

国立公害研究所研究報告 第62号

Research Report from the National Institute for Environmental Studies, Japan, No.62, 1984.

有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究

Effects of Toxic Substances on Aquatic Ecosystems

昭和56～58年度 特別研究中間報告

Progress Report in 1981—1983

環境庁 国立公害研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

序

稲の害虫を駆除するために農薬を散布すると、ホタルやトンボが絶滅するとよく言われる。松喰虫の駆除対策についてもそのようなことが指摘されている。これは農薬によって生態系が変化するためである。

個々の生物に対する化合物の毒性は小規模実験で試験することが可能であるが、自然界における生物相の変化を知るにはこのような試験では不十分である。

例えばある種の減少はそれと関係する他の種に大きな変化を及ぼし、このような影響が次々に波及することが多い。

そこでこのような変化を研究するためには、是非とも野外で実地に調査することが必要になる。しかるに実際に毒物を用いて調査することは影響が大きく、またその効果が永く残る恐れがあるので実施ができない。しかし鉱山の鉱滓や廃水などが事故によって流出したり、また場所によっては重金属の濃度の高い自然河川などがあるから、そのような機会や場所をとらえて調査することができる。また生態系の一部を研究所内で再現して、それについて毒物による生態系の破壊と毒物流入停止後の生態系回復の様子などを実験した。

自然界には様々の生物が存在したとして、それらは被食者と捕食者の関係で関連し合っていることが多い。このような食物連鎖をとおして有害物質が濃縮されることがある。その過程についてもモデル河川等により生物濃縮とその影響に関して調べた。最後には乳動物では重金属を経口投与すると、体内でメタロチオネインが合成されるが、各種の水生生物についても同様であるかどうかについて検討を行った。

生態系の動的な変化は連立常微分方程式で表現されることが多い。しかし実際の現象をこのような数学モデルで解明しようとする、式中のパラメーター等を設定する必要がある。またときには解が不安定になって利用できないこともある。したがって大型の計算機が利用できるときでもあらかじめすべての場合について計算するのは適当ではない。そこで条件を途中で設定あるい

は変更が可能なプログラムが便利である。このような試みとして BGS II を開発した。

本報告は「有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究」として昭和56～58年度の特別研究の中間報告である。最初に述べたように生態系の実験や調査観察は余り多くないので、我々の研究結果がこの方面の研究の進歩に役立てば甚だ幸いである。

昭和59年3月

国立公害研究所

所長 近藤次郎

ま え が き

人類が生活向上のために作りだした化学物質の数は数万とも数百万ともいわれており、年を追うごとに多様化され、新しい化学物質が誕生している。これらの化学物質の中には、有益性とは裏腹に人の健康を害したり、生態系に悪影響を与えたりする可能性を秘めたもののがかなりあると考えられる。地球的規模の PCB 汚染の出現を契機に、化学物質による環境汚染問題に対して国際的に関心がたかまり、我が国においても「化学物質審査規制法」が昭和49年に施行され、新しい化学物質に対して、難分解性、生物濃縮性及び毒性に関して環境汚染に着目して審査することになった。

環境庁においては、化学物質の生態系に及ぼす影響を重視し、これらを評価する試験法の開発に着手し、植物影響試験及び水生動物影響試験について検討が行われてきた。一方 OECD 環境委員会でも、生態毒性試験法が検討され、昭和56年5月に OECD 勧告として三つの試験法のガイドラインが採択されている。この三つの試験法は藻類、ミジンコ及び魚類に関するもので、いずれも水界生態系の構成生物種であり、藻類は食物連鎖の底辺にある第一次生産者、ミジンコは第二次生産者、魚類は消費者として生態系の主要部位を占めている。この事は、化学物質を含めた有害汚染物質が最終的に水界に入り込むので、水界生態系への影響を重視していることを意味する。

しかしながら、これらの毒性試験法の内容をみると、生態影響評価法としては不十分でこれまでの生物検定法の域を出ていない。生態系では同時に多数の生物が影響を受けるが、仮りに一つの生物種が汚染物質により影響を受けたとしても、その影響は必ず他の構成生物種へ大なり小なり波及する。これは生態系が構成生物種相互の錯そうした関係によって平衡を保っているからである。この生物の相互依存関係を無視して正しい生態影響評価はできない。

本特別研究は、有害汚染物質による水界生態系の攪乱と回復過程に関して、自然生態系の現地調査及びモデル生態系の開発により、生物の相互関係を考慮した生態影響評価を行うことを目指して発足した。研究の近道として、有害汚染物質としては、個々の生物種について知見の多い

重金属と農薬及び殺虫剤を当初手がけている。これらによって生態影響評価法が確立されれば、多くの化学物質への適用も可能となる。

本報告は中間的成果であって、まだまとまったものではない。しかし、一度成果を振りかえり、新たに研究の方向と手法の正しさを確認し、今後の進展の基盤にしたいと考えてとりまとめたものである。

昭和 59 年 3 月

国立公害研究所生物環境部

部長 菅原 淳

目 次

研究の概要と今後の展望	1
安野正之	
1. 小坂川における重金属汚染を指標する生物相	7
安野正之・畠山成久	
2. 屋外水路による殺虫剤の生態系影響の実験的研究	19
安野正之・菅谷芳雄・岩熊敏夫	
3. モデル生態系における動物プランクトン群集に対する殺虫剤の影響	29
長谷川淳一・安野正之	
4. 微小生態系の構造に対する有害汚染物質の影響評価	37
宮下 衛・安野正之	
5. 生態モデル作成のための会話型コンピュータプログラム BGS II について	49
袴田共之・廣崎昭太	
6. グッピーによる有害汚染物質の影響評価	65
宮下 衛	
7. 重金属のカゲロウ (<i>Epeorus latiforium</i>) に対する影響解析	73
畠山成久・福島 悟	
8. グッピーの成長及び産仔に及ぼす食物連鎖によるカドミウムの影響	99
畠山成久	
9. ユスリカ幼虫のカドミウムに対する耐性とカドミウム結合タンパク質の誘導	121
山村 充・畠山成久・鈴木和夫	
10. タマミジンコにおけるカドミウムの蓄積とカドミウム結合タンパク質の誘導	129
山村 充・畠山成久・鈴木和夫	
11. シマミズへのカドミウムの蓄積と誘導されるメタロチオネインの性質	135
山村 充・鈴木和夫	
12. 両生類に対する重金属の影響 I	
アフリカツメガエルへの重金属の蓄積と存在状態並びに必須金属への影響	143
鈴木和夫・山村 充	

Contents

Outline of the Project in this Report	1
M. YASUNO	
1. Flora and Fauna Indicating Heavy Metal Pollutions in the Kosaka River ...	7
M. YASUNO and S. HATAKEYAMA	
2. Effects of Insecticides on the Benthic Community in a Model Stream	19
M. YASUNO, Y. SUGAYA and I. IWAKUMA	
3. Impact of Insecticides on the Zooplankton Communities of Model Aquatic Ecosystems	29
J. HASEGAWA and M. YASUNO	
4. Evaluation of Toxicant Effects on Structure of a Microcosm	37
M. MIYASHITA and M. YASUNO	
5. Interactive Computer Programs (BGS II) for Ecological Simulation	49
T. HAKAMATA, S. HIROSAKI	
6. Assessment of Hazardous Substances with the Guppy	65
M. MIYASHITA	
7. Effects of Heavy Metals on the Growth of the Mayfly Nymph (<i>Epeorus latifolium</i>)	73
S. HATAKEYAMA and S. FUKUSHIMA	
8. Accumulation and Chronic Effects of Cadmium on the Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>) Fed the Cadmium-Accumulated Midge Larva	99
S. HATAKEYAMA	
9. Tolerance to Cadmium and Cadmium-Binding Proteins Induced in the Midge Larvae, <i>Chironomus yoshimatsui</i> (Diptera, Chironomidae)	121
M. YAMAMURA, S. HATAKEYAMA and K. T. SUZUKI	
10. Cadmium Uptake and Induction of Cadmium-Binding Protein in the Waterflea, <i>Moina macrocopa</i>	129
M. YAMAMURA, S. HATAKEYAMA and K. T. SUZUKI	
11. Cadmium Accumulation and Characterization of Metallothionein Induced in the Earthworm	135
M. YAMAMURA and K. T. SUZUKI	
12. Effects of Heavy Metals on Amphibia I. Accumulation and Chemical Forms of Heavy Metals, and Effects on Essential Metals in <i>Xenopus laevis</i>	143
K. T. SUZUKI and M. YAMAMURA	

研究の概要と今後の展望

安野 正之¹

Outline of the Project in this Report

Masayuki YASUNO¹

1. 研究の意義

有害汚染物質とは何であるか明確に定義がなされているわけではないが、これまで使われてきた化学物質、あるいは使われようとしている物質のうちかなりのものが何らかの形で生物に影響を与えるものと考えられる。殺虫剤、殺菌剤、除草剤等には対象となる生物以外に影響の少ないものになりつつあるといえ、他の生物を含めた環境への影響はまぬがれることはできない。カドミウム及び水銀汚染が問題となったとき、生態系影響の研究の必要性が言われたが、その後は十分な研究体制も研究も進められなかった。生態影響と呼ばれるものは従来の生物による毒性試験の範ちゅうを越えるもので、その中で慢性影響に関しては一部研究が進められたが、生態系影響はこれとはやや異なっている。すなわち生態系の特徴である食物連鎖関係と系としてのホメオスタシスに関する有害汚染物質の影響研究はこれから進めなければならない分野である。

自然の生態系は閉鎖系ではないこと、環境の不均質性からくるその多様性、そしてまたそれと無関係ではない生態的地位の豊富さからくる構成生物種の多様性などが、従来の毒性試験結果を積み重ねても生態系への影響を推し量ることが不可能とされるゆえんである。したがって自然の生態系への有害汚染物質の影響の研究（フィールド調査）は欠かすことができない。しかし多くの要因が重なっていて解析しにくいのも事実である。自然生態系における実験的研究は慎重に行われねばならないし、また繰り返すことが許されるような研究場所もあるわけでない。そのためには自然生態系が持つ特徴を多少とも備えたモデル生態系が開発されなければならない。1978年米国のジョージアで行われた生態学研究におけるマイクロコスムに関するシンポジウムでは50の演題が出されたが、その多くはこの有害汚染物質の検出系あるいは影響解析を目指したものであった。このシンポジウムの成果はモデル生態系が有害汚染物質の生態影響を知る上で用いること

1. 国立公害研究所 生物環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Environmental Biology Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

ができるのではないかと希望を持たせた。

本プロジェクトはこのような観点から生態系影響に研究の中心を置き、その影響の生理学的機序についても解明するため昭和56年より始められた。

2. 研究課題と研究組織

本特別研究は以下の四つのサブテーマからなり、本研究所の5研究室、16名及び客員研究員、共同研究員多数の協力を得て研究が推進されている。

研究課題

1. 有害汚染物質の自然生態系に及ぼす影響に関する研究
2. モデル生態系による生態系かく乱機構の実験的研究
3. 食物連鎖による有害汚染物質の生物濃縮と生物影響に関する研究
4. 有害汚染物質が水生生物に及ぼす影響の生理学的研究

この四つのサブテーマは図1のように関連し、最終目標とする有害汚染物質の生態系への影響評価に資するためのものである。

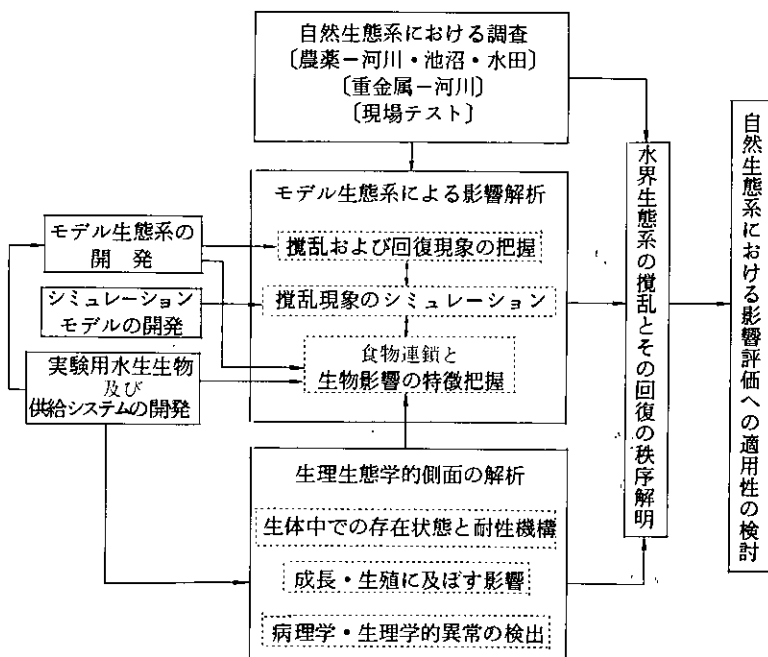


図1 有害汚染物質による水界生態系の攪乱と回復過程に関する研究

研究担当者 (所属・氏名)

生物環境部	菅原 淳	
水生生物生態研究室	安野 正之・畠山 成久・春日 清一・宮下 衛	
	高村 典子・花里 孝幸・佐竹 潔	
生物環境管理研究室	岩熊 敏夫・高村 健二	
環境生理部		
慢性影響研究室	鈴木 和夫・山村 充	
環境情報部	廣崎 昭太	
情報調査室	松本 幸雄・袴田 共之	
技術部		
生物施設管理室	菅谷 芳雄	
客員研究員		
56~59年度	滝本 道明	東邦大学理学部
56~59年度	田崎 忠良	" "
56~59年度	矢島 毅彦	" 薬学部
56~59年度	佐藤 良博	共立薬科大学生化学部
56~59年度	宇田川 龍男	麻布大学環境保健学部
56~59年度	福岡 秀雄	" 獣医学部
57~59年度	鷺見 和	聖マリアンナ医科大学解剖学教室
57~59年度	横山 宣雄	山形大学理学部
57~59年度	塩見 正衛	農林水産省草地試験場
56~59年度	福島 悟	横浜市公害研究所水質部

3. これまでの成果の概要

サブテーマ1

自然生態系に対する有害汚染物質の影響については秋田県小坂川, 山形県最上川の三つの支流, 長崎県対馬の佐須川, 岩手県長内川, その他鉱山からの廃水が流入する河川において調査が行われ, 小坂川についてはその一部が本報告書に, 山形県の三つの河川についてはその一部が既に報告された。汚染のある地域には大変特徴的な生物相が形成されることが見いだされ, その生物相は多様性こそ減少するが, 種類の減少は個体数の増加によって補われ, 補償的な生態系が成り立っていることが明らかになった。これら特徴的な生物の耐性機構の一部については, サブテーマ4において報告されている。ここに出現する生物は重金属を多く取り込む種類と逆に取り込み量が少ない種の両方が見いだされ, それぞれ違った耐性の機構を持っていることが示唆されている。

殺虫剤の水域生態系への影響の研究は養鰻池において、処理前後の構成生物種の変化が研究された。殺虫剤は動物プランクトン、及びベントスに対し選択的に影響を与え、むしろ個体数の増加するものも見られる。この成果は既に報告されたが、本報告書には収録されていない。水田における除草剤、殺虫剤等の散布は頻繁に行われているが、水田の生物相への影響の研究が現在ほ場で始められた。比較対照のための無処理区とはかなり異なった生物相が見いだされている。生態系としての機能的な面への影響を明らかにすることが今後の課題である。

サブテーマ2

有害汚染物質が水界生態系に及ぼす影響とその回復過程の機序を解明するため種々のレベルのモデル生態系が設置、又は開発され以下のような成果が得られた。

- 1) 屋外の河川モデルでは有機リン系殺虫剤（2種）によって破壊された溪流生態系の回復過程について調べられた。この実験では破壊された生態系へのパイオニアとしてのユスリカの役割が示され、また付着藻の現存量が水生昆虫の摂食圧に大きく影響を受けていることが明らかにされた。
- 2) 霞ヶ浦底泥によって形成された湖沼のモデル生態系に有機リン系殺虫剤（2種）、昆虫幼若ホルモン様活性物質を作用させ、プランクトン群集に対する影響が調べられた。枝角類は殺虫剤に感受性が高いが、かいあし類は低いなど種間差が明らかにされた。わむし類の増殖期間の延長は枝角類の減少に伴う植物プランクトンの増加に伴うことが明らかにされた。
- 3) バクテリア、クロレラ、ミジンコ、ユスリカなどからなる4種類の微小モデル生態系における構成種の変動、継続性、再現性などについて検討がなされた。これらの系は3か月間安定な状態に保たれる。カドミウムの添加に対し、バクテリア-クロレラ-ミジンコの系で早期に影響が認められた。カドミウムの影響の機序として、ミジンコ又はユスリカ数の低下による細菌数の増加、総生物現存量の変化が明らかにされた。
- 4) 水界生態系の各種構成生物の動態をモデル化し、シミュレートするため会話型シミュレーションプログラム(BGS II)が開発された。BGS IIにより微小生態系の動態をシミュレートする数理モデルの試作を行い、3)の実験結果と類似した生態系の変動が再現された。BGS IIは会話型の機能を有しているため、生態系モデルの開発や改編にバッチ型処理に比較し極めて効率的であることが明らかにされた。
- 5) 当研究所で分離継代飼育した黄色系グッピーを用い農薬、重金属の急性毒性試験、生長、産仔に対する慢性毒性試験、行動に及ぼす影響試験が行われた。稚魚を用いることにより急性毒性試験の結果に安定した成績が得られることが分かった。有機リン系殺虫剤の慢性影響試験により次世代への影響評価が可能であることが示された。行動に対する影響は極めて感度の高い試験方法であることが明らかにされた。

サブテーマ3

水界生態系においては被食者も、その捕食者も同一の汚染環境に生息する 경우가多く、両者とも有害汚染物質を体内に蓄積する。そのため食物連鎖による生物濃縮とその生物影響について関心が持たれているが研究例は多くない。ここでは被食者—捕食者の関係にある各種の水生生物を用いた食物連鎖モデルによりカドミウムを主とした重金属の影響を検討した。手法としては被食者に3～5濃度段階で重金属を蓄積させ、これを長期間その捕食者に給餌し生物濃縮とその影響が研究された。これまで用いられた主な系は藻類(Cd, Cu)—ミジンコ、ワムシ；付着藻(Cd, Cu, Zn)—カゲロウ；ミジンコ(Cd, Cu, Hg)—淡水ヒドラ、イサザアミ；ミジンコ(Cd)—グッピー；乾燥酵母(Cd, Cu)—ユスリカ；ユスリカ(Cd, Hg)—グッピーなどである。これらの研究から食物連鎖による生物影響は1例(ミジンコ—淡水ヒドラ)を除き短期間では現れ難い事が明らかにされた。また、捕食者の生長や産仔、産卵に明らかな影響を及ぼす被食者中の重金属濃度は本報告書にも示されているように概して高く、100—1000 $\mu\text{g/g}$ (dry weight) のレベルであり、100以下の濃度ではその影響はほとんど見られなかった。

食物連鎖モデルによるCdやCuの生物濃縮では、通常考えられているような栄養段階を上がるに伴っての濃度の増加は認められず、捕食者中の重金属濃度は長期の実験でも被食者中のそれよりも低いレベルに滞った。これは本報告書でも示されているように被食者中の重金属がその捕食者に転移する割合がユスリカ(Cd)—グッピーの場合では1%以下と極めて低い事からも分る。一方、ミジンコ(Cd)—グッピーの系におけるCdの転移率は、上記の系の数倍を示したが、このような差はサブテーマ4で明らかにされた被食者中での重金属の存在状態の差にも起因していることが示唆された。付着藻(Cd, Cu, Zn)—カゲロウのモデル実験(本報告書)と野外調査で得られた藻類中の重金属濃度の値から、重金属汚染河川におけるCuは食物連鎖によって水生昆虫に有害な影響を及ぼし得る事が示された。

サブテーマ 4

食物連鎖による重金属の生物濃縮並びに水生生物体内での重金属の存在状態を解明するための研究として、以下の4項目が検討されここに報告されている。

1) ユスリカは汚染と密接な関係を持つ重要な指標動物とされており、重金属に対しても耐性を示すことが知られている。重金属の内でもカドミウムは蓄積性の重金属として、他の重金属とは生体内の動態が違うことが指摘されている。そこでカドミウムに対して耐性を示すユスリカが、どのような機構によって耐性を獲得又は保持しているかという観点から検討が加えられた。その結果、ユスリカの幼虫はカドミウムを非常に高濃度に蓄積するが、大部分のカドミウムは体内で、非特異的に生体構成成分に結合している可能性が示唆された。これはほ乳動物などで説明されているメタロチオネインによる解毒又は耐性機構とは異なっている。

2) ミジンコ(甲かく類)と水環境の指標動物としてよく利用されている動物である。ミジン

コについてもカドミウムに対する耐性機構を検討したところ、この動物はカドミウム結合タンパク質を誘導することから多少耐性を獲得しうることが示唆された。

3) 環形動物の一種であるシマミミズはカドミウムに対して強い耐性を示すことが報告されている。この動物についても耐性機構を検討したところ、カドミウム結合タンパク質を誘導していることが明らかにされた。しかしこの動物のカドミウム結合タンパク質は他の動物についてこれまで報告されているものとは著しく違っていることがわかった。

4) 水界生態系を形成する生物の内では、両生類は高等動物に属し、食物連鎖の面でも高位に位置している。そこでアフリカガエルを用いて、蓄積性の重金属であるカドミウムの食物連鎖実験が行われた。飼料中に存在するメタロチオネインに結合したカドミウムはほとんど体内に蓄積されないことが明らかにされた。またせきついで動物のメタロチオネインとして、アフリカツメガエルのメタロチオネインを特徴付け、カドミウムや銅の代謝との関連が検討された。

4. 今後の展望

モデル生態系も多種多様で自然界の一部を隔離したものから本報告にみられるようなビーカーレベルのものまで含まれる。前者については現在研究が継続中で近く報告されるであろう。本報告に発表された本研究所構内の屋外人工水路は自然の河川の一部ではないが、わき水から池に注ぐ河川の形をとり、自然の小河川そのものである。現在進行中の水田ほ場による研究も実際の場合に近いものである。しかし季節を問わない短期間の試験も一つの段階としては必要であり実験室内のモデル生態系の開発も重要である。本報告中にも既に一部が発表されているが、それに基づく予測モデルとともにさらに推進されるであろう。

生態系のもう一つの特徴である食物連鎖による濃縮や影響については基礎データをより多く得ることと同時に、いろいろな化学物質による影響の相違などの整理がなされなければならない。

重金属汚染水域からそれに耐性のある生物が見いだされその環境指標性が検討されてきた。それらの生物の耐性機構について興味ある事実が分かってきたが、生物の種、あるいはそれ以上の分類学上の区分における比較生化学的な研究がなされるであろう。

小坂川における重金属汚染を指標する生物相

安野正之¹・畠山成久¹

Flora and Fauna indicating Heavy Metal Pollutions in the Kosaka River

Masayuki YASUNO¹ and Shigehisa HATAKEYAMA¹

Abstract

Some species of attached algae or chironomids in rivers are known to be tolerable to heavy metal pollution. Surveys had been conducted in the River Kosaka, Akita prefecture where the effluent from closed mines as well as operating mines have entered, and we confirmed the specific flora consisting of *Achnanthes minutissima* and the predominance of chironomid larvae in the rivers polluted with heavy metals. *Baetis* spp. showed some tolerance to the heavy metals compared with other macrozoobenthos but decreased the density at the heavily polluted region. While, chironomid larvae composed of *Eukiefferiella* sp. and *Orthocladus* sp. increased in such regions. The relationships between the electric conductivity and the number of species of algae or insects or the abundance of them were clarified. The diversities of the flora and fauna decreased with the increase of the electric conductivity.

