984) は、兵庫県円山川中流域における非越冬世代の蛹期が 21.7 日間であると報告した。この円山川のヒゲナガカワトビケラ個体群の羽化期は 4 月、5 月と 9 月、10 月で (Nishimura, 1984)、天竜川的生活史とほぼ一致することから (Fig. 3)、天竜川における蛹期も円山川とほぼ同じ期間であると推定される。蛹や成虫から microcystin が検出されたことは、microcystin が組織内に蓄積し、温暖期においても約 20 日間にわたって残留することを示しており、幼虫期の microcystin 排出機構と蛹・成虫期のそれとが異なる可能性を示唆している。

河川生態系における藍藻毒 microcystin の影響

天竜川上流域のヒゲナガカワトビケラは、諏訪湖で大量に発生した植物プランクトンを餌として、その高い個体群密度を維持している可能性がある。しかし諏訪湖で *Microcystis* が大量発生した 2000 年 8 月にヒゲナガカワトビケラ幼虫の個体群密度が半減した (Figs. 2a, 3a)。この個体群密度の減少を説明する要因は幾つか考えられ、①羽化による減少、②河床攪乱による幼虫の流下、③大量

の *Microcystis* および microcystin に対する忌避行動としての幼虫の流下、④魚類による捕食などが挙げられる。7 月の前蛹・蛹の割合から 7 月から 8 月の羽化個体数を推測し、羽化による個体群密度の減少率を計算すると、8 月の個体群密度の減少率の 5 % しか説明できなかった。また採集地点である St. A のある天竜川上流域では、諏訪湖からの放水量が水門によって調節されており、大きな支流もないことから河床攪乱を引き起こす出水は起こりにくい状況にある。7 月 18 日から 8 月 18 日の 1 ヶ月間で、まとまった降水があったのは 8 月 4 日 (37.5 mm day^{-1}) だけで (気象庁月報, 2000)、この日より多量の降水があった 9 月 11, 12 日 (70 mm day^{-1} 以上) の後に行われた 9 月の採集では幼虫の個体群密度の減少は観察されなかった。したがって 8 月 4 日の降水は幼虫の流下に大きな影響を与えなかったと考えられる。水生昆虫にとって有害な殺虫剤が出巢反応を引き起こすことが、ウルマーシマトビケラやコガタシマトビケラで確認されている (国立環境研究所, 1995)。固着巣から出巢すると幼虫は流下しやすくなると考えられる。Microcystin が昆虫に与える影響について調べた研究は少ないが、Delaney and Wilkins (1995) は microcystin を投与した鱗翅目の 3 種の幼虫で急性毒性が認められたことを報告している。したがって 2000 年 8 月はヒゲナガカワトビケラ幼虫が大量の有毒 *Microcystis* を忌避するため出巢反応を示し、*Microcystis* のより少ない下流に流下した可能性がある。ヒゲナガカワトビケラ幼虫は通常固着巣内で生活しているため個体群密度を半減させるような魚類による捕食は起こりにくいと考えられる。しかし、前述した有毒 *Microcystis* に対する出巢反応により魚類に捕食される可能性がより高くなることが示唆される。

本研究は、天竜川上流域の河川生態系の重要種と考えられるヒゲナガカワトビケラに microcystin が蓄積されることを明らかにした。本結果からヒゲナガカワトビケラが食物連鎖の中で microcystin のベクターとなることが予想される。ヒゲナガカワトビケラ幼虫は、ウグイ *Tribolodon hakonensis*、カジカ *Cottus pollux*、カワヨシノボリ *Rhinogobius flumineus* といった魚類の餌となっており (西村, 1965, 1983)、microcystin が魚に移行する可能性がある。カニ幼生が microcystin のベクターと推定されるタイセイヨウサケの NLD 被害の例もあることから (Andersen, et al., 1993; Williams et al., 1997a, b)、天竜川上流域で現存量の多いヒゲナガカワトビケラが microcystin のベクターになるとすれば、食物連鎖を通じて microcystin の移行は非常に大きくなる可能性がある。

