

香川県東讃の代表的な22の溜池のマイクロシスチン汚染

田淵結実・川村 理

Occurrence of Microcystins in 22 representative reservoirs in eastern Kagawa

Yumi Tabuchi and Osamu Kawamura

Abstract

Microcystins (MCs) are one of toxic cyanotoxins, which are contaminated in eutrophicated lakes and ponds. MCs have the strong liver toxicity and carcinogenic promoter activity, and causes healthy damage to livestock animals and humans. In 2014, we clarified that Oimai Pond, near the Faculty of Agriculture, Kagawa University, was contaminated with high concentrations of MCs. In order to clarify the MCs contamination in reservoir of Kagawa, we measured MCs, dissolved total nitrogen and dissolved total phosphorus in 22 representative reservoirs in eastern Kagawa. In the results, 40% of the samples exceeded the standard value of MCs in drinking water (1 ng/mL), and 20% exceeded the regulation value of recreational water (10 ng/mL) set in Australia. In addition, 5% of the samples were contaminated with extremely high MCs of over 10,000 ng/mL. The highest concentration of MCs was 88,498 ng/mL, and only 0.027 mL of this sample was corresponding to the tolerable daily intake of MC-LR. The average of MCs concentrations of Funaoka, Oima and Hira ponds surrounded by farmland and residential area exceeded 1,000 ng/mL. On the other hand, the average of MCs concentrations in Kinbuchi, Ishigami, and Kawamuta ponds surrounded by trees such as forests was less than 0.1 ng/mL. The correlation coefficient between the logarithm of MCs concentration and dissolved total nitrogen was $r^2=0.417$, and the correlation coefficient between the logarithm of MCs concentration and dissolved total phosphorus was $r^2=0.575$, both showing a high positive correlation. These results suggest that eutrophication caused by nitrogen and phosphorus flowing from the surrounding area may cause highly contamination with MCs in these reservoirs.

Key words : microcystin, ELISA, Reservoir, Eastern Kagawa

緒 言

アオコは富栄養化した湖沼などで発生し、景観悪化や悪臭発生のみならず、シアノトキシン（藍藻毒）を生産し水を汚染する⁽¹⁾。アオコを構成する主要な藍藻であるマイクロシスチス属（代表菌種*Microcystis aeruginosa*）などは、7個のアミノ酸から構成される環状のペプチドで、強い肝臓毒性と発がんプロモーター活性を有するマイクロシスチン類（microcystins, MCs）を生産する⁽²⁾。日本では、主に、MC-LR、MC-RRとMC-YRなどが主要なMCsである。

マイクロシスチンによる家畜やヒトへの被害は、かなり以前から、米国やオーストラリアなどで、放牧家畜が

アオコの発生した湖沼水を摂取し、斃死する事故が多発している。また、ヒトでのマイクロシスチン摂取が原因と考えられる死亡事例がいくつか報告されている。世界保健機関は、動物実験の結果からMC-LRのTDI（耐用1日摂取量）を0.04 µg/kg体重/dayとし、飲料水中のMCsの基準値を1 µg/Lに設定し、また、オーストラリアなどでは、レクリエーション水の規制値を10 µg/Lに設定している⁽³⁾。日本では、水道の要検討項目としてMC-LRの目標値を0.8 µg/L⁽⁴⁾としている。

香川では地理的に水不足が大きな問題であり、約16,000の溜池があり、現在でも農業用水の50%以上を溜池に頼っている。これらの溜池ではアオコが毎年のように発生しているが、マイクロシスチンの汚染実態は不明

確であった。そこで、2014年7月から11月に香川大学農学部近郊の溜池である男井間池ではかなり高濃度のMCsに汚染されていることを明らかにした⁽⁵⁾。そこで香川の溜池のMCs汚染の実態を明らかにすることを目的として、香川県東讃の代表的な22の溜池のマイクロシスチン汚染調査を行った。また、溶存態総窒素と溶存態総リンの測定も行い、香川の溜池におけるMCs汚染の要因について考察した。