The accumulations of the heavy metals in these aquatic insects as well as fish in this river were also studied and it was found that *Baetis* spp. had highly accumulated Cd specifically. *Baetis* spp. had accumulated also Cu and Zn in great extent but some other species did so for these metals.

1. はじめに

重金属に汚染されている河川は小規模であるがまだかなり多く各地に残されている。そのほとんどが鉱山の廃水のためであるが、廃鉱は管理も十分でないことから現在に至っても汚染が続いている。これらの小河川についても環境基準値が適用され、防止対策がとられる。しかし鉱さいのような大量に積み上げられたものは容易に取除くことができない。いずれにせよ、環境基準値前後の重金属汚染が河川生態系に何らかの影響を与えていないのかどうか十分に研究されねばならない。

1. 国立公害研究所 生物環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Environmental Biology Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

重金属汚染河川の生物相調査はこれまでも数多くなされてきた¹⁻¹⁰⁾。しかしそれらは個々ばらばらであり、何らかの整理が必要である。ここでは秋田県小坂川及びその支流における調査結果に基づいて、重金属汚染の生態影響を種々な観点から検討する。

2. 研究場所及び方法

小坂川は全長およそ20km、小坂町から10km 下流で米代川に合流し日本海へ注ぐ。川幅は小坂町付近で約50m、平均流量は約100t/s である。この流域には現在も操業中の鉱山もあるが、休廃止鉱山が数十とあり、鉱さいの堆積は川沿いに多い。坑内水の川への流入は完全に止めることは不可能で、やはり汚染源となっている。したがって支流の多くの箇所を調査地点に選んだが、汚染されていない比較対象となる箇所は限られていた(図1)。図中 AO 1 の上流、B の上流にそれぞれ稼働中の鉱業所があり、最大の小坂鉱山の廃水の出口は小坂町の下に当たる Z 3 のすぐ上流にある。重金属汚染のほとんどないと思われた地点は A 5 と C である。

河川の水量及び河川水中の重金属濃度は季節によって変動する。調査は1979年から続けられているが、ほとんどは10月に行われ、1983年は4月に行われた。2か点におけるカドミウムと銅の

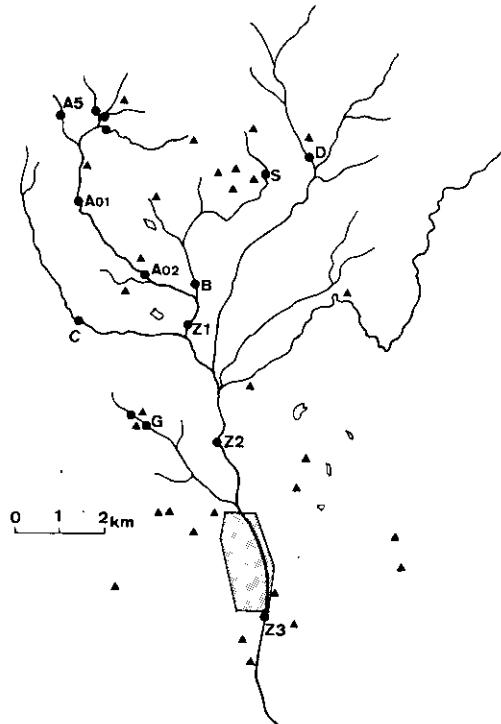


図1 小坂川及びその支流
三角は鉱山跡及び操業中の鉱山、黒丸は調査定点、Z 2 と Z 3 の間の陰の部分
は小坂町を示す。

河川水中の濃度及び電導度の年による違いを図2に示す。これはしたがって必ずしも経年変化とは言えない。むしろこの程度の変動は容易に起こることと考えねばならない。少なくともB地点ではカドミウムの濃度が低いこと、逆にZ3地点では環境基準値を超えることがあること、銅の濃度は両地点ともほぼ同じレベルにあることが示されている。電導度は河川中に溶けている重金属イオン濃度をよく反映すると考えられるが、B地点では銅以外の鉄や亜鉛などが高濃度で流れているために銅の濃度とは一致しない。Z3地点においても鉄、亜鉛等の濃度は高いが、おそらく銅、カドミウムの濃度と平行して変動していて見かけ上よく一致している。

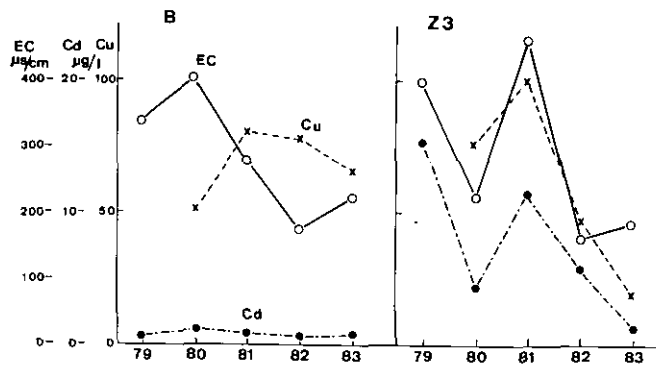


図2 小坂川二地点における電気伝導度、及び水中のカドミウム、銅の濃度の年変動

河川の水温、pH、電気伝導度、流速、流量等は現場で測定し、水中の重金属濃度はサンプルを実験室に持ち帰り ICP 及びフレイムレス偏光ゼーマン原子吸光光度計（日立180-80型）で測定した。藻類は碟表面の5 cm×5 cmの面積をブラシで洗い落としサンプルとし1か点8サンプル取った。その半分はクロロフィル a 量を測定するため現地でグラスファイバーフィルターでろ過し、残る4サンプルはホルマリンを加えて持ち帰り、後で検鏡した。水生昆虫はNGG40のサーバーネットを用いて河床の0.1m²から採集した。密度推定用として1か点4サンプル、さらに重金属分析用に採集を行った。分析用は採集直後 EDTA で洗い、種が明確に分けることができる場合を除いて、個別にあらかじめひょう量したガラスビンに入れて持ち帰り分析に供した。ユスリカは大きさ20cm×20cmの枠でメッシュ NXX13のネットで水生昆虫とは別に採集を行った。1か点4サンプルであった。魚は主として重金属分析に供するために採集を行ったが、小坂町役場によって採取されたものも重金属の蓄積量の測定に供した。

これらは現場で体長、体重を測り、肝臓、腎臓、消化管などを分けて水生昆虫の場合と同様にガラスビンに移し研究室に持ち帰った。

3. 汚染河川特徴種

環境汚染が甚だしい場合に生息できる生物は極端に限られる。重金属汚染の場合も例外ではない。一般に環境に傾斜がある場合に生物種はそれぞれ最適の生息環境を占め、多少重なり合いながら分布している。しかし重金属の場合にはこの考えは当てはまらない。ほとんどの生物にとって最適の環境は汚染の少ない側にあつて、汚染に対する耐性の差が見かけ上分布の違いをもたらしている¹¹⁾。しかし重金属汚染河川に大変特徴的であることで知られている生物がいくつか存在する。例えば *Achnanthes minutissima* である。この種は重金属に汚染されていない河川でも見いだすことができることから生息範囲がかなり広いものと考えられる。しかし重金属汚染が甚だしいところでは、ほぼこの種類のみになってしまうことがよく知られている⁶⁾。図3は調査地点での電導度（鉱山廃水には多種類の重金属が含まれているので、その混合したものとして水質を表している。実際に銅、カドミウム、亜鉛、鉛などの濃度とよい相関がある。）とケイ藻類の中での *Achnanthes minutissima* の比率の関係を示している。この図からもこの種の優占の割合が重金属濃度とよく対応していることがよく分かる。ここではどの重金属が影響しているか決定することはできないが、電導度にして150 $\mu\text{U}/\text{cm}$ 付近でこの種の優占が始まる。なぜこの種が重金属耐性があるのか分かっていない。

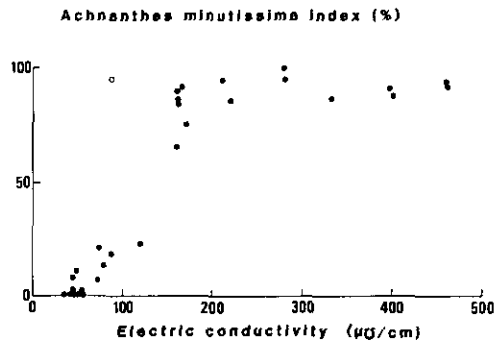


図3 小坂川調査地点の電気伝導度と付着ケイ藻中の *Achnanthes minutissima* の比率

図4はこれら調査地点の電気伝導度と付着藻の現存量を示すクロロフィル量の関係を示している。付着藻類の現存量はそれを摂食する底生動物群集の影響を受けているので、そのまま評価しにくい面がある^{12,13)}。

しかしここで電気伝導度が50 $\mu\text{U}/\text{cm}$ 程度のところでは多くなることから、重金属は一般的には付着藻の現存量を抑制しているということが十分考えられる。また一方、電気伝導度が200 $\mu\text{U}/\text{cm}$ 以上のところでもクロロフィルa量が高くなる場所がある。これは *Achnanthes minutissima* のような耐性種によるものである。

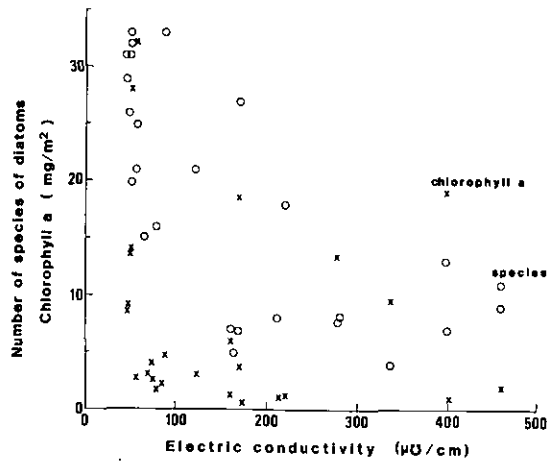


図4 小坂川調査地点の電気伝導度と付着藻類のクロロフィルa量及び種類数の関係

ケイ藻類の出現種数と電気伝導度の関係はクロロフィルaとやや異なっていて、電気伝導度の増加に伴う種類の減少は多少緩やかである。しかし確実に減少する。ラン藻類や緑藻類についても同様のことが見られている。

同じようなことは底生動物についても言える(図5)。ただしこの図にはユスリカは含まれていない。個体数はばらつきが見られるが、種類数は電気伝導度100から200 $\mu\text{U}/\text{cm}$ にかけて減少し、それ以降はあまり変化せず10種内外であった。ほとんどの底生動物は、このように重金属汚染に耐性がなく200 $\mu\text{U}/\text{cm}$ 程度で生息できなくなることが示される。この耐性の多少ある種の中にコカゲロウ (*Baetis* spp.) が含まれる。この仲間も汚染された河川はもとより汚染されていない河川にも生息しており種類も多いのであるが、分類の研究が十分進んでいない。重金属汚染河川に出現する種が特殊なものかどうか検討中である。

ケイ藻類の場合と同じことをこの種についても試みてみた結果が図6に示されている。底生動物の中での比率は電気伝導度が200 $\mu\text{U}/\text{cm}$ までは上昇するが、それ以上ではむしろ減少する。したがって *Achnanthes minutissima* のような指標性は持っていない。この種が本来好金属性でなく耐性が他の種に比して高いため、やや汚染された地区で優占種となるものと考えられる。このような性質の底生動物は他にもあると考えられるが、個体数が多くなることはない。

ほんとうの意味で好金属性の種はユスリカである。有機汚染の場合と同じように重金属汚染の甚だしい河川ではユスリカしか見ることができない。またその個体数も非常に多くなることが報告されている^{3,4)}。種類については研究がなされておらず、1種なのか複数種なのか、汚染地に特有な種なのかなど不明のままであった。小坂川の上流の非汚染地区と中流域の汚染地区のユスリカ相について調べた結果を表1にまとめてある。非汚染地区ではユスリカは10種以上見いだすことができる。それぞれの個体数は決して多くない。それに対して汚染地区では *Orthocladius* sp.と

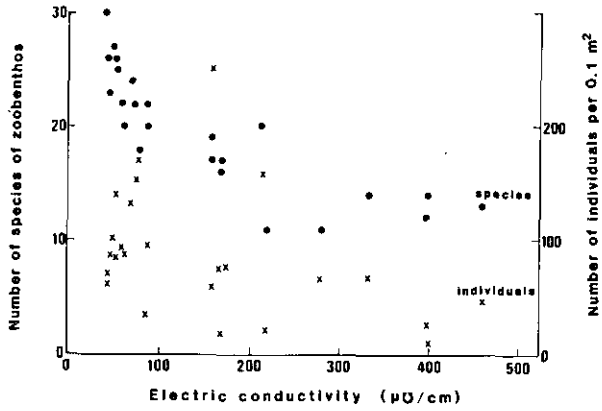


図5 小坂川調査地点の電気伝導度と底生動物の個体数及び種類数の関係

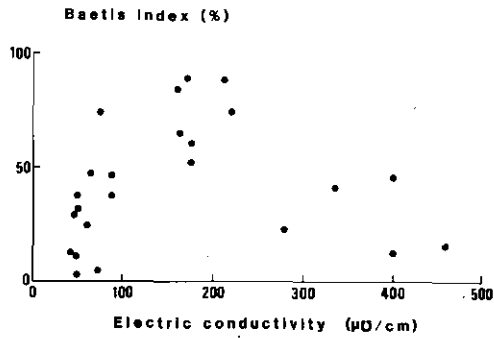


図6 小坂川調査地点の電気伝導度と底生動物中のコカゲロウの比率

表1 小坂川におけるユスリカ相 (20×20cm当たり)

	汚染区	
	(A-5)	(Z-3)
Tanypodiinae		
Genus spp.	<10	
Orthocladinae		
Genus spp.	>10	
<i>Thienemanniella</i> sp.	<10	
<i>Corynoneura</i> sp.	<10	
<i>Orthocladius</i> sp.		680
<i>Eukiefferiella</i> sp.		365
Tanytarsini		
Genus spp.	>10	

幼虫時代頭部の黒い *Eukiefferiella* sp. の 2 種が特徴的である。両種とも非汚染地区には出現せず、やや汚染された地点には他の種に混じって見ることができる。両種とも汚染区で個体数の増大を認めた。この数値は前記底生動物のデータには入っていない。通常底生動物の採集に用いられるネットのメッシュではその多くが通ってしまうからである。小坂川に見られる 2 種のユスリカは他の重金属汚染河川で優占種となるユスリカと同じであると考えられ、その出現は汚染のよい指標となる。恐らく未記載種でこれまで知られておらず、新種と思われる。出形県の重金属汚染河川からは、これらに加えてさらに別の特徴種を見いだしている。

4. 群集構造の特性

既に述べたように重金属汚染によって種数また一般的には個体数の減少も起こる。その結果群集は単純化していく傾向であり多様性は減少してくる。図 7 は小坂川のいろいろな地点における底生動物と付着ケイ藻類のそれぞれについてシャノン・ウィーバーの式で計算した多様性指数である。

H' は電気伝導度とは指数関数的関係にある。かなりばらつきがあるが、汚染度が高くなると多様性は減少する。二つの生物群では多少の差が認められ、丁度前記特徴種の場合と同じである。すなわちケイ藻類の場合には少数種による優占の度合がここに現れている。底生動物の場合、ユスリカが同じ方法で取られていないため、その優占度がここに現れていない。汚染度の高い地点でコカゲロウが減少するために多様性指数は 1 近くに留まっている。生物群集としては個体数も減少しかなり違ったものになっている。 H' のばらつきはかなり大きい特定の汚染地域に限れば、重金属汚染の尺度として十分用いることができる。このシャノン・ウィーバーの指数は種類数の変化とよく対応する。種類数の減少に対する個体数の変化は必ずしも一定でない。そこには生物

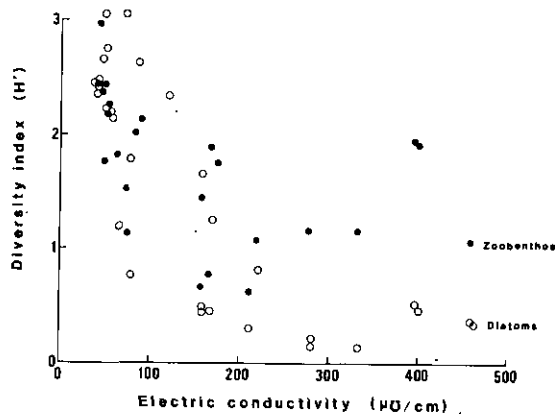


図 7 小坂川調査地点の電気伝導度とケイ藻類及び底生動物における多様性指数との関係

相互の関係が関与しているからである。

図8に河川生態系に汚染物質あるいは環境の破壊による衝撃によって生起する変化を示す。河川生態系において安定した状態では比較的少数種のラン藻によって付着藻類群集は構成されている。底生動物群集もこれには一枚かんでいる。環境の変化はこれをむしろ複雑化する場合がある。さらに進行した場合はこの報告に見られるような耐性種のみが残ることになる。競争種、摂食者の減少は藻類現存量を増加させるが、これはまた動物の個体数増加の引金になり、元の方角へ向うことになる。重金属汚染の場合のケイ藻類とユスリカの関係はこの図の最終段階を極相にしたものである。

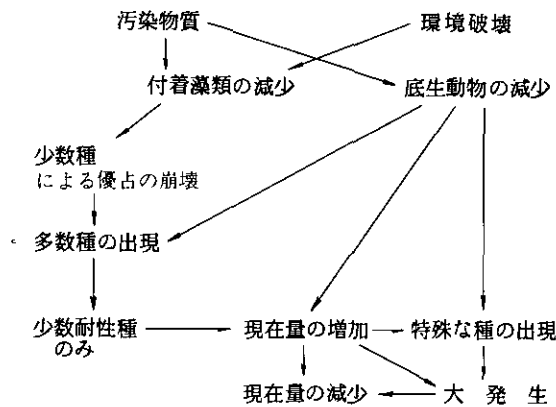


図8 環境汚染によって生起する河川生態系の変化

5. 蓄積者としての環境指標生物

本来生息するべきはずの生物がないということは大変重要な指標である。魚はその意味では大変感度のいい指標生物である。しかし汚染物質の蓄積者としては定着性に欠けていて不適當かもしれない。とはいうものの食物連鎖の上位にある魚を無視するわけにはいかない。重金属汚染地区では採集することは容易ではない。1981年上流域でイワナ、汚染されている中流域でアブラハヤと放流されたヤマメが採られ、肝臓中の重金属が分析された(表2)。ここで非汚染区は電気伝導度で $120\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下、汚染区はそれ以上としそれぞれの平均で示している。河川水中の重金属はフレイムレス偏光ゼーマン原子吸光光度計で測られているが、それでも分析限界を考慮すると非汚染地区の値はほぼ0と考えられる。カドミウムと銅も魚の肝臓中の重金属量は二つの区域間で有意の差がある。銅の場合にはその差が大きいことが示されている。濃縮係数は湿重に換算し直して計算されている。おおよそ100から400倍である。魚肉中の重金属ははるかに低い、カドミウムの場合の最大値は、 $2.36\mu\text{g}/\text{乾重 g}$ 、湿重に換算すると約 0.5ppm であった。

底生動物の重金属含量についてはできるかぎり多くの生物について調べられた。カドミウムにつ

いてはあまり顕著な差が出ないのが普通であったが、トビケラとカゲロウでは特異的に高い値を示した。銅についてはすべての種が汚染地区で高く有意な差であった。特にトビケラとカゲロウが飛抜けて高い値であった。図9はコカゲロウとヘビトンボの重金属含量を示している。コカゲロウは非汚染地区にも汚染地区にも分布していること、及び藻類をえさとしている種類を代表するものとして取り上げた。ヘビトンボは各種の汚染に比較的強いこと、捕食者として食物連鎖の上位に位する生物の代表として取り上げた。非汚染地区ではカドミウムも銅も蓄積量は少ない。ヘビトンボの場合には汚染区でカドミウムの量は有意差となる程高くない。しかし銅の蓄積量はかなり高くなること示されている。魚の肝臓に比べると、数倍である。魚の場合には臓器ごとに分けて分析したが、虫の場合は丸ごとであることを考慮すれば虫の重金属蓄積量は魚に比べてはるかに高いことが分かる。コカゲロウの場合はさらに高い重金属含量が見いだされた。カドミウムにしても魚におけるよりはるかに高く乾重1g当たり40 μ gも含んでいた。最大値は74 μ gであった。カゲロウ、中でもコカゲロウはカドミウム蓄積者として、環境を指標しうる生物である。銅の蓄積量も大変高く、ヘビトンボの蓄積量をりょうがしている。しかし銅については他の生物をもってしてもモニターすることができる。ここに例示した2種の昆虫は比較的汚染に強く、魚

表2 小坂川の魚類肝臓中の重金属量

	カドミウム		銅	
	非汚染地区	汚染地区	非汚染地区	汚染地区
河川水 (μ g/l)	0.04	11.49	0.73	100.8
魚 (μ g/g乾重)	2.10 \pm 1.1	6.57 \pm 2.5	13.66 \pm 13.53	174.2 \pm 135.2
濃縮係数	—	114	3700	345

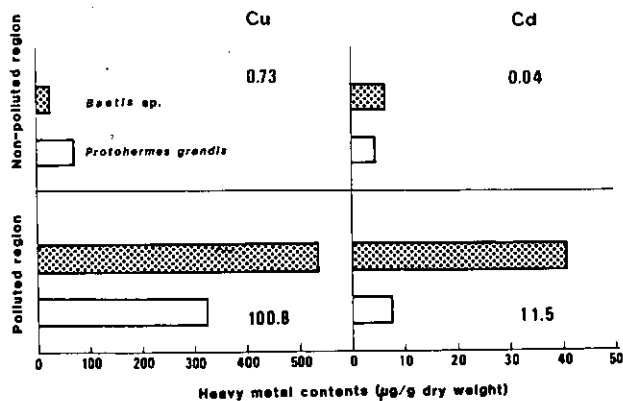


図9 小坂川における2種の水生昆虫の重金属含量
 図中の数字は河川水中のカドミウムないし銅の濃度 (ppb)。

の生息できないところでも見いだすことができる。ヒゲナガカワトビケラがモニター生物として考えられる⁹⁾が、生息可能地域は上記2種程広くない。

これらより重金属汚染性の高いユスリカは意外と重金属含量は低く、取り込まないのか、排せつが速いのか今後明らかにされるであろう。

6. まとめ

秋田県北部の小坂川流域には現在操業中の鉱山並びに多数の廃鉱がある。この川のいろいろな地点での生物調査から、重金属汚染に耐性のある特徴的な生物が見つげられた。

ケイ藻の *Achnanthes minutissima* の出現する割合は調査地点の電気伝導度と高い正の相関があり、これは重金属濃度が高くなると他の種が消失するためである。同じことは2種のユスリカの出現についても言える。これらは他の生物が耐えられない程度の汚染地区でむしろ個体数の増加が認められた。コカゲロウもかなり耐性があると思われるが、この種は重金属、特にカドミウムを他のどの生物よりも高く蓄積することが分かった。銅と亜鉛についてはトビケラやヘビトンボとあまり大きな相違はなかった。

引用文献

- 1) 御勢久右衛門 (1960): 奈良県立里, 川股両鉱山及び和歌山県飯盛鉱山廃水の河川生物に及ぼす影響. 日本生態学誌, 10, 38-45.
- 2) 御勢久右衛門 (1960): 兵庫県生野, 岡山県棚原鉱山の廃水の河川生物に及ぼす影響. 日本生態学誌, 10, 193-201.
- 3) 御勢久右衛門 (1961): 岐阜県神岡, 石川県尾小屋, 宮城県細倉鉱山の廃水の河川生物に及ぼす影響. 日本生態学誌, 11, 111-117.
- 4) Sprague, J. B., Elson and R. L. Saunders (1965) Sublethal copper-zinc pollution in a salmon river—a field and laboratory study. *Advances in Water Pollution Res.*, 1, 61-82, Pergamon Press, London.
- 5) 渡辺 直・原田三郎 (1976): 鉱山廃水流入河川, 市川における底生動物相の回復について. 兵庫県公害研究報告, 8, 20-25.
- 6) 渡辺仁治・墨田迪彰 (1976): 梯川水系の川床付着物による重金属の濃縮と生物相. 日本水処理生物誌, 12, 65-72.
- 7) 渡辺仁治・墨田迪彰・大柳実喜子・岩切末枝保 (1977): 鉱山閉山後における梯川水系の生物相の変化と川床付着物, 生物による重金属の濃縮. 淡水生物, 20, 44-56.
- 8) Nehring, R. B., R. Nisson and G. Minasian (1979): Reliability of aquatic insects versus water samples as measures of aquatic lead pollution. *Bull. Environ. Contam.* 22, 103-108.
- 9) Jeffree, R. A. and N. J. Williams (1980): Mining pollution and the diet of the purple-striped gudgeon *Mogurnda mogurnda* Richardson (Eleotridae) in the Finnis River, Northern Territory, Australia. *Ecol. Monogr.*, 50, 457-485.
- 10) Peckarsky, B. L. and K. Z. Cook (1980): Effect of Keystone mine effluent on colonization of stream benthos. *Ent. Soc. Amer.*, 10, 864-871.