さらに成虫から microcystin が検出されたという事実は、成虫によって microcystin が水界生態系から陸上生態系へ移行することを示唆している。鳥やクモ類などの捕食者の餌になると推測される成虫は、羽化場所から上流・下流に向かって飛行移動することが知られており（西村，1981），ヒゲナガカワトビケラが河川・陸上生態系にまたがった時空間的広がりを持つ，世界でも例のない特異的な microcystin のベクターである可能性が示唆される。

ヒトがヒゲナガカワトビケラ幼虫を消費することに対するリスクを評価するために，1998年度冬季に採集されたざざむしの市販の大和煮を分析したが microcystin は検出されなかった（data not shown）。大和煮用のざざむし漁が行われるのは例年冬季（12月から2月）であり，漁場も諏訪湖から 35 km 以上下流の地点である。アオコの多い夏季でも，この地域の残存 *Microcystis* 細胞数は少なく（Kim et al., 2001a; 片上ら，2003），大和煮の原料となるヒゲナガカワトビケラ幼虫が microcystin を含有している可能性は季節的にも地理的にも低く，また仮に含有していたとしても極微量であると考えられる。したがって現段階ではざざむしの消費による危険性は低いものと判断される。

本研究はヒゲナガカワトビケラのみを対象としたが，天竜川上流域には同じ摂食機能群の水生昆虫のウルマーシマトビケラ *Hydropsyche orientalis* やナカハラシマトビケラ *Hydropsyche setensis* 等が生息している（天竜川上流工事事務所，1991）。天竜川上流域ではヒゲナガカワトビケラ以外のこれらの水生生物も microcystin を蓄積し，ベクターとなる可能性があり，その場合 microcystin の河川・陸上への移行はさらに広範囲になると予想される。今後，研究範囲をさらに広げ，天竜川の河川生態系全体における microcystin の動態を明らかにする必要があると思われる。

文 献

- Andersen, R. J., H. A. Luu, D. Z. X. Chen, C. F. B. Holmes, M. L. Kent, M. LeBanc, 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.
- Carmichael, W. W. (1992): Cyanobacterial 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.
- Engström-Öst, J., M. Lehtiniemi, S. Green, B. Kozłowsky-Suzuki and M. Viitasalo (2002): Dose cyanobacterial toxin accumulate in mysid shrimps and fish via copepod?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 276: 95-107.
- Georgian, T. J. Jr. and J. B. Wallace (1981): A model of seston capture by net-spinning caddisflies. *OIKOS*, 36: 147-157.
- 御勢久右衛門 (1959): チャバネヒゲナガカワトビケラ幼虫の1日の摂食量の推定. *生態昆虫*, 8: 58-59.
- 御勢久右衛門 (1970): ヒゲナガカワトビケラの生活史と齢期分析. *陸水学雑誌*, 31: 96-106.
- 浜 栄一 (1999): 天竜川のざざむし. *信州の旅*, 107: 6-9.
- Harada, K.-I., M. Oshikata, H. Uchida, M. Suzuki, F. Kondo, K. Sato, Y. Ueno, S.-Z. Yu, G. Chen and G.-C. Chen (1996): Detection and identification of microcystins in the drinking water of Haimen city, China. *Natural Toxins*, 4: 277-283.
- 伊藤春子 (1970): ヒゲナガカワトビケラ幼虫の消化管内容物の日周変化と消化管内容量減少速度の考察. *奈良陸水生物学報*, 3: 20-21.
- Jochimsen, E. M., W. W. Carmichael, J. An, D. M. Cardo, S. T. Cookson, C. E. M. Holmes, B. C. Antunes, D. A. Mero Filho, T. M. Lyra, V. S. T. Barret, S. M. F. O. Azeved and W. R. Jarvis (1998): Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, 338: 873-878.
- 片上幸美・中山恵介・金 昊燮・米塚佐世子・朴 虎東 (2003): 移流拡散モデルを用いた天竜川の藍藻 *Microcystis* の動態解析. *陸水学雑誌*, 64: 121-131.
- Kim, H. S., B. Kim, H. D. Park, Y. Katagami and S. J. Hwang (2001a): Dynamics of cyanobacterial toxins in the downstream river of Lake Suwa, *Korean Journal of Limnology*, 34: 45-53.
- Kim, H. S., B. Kim, H. D. Park, Y. Katagami and S. J. Hwang (2001b): Diel changes of cyanobacterial toxins in outflow water of Lake Suwa. *Korean Journal of Limnology*, 34: 175-184.
- 気象庁月報: (財)気象業務支援センター (2000) Jun.-Sep. 2000.
- 国立環境研究所 (1995): 水環境における化学物質の長期曝露による相乗的生態系影響に関する研究. 2.1.6 農薬汚染河川に優占する水生昆虫3種の殺虫剤感受性評価. 国立環境研究所特別研究報告, SR-19: 20.
- 小松 典 (1974): 天竜川における水生昆虫群集の構造, biotic index および季節変動. *陸水学雑誌*, 35: 173-182.
- 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 Fish and Aquatic Sciences*, 53: 1974-1985.
- Lauren-Maättä, 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.