方 法

試験試料

代表的な溜池は、2015年4月の時点で、香川の農村農業整備のホームページの「水土里情報さぬきの水物語」に、代表的な溜池として写真入りで掲載されていた東讃地区の溜池（三郎池、弥勒池、山大寺池、平池、宮池、音谷池、橘池、原間池、新池、石神池、川股池、川田池、男井間池、東王田池、奈良須池、小田池、公測池、野間池、坂瀬池、蓮池、三ツ子石と船岡池）を東讃の代表的な溜池とした。検体は、2015年5月から11月に月に2回、原則として、上記の溜池の余水吐（排水口の付近）の1カ所から水を採取した。水路がつながっており排水口が複数ある時は、これらも付近からも採取した。上記の溜池の余水吐（排水口の付近）の1カ所から日中の11時から14時までに水面付近から水検体を収集した。検体は、40メッシュの金網でろ過しゴミなどを除去した後、最終0.1%となるように NaN_3 を加え、 -20°C で凍結保存した。分析前に凍結融解を2回繰り返し、シアノバクテリアを溶菌させ菌体内MCsを放出させた後、のGA-200ガラス繊維ろ紙（ADVANTEC）で破碎菌体を除去後、1/10容量の10倍濃度のダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を加え中和後、ELISAでMCsを測定した。

ELISA

ELISAは田淵・川村の方法⁽⁵⁾で行った。すなわち、MC-LRウシ血清アルブミン結合体を0.01M炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液（pH 9.6）で0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、50 μL ずつ96ウェルマイクロプレート（Nunc）の各ウェルに加え、プレートミキサーで攪拌後、プレートシールで密閉し、 4°C で一晩静置しコーティングを行った。プレートを0.05% Tween 20を含むPBS（PBS/Tween）で3回洗浄した後、各ウェルに0.1% 卵白アルブミン（Sigma-Aldrich）を含むPBS溶液を125 μL ずつ加え、室温で1時間又は 4°C で一晩静置し、ブロッキングを行った。プレートをPBS/Tweenで3回洗浄した後、各ウェルに50 μL ずつ20~2,000 pg/mL に調整したMC-LR

標準品（和光純薬工業）溶液又は、PBSで希釈した検体を加えた。これらのウェルにPBSで2,000希釈した抗MCsモノクローナル抗体MC5-3溶液を50 μL ずつ加え、攪拌後、室温で60分間競合反応を行った。プレートをPBS/Tweenで3回洗浄した後、PBS/Tweenで1/4,000希釈したGoat anti-mouse Ig's horseradish peroxidase conjugates（BIOSOURCE）を50 μL ずつ加え、室温で45分反応させた。PBS/Tweenで6回洗浄後、100 μL の0.005%過酸化水素と0.1 mg/mL の3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン（和光純薬工業）を含む0.1M酢酸緩衝液（pH 5.0）を加え、室温で30分間酵素反応させた後、1 M硫酸50 μL を加え酵素反応を停止し、450 nmの吸光度を測定した。各検体は2回以上測定し、その平均値を測定値とした。

溶存態総窒素と溶存態総リンの測定

環境庁告示法に記載されている溶存態総窒素は銅・カドミウムカラム還元法で、溶存態総リンはペルオキシ二硫酸カリウム-リンモリブド錯体法でそれぞれ測定した。

結果および考察

MCs汚染濃度分布と最高濃度汚染検体のリスク評価

2015年5月から11月に香川県東讃の代表的な22の溜池から採取した水検体（合計193検体）のMCs汚染の濃度分布をFig. 1に示した。全検体の40%が飲料水中のMCsの基準値を1 ng/mL を超えており、20%がオーストラリアなどで設定しているレクリエーション水の規制値を10 ng/mL を超えていた。また、5%の検体が10,000 ng/mL 以上の極めた高いMCsに汚染されていた。最高濃度のMCsが検出されたのが9月に船岡池で採取した検体で、MCs濃度は88,498 ng/mL であった。MCsのうち最も一般的なMC-LRの耐容一日摂取量は、0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/dayで体重60kg人での値は、2.4 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{day}$ となる。これは最高濃度のMCsが検出された検体のわずか0.027 mLに相当した。すなわち、この水を毎日わずか27 μL 摂取するだけで何らかの健康に影響が現れる可能性が考えられた。船岡池水は飲料水としては利用されていないが、農業用水等で利用されており、この水に接触するヒトにとってかなり問題があるほどの高濃度汚染であった。