- 11) Hynes, H. B. N. (1971) : The biology of polluted waters. Liverpool Univ., Press Liverpool.
- 12) Yasuno, M., J. Okita, and S. Hatakeyama (1982) : Effects of temephos on macrobenthos in a stream of Mt. Tsukuba. *Jap. J. Ecol.*, 32, 29-38.
- 13) Yasuno, M., S. Fukushima, J. Hasegawa, F. Shioyama and S. Hatakeyama (1982) : Changes in the benthic fauna and flora after application of temephos to a stream on Mt. Tsukuba. *Hydrobiologia*, 89, 205-214.
- 14) 橋本 博・押田裕子・菊地洋子・笹野英雄・中村 弘・松本昌雄 (1981) : 河川の重金属汚染指標としての水生昆虫. *東京衛研年報*, 22, 296-303.

屋外水路による殺虫剤の生態系影響の実験的研究

安野正之¹・菅谷芳雄²・岩熊敏夫¹

Effects of Insecticides on the Benthic Community in a Model Stream

Masayuki YASUNO¹, Yoshio SUGAYA² and Toshio IWAKUMA¹

Abstract

Benthic community in an outdoor model stream was exposed to organophosphorus insecticides, temephos at a concentration of 5 ppm for 30 minutes or chlorphoxim at 2 ppm for 3 hours. Three species of chironomids were predominant in this stream in the 1st experiment and *Hydropsychodes brevilineata* joined to them in the 2nd experiment. Both of the insecticides killed the majority of zoobenthos, and as a result, the bloom of epilithic algae occurred. From this result, the extent of grazing pressure by chironomids on algae was assessed. The chironomid populations recovered quickly but trichopteran larvae did slowly.

There were some differences in the toxicity between the two insecticides. *Paracyclops fimbriatus* and *Procladius* sp. were drifted only by chlorphoxim.

1. はじめに

これまで農地に散布された殺虫剤や除草剤が河川などの水系に流入しその本来の生物相を異なったものに置き換えてしまっていることは経験的によく知られている。特に水田は長期間にわたって数多くの殺虫剤が散布されてきたが、残念ながらその影響についての研究例がない。Heckman¹⁾は果樹園内の水路の最近の生物相を25年前のそれと比較し、数多くの種類が姿を消したことが、またある種類は影響を受けないが、殺虫剤抵抗性が増加したことが、新しい種類としてユスリカが出現したこと等を記している。春日(未発表)は茨城県の一水田から採集したホウネンエビが数ppmのスミチオンに対しても耐性があることを示した。恐らく最近抵抗性を得て生存し続けることが

-
1. 国立公害研究所 生物環境部 〒305 茨城県筑波群谷田郡小野川16番2
Environmental Biology Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県筑波郡谷田郡小野川16番2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

できた種の一つと考えられる。

山地の溪流はこのような殺虫剤汚染からまぬがれていると考えられていたが、近年の松林への空中散布は水生昆虫にも多大の影響を及ぼしている。Yasuno ら²⁻⁴⁾は溪流の水生昆虫群集への殺虫剤の影響を調べた。生物の種によって影響の受け方は異なっており、ある期間特異な生物相が起きること、また本来はほとんど見られない種が優占種となることなどが明らかにされた。自然の生物相の変化が殺虫剤の直接的な影響ばかりではなく、生物相互の関係による2次的な影響によって大きく左右されていることが前記の研究で示唆されたことから、水路を作っての実験的研究が行われた。

2. 方法

屋外水路は国立公害研究所の敷地内に設置された。長さ100m、幅23cm、こう配2%で井戸水を掛流しにした。流量は0.47 l/s で流速は底部に玉砂利を敷いたため部分により異なるが約12cm/s である。水路は松林の中を通り、下流部のみが草地にある。実験は水を流しはじめてから半年以上経てから行った。その時点では水路の生物相はかなり安定したものと考えられる。実験は2回行った。実験1では有機リン殺虫剤、テメフォスの乳化剤を5 ppm になるよう30分間流した。実験2は前実験の影響が消えたと思われる半年後に同じく有機リン殺虫剤のクロルフォキシムを2 ppm の濃度になるように調整し3時間流した。

殺虫剤は流入終止後水路に残る量はほとんどないと考えられる。真直な水路であるため、乱流もなく、ほぼ期待濃度及び暴露時間が満たされたと考えられた。各実験共、2本の水路の一方はコントロールに供された。殺虫剤の生物への影響は(1)底生動物の流下数、(2)同じく残存数、(3)付着藻類の現存量としてのクロロフィル *a* 量について調べられた。(1)の流下数は水路の末端にネットを設置し、一定時間間隔で交換して集めた。(2)は10cm²の枠を用いて水路の上中下流の各地点でサンプルを採集した。(3)は同じく10cm²枠に入る玉石をメチルアルコールに移しその抽出液によって測定した。

実験前の水路を流れる水の化学的データは表1のとおりであった。硝酸態、亜硝酸態の窒素は検出されないが、全窒素は多く、リン酸態のリンの量も藻類が増殖するに十分な量が含まれている。これらの栄養塩濃度はこの水路を100m 流下してもほとんど減少しない。COD はわずかながら上昇し、水路で増殖した藻類などの自然流下を示している。水路の生物は井戸水起源のものと考えられる *Paracyclops* と空中から入った昆虫等で造られている。藻類は *Stigeoclonium* sp. が優占し、*Achnanthes* sp. などがこれに次いでいる。出現生物種は表2のとおりである。

3. 結果

実験1

殺虫剤投与前は二つの水路ともユスリカが優占していて、他の水生昆虫はあまり出現しない。

表1 屋外実験水路の水質

	Channel A		Channel B	
	0m	100m	0m	100m
Water temp. (°C)	18.9	21.5	18.9	21.5
Cl ⁻ (mg/l)	3.13	3.25	3.13	3.25
COD (mg/l)	0.8	1.2	0.2	2.3
T-N (mg/l)	0.43	0.40	0.40	0.40
NH ₄ -N (mg/l)	0.07	0.06	0.05	0.05
T-P (mg/l)	0.52	0.48	0.49	0.43
PO ₄ -P (mg/l)	0.31	0.30	0.30	0.28

表2 実験水路に出現する生物

Algae	Insecta	Ostracoda
<i>Stigeoclonium</i> sp.	<i>Chironomus flaviplumus</i>	Copepoda
<i>Achnanthes</i> spp.	<i>Polypedilum nuvifer</i>	<i>Paracyclops fimbriatus</i>
<i>Nitzschia palea</i>	<i>Paratrichocladium rufiventris</i>	Oligochaeta
<i>Tetraspora</i> sp.	<i>Cricotopus yatabensis</i>	Nematoda
<i>Phormidium</i> sp.	<i>Thienemanniella majuscula</i>	
<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Procladis</i> sp.	
<i>Synedra</i> sp.		
<i>Gomphonema</i> sp.	<i>Simulium uchidai</i>	
	<i>Hydropsychodes brevilineata</i>	

ユスリカは3種が普通にみられ、そのうちでも *Thienemanniella majuscula* が多数を占めていた。しかし3種は分布が多少異なっていて *Chironomus flaviplumus* は上流部分 *Thienemanniella* は下流部分に分布の中心があった。

殺虫剤散布はほぼ全域のユスリカを消滅させた。(図1)

しかし約1か月後には早くも同じ3種は回復してしまった。ただし *Chironomus flaviplumus* の個体数の増加とその分布域の拡大が認められた。この殺虫剤投与後のユスリカの現存量の変化は藻類量の変化とよく対応している。図2はユスリカのいなくなった5月20日すぎとユスリカの回復した6月初めのクロロフィル *a* 量を示している。コントロールの水路では、両日のクロロフィル *a* 量に大きな差が見られない。また下流部では *Thienemanniella* の摂食圧のために非常に少ないことが示されている。処理水路では、殺虫剤投入約2週間後のクロロフィル *a* 量は非常に高く、ユスリカの回復した6月にはコントロールと量も分布もほぼ同じになった。この結果からいかにユスリカの摂食圧が大きいかわかる。このことは、溪流の付着藻類の現存量が水生昆虫に大きく影響を受けていることを示唆するものである。我々の溪流における実験では藻類の組成の変化、水生昆虫の組成の変化が認められたが、その場合、破壊された生物相をつくろう種として真っ先に出現するのがユスリカである。この実験水路では最初からユスリカを優占とする群集であることから修復も同じ種によってなされたのも当然である。

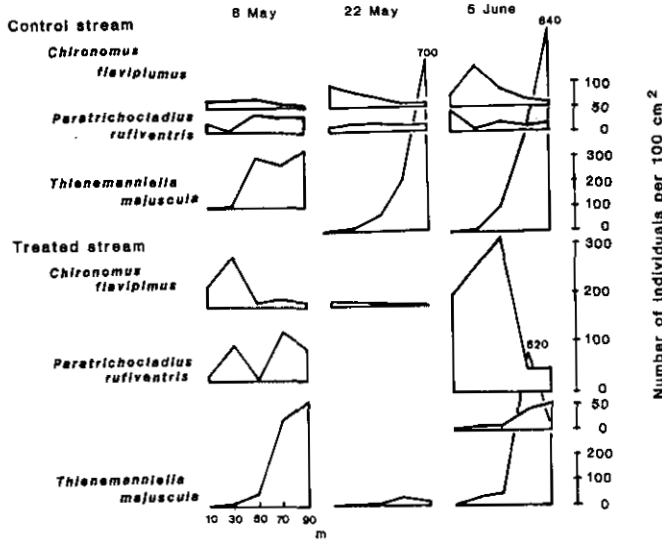


図1 テメフォス投入（5月9日）前後の屋外水路のユスリカ幼虫生息密度

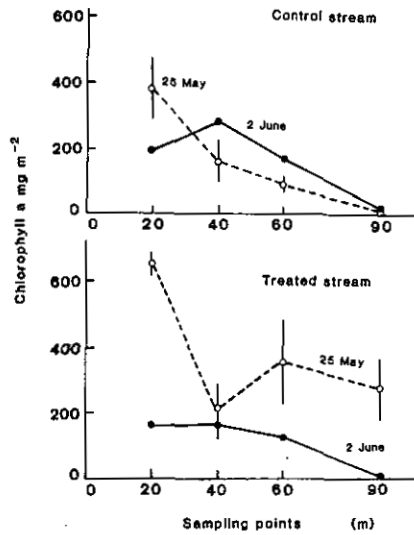


図2 テメフォス投入後の屋外水路の付着藻の現存量（クロロフィルa量として）の変化

実験2

表3はクロルフォキシムを投入後2時間の流下昆虫とミジンコの総数を示す。実験1のときとちがってトビケラが構成員として重要な位置を占めていた。流下は無処理の水路では *Thienemanniella* で1時間当たり100を超える個体数が目立つが他の種類はほとんどないが、あっても少数で

ある。殺虫剤投入後、流下はすぐ始まり最初の30分間に約10万匹の *Thienemanniella* が流れた。もちろん100m 水路の途中で引っ掛かった個体も数多いと思われるので絶対数としての意味はあまりないが、この水路において *Thienemanniella* が大きな位置を占めていることが明らかとなった。この最初の30分間に多く流れ出した種は *Hydropsychodes* である。この個体数もその現存量からすればかなり高いものである。ユスリカの *Cricotopus* と *Paratrichocladius* は次の30分間に流下し、*Chironomus flaviplumus* はさらに次の30分間に流下した。この水路には捕食性のユスリカである *Procladius* が生息しているが、実験1のテメフォスではこの種は影響を受けない。重いため流下する個体は少ないが、クロルフォキシムには弱いことが示された。同じことは *Paracyclops* についてもいえる。前の実験のときにも多数生息していたが、このように多数流下することはなかった。

表3 クロルフォキシム投入後(矢印)の水路の底生動物の流下

Time	<i>Hydropsychodes brevilineata</i>	<i>Procladius sp.</i>	<i>Thienemanniella majuscula</i>	<i>Cricotopus yatabensis</i>	<i>Paratrichocladius rufiventris</i>	<i>Chironomus flaviplumus</i>	<i>Paracyclops</i>
Treated channel							
1350-1420	5	0	69	1	2	0	±
1420-1450	5708	1	108728	0	0	0	5895
1450-1520	1295	3	15962	58	311	1	4697
1520-1650	429	7	9792	0	0	191	3772
1650-1720	454	3	2631	0	5	4	1969
Control channel							
1420-1450	1	0	7	0	1	0	±
1450-1520	3	0	77	0	6	0	±
1520-1650	2	0	89	0	3	0	±
1650-1720	9	0	92	0	0	0	±

殺虫剤処理後の底生生物各種の密度の変化は図3に示されている。*Hydropsychodes* は殺虫剤処理水路では消失してから回復するまで2か月かかるようである。コントロール水路においても数の増減がはなはだしいが、 10cm^2 に40個体以上に達することがあることがこの水路の生産性の高さを示している。(この種は雑食性で巣にかかる自然流下のユスリカを食べていることが確かめられた)。*Thienemanniella* は流下数に示されたようにはほぼ全個体が処理水路から消えたのに2週間後には回復のきざしが見られる。隣接する無処理水路からの成虫が産卵するためと思われる。(図3) *Chironomus flaviplumus* は殺虫剤投入前の個体数は少ないのにもかかわらず、投入後の中下流部でコントロール以上に個体数が増大した。このように逆に増加することは実験1でも認められた。同じような殺虫剤投入後の個体数の増加は *Paratrichocladius* にも認められる。しかし前種とはその増大する時期に相異があること。上流部でも増加することでも違っている。

附着藻類の現存量は上中流部では殺虫剤投入の影響が認められない。(図4)。恐らく上流部でのユスリカの現存量がもともと下流部程多くなかったため、ユスリカの消失の2次的な影響がは

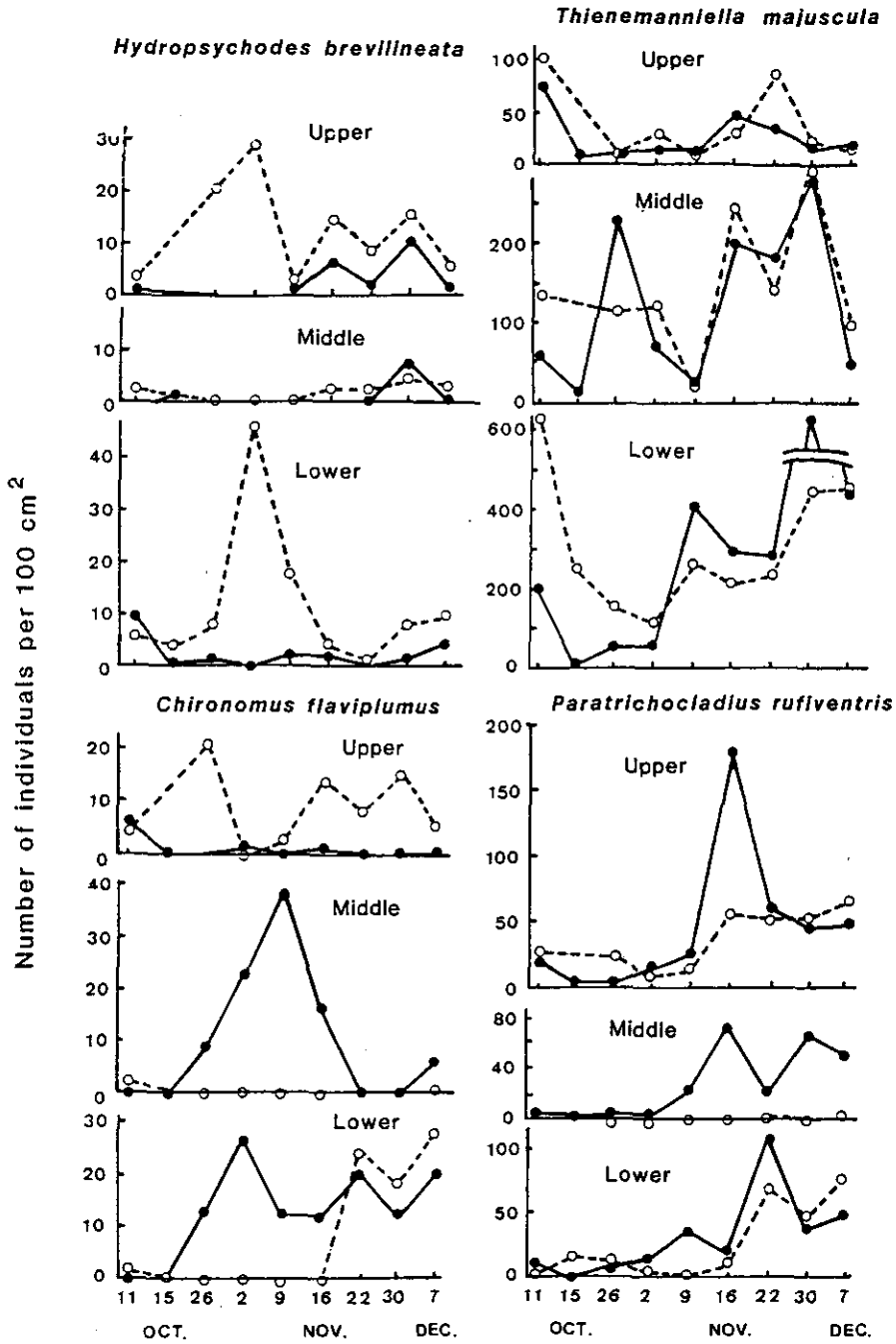


図3 クロルフォキシム投入後の屋外水路出現主要底生昆虫(トビケラ(左上), 及びユスリカ3種)の生息密度の変化。
それぞれ上流, 中流, 下流について示されている。黒丸は処理水路, 白丸は対照水路。

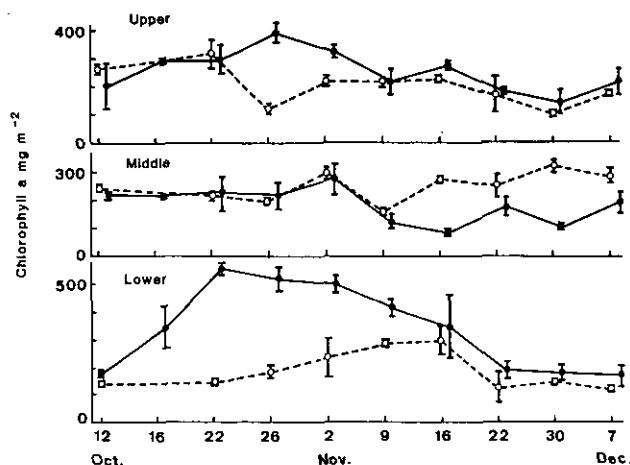


図4 クロルフォキシム投入後の礫上のクロロフィルa量の変化
黒丸は処理水路，白丸は対照水路，殺虫剤は10月11日投入。

っきり出なかったであろう。下流部は殺虫剤投入後10日位で $500\text{mg}/\text{m}^2$ に達した。コントロールと同じレベルに減少するまで約1か月を要した。この減少は *Thienmanniella* の増加と対応している。

Thienmanniella は河川の最上流部に普通の種で、同じく上流種であるブユの *Simulium uchidai* がこの水路に出現するように、この実験水路は上流域の性質を持っている。水量が少なく、流速が遅いことが原因している。*Chironomus flaviplumus* は逆に下流種かあるいは池に出現する種類である。*Paratrichocladius* は他のところではまだ記録されていないが、この程度の水量の水路には出現するものと考えられる。これらの出現は河川としてはややきれいなタイプに分類できる。*Stigeclonidium* の優占も同じようなことを示していると考えられる。

Thienmanniella は巣を造らずに糸を石の上に張るだけで動き回り、積極的に付着藻類を摂食する大変小型のユスリカであるが、この水路では高密度に達し石の上の藻類を食べつくしてしまう程であった。自然の溪流でこのような密度になることはむしろまれかもしれないが、その摂食圧の藻類へ与える影響がいかに大きいかが、この実験から明らかとなった。

4. 考 察

河川の汚染の研究に実験水路が使われるようになったのは決して新しいことではないが、その数は多くない。当初は河川の自浄作用の研究が目的であったが⁵⁾、その後重金属や農業の汚染が問題になるに従い、その目的に合う実験水路が開発された⁶⁻⁸⁾。水路の活用はその生態系における変化を克明に観察し記録できる点にある。したがって系に出現するバクテリア、原生動物から水生昆虫、貝類まで含めて、その影響を調べることができる。残念ながら魚が入る系は作られていな

い。もし作られるとすれば、自然の河川から引き込んだ型の実験水路で一次生産をその系の外に依存する生態系でなければ存続しえない。

屋外水路によるこのような実験の場合も、事故的な汚染と、長期の連続した汚染の研究の両方があり、重金属汚染のような場合は後者であり、農薬汚染の場合は前者である。時に合成化合物についても長期の暴露が行われることもあるが限られている⁹⁾。いずれも系を構成する様々な生物種の汚染物質による影響を主として数の減少からみている。したがって系あるいは群集としての多様性の減少が目立つわけであるが、本研究にみられるような2次的影響、すなわち付着藻の現存量の増加、あるいはその後の底生動物の増加などの点について報告されていない。つまり、生物相互の関係を十分考慮していない点にある。系が破壊された後の回復の過程を今後詳細に研究する必要があり、その際にはますます生物相互の関係が重要となると思われる。

本研究で用いた2種の殺虫剤はどちらも低毒性（ほ乳類に対して）で経口毒性はラットで5000 mg/kg から10000mg/kg である。水路の生物に対する影響にやや違いがみられた。しかしその後の変化には大きな違いをみることができなく、むしろ同じような現象がみられたことは、このような殺虫剤の混入が河川で生じたときの影響を予測するのに役立つと思われる。

これまでの自然の溪流での実験と比較するとここで明らかとなった殺虫剤投入による生物群集の変化は、自然の溪流の一部に過ぎず、しかも変化の前半の部分、すなわち、回復過程でパイオニアとして位置づけられるユスリカ群集が主体であったことに特徴があり、現在、同じ水路で行っている実験はさらに発達した生態系から成っており、また別の過程もみられている。その成果は近く発表される予定である。

5. まとめ

屋外水路の底生生物群集を有機リン殺虫剤テメフォスを5 ppmの濃度で30分間あるいはクロロフォキシム2 ppmを3時間暴露した。最初の実験では数種のユスリカが優占する群集で、これらが殺虫剤で消失後付着藻の増加が認められた。比較対照に対する付着藻の増加分はユスリカによる摂食量に相当すると考えられた。ユスリカ群集の回復過程では比較対照の水路における密度よりむしろはるかに高い密度に達した。また安定するまでに3種のユスリカの分布が変化し、ユスリカの種間の関係も系の維持に関与していることが示された。2回目の実験ではコガタシマトビケラが多数生息していた。この種の回復はユスリカに比して大変遅かった。

引用文献

- 1) Hechman, C. W. (1981) : Long-Term Effects of Intensive Pesticide Applications on the Aquatic Community in Orchard Drainage Ditches near Hamburg, Germany. Arch. Environm. Contam. Toxicol., 10, 393-426.