- Lirås, V., M. Lindberg, P. Nyström, 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.
- 松井ゆう (1972): ヒゲナガカワトビケラの巣について. 吉野川の生物生産力の研究, 4: 31-36.
- Magalhães, V. F., R. M. Soares and S. M. F. O. Azevedo (2001): Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, 39: 1077-1085.
- 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 Nishinomiya, Japan: Sudden appearance of toxic cyanobacteria. *Natural Toxins*, 7: 81-84.
- 水野寿彦・田中義輝 (1969): 水生昆虫の摂食量. 吉野川の生物生産力の研究, 1: 12-20.
- 西村 登 (1964): ヒゲナガカワトビケラ科幼虫の消化管内容物. 兵庫生物, 4: 219-221.
- 西村 登 (1965): ヒゲナガカワトビケラとカジカの関係. 兵庫生物, 5: 33-34.
- 西村 登 (1981): 成虫の遡上飛行. *Kontyû* (昆虫), 49: 192-204.
- 西村 登 (1983): 円山川中流域産主要魚種の食性. 円山川水系の生物生態 (兵庫県八鹿土木事務所): 451-470.
- Nishimura, N. (1984): Ecological studies on the net-spinning caddisfly, *Stenopsyche marmorata* NAVAS 6. Larval and pupal density in the Maruyama River, Central Japan, with special reference to floods and after flood recovery processes. *Physiology and Ecology Japan*, 21: 1-34.
- 西村 登・信本 励・三橋弘宗 (2001): 山陰・北陸・近畿地方 16 河川における底生動物の現存量とそれに関連する要因. ホシザキグリーン財団研究報告, 5: 161-206.
- Nishiwaki-Matsushima, R., S. Nishiwaki, T. Ohta, S. Yoshizawa, M. Suganuma, K.-I. Harada, M. F. Watanabe and H. Fujiki (1991): Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Japan Journal of Cancer Research*, 82: 993-996.
- Nishiwaki-Matsushima, R., T. Ohta, S. Nishiwaki, M. Suganuma, K. Kohyama, T. Ishikawa, W. W. Carmichael and H. Fujiki (1992): Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*, 118: 420-424.
- Park, H.-D., C. Iwami, M. F. Watanabe, K.-I. Harada, T. Okino and H. Hayashi (1998): 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., M. F. Watanabe, K.-I. Harada, M. Suzuki, H. Hayashi and T. Okino (1993): Seasonal variations of *Microcystis* species and toxic heptapeptide microcystins in Lake Suwa. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8: 425-435.
- 朴 虎東・横山淳史・沖野外輝夫 (2001): 諏訪湖におけるアオコ毒素 microcystin の動態. 陸水学雑誌, 62: 229-248.
- Pitois, S., M. H. Jackson and B. J. B. Wood (2000): Problems associated with the presence of cyanobacteria in recreational and drinking waters. *International Journal of Environmental Health Research*, 10: 203-218.
- Rossiter, A. (1989): シマトビケラ科幼虫の生態的分化 (総説). 日本の水生昆虫 種分化とすみわけをめぐって, 柴谷篤弘・谷田一三 (編著): 130-140. 東海大学出版会, 東京.
- 新名史典 (1995): 河川底生動物群集の食物網の実態とその動的側面. 平成 6 年度文部科学省研究補助金報告書: 60-69.
- Spacie, A. and J. L. Hamelink (1982): Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1: 309-320.