月別のMCs汚染濃度の変化

月別のMCs汚染濃度の変化と水温の関係をFig. 2に示した。月別のMCs汚染濃度を平均値で比較するとバラツキが大きく一定の傾向は認められなかった。そこで、月別のMCs汚染濃度の中央値と水温の平均値でFig. 2を作製した。その結果、MCs生産藍藻の至適増殖温度である

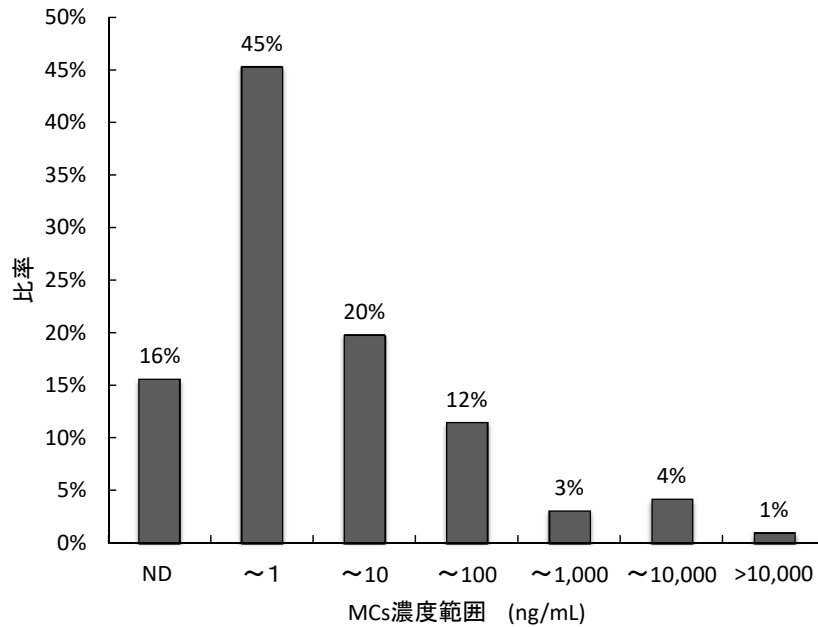


Fig. 1 香川県東讃の代表的な22の溜池から採取した水検体（193検体）のマイクロシスチン汚染の濃度分布

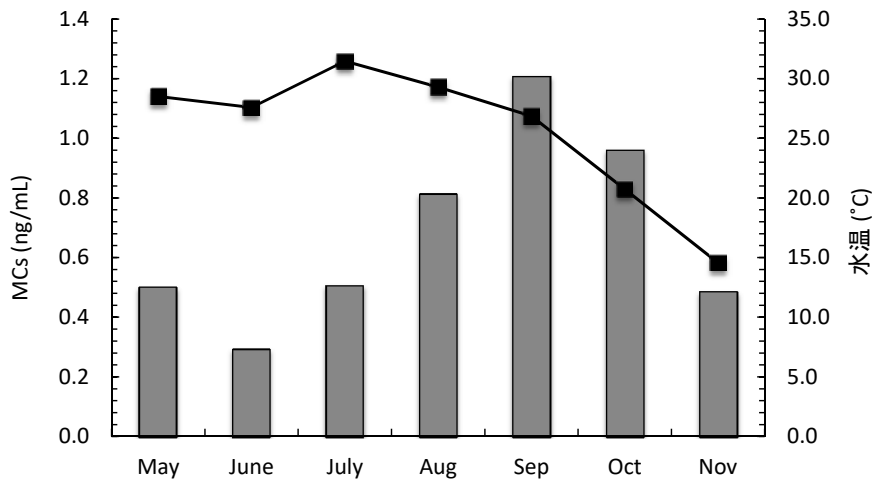


Fig. 2 月別中央値と平均水温の比較

20℃台に平均水温がなる9月と10月にMCsが高濃度になることが分かった。

香川東讃の主な22の溜池のMCsと溶存態総窒素とリン濃度の比較

香川東讃の主要な22の溜池各池の平均MCsと溶存態総窒素とリン濃度の比較をTable 1に示した。MCs最高値8,893 ng/mLの船岡池と最低値0.04 ng/mLの川股池まで22万倍以上の差があった。また、船岡池、男井間池や平池は、周囲が農地や住宅地に囲まれていた。このような溜池では、平均MCs濃度は1,000 ng/mLを超えていた。一

方、周囲が森などの木々に囲まれている公測池、石神池や川股池での平均MCs濃度は0.1 ng/mL以下でかなり低濃度であった。以上のことから溜池の周囲の環境がMCs濃度と密接な関係があることが示唆された。そこで、農地や住宅地から排水が溜池の富栄養価を引き起こし、MCs生産藍藻を増殖させたと仮定して、溶存態総窒素と総リンの測定を行った。