- 2) Yasuno, M., J. Ohkita, K. Saito, Y. Nakamura, S. Hatakeyama and S. Kasuga (1981) : Effects of fenitrothion on benthic fauna in small streams of Mt. Tsukuba, Japan. *Jpn. J. Ecol.*, **31**, 237-245.
- 3) Yasuno, M., J. Okita, and S. Hatakeyama (1982) : Effects of temephos on macrobenthos in a stream of Mt. Tsukuba. *Jpn. J. Ecol.*, **32**, 29-38.
- 4) Yasuno, M., S. Fukushima, J. Hasegawa, F. Shioyama and S. Hatakeyama (1982) : Changes in the benthic fauna and flora after application of temephos to a stream on Mt. Tsukuba. *Hydrobiologia*, **89**, 205-214.
- 5) Wuhrmann, K., J. Ruchti and E. Eichenkerger (1966) : Quantitative experiments on self-purification with pure organic compounds. *Third Int. Cont. Water Pollut. Res. Water Pollut. Cont. Fed.*, 1-17.
- 6) Giesy, J. P., H. J. Kania, J. W. Bowling, R. L. Knight, S. Mashburn and S. Clarkin (1979) : Fate and biological effects of cadmium introduced into channel microcosms. *EPA Ecol. Res. Ser.*, EPA-600/3-79-039, 159p.
- 7) Maki, A. W. (1980) : Evaluation of toxicant effects on structure and function of model stream communities : Correlations with natural stream effects. In *Microcosms in ecological research*. ed. by J. P. Giesy, 583-609. Tech. Information Cent, U. S. Dept Energy.
- 8) Eichenberger, E., Shlatter, F. Weilemann, H. and Wuhrmann, K. (1981) : Toxic and eutrophicating effects of Co, Cu and Zn on algal benthic communities in rivers. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, **21**, 1131-1134.

モデル生態系における動物プランクトン群集に対する殺虫剤の影響

長谷川淳一¹・安野正之²

Impact of Insecticides on the Zooplankton Communities of Model Aquatic Ecosystems

Junichi HASEGAWA¹ and Masayuki YASUNO²

Abstract

Model aquatic ecosystem was made with the mud taken from Lake Kasumigaura, in which the resting eggs of zooplanktons had been contained. And the impact of two organophosphorus insecticides, chlorpyrifos methyl, chlorphoxim, and an insect growth regulator, methoprene, on the zooplankton communities of this ecosystem was studied. Almost all species of zooplankton collected from Lake Kasumigaura were observed in this ecosystem. Populations of a copepod, *Eodiaptomus japonicus*, and its nauplius were less susceptible to these chemicals and no obvious effect on this species was observed. Cladoceran populations were severely affected by both organophosphorus insecticides. Methoprene did not affect these populations, but the delayed population growth was observed. *Brachionus calyciflorus* continued to increase for a longer period in the treated ecosystem, where cladocerans were eliminated, than in control ecosystem. *Filinia longiseta* remained at low density level in control ecosystem but increased conspicuously in the treated ecosystem. The increase of *Conochilus dossuarius* was observed only in the methoprene treated ecosystem.

1. はじめに

農業生産、森林管理あるいは公衆衛生などの目的で極めて多量の農薬が散布されており、その水域への流入経路は様々である。これらの一部は直接河川、湖沼へ散布されているが、農業害虫、森林害虫防除の空中散布からのドリフト、農業排水あるいは農地地表水からの間接的な流入も多

1. 昭和55年度～国立公害研究所共同研究員

(東京大学 農学部 農業生物学科害虫学教室 〒113 東京都文京区弥生1-1-1)

Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present Address: Department of Agricultural Biology, the University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

2. 国立公害研究所 生物環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

Environmental Biology Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

い。またこれらの農薬は単に水生生物の死亡、除去をもたらすばかりでなく、生態系内に様々な二次的变化を引き起こすことは良く知られており、個々の水生生物に対する農薬の毒性に関する研究も多い。しかし殺虫剤が生態系内に引き起こす現象に関する実験研究はあまり行われていない¹⁻³⁾。

本研究では、動物プランクトン源として霞ヶ浦より採取した底泥中の耐久卵を用いたモデル生態系を作成し、3種類の殺虫剤が動物プランクトン群集に対して与える影響を明らかにする。

2. 実験方法

モデル生態系の作成は室温 20℃の恒温室内で行い、600×295×360 mm のガラス製水槽 8 個を用意した。異物の混入を避けるため実験中は各水槽上部を厚さ 3 mm のガラス板で被い、また以前に行われた実験の影響を避けるため各水槽内側には同大水槽のビニール袋を使用した。光周期は 12 時間明 : 12 時間暗とし、光源には昼光色蛍光灯を用いた。なお光合成有効光量は各水槽の水面直上で約 13 W・m⁻²であった。動植物プランクトン源には、2 月に霞ヶ浦高浜入 (36°8' N, 140°20' E, 水深 2 m) より採取し、室温 5℃の暗室中に約 8 か月間保存した底泥を使用した。また培養水には、水道水を逆浸透ろ過装置 (Milli-RO 4) によりろ過し、塩素除去のため自然光下に 3 日間放置した水を使用した。実験に際して各水槽当たり約 2000 ml の上記霞ヶ浦底泥及び 40 l の培養水を加え、実験中は各水槽に曝気を行った。

共試殺虫剤は有機リン系殺虫剤 chlorpyrifos methyl 20% 乳化剤, chlorphoxim 20% 乳化剤及び昆虫幼若ホルモン様活性物質 methoprene 10% 製剤で、処理濃度はそれぞれ 0.1, 0.01, 1 ppm とした。殺虫剤処理は実験開始後 3 日目に行い、無処理区、処理区とも反復数は 2 とした。

動物プランクトンの定量採集は実験開始より、7, 10, 14, 17, 21, 24, 27, 30, 34, 37 日目に行った。動物プランクトンのサンプルは内径 12 mm のシリコンチューブを用いたサイホンにより各水槽当たり 2 l を採取し、網目 58 μm のナイロンネット地 (NXX 25) でろ過濃縮後、90% エチルアルコール中に保存した。各サンプルは 50 ml メスシリンダー中で 12 時間以上静置沈殿させ 10 ml に濃縮後、サンプル全体について顕微鏡下 150 倍で動物プランクトンの同定及び計数を行った。

3. 結果及び考察

モデル生態系における動物プランクトン構成種数はわむし類 26 種、枝角類 6 種、かいあし類 5 種であり (表 1)、霞ヶ浦における出現種⁴⁾のうち耐久卵で越冬するわむし類、枝角類についてはその大部分が認められた。しかし幼若個体 (copepodite) で越冬すると思われるかいあし類の Cyclopoida 亜目に属する種類はほとんど出現しなかった。これは底泥の低温保存の影響であると考えられ、3 か月以内の保存であれば cyclopoid も出現することが確認されている⁵⁾。

かいあし類の *E. japonicus* 及びその nauplius については、殺虫剤の影はほとんど認められなかった (図 1)。一方枝角類の殺虫剤に対する感受性はわむし類、かいあし類に比べ極めて高く、そ

表1 モデル生態系における動物プランクトンの出現種

ROTIFERA	
<i>Brachionus calyciflorus</i>	<i>Polyarthra vulgaris</i>
<i>B. angularis</i>	<i>Asplanchna priodonta</i>
<i>B. quadridentatus</i>	<i>A. brightwelli</i>
<i>B. budapestinensis</i>	<i>Pompholyx complanata</i>
<i>B. urceolaris</i>	<i>Conochilus dossuarius</i>
<i>B. caudatus</i>	<i>Hexarthra mira</i>
<i>B. diversicornis</i>	<i>Filinia longiseta</i>
<i>B. forficula</i>	<i>Collotheca</i> spp.
<i>Keratella tropica</i>	<i>Trichocerca similis</i>
<i>K. cochlearis</i>	<i>T. capucina</i>
<i>Euchlanis dilatata</i>	<i>Trichocerca</i> spp.
<i>Mytilinia ventralis</i>	
CLADOCERA	
<i>Moina micrura</i>	<i>Diaphanosoma</i> sp.
<i>Bosmina fatalis</i>	<i>Ceriodaphnia cornuta</i>
<i>B. longilostris</i>	<i>Alona guttata</i>
COPEPODA	
<i>Eodiaptomus japonicus</i>	

の減少率は chlorpyrifos methyl, chlorphoxim 処理区では無処理区に対して 90—100 % であった。しかし methoprene 処理区では30日目以降にその増殖が認められた(図2)。またわむし類はその増殖パターンから二つのタイプに分けられる。すなわち一方は殺虫剤処理の有無にかかわらず出現した *B. calyciflorus* であり、他方は処理区でのみ顕著な増殖を示した *F. longiseta*, *C. dossuarius* である(図3)。

B. calyciflorus は、無処理区では7日目に最高密度に達した後激減し14日目以降は全く出現しなかったが、chlorpyrifos methyl 処理区では7日目にはほぼ無処理区とほぼ同じ密度に達し10日目にも引き続きその密度を維持した。その原因として以下の様なことが挙げられる。すなわちモデル生態系におけるクロロフィル *a* 量は、7日目には無処理区で $7 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, chlorpyrifos methyl 処理区で $13 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, 14日目にはいずれも $2 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下であり比較的少なかった。また10日目の枝角類平均密度は無処理区では $35 \text{ inds} \cdot \text{l}^{-1}$ でありその96%は *M. micrura* 及び *B. fatalis* が占めたが、処理区ではいずれも $1 \text{ inds} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下であった。さらにろ水速度は *B. calyciflorus*⁵⁾ の 1—7

$\mu\text{l} \cdot \text{animal}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ に対して *M. micrura*⁷⁾では $100\text{-}200 \mu\text{l} \cdot \text{animal}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ である。以上のことから、殺虫剤処理による枝角類の減少すなわちその摂食圧低下が植物プランクトンの増加をもたらし、その結果 *Brachionus* の増殖期間が延長されたと考えられる。また処理区における *B. calyciflorus* の消滅は無処理区同様植物プランクトンの減少を伴っていること、並びにバクテリアはその食物としては不適当であることから⁸⁾、*B. calyciflorus* は植物プランクトンに対する依存度が高く、処理区におけるその消滅は *Brachionus* 自身による過剰摂食が原因であったと思われる。

F. longiseta 及び *C. dossuarius* の増殖も、無処理区では7、10日目でありしかも低密度であった。しかし処理区では *F. longiseta* は殺虫剤の種類にかかわらず20、24日目には無処理の4-16倍の密度に達し、特に枝角類がほとんど除去された chlorpyrifos methyl 処理区及び chlorphoxim 処理区ではその増殖は顕著であった。また *C. dossuarius* の明らかな増殖は殺虫剤処理区のうち *F.*

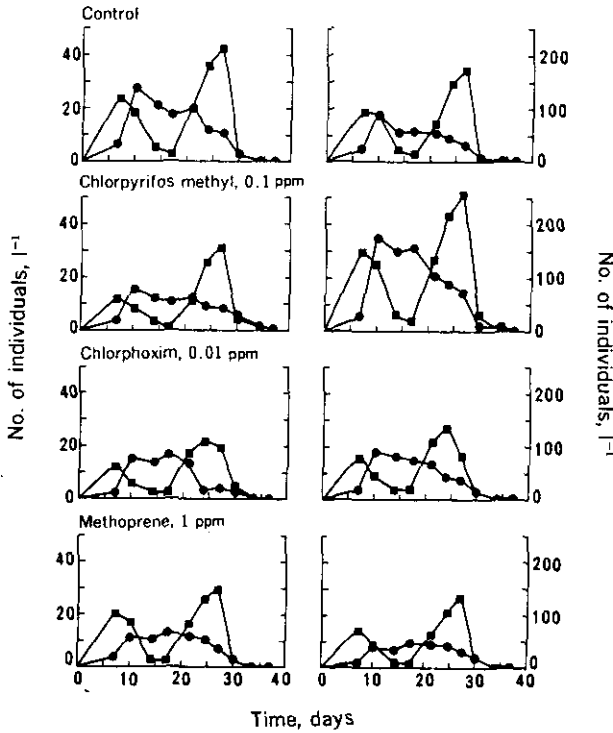


図1 モデル生態系におけるかいあし類(●)及びその nauplius (■)の密度の変動
左縦軸はかいあし類の密度を、右縦軸はnaupliusの密度を示す。

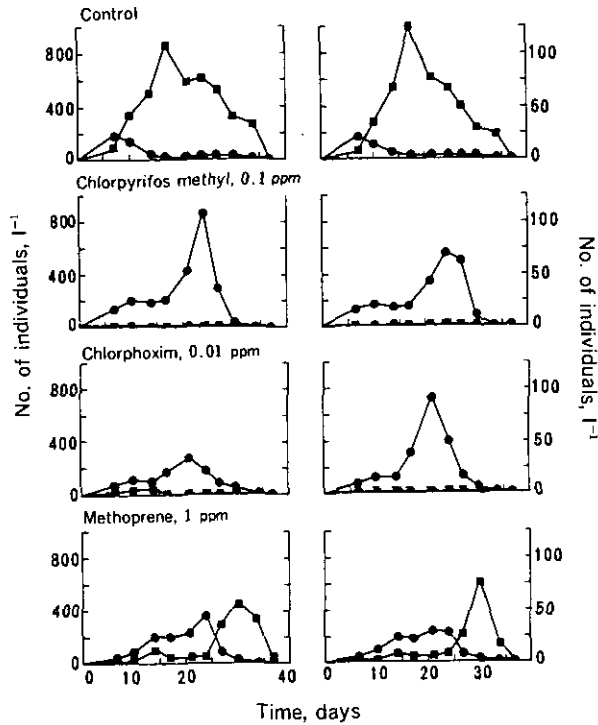


図2 モデル生態系におけるわむし類(●)及び枝角類(■)の密度の変動
左縦軸はわむし類の密度を、右縦軸は枝角類の密度を示す。

longiseta の密度が他に比べ低かった methoprene 処理区に限られた。ところで *M. micrura* を単独培養した場合には、*Chlorella*, *Chlamydomonas* などの緑藻類によりその個体群を長期間維持することができる (personal observation)。しかし前にも述べた様に、モデル生態系におけるその増殖時にはクロロフィル *a* 量は数 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ であるため、*Moina* が植物プランクトンに依存していたとは考え難く、むしろバクテリア、デトリタスを主に摂食していたのではないかと考えられる。また *F. longiseta*, *C. dossuarius* もバクテリア、デトリタスを好んで摂食することから⁹⁾、ここでもまた殺虫剤による *Moina* の除去が食物の増加を産み *F. longiseta* の増殖を可能にしたものと思われる。さらに *C. dossuarius* は *F. longiseta* よりも競争的に下位にあり、殺虫剤により枝角類の増殖が抑制され、しかも *F. longiseta* が殺虫剤あるいは他の何らかの要因により低密度であった場合にのみ増殖可能であったと考えられる。

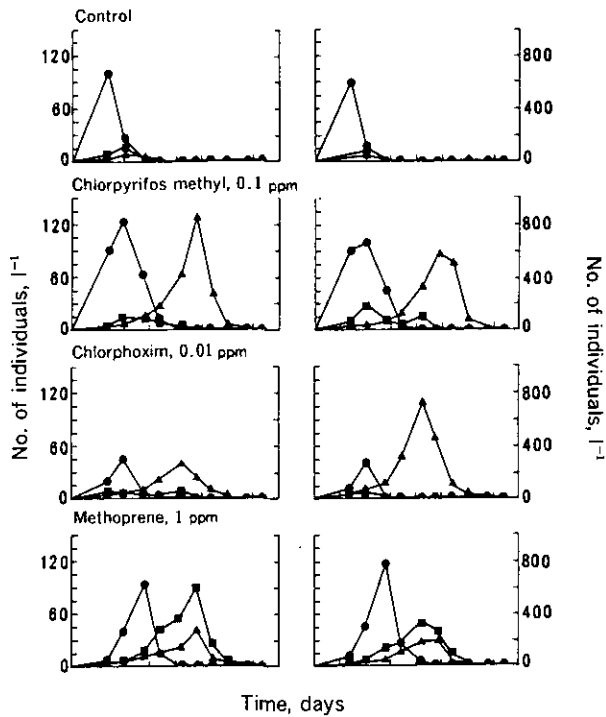


図3 モデル生態系における主なわむし類3種の密度の変動

●, *B. calyciflorus* ; ▲, *F. longiseta* ;
 ■, *C. dossuarius*.

左縦軸は *B. calyciflorus* 及び *C. dossuarius* の密度を、右縦軸は *F. longiseta* の密度を示す。

4. まとめ

動物プランクトン源として霞ヶ浦より採取した底泥中の耐久卵を用いたモデル生態系を作成し、有機リン系殺虫剤 chlorpyrifos methyl, chlorphoxim, 昆虫幼若ホルモン様活性物質 methoprene が動物プランクトン群集に対して与える影響を調べた。モデル生態系では霞ヶ浦における出現種の大部分が認められた。かいあし類は殺虫剤に対する感受性は低くその影響はほとんど認められなかった。枝角類では殺虫剤の影響は著しく, methoprene 処理区で30日目以降にその増殖が認められたただけであった。わむし類の *B. calyciflorus* は枝角類が除去された処理区では無処理区よりも長期間増殖し続けた。*F. longiseta* は無処理区では低密度であったが、枝角類の除去された処理区では 20, 24日目に顕著な増殖を示した。また *C. dossuarius* の増殖は methoprene 処理区のみに限られた。

引用文献

- 1) Hurlbert, S. H., M. S. Mulla, and H. R. Wilson (1972) : Effects of an organophosphorus insecticide on the phytoplankton, zooplankton, and insect populations of fresh-water ponds. *Ecol. Monogr.*, 42, 269-299.
- 2) Simpson, R. L., and D. Pimentel (1972) : Ecological effects of the aquatic herbicide Fenac on small ponds. *Search* (Cornell Univ. Agric. Exp. Stn., Ithaca, N. Y.), 2(10), 1-57.
- 3) Campbell, B. C., and R. F. Denno (1976) : The effect of temephos and chlorpyrifos on the aquatic insect community of a New Jersey salt marsh. *Environ. Entomol.*, 5, 477-483.
- 4) 安野正之・森下正彦・菅谷芳雄 (1977) : 霞ヶ浦高浜入における底生生物と動物プランクトン. 国立公害研究所特別研究成果報告, 第1号, 94-107.
- 5) 長谷川淳一・安野正之 : in preparation.
- 6) Starkweather, P. L., and J. J. Gilbert (1978) : Feeding in the rotifer *Brachionus calyciflorus* IV. Selective feeding on tracer particles as a factor in trophic ecology and in situ technique. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 20, 2389-2394.
- 7) 花里孝幸 : personal communication.
- 8) Pourriot, R. (1965) : Recherches sur l'ecologie des Rotiferes. *Vie et Milieu, Suppl.*, 21, 1-224.
- 9) Pourriot, R. (1978) : Food and feeding habits of Rotifera. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, 8, 243-260.

微小生態系の構造に対する有害汚染物質の影響評価

宮下 衛¹・安野 正之¹

Evaluation of Toxicant Effects on Structure of a Microcosm

Mamoru MIYASHITA¹ and Masayuki YASUNO¹

Abstract

To assess ecological effects of pollutants, an aquatic microecosystem consisted of bacteria, green-algae *Chlorella* sp., water-flea *Moina macrocopa* and chironomid midge *paratanytarsus Parthenogeneticus* was developed. The microecosystem was established in 200 ml beakers containing 150 ml of autoclaved tap water. Four types of microecosystem were constructed, Type I: Bacteria-Chlorella, Type II: Bacteria-Chlorella-Moina, Type III: Bacteria-Chlorella-Paratanytarsus, and Type IV: Bacteria-Chlorella-Moina-Paratanytarsus. *M. macrocopa* and *P. parthenogeneticus* populations in these systems persisted for three months. Parameters being observed at intervals during the experiment were the densities of *M. macrocopa*, *P. parthenogeneticus* and bacteria, pH, chlorophyll a, phaeopigment and total biomass. The averaged coefficient variation (CV) for the densities of *M. macrocopa*, *P. parthenogeneticus* and bacteria in these systems was 51.5, 41.4 and 56.4 percent, respectively. The CV values for total biomass and pH were much lower than that for the densities of *M. macrocopa*, *P. parthenogeneticus* and bacteria. To examine the repeatability of the present microecosystem, the parameters in two experiments of Type II were compared. The patterns of the changes in the parameters were almost identical between the two months.

The response of microecosystems to the stress of cadmium were observed. The population growth of *M. macrocopa* and *P. parthenogeneticus* was inhibited with 10 ppb Cd. In Type II, the differences in the density of *M. macrocopa* and chlorophyll a between control and 10 ppb Cd treatment became significant after day 4. Significant differences in the density of bacteria, pH and total biomass were detected after day 8, 16 and 20, respectively.