- Sipiä, V. O., H. T. Kankaanpää, J. Flinkman, K. Lahti and J. A. O. Meriluoto (2001a): Time-dependent accumulation of cyanobacterial hepatotoxins in flounders (*Platichthys flesus*) and mussels (*Mytilus edulis*) from the northern Baltic Sea. *Environmental Toxicology*, 16: 330-336.
- Sipiä, V. O., H. T. Kankaanpää, K. Lahti, W. W. Carmichael and J. Meriluoto (2001b): Detection of nodularin in flounders and cod from the Baltic Sea. *Environmental Toxicology*, 16: 121-126.
- Steffensen, D., M. Burch, B. Nicholson, M. Drikas and P. Baker (1999): Management of toxic blue green algae (cyanobacteria) in Australia. *Environmental Toxicology*, 4: 183-195.
- 天竜川上流工事事務所 (建設省中部地方建設局) (1991): 平成 2 年度天竜川上流域生物環境調査の概要 (生物関係資料収集整理結果): 3-13.
- 天竜川上流工事事務所 (建設省中部地方建設局) (1999): 天竜川流量年表 (1998).
- 鳥居西蔵 (1957): 伊那天竜特産ザザムシの記. *新昆虫*, 10: 26-29.
- 津田由紀子 (1971): ヒゲナガカワトビケラの夏季と冬季の食性について. 奈良陸水生物学報, 4: 5-8.
- Ueno, Y., S. Nagata, A. H. Tsutsumi, M. F. Watanabe, H.-D. Park, G.-C. Chen and S.-Z. Yu (1996): Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17: 1317-1321.
- Van Buynder, P. G., T. Oughtred, B. Kirkby, S. Phillips, G. Eaglesham, K. Thomas and M. Burch (2001): Nodularin

- uptake by seafood during a cyanobacterial bloom. *Environmental Toxicology*, 16: 468-471.
- Vasconcelos, V.M. (1999): Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 249-254.
- Watanabe, M. F., K.-I. Harada, K. Matsuura, S. Oishi, Y. Watanabe 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.
- Williams, D. E., M. Craig, S. C. Dawe, M. L. Kent, R. J. Andersen and C. F. B. Holmes (1997a): Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and dungeness crab larvae. *Chemical research 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.
- Yokoyama, A. and H.-D. Park (2002): Mechanism and prediction for contamination of freshwater bivalves (Unionidae) with the cyanobacterial toxin microcystin in hypereutrophic Lake Suwa, Japan. *Environmental Toxicology*, 17: 424-433.
- Yokoyama, A. and H.-D. Park (2003): Depuration kinetics and persistence of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in the freshwater bivalve *Unio douglasiae*. *Environmental Toxicology*, 18: 61-67.
- Zimba, P. V., L. Khoo, P. S. Gaunt, S. Brittain and W. W. Carmichael (2001): Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxin. *Journal of Fish Diseases*, 24: 41-47.