MCsと溶存態総窒素および総リンの相関性をFig. 3に示した。MCs濃度の対数と溶存態総窒素の相関係数は $r^2 = 0.417$ であり、MCs濃度の対数と溶存態総リンの相関係数は $r^2 = 0.575$ と高い正の相関性を示した。以上の結果から、溜池の周囲から流れ込む窒素や

Table 1 香川東讃の主な22の溜池の平均マイクロシスチンと溶存態総窒素とリン濃度の比較

池	MCs (ng/mL)	溶存態総窒素 (μM)	溶存態総リン (μM)
Funaoka	8,893	32.9	2.05
Oima	1,711	82.4	1.82
Hira	1,416	96.7	4.24
Kawada	53.5	37.7	0.73
Oda	46.7	73.7	2.49
Saburou	24.8	55.3	1.44
Miya	12.9	44.2	0.81
Mitugoishi	7.57	51.3	1.58
Noma	5.07	50.0	2.37
Harama	3.95	35.8	0.62
Hasu	1.49	44.5	1.47
Shin	0.38	29.8	0.65
Tachibana	0.30	25.4	0.38
Otoya	0.29	36.3	0.61
Narasu	0.29	20.5	0.30
Higashiohda	0.21	31.0	0.62
Sakase	0.15	60.7	1.37
Myoujin	0.10	20.3	0.20
Sandaiji	0.10	22.3	0.33
Kinbuchi	0.07	16.0	0.07
Ishigami	0.05	44.3	0.18
Kawamata	0.04	27.5	0.13