1. 国立公害研究所 生物環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Environmental Biology Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan,

1. はじめに

自然の生態系はあまりに大きく複雑であるため、そこに住む生物がどのように生活し、また、どのような働きをしているかを理解することは極めて難しい。自然の生態系の解明の手段として、多くの場合、湖や河川、あるいは森林などから、それらを構成している動植物や、それらの住み場である底質、土壌、水などをポットや水槽などに移して、再び自然の生態系の模型、いわゆるモデルエコシステムを作り、その中での動植物の働きや、相互関係、物理的環境との関係などを調べる方法がとられている。

当初、モデルエコシステムは河川の藻類の物質代謝¹⁾、リンの水槽における循環²⁾、など自然の生態系の構造を明らかにするために主として用いられていたが、環境汚染問題の進行につれて、自然の生態系における汚染物質の蓄積や移行³⁾、個体群に対する影響⁴⁾、などを調べるための有効な手段になりうるのではないかということで注目されるようになった。

環境汚染問題に関してのモデルエコシステムを用いることの利点としては、水槽などの容器にとじ込めた状態で実験が行えるので環境の汚染の心配のないこと、生態系の一部分を取り出して実験を行うので、影響の検出が容易になり、短期間で調べることが可能なこと、また、大がかりな装置を必要としないので、物理的環境、汚染物質の濃度など、さまざまな条件で繰り返して実験を行えることなどがあげられる。

ここでは、環境汚染物質の影響を評価するために開発した細菌、クロレラ、ミジンコ、ユスリカからなるビーカーレベルのモデルエコシステムについて報告する。

2. モデルエコシステムの組み立て

2.1 構成種について

モデルエコシステムが独立した生態系として機能するためには、生産者、消費者、分解者の三者が必要とされる。生産者としては、緑藻の代表的な種であるクロレラ、消費者としては、いずれも単為生殖で増殖するタマミジンコ⁵⁾、ユスリカ^{6,7)}を選んだ。分解者としては、タマミジンコやユスリカの飼育に伴い、それらと共存している細菌をそのまま用いることにした。これらは、これまで実験室内で飼育してきた生物で、容易に繁殖できる種であること、実験期間スペースの点で、一世代の期間が短く、小型の容器内で世代交代を繰り返す種であること、さらに他の種の生物と共存できる種であることなどを基準として選ばれた。

2.2 実験条件について

モデルエコシステムのタイプ、初期条件、実験条件については表1に示した。200 mlのビーカーに滅菌した上水500 mlを入れ、所定量のクロレラやタマミジンコ、ユスリカを接種し、直径9 cmのガラスシャーレでふたをしたものを1セットのモデルエコシステムとした。これらをポリエチレン製のバットに12セットずつ並べ、30 W 蛍光灯を15本並べた縦 60 cm、横 180 cmの実験

表1 モデルエコシステムの種類と実験条件

Microecosystem	
Type I :	Bacteria-Chlorella
Type II :	Bacteria-Chlorella-Moina
Type III :	Bacteria-Chlorella-Paratanytarsus
Type IV :	Bacteria-Chlorella-Moina-Paratanytarsus
Experimental Conditions	
Container :	200ml Beaker
Culture Medium :	150ml Tap Water (Autoclaved)
Temperature :	23±2℃
Light Intensity :	5,000 lx, Fluorescent Light
Photoperiod :	12h-Light, 12h-Dark
Materials Inoculated	
<i>Chlorella</i> sp.	3.33 × 10 ⁷ cells/ml
<i>Moina Macrocopa</i>	10 individuals
<i>Paratanytarsus parthenogeneticus</i>	10 individuals

装置の上に置いた。一つの実験装置には同時に8バット、96セットのモデルエコシステムが置ける。またタイマーで照明時間を調整できるようにしてある。サンプリングは、4~6セットのモデルエコシステムをランダムに取り、全量を測定に用いることにより行った。なお、実験装置床面の照度は5000 lxで、12時間明暗期とした。実験装置は23±1℃の恒温室に置かれているが、モデルエコシステム内の水温は22~25℃であった。

3. それぞれのモデルエコシステムの特徴

3.1 細菌-クロレラ系 (系I)

この系は消費者を欠いた系であるため、モデルエコシステムとしては不完全な系である。クロロフィル量、細菌数は、30日目頃まではほぼ一定であったが、40日目以降、クロロフィル量の急激な減少がみられた。一方、細菌数は60日目頃まで増加するが、その後、減少する(図1)。クロレラの急激な減少に伴う、細菌の著しい増加がみられる。

3.2 細菌-クロレラ-タマミジンコ系 (系II)

この系は、系Iに消費者としてタマミジンコを加えたもので、最も単純なモデルエコシステムと言えよう。タマミジンコはクロレラを食べつくすまで急激に増加する。その後、クロロフィル量の増減に対応して、振動しながら徐々に減少する(図2)。細菌数も振動しているように見られるが、そのレベルは5×10⁸~2×10⁹/150mlの間にあり、安定している。栄養塩類はクロレラ→

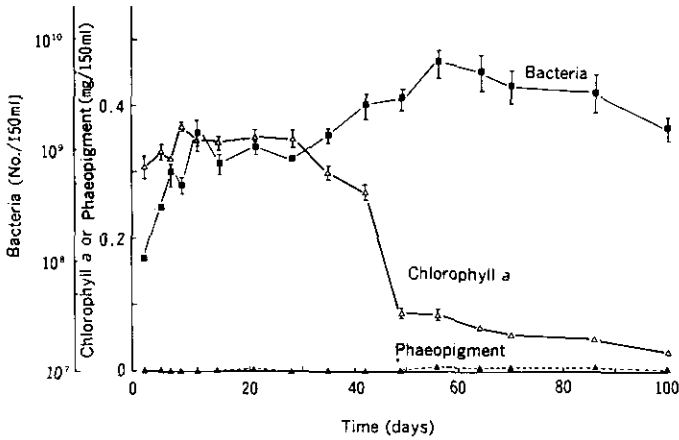


図1 細菌-クロレラ系 (系I) における細菌, クロロフィル, フェオ色素の変動

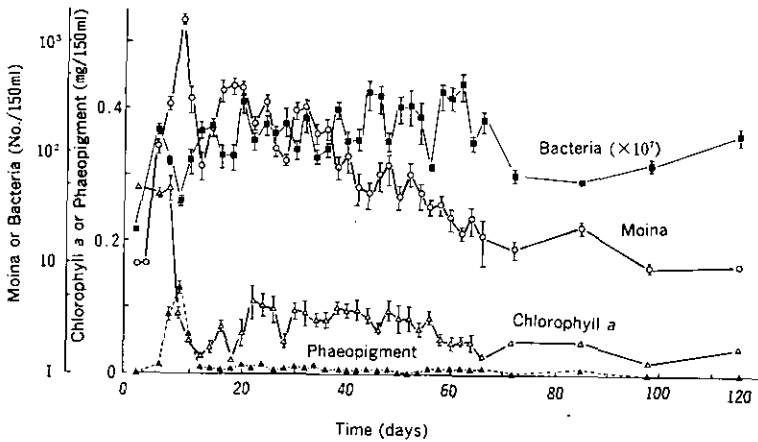


図2 細菌-クロレラ-タマジジンコ系 (系II) における細菌, タマジジンコ, クロロフィル, フェオ色素の変動

タマジジンコ→細菌→クロレラへとタマジジンコを介して系Iよりも早く循環するため, 初期のクロレラの生産力は高いと思われる。しかし, 後半になるとタマジジンコの死がいなど分解されにくい物質が系内に増加するために, 栄養塩類の回帰速度の低下, クロレラの生産量の低下, タマジジンコ個体群の減少と続き, やがてはタマジジンコも死滅する。

3.3 細菌-クロレラ-ユスリカ系 (系III)

タマジジンコの代わりにユスリカの幼虫を入れた系である。このユスリカは単為生殖により増

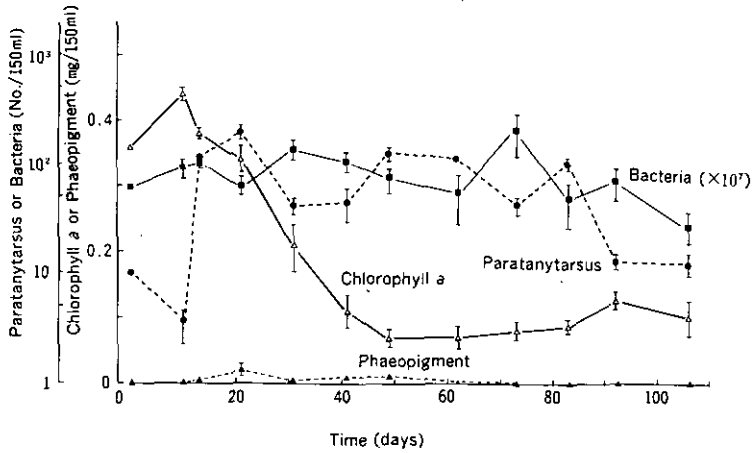


図3 細菌-クロレラ-ユスリカ系(系III)における細菌、ユスリカ、クロロフィル、フェオ色素の変動

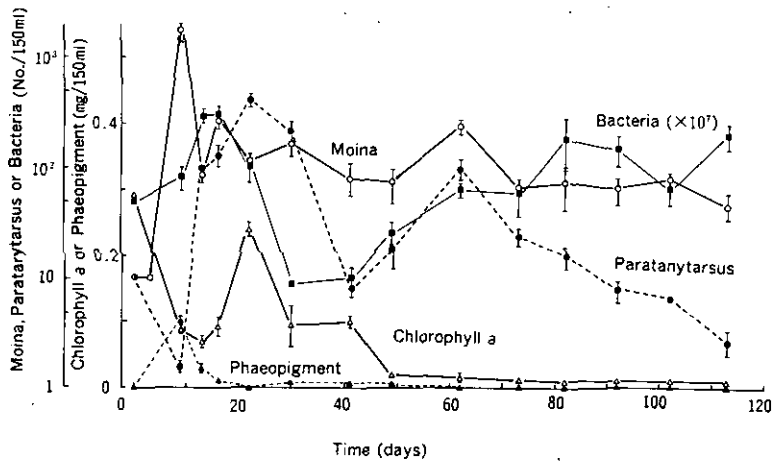


図4 細菌-クロレラ-タマミジンコ-ユスリカ系(系IV)における細菌、タマミジンコ、ユスリカ、クロロフィル、フェオ色素の変動

殖する点で、他のユスリカとは異なる。この系では、ユスリカは約30日の周期で、100日後までに3世代を繰り返す(図3)。このユスリカは約100個の卵を産む。ふ化した幼虫はビーカーの底や壁一面にクロレラで鞠状の巣を作るが、成長に伴い、えさの競争による減少がみられる。羽化時の死亡率も高く、次世代を産むことのできる親の数は数個体にすぎない。クロロフィル量はユスリカの幼虫のふ化後、10日目以降から急激に減少している。細菌数は系IIよりも少なく、大きな変化はみられなかった。

3.4 細菌-クロレラ-タマミジンコ-ユスリカ系 (系IV)

消費者としてタマミジンコ、ユスリカの二者を含む系である。タマミジンコは主として浮遊生活をしている。一方、ユスリカの幼虫は底面や壁面に巣を作って生活している点で互いに住み場を異にしており、共存可能である。この系と系II, IIIとの違いは、ユスリカの世代期間が長くなったために、3世代から2世代の繰り返しになったこと、及び、後期のタマミジンコの個体数は、系IIほど減少していないことの二点である(図4)。ユスリカの幼虫はモデルエコシステムの底面に沈殿したタマミジンコの死がいなどの堆積物を巣に利用したり、摂食することで栄養塩の回帰に帰与しており、クロレラの生産速度を高める働きをしていると考えられる。タマミジンコの個体数を多く保つ要因の一つと思われる。

4. モデルエコシステムの継続性について

系II, III, IVの構成種であるタマミジンコ及びユスリカ個体群のそれぞれの系における継続期間を表2に示した。72日後における系IIのタマミジンコは30区中28区で生き残っていたが、ユスリカの入った系IVでは、21区に減少していた。一方、ユスリカはタマミジンコの入った系IVにおいては29区で生き残っており、タマミジンコの共存はユスリカの生残に対して影響はないと考えられる。

表2 各マイクロエコシステムにおけるタマミジンコ及びユスリカ個体群の生残期間

Type of Microecosystem	Species	Time in days					
		0	16	24	34	54	72
I	Moina	30*	28	28	28	28	28
II	Paratany.	30	30	27	27	27	27
III	Moina	30	29	26	26	21	21
	Paratany.	30	30	30	30	29	29

*No. of microecosystems tested.

タマミジンコの個体数は、系II (図2) ではクロロフィル量の低下につれて徐々に減少しているが系IV (図4) では40日目以降のクロロフィル量の急激な減少にもかかわらず、タマミジンコの個体数は、系IIよりも多く維持されている。したがって、絶滅に関連した、クロレラの食べつくされる機会が系IVでは系IIよりも多いと考えられる。一方、ユスリカは世代数を3世代(系III)から2世代(系IV)に減少させており、栄養条件の悪化に伴い幼虫期間を増加させることで、絶滅の機会を減らしていると考えられる。

5. パラメーターについて

5.1 パラメーターと変動係数

モデルエコシステムの動態は、その構造と機能を示すパラメーターによって表される。構造は、システムの種や栄養段階の構成、群集構造を示すそれぞれの個体数や現存量などによって、機能は、そのシステムの活性を示す光合成や呼吸、栄養塩のサイクルなどによって表される。環境汚染物質などの影響をモデルエコシステムによって検出するためには、自然の生態系及び他のモデルエコシステムとの比較が可能であり、かつ、生態系全体の影響を反映するようなパラメーターを選択することが必要とされる⁹⁾。

表3に、ここで組み立てた四つのモデルエコシステムのそれぞれのパラメーターの変動係数を示した。この値は、繰り返して同一のモデルエコシステムを組み立てたときのモデル間のばらつきの度合いである。表3の値は、8日目から72日目まで8日おきにとった9回のサンプルの変動係数の平均である。細菌、タマジシコ、ユスリカの個体数を示すパラメーターの変動係数は大きく、pHのそれは最小である。これまでのモデルエコシステムの研究では、個体群の密度の変動係数が100%を超すことは普通であり、物理的なパラメーターの約4倍の値をとるとされている⁹⁾。現存量、クロロフィル量の変動係数は、系Iでは他の系よりも小さい値となっているが、細菌数では、他の系との差はみられない。タマジシコ、ユスリカの個体数の変動係数は系IIと系IV、系IIIと系IVの間で大きな差はみられなかった。ここでは、長期間継続するモデルエコシステムの組み立てを目的として研究を進めてきたために、主として個体数の変動を取り扱ってきたが、現存量でみるとタマジシコでは産まれた直後のものと成熟した親では約10倍の差があり、また、高密度の時には、小型のものが多くなる。したがって、現存量の変化で表すと、その変動は個体数で表したものよりも振幅は小さくなり、変動係数の値も小さくなる。これは、ユスリカ幼虫についても同様である。

表3 各パラメーターの変動係数の平均値

Parameter	Type of Microecosystem			
	I (3) *	II (6)	III (6)	IV (5)
Biomass	2.7	13.6	11.0	16.9
Chlorophyll a	8.6	38.9	32.5	38.5
pH	1.3	4.1	3.2	4.0
No. of Bacteria	56.6	41.0	65.4	62.7
No. of Moina	—	49.5	—	53.5
No. of Paratany.	—	—	36.1	46.7

* No. of replicates.

5.2 モデルエコシステムの再現性

同時に組み立てたエコシステム間での差異については前述した。ここでは、異なる時期に細菌-クロレラ-タマミジンコ系(系III)を組み立てたときに同じ変動を繰り返すかどうかを調べた結果について図5に示した。実験の初期では、タマミジンコの個体数、pH及び現存量、中期ではクロロフィル量、後期ではpHと細菌数で有意差が認められる。しかし、それぞれのパラメーターの変動のパターンには大きな差はない。実験開始時のタマミジンコは生後2日目のものを用いているが、実験初期の個体数の増減のパターンには1~2日のずれがみられ、それが、他のパラメーターにも影響していると考えられる。

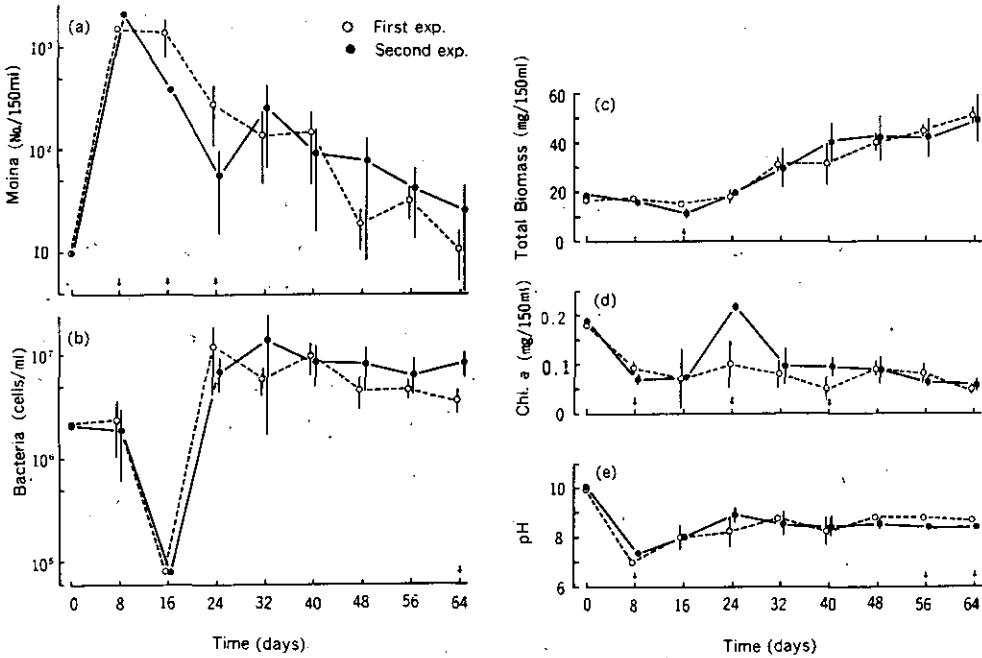


図5 時期を変えて行った細菌-クロレラ-タマミジンコ系(系II)における(a)タマミジンコの個体数、(b)細菌数、(c)総生物現存量(d)クロロフィル量(e)pHの変動
↓は有意差のみられた日を示す。

5.3 環境汚染物質の影響

環境汚染物質の代表的なものとしてカドミウムを選び系I~IIIの各エコシステムにおけるパラメーターの変動について調べた。なお、カドミウムはそれぞれの系を組み立てた直後0日目に処理した。サンプリングは4日目ごとに行われた。系IIにおけるタマミジンコの変動は10ppb区では対照区と同様の変動傾向を示しているが、100ppb区では初期の増加が著しく阻害され、増加の始まる時期のずれもみられる(図6)。一方、系IIIのユスリカは10ppb区で大きな阻害がみられ、

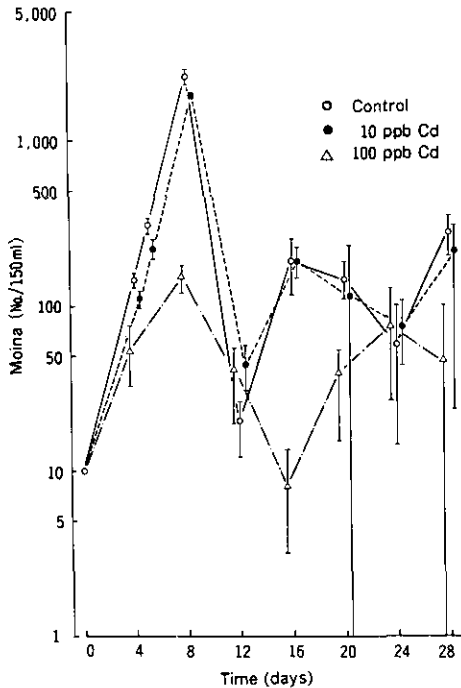


図6 細菌-クロレラ-タマジシコ系(系II)におけるタマジシコに対するカドミウムの影響

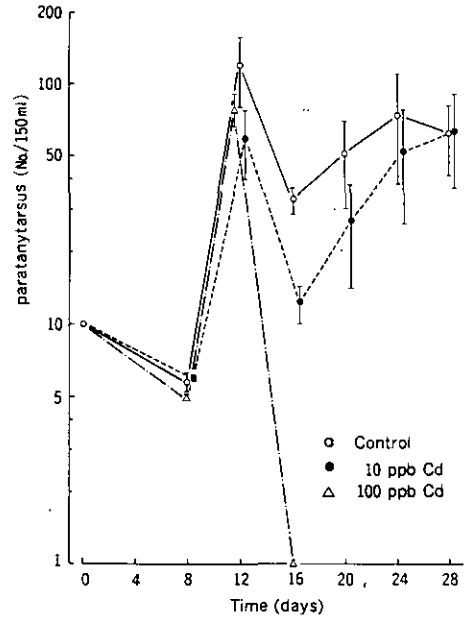


図7 細菌-クロレラ-ユスリカ系(系III)におけるユスリカに対するカドミウムの影響

100 ppb 区では16日目までに絶滅している(図7)。この濃度では産卵及び幼虫のふ化はほぼ正常に行われており、カドミウムは弱齢幼虫期に強く作用したと考えられる。タマジシコ及びユスリカの両者が生存しうる10 ppbにおける各パラメーターの対照区との差異についての比較を表4に示した。系Iでは12日目にはじめて現存量に有意差が認められるが、系IIでは4日目にタマジシコの個体数、クロロフィル量で既に差が認められている。一方、系IIIでは、12日目にユスリカの個体数とクロロフィル量ではじめて差がみられた。細菌-クロレラ系(系I)では100 ppbの濃度でもほとんど影響が認められず、この消費者を欠く不完全な系はカドミウムの影響の現れにくい系と言えよう。一方、細菌-クロレラ-タマジシコ系(系II)は、早い時期に多くのパラメーターで有意差が認められており、ここで比較した三つのモデルエコシステムの中では最も高感度の系と思われる。タマジシコとユスリカの二者間の有意差の現れる時期の差は、両者のカドミウムに対する感受性の差(タマジシコ LC_{50} -48hrs; 30 ppb, ユスリカ幼虫 LC_{50} -48hrs; >100 ppb)にもよるが、カドミウムを処理したときの両者の発育段階(タマジシコ; 生後2日目, ユスリカ; 4 齢幼虫)も関与していると思われる。有意差の現れ方をみると、タマジシコ又はユスリカの個体数増殖率の低下→クロレラの現存量増加速度の減少→細菌数の増加→総生物現存量の変化順になっている。これは、モデルエコシステムにおけるカドミウムの影響の現れ方を示唆していると考えられる。

表4 3種類のマイクロエコシステムにおける10 ppbのカドミウム添加による影響の現れ方

Parameter	Time (Days)						
	4	8	12	16	20	24	28
Type I : Bacteria-Chlorella							
Chlorophyll <i>a</i>	-	-	-	-	-	-	-
Phaeopigments	-	-	-	S	-	-	-
No. of Bacteria	-	-	-	-	-	-	-
pH	-	-	-	-	S	-	-
Total Biomass	-	-	S	-	S	-	-
Type II : Bacteria-Chlorella-Moina							
No. of Moina	S	S	S	-	-	-	-
Chlorophyll <i>a</i>	S	S	S	S	S	S	-
Phaeopigments	-	S	S	-	-	S	-
No. of Bacteria	-	S	-	S	-	-	S
pH	-	-	-	S	-	S	S
Total Biomass	-	-	-	-	S	S	S
Type III : Bacteria-Chlorella-Paratanaytarsus							
No. of Paratany.	-	-	S	S	-	-	-
Chlorophyll <i>a</i>	-	-	-	S	-	-	-
Phaeopigments	-	-	-	-	-	-	-
No. of Bacteria	-	-	-	S	S	-	-
pH	-	-	-	S	S	-	-
Total Biomass	-	-	-	S	S	-	-

S : Significant, - : Not significant.

6. まとめ

環境汚染物質の生態系に及ぼす影響を評価するためのモデル生態系の開発を目的として、ピーカーレベルのモデルエコシステムにおける構成種の変動とその継続性、再現性について検討を行い、カドミウムの添加による影響の現れ方について調べた。カドミウムの影響として検出されるパラメーターの順序は、そのモデルエコシステムを構成する各生物と環境との相互関係の結果として表れるもので、単一の種を扱うテストでは決して見ることのできない現象である。生態系に未知の汚染物質が混入した場合、まず、どこにその影響が現れ、どのように波及して行くかを調べるのがモデルエコシステムの一つの使命であるが、ここで開発した単純なモデルエコシステムでも、それが可能であることが示された。今後、再現性のある実験条件の確立、他のパラメーターについての検討、及びこのモデルエコシステムの限界をはっきりさせることが課題とされる。

引用文献

- 1) Odum, H. T. and C. M. Hoskin (1957) : Metabolism of a laboratory stream microcosm. Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas., 4, 115-133.
- 2) Whittaker, R. H. (1961) : Experiments with radiophosphorus tracer in aquatic microcosms. Ecol. Monogr., 31(2), 157-188.
- 3) Metcalf, C. K., C. K. Sangha and I. R. Kapoor (1971) : Model ecosystem for the evaluation of pesticide biodegradability and ecological magnification. Environ. Sci. Tech., 5(8), 709-713.
- 4) Taub, F. B. (1973) : Biological models of freshwater communities. EPA-660/3-73-008, PB -225029.
- 5) Hatakeyama, S. and M. Yasuno (1981) : The effects of cadmium-accumulated chlorella on the reproduction of *Moina macrocopa* (Cladocera). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5, 341-350.
- 6) Sasa, M. (1979) : A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. Jpn., No 7, 148p.
- 7) Hatakeyama, S. and M. Yasuno (1981) : A method for assessing chronic effects of toxic substances on the midge, *Paratanytarsus parthenogeneticus*—effect of copper. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10, 705-713.
- 8) Haque, R., J. V. Nabholz and M. G. Ryon (1980) : Interlaboratory evaluation of microcosm research; Proceedings of the workshop. EPA-600/9-80-019, PB 80-179005.
- 9) Isensee, A. R. (1976) : Variability of aquatic model ecosystem-derived data. Int. J. Environ. Stud., 10, 35-41.

生態モデル作成のための会話型コンピュータープログラム BGS II について

袴田 共之¹・廣崎 昭太¹

Interactive Computer Programs (BGS II) for Ecological Simulation

Tomoyuki HAKAMATA¹ and Syota HIROSAKI¹

Abstract

BGS II (Biological Growth Simulator, Version II) is an interactive program that helps ecologists writing ecological models by simultaneous ordinary differential equations and simulating the ecological phenomena by the models. It is machine-independent program because of writing in FORTRAN 77. A model is written as a subroutine of a FORTRAN program. BGS II prepares a framework for users to write the subroutine. Model parameter values and other simulating conditions are inputted from a keyboard followed out a menu. A lot of default value are prepared in a simulating condition file for beginners. The BGS II-commands are represented by an alphabetical letter symbolizing an operational function. The most suitable integration method can be selected from five numerical methods such as Runge-Kutta, Euler, improved Euler, Runge-Kutta-Gill and Milne methods. Simulation can be intercepted and rerun after resetting such conditions as an interval of integration, etc. BGS II produces tabular and/or graphical output. BGS II stores five cases of results of simulations in a file to compare with one another on CRT screen. A simulation of biomass fluctuation of *chlorella-moina* system was shown as an exemple which was operated using BGS II.

1. はじめに

自然現象を数式で表現することは、ガリレオ、ニュートンらによって成立した近代科学の伝統的方法である。現在においては、「現象のモデル化」と呼ばれるステップが多くの分野で確立している。「モデルは現象の特徴または本質を数学的に表現したものである⁹⁾」と定義すれば、生態学においてもモデル化が行われることは論理的に首肯できる。

* 本論文の要旨は第30回日本生態学会大会(1983年7月、松本市)において発表した。

1. 国立公害研究所 環境情報部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Environmental Information Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305 Japan.

しかし、生態学においてモデルを使用したアプローチは、一部の先駆的業績を除いて、1960年代後半以降におう盛な流れとなったものである。この流れを推進する上でIBP(The International Biological Programme)の果たした役割は大きかった。IBP以後の成果を総括的にまとめ、今後の発展を計ろうとする論考は数多く見られる^{1,6,7)}。それらの中で、モデルの開発やシミュレーションの実行のためのソフトウェアについて言及したものはそれほど多くない^{3,8,13)}が、そこでは、従来のCSMP III, DYNAMOなどのシミュレーション用ソフトウェアの果たした役割を大きく評価している。

ところで、CSMP III, DYNAMOは、それぞれIBM社、MITで開発されたシミュレーション用ソフトウェアである。その後、我が国の主要コンピューターメーカーにおいても、同様の機能を有するプログラムパッケージが作られ、使用可能となっている。しかし、これらは基本的にバッチ型のプログラムである。ところが、生態学の分野では多要素、多要因の現象を扱うことが多いので、一般に解析解が得られ難い形式のモデルを開発して数値計算を行う場合が多い。したがって、このような用途には、後述するような試行錯誤的操作に対応した会話型処理が不可欠となる。つまり、会話型処理を行にくいプログラムは本質的弱点を持つと言わざるを得ない。もっとも、IBM社は、会話型ソフトウェアとしてCSMP IIIのGraphic featureを提供しているが、これはIBM社の端末装置に専用のものであって、他社の装置を利用している研究者は使えない。

そこで、このたび、特別研究「有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究」において、水界生態系の生物の動態をモデル化し、シミュレートする仕事の一環として、会話型シミュレーション用プログラム(BGS II: Biological Growth Simulator, Version II)を準備することとした。このプログラムの原型は、農林水産省において、著者の一人を含むプロジェクトチームにより開発された⁹⁾ものである。著者らによるその後の改訂作業を経て、現在三つのバージョンを保有しているが、本報では、汎用性の高い会話型のバージョンであるBGS IIにつき、その概要を報告する。機能の詳細、使用方法、プログラムリストなどは改めて報告する。

2. BGS IIの特徴

BGS IIの機能の特徴として、①モデルの記述形態、②会話型処理、③用意した数値解法の種類、④コンピューター間の互換性、⑤結果の出力形態などをあげることができる。

① モデルの記述形態

バイオマスの時系列変化や生物の成長などは、連立常微分方程式の初期値問題として定式化されることが多い。大気や土壤中の物質移動などに関して使われる偏微分方程式のモデル(拡散方程式などは、いずれかの変数(例えば土壌層の深さ)を離散化することによって常微分方程式として扱うことができる²⁾。常微分方程式は、一般に正規形、すなわち次のような形の連立一階常微分方程式として表現することができるので、汎用的な数値解法はそれを前提としている。

$$\begin{aligned} \dot{u}_1 &= \psi_1(t, u_1, \dots, u_n) \\ &\dots \dots \dots \\ \dot{u}_n &= \psi_n(t, u_1, \dots, u_n) \end{aligned}$$

ベクトルで書くと

$$\dot{\mathbf{u}} = \boldsymbol{\psi}(t, \mathbf{u}) \quad (1)$$

常微分方程式(初期値問題)の数値解法とは(1)式の解 $\mathbf{u} = \mathbf{u}(t)$ を初期条件 $t = t_0$ のときの値 $\mathbf{u}(t_0)$ を与えて数値的に求めることである。BGS IIは、このような形で記述されたモデルを取り扱う。

後述するように、BGSはFORTRAN言語で書かれている。使用するモデルはサブルーチンとしてユーザーが作成する。その他の機能(パラメーターの入力や変更、数値解法、図表の出力等)は、BGS IIに準備されている。モデル作成上必要があれば、外部関数やサブルーチンを追加でき、現在、FORTRANに含まれる関数以外に14種の外部関数を用意している。したがって、本プログラムのユーザーは、FORTRANの基礎的な知識を持っていることが望ましいが、モデルのプログラムの記述方法は、以下のとおり、基本型として定まっているので単純なモデルを扱う場合は、FORTRANの知識は必須ではない。

ユーザーはモデルを表示2に掲げた基本型に添ってプログラミングする。1～4行は、プログラム起動のための形式的なメインプログラムである。SUBROUTINE MODELは、BGS IIの「積分」(微分方程式の数値解法)サブルーチンより引用される。このとき、他のサブプログラムとの間の変数の受渡しは、COMMON BLOCKを通じて行われるので、表示2に示すように、モデル内で使用する変数をCOMMON BLOCKで定義する必要がある。具体的な記述法の詳細は、近く発表する予定のマニュアルを参照されたい。

② 会話型処理

個体群や群集、あるいは生態系における構成生物種の変動について、従来より1種又は2種を構成要素とするモデルを使った研究は多く、理論的な解明が行われている。しかし、その際に使われたアプローチを構成種が3種以上の場合に拡張することは容易でない¹²⁾。そこで、多要素から成る系の大規模なモデルを作成し、コンピューターシミュレーションによりその系の挙動を研究しようとするアプローチが採用されるようになった。そのような場合には、モデルの作成、パラメーターの決定、モデルの挙動の解明などの過程に試行錯誤的な操作が多く含まれる。また、生物現象は、変化の激しい期間と緩やかな期間があるので、シミュレーション途中でシミュレーション条件(パラメーター、「積分」間隔、テーブルデータ等)を変えることも必要となる。

ところで、コンピューターのTSS(Time Sharing System)機能の充実とパーソナルコンピューターの普及によって、従来のバッチ型処理とは全く異なるコンピューターの使い方ができるよ

うになった。すなわち、バッチ型処理ではあらかじめ指定したルールに従って機械的に実行されてしまい、計算の途中経過を見て、人間の判断により次の処理方法を変えることは不可能であった。それに対して、会話型処理では、CRT (Cathod Ray Tube, ブラウン管) やプリンタに途中結果を表示し、次の処理手順をキーボードから指定することにより、高度の判断を加えた解析ができるようになった⁴⁾。

そこで、BGS IIは試行錯誤的操作に対応するため会話型処理を行う。第1に、各種機能をモジュール化し、全体を統括するコントロールモジュールを中心に、各機能モジュールを結合した(図1)。これにより、各機能モジュール間の情報の受渡しが効率的に行われることとなった。第2に、命令の入力方法はメニュー方式を基本とした。つまり、ひとつの操作の開始時に(コントロールモジュールにおいて)、選択できる機能のメニューをCRT画面に表示し、それに答える形で英字1字のコマンド入力を行う。目的の出力を得るまでには、一般に数回のメニュー選択を行うが、それらの一連の英字コマンドを一括入力することによっていくつかの機能に対する命令をまとめて与えることも可能としている。

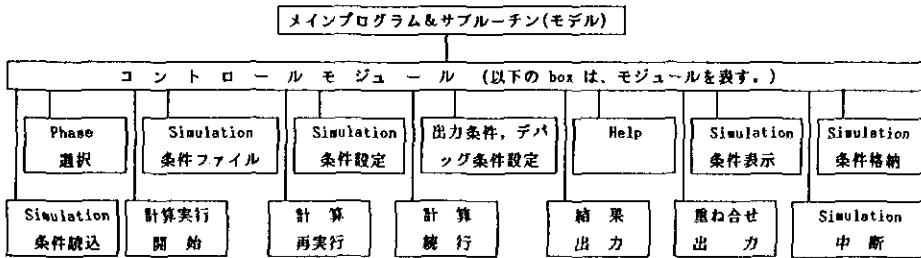


図1 BGS IIのモジュールの構成

③ モデルの数値解法

常微分方程式の数値解は、基本的には差分近似により時刻 t における変化量 $(u_{t+1} - u_t)$ を求めることである。したがって、モデルで考えている全時間域で数値解を求めるためには、膨大な計算が必要となり、計算時間や打ち切り誤差など数値計算上の問題が生ずる。BGS IIはすべて倍精度で計算するので、とくに計算時間が問題となる。また、扱う現象の変化の激しさに応じて、精度の異なる数値解法を使い分けることも考慮すべきである。

したがって、シミュレーションプログラムでは、数値解法について簡単なものから複雑なものまで、また、精度と計算スピードによって数種類用意され、モデル及び使用するコンピューターの計算スピード等に応じて最適なものを選択できることが望ましい。そこで、BGS IIでは、5種類の数値解法を用意した。すなわち、ルンゲ・クッタ法(BGS IIにおける標準法)、オイラー法、ルンゲ・クッタ・ギル法、改良オイラー法、予測子・修正子法(ミルン法)である。

④ コンピューター間の互換性

BGS IIは、機種間の互換性を確保するためFORTRAN 77でプログラミングを行った。FORTRAN 77は、主要大型機種をはじめ、パーソナルコンピューターの高級機種にも取り入れられているので、メモリーの制限以外、若干の修正により任意の機種用に変換できる。

モデルの記述について、前述のとおり、SUBROUTINE MODELは、ほとんど定形的なパターンでコーディングされ、また、その主要部分は数式表現についての知識があればモデルの記述は容易である。しかし、後述するとおり、ソート機能を備えていないため若干の制限がある。

これらの2点は、CSMP IIIやDYNAMOと著しく異なる点である。

⑤ 結果の出力方法

シミュレーション結果の出力が適切であるかどうかは、その研究の質を左右する問題である。したがって、既存のプログラムは出力について各種の工夫をこらしている。BGS IIでは、CSMP IIIとDYNAMOの長所を取り入れ、表形成とグラフ形式の出力方法を採用した上、各種機能を強化している。

モデルを使用した研究は、基本的に、モデルを作成する段階(デバッグ段階)と作成したモデルを使用してシミュレーションを行う段階(シミュレーション段階)とに区分することができる。(ただし、シミュレーション段階であっても、モデルの修正を行うことは多いので、この区分は絶対的なものではない。)出力方法も、両段階で異なるところが多い。特に、デバッグ段階では、「積分」終了予定時点まで計算を遂行できずに途中で異常終了することがある。そのため、デバッグ段階では計算の1ステップごとに結果を出力する必要がある。BGS IIのデバッグ出力では1ステップごとに図又は表を書き加えている。また、仮に異常終了の状態になっても直ちに(BGS IIの稼働を終了させることなく)モデルの修正等を行えることが必要である。BGS IIでは、異常終了の場合、コントロールモジュールへ制御が移るので、引き続きモデルの修正へ移行することができる。

表の印刷に際しては、標準的なフォーマットのほかに、出力する変数の個数やけた数をユーザーが指定できることとした。グラフの印刷においては各変数の最小値と最大値を判断して自動的にスケールを決める機能のほか、ユーザーがスケールの指定をすることも可能である。この指定は、出力結果を見た後に何回でも行うことができるので、シミュレーションの最終結果を出力する際又は、デバッグ段階に有効である。

グラフ出力は、前述の機種間の互換性を保証するためキャラクターディスプレイ上で行うこととしたが、必要に応じてXYプロッターへ出力を行うためにデータを保存でき、その保存データは、各機種に固有なプログラムによりXYプロッターへ出力することができる。

モデル生態学においては、アイソクラインの検討等において2種間の相互関係を検討することが頻繁に行われる。そのため、グラフの2軸に各生物種の量をとった相関図の出力を可能とした。

また、感度解析において行われるように、パラメーターやその他のシミュレーション条件を変更

した複数回のシミュレーション結果を比較することが多い。BGS IIでは、5とおりまでの結果をディスクファイル上に保存でき、その中から任意の2回ずつの結果を同一図上に出力して比較することが可能である。

3. BGS IIの使用例

BGS IIの主な機能の特徴を具体的に示すため、ピーカー内におけるクロレラ-ミジンコ系のバイオマス量の変化¹⁴⁾について適用した結果を例示する。この系の特徴(図2)としては、i)実験開始時に多かったクロレラが、10日目までに急増したミジンコに摂取されて減少し、以後は振動しながら漸減する、他方、ii) ミジンコは10日目以降は振動しながらやや顕著に減少する。そこで、このパターンを簡単なモデルによって再現することを試みた。

当例で使用したコンピューターは国立公害研究所所有の HITAC M180 である。

① BGS IIの起動 (表示1)

コマンド“BGS2V2” (以下“ ”でBGS IIのコマンドを表す)を入力すると、新しくモデルを

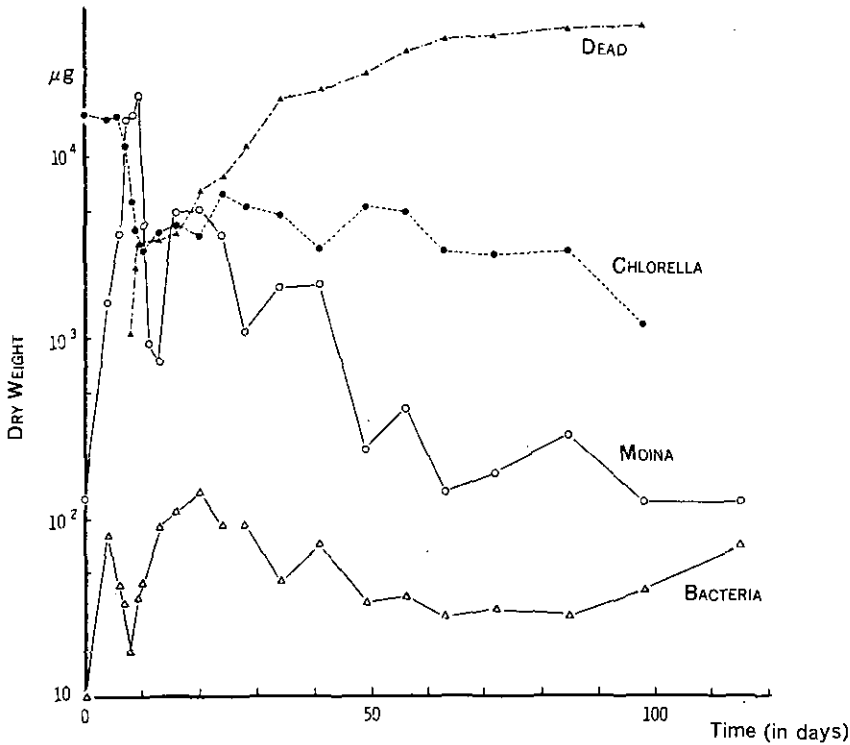


図2 クロレラ-ミジンコ系のバイオマスの時系列変化

作成するか、ファイルに既に入力済みのものを使用するかを選択の要求が表示される。ここでは、モデルがファイルに既に入力済みのものと想定して、“N”=否と答える。それに対してモデルが書き込まれているファイル名を問い返している。その後、XYプロットを使う際のファイルを準備するか否かの問いに対し、ここでは“N”=否と答えた。

表示1 BGS IIの起動

```

READY
BGS2V2
  MAKE NEW MODEL (Y/N)
  ?
  N

  DATA SET NAME ( *EXAMPLE* [REDACTED].MODEL.FORT )
  ?
  [REDACTED].MODEL.FORT
  CLEAR PLOTOUT FILE (Y/N)
  ?
  N

  *EDIT*          "BGS" [ENTER] テ" シ"ヨコウ シマス。
                  "END" [ENTER] テ" シュクヨウ シマス。

```

② SUBROUTINE MODEL (表示2)

実行に移る前にファイル内のモデルを確認しておく。冒頭の4行は、前述したメインプログラムである。5行目以下はモデルを記述したサブルーチンの基本的な形式であり、ユーザーが決める部分は実線で囲ってある。使用する変数として、初期値(IC)、パラメーター(PARAM)、被積分関数の名前(D)、モデル内の変数名(V)、印刷したいパラメーターの名前(F)をユーザーが記入する。NYは方程式の個数である。次の2行は、モデル式の数値計算において、分数の分母が0となる場合に対する予防措置であり、いずれかの場所に記入しておくことが望ましい。

本例で使用したモデルは、被食者と植物との関係を解析したMayのモデル¹⁾であり、次式のとおりである。

$$dH/dt = rH(1-H/K) - kV[1 - \exp(-cH)] \quad (2)$$

$$dV/dt = V\{-b + \beta[1 - \exp(-cH)]\} \quad (3)$$

Vは植物、Hは植食者の量、r, k, b, β , c, Kはパラメーターであり、特にKは一般に環境容量と呼ばれるものである。これらを、FORTRANで書きおろしたものが170~180行であり、各変数は(2)、(3)式と対応している。

③ メニュー画面 (表示3, 4)

EDITの状態(表示1)で、“BGS”を入力すると(表示3)実行を開始する。まず、コントロールモジュールに対応するメニューが表示される。ここで、HELP(表示4ではH_LW)機能を選択すると、各メニューの内容の概略が表示される。

表示2 モデルの記述

```

00010      PROGRAM BG2721
00020      CALL MAIN
00030      STOP
00040      END
00050      SUBROUTINE MODEL
00060      IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
00070      COMMON /GENERA/ T,TS,DT,TF,NY,MT
00080      COMMON /IC/VS(190)
00090      COMMON /PARAM/ P(100)
00100      COMMON /D/ DC,DM,DDD(188)
00110      COMMON /V/ VC,VM,VVV(188)
00120      COMMON /F/ F(95)
00130      COMMON /NOVER/ I01,I02,I03
00140      NY=2
00150      CALL OVER
00160      IF (I01.NE.0.OR.I02.NE.0.OR.I03.NE.0) RETURN
00170      DC = P(1)*VC*(1.0-VC/P(2))-F(3)*VM*(1.0-DEXP(-P(4)*VC))
00180      DM = VM*(-F(5)+P(6))*(1.0-DEXP(-P(7)*VC))
00190      RETURN
00200      END
JET452001 END OF DATA

```

BGS IIでは、5とおりの計算結果をファイルに格納することができ、それぞれをBGSフェーズ(B-GSPHase)と称している。まずここ(表示3)では、2番のフェーズで仕事を行うこととして、“B 2”と入力する。続いて、シミュレーション条件のデータ(事前にS-ETのメニューによりキーボードから入力されているものとする)をファイルから取り出す(Get Data)のために“G D”，同様に、出力(Output)条件(F-IGにより入力済みとする)を取り出す(Get)のために“G O”を入力する。

ここまででシミュレーションの実行に必要な最小限の情報がそろったことになる。

④ 実行のための各種条件の確認 (表示5)