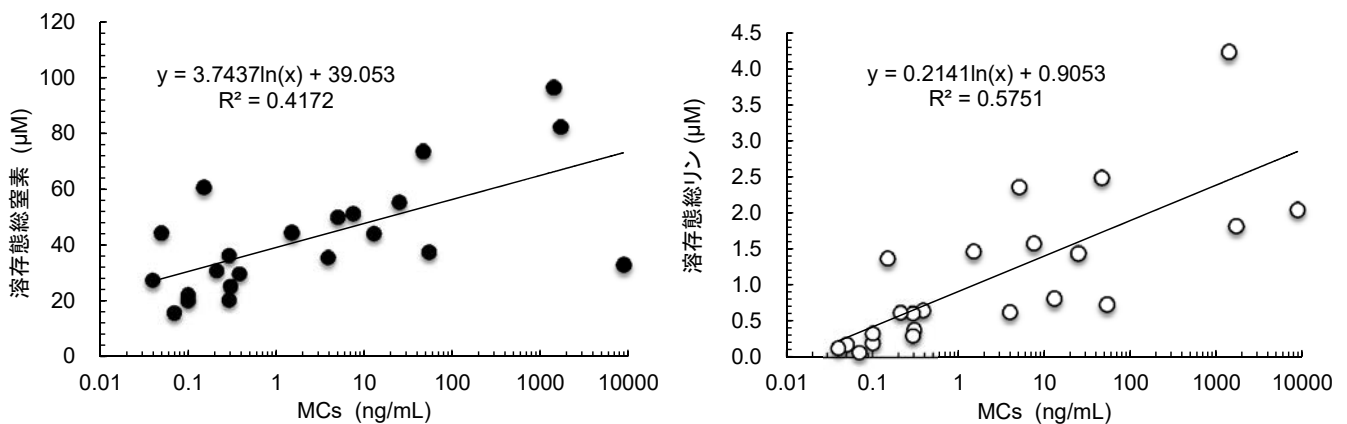


Fig. 3 マイクロシスチン濃度と溶存態総窒素と総リンの相関性

リンが引き起こした富栄養化がMCsの高濃度汚染を引き起こした可能性が強く示唆された。

本研究は、香川の溜池のMCs汚染実態を初めて明らかにした報告である。周囲が農地や住宅地に囲まれていた船岡池、男井間池や平池では、平均1,000 ng/mL以上のMCsに汚染された。香川の溜池の水は飲用水としては使用されていないが、農業用水やリクレーションとしては使われているので、これらのMCs高濃度汚染の溜池の水による人健康被害の可能性も考えられる。よって、今後も継続的なMCsの汚染調査を継続的に、監視していくと共に、MCs低減のための対策を講ずる必要があると考え

られた。

謝 辞

溶存態総窒素と溶存態総リンの測定において、機器の使用及びご親切なご指導とを頂いた香川大学農学部多田邦尚教授及び山口一岩准教授に深く感謝いたします。

摘 要

マイクロシスチン (MCs) は、アオコを構成する藍藻

が生産する強い肝臓毒性と発がんプロモーター活性を有する。MCsは、富栄養化した淡水を汚染し、家畜やヒトへの健康被害を起こしている。2014年に香川大学農学部近郊の男井間池が高濃度のMCs汚染していることが明確なため、香川の溜井のMCs汚染実態を明らかにすることを目的として、香川東讃の代表的な22の溜池の汚染調査を行った。その結果、検体の40%が飲料水中のMCsの基準値を1 ng/mLを超えており、20%がオーストラリアなどで設定しているレクリエーション水の規制値を10 ng/mLを超えていた。また、5%の検体が10,000 ng/mL以上の極めて高いMCsに汚染されていた。最高濃度MCsは88,498 ng/mLでこの検体のわずか0.027 mLで耐容一日

摂取量に相当しするほどの高濃度汚染であった。周囲が農地や住宅地に囲まれている船岡池、男井間池や平池の平均MCs濃度は1,000 ng/mLを超えていた。一方、周囲が森などの木々に囲まれている公測池、石神池や川股池での平均MCs濃度は0.1 ng/mL以下でかなり低濃度であった。また、MCs濃度の対数と溶存態総窒素の相関係数は $r^2=0.417$ であり、MCs濃度の対数と溶存態総リンの相関係数は $r^2=0.575$ といずれも高い正の相関性を示した。以上の結果から、これらの溜池では、周囲から流れ込む窒素やリンが引き起こした富栄養化がMCsの高濃度汚染を引き起こした可能性が強く示唆された。

引用文献

- (1) Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O.: State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, 59, 303–327 (2013).
- (2) Van Apeldoorn, M. E., Van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A., Bakker, G.J. I.: Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 7–60 (2007).
- (3) Chorus, I.: Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Dessau-Roßlau, Germany, Federal Environment Agency (2012).
- (4) 厚生労働省：要検討項目と目標値，（平成28年4月1日施行）
<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/kijunchi.html> (2019/10/28)
- (5) 田淵結実，川村 理：香川大学農学部近郊の溜池，男井間池と平田池のマイクロシスチン汚染調査（2014）．香川大学農学部学術報告，69，23–26（2017）．