実行に先立ち、シミュレーション条件、出力条件を確認するため、“L W”を入力し、すべて

表示3 メニュー画面及びデータの取り込み

```

BGS
*DFORT77 ENTERED
*PROGRAM NAME = BG2721
*PROGRAM NAME = MODEL
*PROGRAM UNITS = 2

J S-ET F-IG L-ST P-UT G-ET B-GSP X-EC R-RN C-NT O-UT E-ND M-LT D-TA H-LP

B 2

J S-ET F-IG L-ST P-UT G-ET B-GSP X-EC R-RN C-NT O-UT E-ND M-LT D-TA H-LP

G D

J S-ET F-IG L-ST P-UT G-ET B-GSP X-EC R-RN C-NT O-UT E-ND M-LT D-TA H-LP

G O

J S-ET F-IG L-ST P-UT G-ET B-GSP X-EC R-RN C-NT O-UT E-ND M-LT D-TA H-LP

```

表示4 HELP機能の内容

```

H W .
- COMMAND -
B : SELECT BGS SIMULATION PHASE      X : EXECUTE THE PHASE
C : CONTINUE THE SIMULATION          R : RERUN
O : OUTPUT THE RESULT                G : GET DATA FROM FILE
P : PUT DATA TO FILE                M : MULTIPLE OUTPUT
D : TAKE IN DATA FROM DATA FILE     S : SET OR RESE SIMULATE CONDITION
F : SET OUTPUT AND DEBUG CONDITION   E : END
H : EXPLANATION OF COMMAND           L : LIST OF SIMULATE CONDITION

```

の(Whole)リスト(List)を表示する。

シミュレーションは、0日目(Start Time)から1日ごとの「積分」間隔(Delta)で60日目まで(Finish Time)で実施する。デバッグやグラフの出力の場合も同様である。「積分」法はルンゲ・クッタ法。各変数の初期値はV:3,000, H:1.0, パラメーターは表示中に記したとおりである。デバッグ段階での出力はグラフとする。デバッグ情報として、グラフの下限上限とマーク、グラフにつけるタイトルなどを与える。全ステップの計算終了後の出力につき、70カラム幅で時系列グラフとして出力することを指示し、変数名とそのマーク、下限上限を与えている。その他シミュレーショ

表示5 ファイルに格納されたデータの確認

```

J S-ET F-IG L-ST P-UT G-ET B-GSP X-EC R-RN C-NT O-UT E-ND M-LT D-TA H-LP
L W
#TIME ( ST , DT , FT ) ; 0.0 1.00 60.00
#METHOD 0-R.K. , 1-EU. , 2-R.K.G , 3-AD.EU , 4-FR.CO ; 0
#INITIAL CONDITION ;
3000.000000 1.000000
#PARAMETER ;
0.800000 3000.000000 1.200000 0.001000 1.100000
1.500000 0.001000
#TABLE ;
0.0
#DEBUG TYPE ( 0-GRPH 1-TABL ) ; 0
DEBUG INFORMATION ;

NO. V V 0 0 0 0
UL 4000.00 4000.00 1000.00 1000.00 1000.00 1000.00
LL 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0
MK C M D E F
/F/ PRNT ; 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
DEBS TIME ( ST , DT , FI ) ; 0.0 1.00 60.00
#TITLE ;
*** CHLORELLA MOINA MODEL ***
#EXP. DATA
#OUTPUT TYPE ( 1-TBL 2-PLT 3-GRH ) ; 3.
TIME ( ST , DT , FT ) ; 0.0 1.00 60.00
GRAPH TYPE ( 0-GRAPH, 1-COR. ) ; 0.
GRAPH SIZE ; 70.
VARIABLE NUMBER ; 2.
COR. GRPH MODE ( T-TIME N-NOTIME ) ; T
VARIABLE INFO ;
CHLORELLA V 1. C 0.0 4000.000000
MOINA V 2. M 0.0 4000.000000

OUT TITLE = --- FIG.1 CHLORELLA MOINA MODEL ---
OUT FMT = ( 1H , F5.0 , 3X , 7616.6 )
#KEYIN MODE ( F-FREE , X-FIX ) ; F
#SIMULATION PHASE NUMBER ; 1

```


ば、その時点でメッセージを出してコントロールモジュールへ戻る。表示6の結果では、CもMも減衰振動しているが、振動しながら減少するパターンは得られていない。そこで、いったんE-ND("E")として、モデルの修正を行うこととした。

⑥ モデルの修正 (表示7)

修正結果を表示7に示した。表示2のモデル式におけるP(2)、すなわち環境容量が日を経るにつれ老廃物の集積等のために小さくなるのが考えられるので、時間と共に減少する関数とし、それをP(8)とした。また、表示2のパラメーターP(7)はDemographic efficiencyと呼ばれ、えさが少ないときにミジンコの増殖する能力を表すものであるが、やはり日数とともに小さくなるものとして、表示7のP(7)で表すこととした。実際には、この結果を得るまでに何回かのデバッグを繰り返している。

表示7 モデルの修正

```

00050      SUBROUTINE MODEL
                ↑
                略
                ↓

00161      P(8)=(1.0-0.010*T)*P(2)
00170      P(7)=(1.0/(1300.0*(1.0-0.001*T)))*DLOG(P(6)/(P(6)-P(5)))
00190      DC = P(1)*VC*(1.0-VC/P(8))-P(3)*VM*(1.0-DEXP(-P(4)*VC))
00200      EM = VM*(-P(5)+P(6)*(1.0-DEXP(-P(7)*VC)))
00230      RETURN
00240      END

```

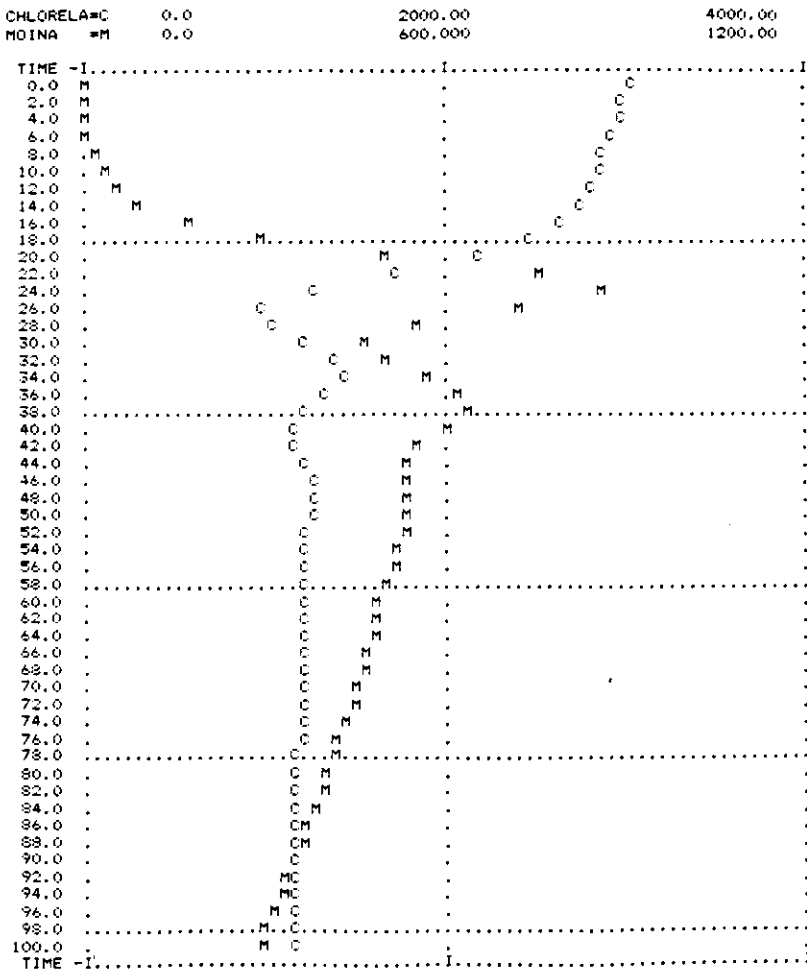
⑦ シミュレーション結果の出力 (表示8)

前述のクロレラ-ミジンコ系の特徴のパターンとおおむね類似した結果を示しているが、これはあくまでも一例として掲げたものであり、最終結果を得るまでには、一層理論的な検討を重ねる必要がある。

⑧ 多重出力 (表示9)

理論的な検討の一環として、感度解析を行うことが多い。その際、二つの結果を一画面に重ねて出力すると便利である。ここでは、表示2のモデルにおいてクロレラの初期値が前述と同様に3,000の場合と1,000の場合とを比較した。そこで、V変数の1番目、すなわち、クロレラの初期値を1,000とし、他は同じ条件でフェーズ2において実行し、その結果をファイルに格納する。次いで、コントロールモジュールにおいて、Mu-LTiple outputを意味する“M”を入力し、続いてV変数の1番目につき0日目から1日きざみで60日目まで出力するよう指示を行う。感度解析については、評価関数を決める必要がある。しかし、ここではそれには言及しないこととして“N”を

表示8 シミュレーションの結果



入力し、フェーズ1の結果と2の結果を二重に出力することとする。下限上限は各々0, 4,000である。出力結果によると、1,000から開始してもクロレラは急激に増加し、3,000の水準に至り、以後は類似した経過をたどることがわかる。

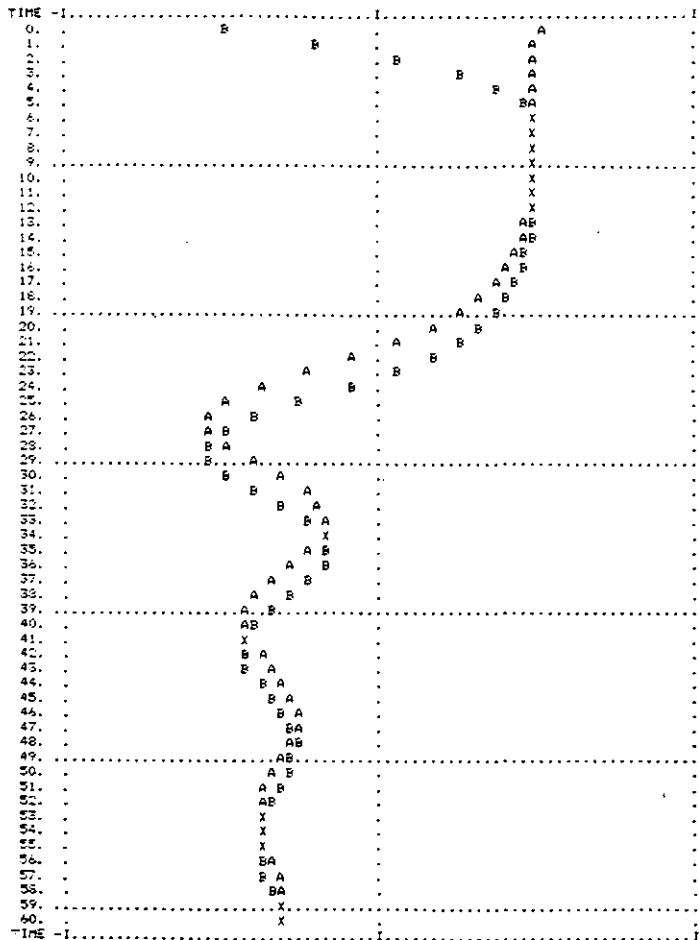
4. BGS IIの評価と問題点

Mejer は、モデル生態学における CSMP III, DYNAMO などのシミュレーション言語の役割を総括し、近年発展しつつある方向と将来の課題を整理した¹³⁾。その中で、会話型処理と携行性(=機種非依存性)の重要性を指摘している。BGS IIは、上述のとおり、会話型処理を最大の特徴とするプログラムであるが、プログラミングに FORTRAN 77 を使用することで後者をも実現した。また、モデルの記述を FORTRAN で行うことにより、CSMP IIIが持つプレコンパイラを省略し、

表示9 多重出力 (クロレラの初期値を変えた場合の比較)

```

J S-ET F-IG L-ST P-UT G-ET B-GSP X-EC R-RN C-NT O-UT E-ND M-LT D-TA H-LP
M
M> "C",+N,+S,+D,+E "C"-COMMON NAME N-VAR.NO. S-STRT D-DELT E-END
V,1,0,1,60
SENSITIVITY TEST (Y/N)
N
INPUT PHASE NO. OF MULTIPLE OUTPUT
1,2
INPUT L.LIMIT AND U.LIMIT
0,4000
    
```



プログラムの全ステップ数を少なく抑えた。したがって、主記憶容量が2MB程度のコンピューター、例えば、パーソナルコンピューターの高級機種による利用も可能となった。しかし、そのためにモデルのソート機能を省く結果となった。

4.1 ソート機能について⁵⁾

CSMP IIIやDYNAMOのシミュレーション言語としての特徴の一つは、記述したモデルに対するソート機能を持っていることである。ソート機能を持つことによって、ユーザーはモデルの計算順序を考慮しないでプログラミングができるので、他人に理解しやすい形でモデルを表現することができる。また、大きなモデルでは、プログラマーが全部の変数について計算順序をチェックすることは大変な労力である。

BGS IIはモデルをFORTRANプログラムのサブルーチンとしてプログラミングするので、計算順序はFORTRAN文法に従わなければならない。すなわち、原則として、右辺の変数はそれ以前に値をもたなければならない。

しかし、BGS IIでは、ユーザーが計算順序を誤ってコーディングしても大きな誤差にならないように、「積分」の前に必ずモデルをCALLして各変数に値を入れるので、時刻 $t-\Delta t$ 時点の値もっている。

上の手続きのため、オイラー法により数値解を求める場合は計算順序は問題とならない。ルンゲ・クッタ法などでは1回の「積分」で何回もMODELをCALLするので、計算順序による誤差は Δt の何分の1か前の値を使うことにより生ずる。変化が滑らかな場合はこの差はそれほど大きくないと考えられるが、急激な変化がある場合や階段関数を使った場合には、解の精度にかなり影響すると考えられるので注意が必要である。

この対策として、 Δt すなわち「積分」間隔を小さくすればよいが、計算時間が長くなる。解の精度を問題にするか、モデルのreadabilityを問題にするかはユーザーが判断するほかない。

4.2 グラフィックディスプレイの使用について

上述した会話型処理は、バッチ型処理に比較すれば極めて効率のよい方法であるが、結果の出力を見ながら、モデルやパラメーター等を検討するには、出力結果を毎回プリンターに印刷しなければならない。これは、必ずしも効率的とは言えない。この点を改善するためには、結果の出力を高解像度のグラフィックディスプレイに描き、同一画面の一部を用いてモデルやパラメーターの変更を行うことが考えられる。そして、必要な出力結果については印刷(ハードコピー)できることが要求される。CSMP IIIのGraphic Featureはそのようなソフトウェアである¹⁶⁾。また、Mejerも、グラフィック機能の導入の重要性を指摘している¹³⁾。

このような機能を実現するためには、現状においては汎用プログラムの開発は困難であり、特定の線画用のグラフィックディスプレイ装置を導入し、その装置専用のソフトウェアを使用してプログラムを開発することとなる。すなわち、前述した機種間の互換性は入出力部分でくずれることとなる。しかし、インテリジェント機能、すなわち、ある程度の演算機能とメモリーを備えたディスプレイ装置を使用すれば、BGS IIの「積分」機能をはじめとしたソフトウェアをコンピューター本体で稼働させ、入出力機能のみを専用装置に保有させることが可能となる。

現在開発中の BGS IIIは、このような考え方にに基づき、TOSBAC UX-300 (UNIX¹⁵⁾に準じた OS を使用)を、前記 M180のグラフィック端末として使用し、一層効率的に作業が行えるように改善したバージョンである。その機能については、追って報告する予定である。

5. まとめ

コンピューターシミュレーション用生態モデルを作成するためのプログラム BGS IIは、FORTRAN 77で書かれているため、コンピューター間の互換性がある。また、出力結果を見ながらモデルの改編やパラメーターの変更を行うのに便利な会話型のプログラムである。BGS IIを使用することにより、モデル生態系のコンピューターシミュレーションを効率的に行うことができる。主要な機能は次のとおりである。

- 1) 各操作はメニューに従って英字 1 文字のコマンドを入力することにより開始される。また、Help 機能によりメニューの詳細を知ることができる。
- 2) モデルは、FORTRAN のサブルーチンとして書くが、一定の書式及びほぼ数式に近い書式でキーボードから入力し、ファイルへ格納する。
- 3) モデルのパラメーターは、キーボード又はディスクのいずれかから入力できる。
- 4) 微分方程式の数値解法として、オイラー法、ルンゲ・クッタ法など 5 種類の中から選ぶことができる。
- 5) シミュレーション条件、結果出力条件はメニューに従って入力する。しかし、モデルをある程度完成させるまでは標準的な条件下で自動的に実行しチェックできる(デバッグ機能)。
- 6) 計算は、中断や再実行が可能であり、中断中に「積分」間隔などのシミュレーション条件の変更ができる。
- 7) 5 通りの計算結果をファイルに保管でき、それら相互の比較(重ね合せ出力)が可能である。
- 8) 結果は、表型式又はグラフ型式でキャラクターディスプレイおよびラインプリンターに出力するほか、XY プロッターへの出力も可能である。

引用文献

- 1) Breymeyer, A. I. and G. M. Van Dyne, (ed.) (1980) : Grasslands, Systems Analysis and Man. International Biological Programme 19, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 950p.
- 2) Frissel, M. J. and P. Reiniger (1974) : Simulation of Accumulation and Leaching in Soils, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, 116p.
- 3) Gustafson, J. D. (1978) : Simcomp 3.0. In : Innis, S. (ed.) Grassland Simulation Model, Springer-Verlag, New York, 298p.
- 4) 芳賀敏郎 (1981) : 多変量解析法のプログラム。奥野忠一・久米均・芳賀敏郎・吉澤正, 多変量解析法 (改訂版), 日科技連, 東京, 430p.

- 5) 廣崎 昭太・宇田川武俊・大塚雅雄・奥野千恵子・神山啓治・塩見正衛・橋村ヤス子 (1979) : 生物現象のためのシミュレーション・プログラム BGS-1 について. 農林研究計算センター報告, B6, 1-72.
- 6) Innis, S. (ed.) (1978) : Grassland Simulation Model. Ecological Studies 26, Springer-Verlag, New York, 298p.
- 7) Jørgensen, S. E. (ed.) (1979) : State of the Art in Ecological Modelling, Pergamon Press, 700p.
- 8) Kirchner, T. B. and J. M. Vevea (1983) : PREMOD and MODAID : Software Tools for Writing Simulation Models. In : Lauenroth, W. K., G. V. Skogerboe and M. Flug, (ed.) Analysis of Ecological Modelling, Developments in Environmental Modelling 5, Elsevier, Amsterdam, 992p.
- 9) 近藤次郎 (1976) : 数学モデル—現象の数式化—, 丸善, 東京, 488p.
- 10) Lauenroth, W. K., G. V. Skogerboe and M. Flug (ed.) (1983) : Analysis of Ecological Systems : State-of-the-Art in Ecological Modelling. Developments in Environmental Modelling 5, Elsevier, Amsterdam, 992p.
- 11) May, R. M. (1974) : Stability and Complexity in Model Ecosystems, Princeton Univ. Press, Princeton, 265p.
- 12) May, R. M. (1981) : Patterns in Multi-Species Communities. In : May, R. M. (ed.) Theoretical Ecology, Principles and Applications, Blackwell, Oxford, 489p.
- 13) Mejer, H. (1983) : The Computer as a Modelling Tool. In : Jørgensen, S. E. (ed.) Application of Ecological Modelling in Environmental Management, Part A, Elsevier, Amsterdam, 735p.
- 14) 宮下 衛・安野正之 (1984) : 微小生態系の構造に対する有害汚染物質の影響評価. 国立公害研究所研究報告, 第62号, 37-48.
- 15) Bell Telephone Laboratories (1982) : Unix Programmer's Manual, Revised and Expanded Version. Holt, Rinehart and Winston, New York, 425p.
- 16) IBM (1972) : Continuous System Modeling Program III (CSMP III) and Graphic Feature (CSMP III Graphic Feature) General Information Manual, (1972), IBM, Ontario, 56p.

グッピーによる有害汚染物質の影響評価

宮下 衛¹

Assessment of Hazardous Substances with the Guppy

Mamoru MIYASHITA¹

Abstract

Experiments were carried out to study the effects of the environmental pollutants on the growth, reproduction and behavior of the guppy, *Poecilia reticulata*. The following results were obtained.

1. A yellow strain of the guppy used in the present study was selected and colonized.
2. Fry of the guppy kept without food after parturition for 2-6 days were suitable for assessing the acute toxicity of pollutants. LC_{50} values did not vary with seasons in the acute toxicity test of pesticides and heavy metals.
3. The 24 and 48 hour LC_{50} values of fenitrothion for fry were 4.22 and 3.72ppm, respectively. Sub-chronic toxicity of fenitrothion, namely, the 30-day LC_{50} for fry was 1.2 ppm. The growth was inhibited significantly at concentration of 0.05 ppm of this insecticide.
4. Chronic sublethal concentration of organophosphorous insecticide affected the reproduction of the guppy: fenitrothion inhibited the egg production and temephos induced a premature birth.
6. The schooling behavior of fry was inhibited significantly with a two weeks exposure of 1.6 ppm of fenitrothion. The diel vertical distribution of the fry in beakers was used for assessing the toxicity of fenitrothion. Significant behavioural changes were found among fry exposed to 0.001 ppm of fenitrothion after 24 hours.

1. はじめに

グッピー *Poecilia reticulata* は約3か月で成熟しほぼ1か月ごとに出産を繰り返すきわめて性成熟の早い魚である。この種は水温を23~25℃に保てば一年を通じて繁殖し、常に稚魚を得ることができる。なお、グッピーは稚魚として出産される卵胎生魚である点で、メダカなどの卵生魚と

1. 国立公害研究所 生物環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Environmental Biology Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

は異なる。当研究室では、実験動物化するために、東大医科学研究所において大量飼育・繁殖を続けていたコロニーから1975年に分離した黄色系のグッピーを保有している。このグッピーに対する農薬・重金属の急性・慢性影響を死亡率、成長、産仔数、産仔周期、行動などさまざまな面から調べた。ここでは、試験魚としてのグッピーの特性、利点及び試験方法について報告する。

2. 急性毒性試験

2.1 試験法について

常に安定した試験成績を得るためには系統的に確立された魚種であり、実験室で容易に繁殖が行え、一年を通じていつでも大量に供給できることが必要とされる。急性毒性試験の値は魚の成長段階¹⁾、栄養条件²⁾、生理的条件³⁾のちがいに異なることが明らかにされている。このような問題から派生する感受性の差をなくすために、無給餌で飼育した生後2～6日目までのグッピーの稚魚を用いる急性毒性試験法を開発した⁴⁾。

2.2 感受性について

上記の試験方法によるグッピーの稚魚の農薬・重金属に対する感受性の結果を図1に示した。東大医科学研究所で飼育されていたコロニー⁵⁾ (以下Pとして示す)と、そのコロニーから当研究所において1975年に分離した黄色系のグッピーの兄妹交配の2世代目のコロニー (F-2) 及びその6世代目のコロニー (F-6) についての比較を同時に行った。試験は硬度25 ppm, pH 約7.0の人工軟水をガラスビーカーに200 ml, 供試魚10尾ずつを入れ23±1℃, 12時間明期の恒温室にて

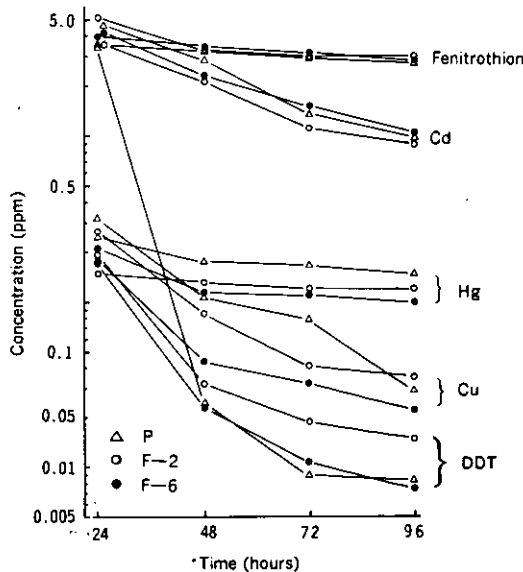


図1 兄妹交配代数の違いとグッピー稚魚のLC₅₀値

行った。なお、ここでは生後4日目の稚魚を用いている。24時間 LC_{50} は3種の重金属間で大きな差は認められないが、時間の経過とともに毒性の差が明白になっており、銅の毒性が最も高く、水銀、カドミウムの順に低くなる。DDTはここで用いた5種類の農薬・重金属の中で最も毒性が高く、フェニトロチオンは最も低い物質であった。DDTの場合、24時間 LC_{50} の値がPとそれより分離したF-2、F-6の間で約20倍の差が認められるが、その理由は明らかでない。その他の物質では、P、F-2、F-6の3者の間における LC_{50} の値が2倍以上異なることは極めてまれであった。F-2、F-6のコロニーについてフェニトロチオンに対する季節による感受性の差異についての試験を行ったが、24~96時間 LC_{50} の値は、ほとんど差が認められず、一年を通じて安定した試験成績の得られることを確認した。

3. 慢性毒性試験

3.1 生存率、成長について

蓄積性がなく低毒性とされている有機リン系殺虫剤フェニトロチオンを用いて、グッピーの成長に及ぼす影響を調べた。縦60cm、横30cm、高さ35cmのガラスの水槽に水40lを入れ、生まれた直後のグッピーを50尾ずつ放し、0.05~3.2 ppmまで対照区を含めて9段階の濃度のフェニトロチオンに連続30日間暴露した。飼育水は毎日全量の交換を行った。昼間の5時間ほどは浄水に戻し、その間に生き餌・タマシジコを与えた。グッピーの生存率は0.8 ppm以上で明白な低下が認められる。2.4 ppmでは著しい生存率の低下が実験の開始時からみられており、3.2 ppmでは20日目にすべて死亡していた(図2)。30日後における体重は0.05 ppmですでに対照区と比べて有意な減少が認められており、体長は0.1 ppm以上で有意差が認められる。長期間暴露における影響濃度は、急性毒性試験値と約100倍の差がみられる(図3.1, 図3.2)。

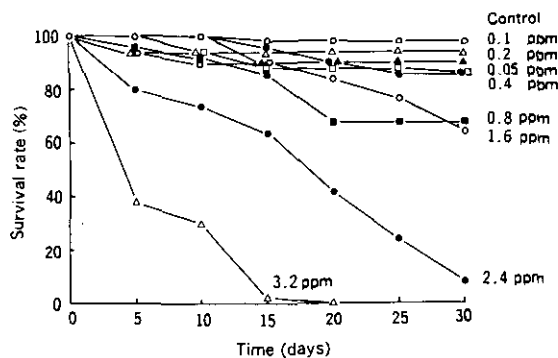


図2 フェニトロチオン連続暴露におけるグッピーの生存率

3.2 産仔に及ぼす影響

3.1と同様水槽に水40 lを入れ、フェニトロチオンの0.1, 0.25, 0.5, 1.0 ppmの4濃度におけるグッピーの産仔数を調べた。この実験は半止水式で40 lの水の半分ずつを毎日取り換えることによって行われた。暴露期間は2か月で、その後2か月は浄水で飼育した。暴露1か月目は、それほど影響は認められなかったが2か月目は、0.25 ppm以上で産仔数の減少がみられた(図4)。浄水に戻した後も影響が残っており、胚の状態で流産される割合が特に多くなっていった。正常に生まれた稚魚と流産した仔の合計で見ても産仔数は対照区に比べて著しく減少しており、卵形成の阻害もみられるようである⁶⁾。

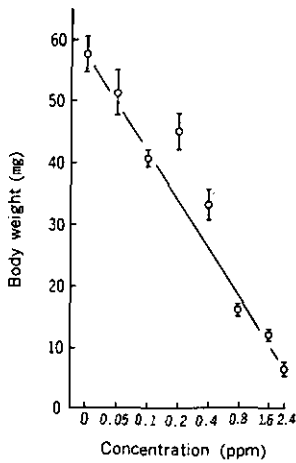


図3.1 グッピーのフェニトロチオン連続暴露30日後の体重

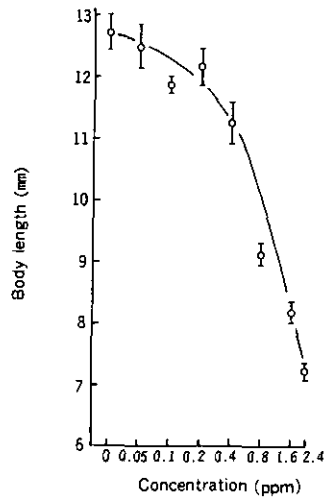


図3.2 グッピーのフェニトロチオン連続暴露30日後の体長

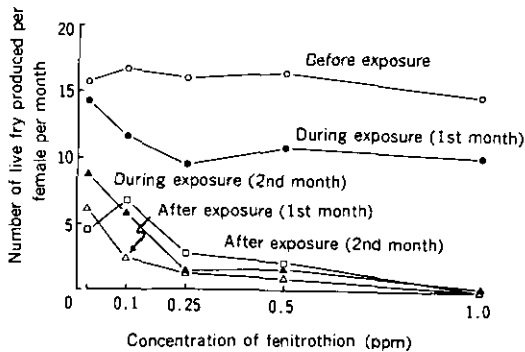


図4 グッピーの産仔に対するフェニトロチオンの慢性影響⁶⁾

4. 行動

4.1 集合性について

グッピーやメダカが群れをなして行動していることは容易に観察される。Seghers⁷⁾は、5か所のグッピーの自然個体群におけるスクーリング行動の発達程度と捕食圧との関係を調べ、捕食者の多くいるところに住むグッピーの個体群は群れの緊密度が高く、捕食者の少ないところの群れは緊密度の低いことを報告している。この群れをつくる行動が、殺虫剤によって影響を受けるかどうかを、Seghersの試験方法に従って調べた。水深を浅くして群れが二次元になるようにした水槽における供試魚の分布を調べることによって実験は行われる。ポリプロピレン製の容器(38.1×63.5 cm)に水を2 cmの深さに入れグッピーの稚魚を10尾ずつ入れて行った。あらかじめ、容器の底に15区画に等分した目印を付けておき、一定の時間ごとに10尾の魚がどの区画にいるかを観察し、15区画中最も多く魚のいる区画内の個体数を記録した。したがって、この値の最低は1、最高は10で、10のときが最も集合性の高いことになる。1区画の大きさは161.3 cm²の正方形である。なお、試験は水温23±1℃、約3,000 lx 照明下の恒温室にて行った。ここでは、3.1の慢性毒性試験に用いられているフェニトロチオン暴露中のグッピーの稚魚を供試魚とした。慢性毒性試験中のグッピーの稚魚の集合性は暴露濃度が高くなるとともに低下することが観察される。試験は死亡率にはほとんど影響がみられないが、集合性の明らかに低下していた1.6 ppm、2週間暴露の稚魚を用いて行った。試験容器に移した直後のグッピーの集合性は一時的に高い値をとるが、一時間ほどで安定した値となり、その後の変化はほとんどみられなかった(図5)。フェニトロチオン暴露中のグッピーの集合性は対照区と比べて、いずれの時間においても低くなっており、この試験により、群れをつくる習性が、殺虫剤により影響を受けることが明らかにされた。

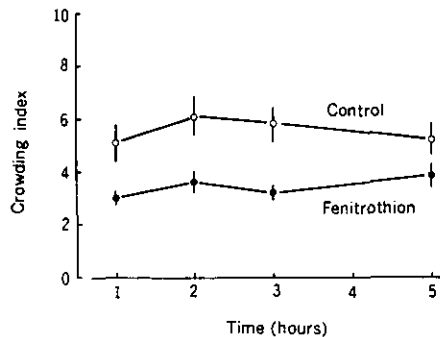


図5 グッピーの集合性に対するフェニトロチオンの影響

4.2 垂直分布について

農薬や殺虫剤の急性毒性試験を行っているとき、魚が水面に浮き上がってしまったり、動きがにぶくなるのをしばしば観察する。このような動きを数量化することにより、薬剤の影響を検討した。

1 lのビーカーに水1 lを入れ生後1週間のグッピーの稚魚を10尾ずつ放し、一定時間ごとにその位置を観察する。ビーカーの水深12.5 cmをあらかじめ3等分になるように線を引いておく。上に位置するときには1、中ほどに位置するときには0.5、下に位置するときには0として位置ごとにスコアを決めておく。すなわち、10尾がすべて上に浮いているときのスコアは10となり、下に位置するときには0である。フェニトロチオンに暴露したときの位置について図6に示した。試験は水温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照度約3,000 lx、24時間明期の恒温室にて行った。試験中の給餌、水の交換はしなかった。フェニトロチオン処理後1時間目は0.01~1.0 ppm区では対照区よりもビーカーの下方に位置していた。その後は、濃度の増加につれて上方に位置するようになり、12時間目では、1, 3 ppm区で水面に浮び上がったままになった。3 ppm区では1週間後でも水面に浮んだままであった。対照区と比較してみると、6時間目では0.03 ppm区以上、12時間目では0.01 ppm区以上、24, 48時間目では0.001 ppm区以上で有意差が認められた。急性毒性試験における、有機リン系殺虫剤に暴露された供試魚が水面に浮び上ることの観察から、その数量化を目的として試験を行ったが、急性毒性試験では無作用域とされる極めて低濃度において、処理後数時間内では、稚魚は対照区より下方に位置することが見いだされ、このような簡便な方法でも高感度に薬剤の影響を検出できたことは興味深い。

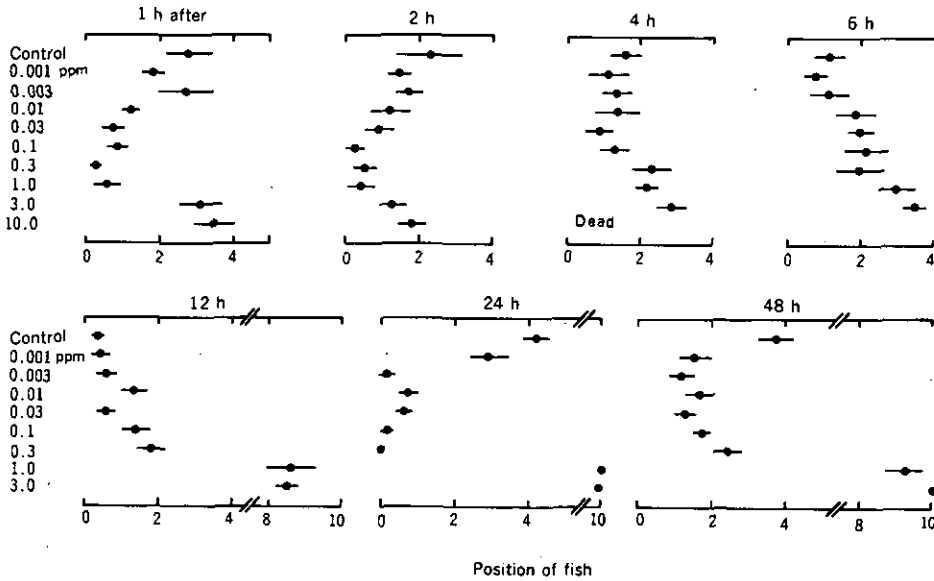


図6 グッピーの水槽内での上下分布に対するフェニトロチオンの影響

5. 考察

TSCAに基づく毒性試験のガイドライン⁸⁾では、魚の急性毒性試験には、ニジマスやブルーギル、ファットヘッドミンノウの幼魚を用いる方法が基準にされている。また、OECDでも基準となる

毒性試験法を定めている⁸⁾。一方、我が国の試験方法は、JISの工場排水試験方法⁹⁾、農林省農政局長通達¹⁰⁾による急性毒性試験方法が標準試験法として用いられているが、供試魚の選定及び試験条件に多くの問題を残している¹¹⁾。このような問題を解決するために黄色系のグッピーの分離を進め、同時に稚魚を用いた急性毒性試験方法を開発した。さらに、この新しい急性毒性試験方法によって、季節を問わず常に安定した試験成績の得られることを確認した。

EPAのガイドライン⁸⁾では、受精直後の胚からふ化後28日目まで(ファットヘッドミンノウ、シープヘッドミンノウ)、あるいは60日目まで(ニジマス、カワマス)の生存率及び成長を調べる弱齢期の魚に対する影響試験が取り上げられている。グッピーの産まれた直後から生後30日目までのフェニトロチオンの連続暴露試験では、対照区における死亡率は2%と極めて低く、個体間のばらつきも少ない(変動係数;体重0.23, 体長0.07)。これらのことから弱齢期における影響試験にもグッピーが適していると言える。既に有機塩素系殺虫剤の暴露により流産が引き起こされることが報告されている¹²⁾が、有機リン系殺虫剤のフェニトロチオンによっても早産の誘発されることをはじめて認めた。フェニトロチオンのウズラにおける4週間の摂食試験では、大量に摂食させた場合に、産卵率の低下がみられたが、摂食中止後2週間で正常に回復する可逆的変化であるとされている¹³⁾がグッピーでは浄水に戻してから2か月たっても回復しておらず、種の違いによる作用機構の違いが示唆される。

魚のスクーリング行動は採餌¹⁴⁾及び捕食圧¹⁵⁾と極めて強い関連をもっており、この行動の低下は、個体群の生存のための競争力を弱める結果をもたらす。グッピーの稚魚のピーカー内の上下運動を観察する試験法は、毒物の影響によって水面に浮び上ってしまったために捕食され易くなったり、流れに押し流され易くなるといったことにも関連している。忌避¹⁶⁾、摂食¹⁷⁾、社会性¹⁸⁾など行動に及ぼす毒物の影響に関する報告は多いが、スクーリング行動に対する影響の試験の報告は極めて少ない。ピーカー内の上下運動を観察する簡便な試験法によって、低濃度における殺虫剤の影響が検出され得ることからも、魚の行動に基づいた試験法には研究の余地は多いと思われる。

6. まとめ

農業・重金属のグッピーの急性毒性試験、生長、産仔に対する慢性毒性試験、行動に及ぼす影響試験を行った。

1) 当研究所において分離した黄色系のコロニーを用いることにより、急性毒性試験において安定した値を示すことを認めた。また、弱齢期における長期暴露試験にも適切な供試魚であることが示された。

2) 成魚の2か月間にわたる有機リン系殺虫剤の暴露試験において、フェニトロチオンは、流産をもたらし、さらに卵形成を阻害することを認めた。

3) 稚魚を用いたスクーリング行動及び水槽内における垂直分布に対するフェニトロチオンの行動に及ぼす影響試験により、低濃度でその影響が検出されることを認めた。

引用文献

- 1) Middaugh, D. P. and J. M. Dean (1977) : Comparative sensitivity of eggs, larvae and adults of the estuarine teleosts, *Fundulus heteroclitus* and *Menidia menidis* to cadmium. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 17(6), 645-652.
- 2) Mehrle, P. M., W. W. Johnson and F. L. Mayer, Jr. (1974) : Nutritional effects on chlordane toxicity in rainbow trout. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 12(5), 513-517.
- 3) 春日清一 (1980) : メダカにおけるカドミウム急性毒性の雌雄差. 日本水産学会誌, 46(9), 1073-1076.
- 4) 広瀬吉則, 安野正之 (1979) : グッピーの稚魚による数種の殺虫剤の毒性試験について. 衛生動物, 30(2), 167-171.
- 5) 佐々学 (1973) : 環境改善に対する胎生メダカ類など生物の利用に関する研究. 文部省研究報告集録, 昭和47年. 人間生存と自然環境, 262-264.
- 6) Yasuno, M., S. Hatakeyama and M. Miyashita (1980) : Effects on reproduction in the guppy (*Poecilia reticulata*) under chronic exposure to temephos and fenitrothion. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25, 29-33.
- 7) Seghers, B. H. (1974) : Geographical variation in the responses of guppies (*Poecilia reticulata*) to aerial predators. Oecol. (Berl.), 14, 93-998.
- 8) EPA (1982) : Environmental effects test guidelines, EPA 560/6-82-002, PB 82-232992.
- 9) 日本規格協会 (1971) : 魚類による急性毒性試験. 工場排水試験方法, JIS K0102-1971, p. 154-157.
- 10) 農林省農政局長通連 (1965) : 魚類に対する毒性試験法. 昭和40年度農政局長通連 B第2735号.
- 11) 宮下衛 (1977) : グッピーの稚魚を用いた重金属類の急性毒性試験. 日本公衆衛生雑誌, 24(7), 423-429.
- 12) Boyd, E. (1964) : Insecticides cause mosquitofish to abort. Prog. Fish. Cult., 26, 138.
- 13) Kadota T. and J. Miyamoto (1975) : Acute and sub-acute toxicity of sumithion in Japanese quails. Botyu-Kagaku, 40, 54-58.
- 14) Hunter, J. R. (1966) : Procedure for analysis of schooling behavior. J. Fish. Res. Bd. Canada, 23(4), 547-562.
- 15) Seghers, B. H. (1974) : Schooling behavior in the guppy (*Poecilia reticulata*) : An evolutionary response to predation. Evolution, 28, 486-489.
- 16) Larrick, S. R., K. L. Dickson, D. S. Charry and J. Cairns, Jr. (1978) : Determining fish avoidance of polluted water. Hydrobiologia, 61(3), 257-265.
- 17) Lingaraja, T., P. S. B. Rao and V. K. Venugopalan (1979) : DDT induced ethological changes in estuarine fish. Environ. Biol. Fish., 4(1), 83-88.
- 18) Bloom, H. D., A. Perlmutter and R. J. Seeley (1978) : Effect of a sublethal concentration of zinc on an aggregating pheromone system in the zebrafish, *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Environ. Pollut., 17, 127-131.

重金属のカゲロウ (*Epeorus latifolium*) に対する影響解析

畠山 成久¹・福島 悟²

Effects of Heavy Metals on the Growth of the Mayfly Nymph (*Epeorus latifolium*)

Shigehisa HATAKEYAMA¹ and Satoshi FUKUSHIMA²

Abstract

Effects of heavy metals (Cadmium and Copper) on the growth and emergence of aquatic insect (Mayfly, *Epeorus latifolium*) was studied using indoor model streams. Water temperature in the streams was controlled to 12°C or 14°C.

Cadmium : Mortality of *E. latifolium* (body length 6 mm at initial) reached to 50% when the larvae were exposed to 100 µg Cd/L for 2 weeks and 300 µg Cd/L for one week respectively. Growth of *E. latifolium* exposed to 10 µg Cd/L for 3 weeks was not affected significantly. While, growth of those exposed to 30 µg Cd/L for 2 to 3 weeks was significantly affected. On the other hand, survival and emergence rate of *E. latifolium* (body length 8.5mm at initial) exposed to 10 µg Cd/L for 4 weeks decreased to about 75% of the control.

Effects of Cd through food chain was also studied. Growth rate of *E. latifolium* (Body length 3 mm at initial) fed the attached algae containing 1,100 to 500 µg Cd/g (dry wt., Cd concentrations of the algae decreased gradually) for 2 weeks was not affected. While, growth rate of those fed the algae containing 1,300 to 700 µg Cd/g for 2 weeks decreased considerably but restored when Cd concentration of the algae decreased lower than 700 µg Cd/g. The sensitivity to the Cd-accumulated algae (500-250 µg Cd/g) differed between the larvae of 8 mm and those of 9.5mm in mean body length. Mortality of the formers reached 50% after one week, while that of the latters remained at 10%.

Copper : Sub-acute toxicity of the Cu was much higher than Cd. Mortality of *E. latifolium* (Body length 5 mm at initial) exposed to 30 µg Cd/L reached 40, 70, and

-
1. 国立公害研究所生物環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Environmental Biology Division, the National Institute for Environmental Studies,
Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 昭和56年度~国立公害研究所客員研究員(横浜市公害研究所水質部 横浜市磯子区滝頭1-2-15)
Visiting Fellow of the National Institute for Environmental Studies. Present Adress :
Yokohama City Institute of Environmental Research, Yokohama 235, Japan.

80% at 1, 2, and 3 weeks respectively. Increase of mortality was also observed in the larvae exposed to 25 $\mu\text{g Cu/L}$. Decrease of the growth rate were observed in the larvae exposed to Cu higher than 15 $\mu\text{g Cu/L}$. At 10 $\mu\text{g Cu/L}$, effects of Cu on the growth and emergence of the mayfly were not observed.

Growth rate of *E. latifolium* (Body length 4.6 mm at initial) fed the attached algae containing 700 to 600 $\mu\text{g Cu/g}$ for one week was significantly lower than control, but restored after one week when Cu concentrations in the algae decreased gradually. While, growth and emergence rate of those fed the algae containing 1,400 to 1,000 $\mu\text{g Cu/g}$ were affected considerably.

1. はじめに

重金属が河川の生態系に及ぼす影響を解明する目的で我々は現在数ヶ所の河川で生物調査と重金属濃度などの環境調査を行っている。調査の対象としている河川は廃止鉱山を汚染源としており、廃止後10年以上も経過しているのにカドミウム、銅、亜鉛などによる高度の汚染が現在も継続している。このような河川では通常の生物種はほとんど生息し得ず、ユスリカやカゲロウなどの重金属耐性種が優先するなどのその生態系は健全な河川とは異なったものになっている。従来からも重金属汚染河川の生態調査は国の内外で数多くなされてきた¹⁻⁴⁾。ところで鉱山による重金属の汚染は複合的なものである。さらに個々の重金属の濃度は季節的变化や降雨、渇水などの自然現象、又は生石灰による中和や護岸作業など人為的所作により変動しているものと考えられる。また生物の側から見れば成長段階、雌雄差などにより重金属に対する感受性も変化するものと考えられる。さらに水生生物は水とえさの両方の径路から重金属を体内に蓄積しその影響を受けることが知られている。したがって野外河川の影響調査のみからでは通年による重金属の影響は評価できるにしても個々の重金属がどの程度の濃度で、特定の生物種にいかなる影響を及ぼすか、またそのときの重金属の蓄積径路などを検討することは極めて困難である。

この研究では人工環境室に設置したモデル河川を使用してカドミウム及び銅がカゲロウの生長や羽化に及ぼす影響を上記の観点(成長段階、蓄積径路)から解析したものである。カドミウムと銅はいずれも水生生物に対する毒性は極めて高く、現在調査中の河川にも高濃度で含有されている。カゲロウはエルモンヒラタカゲロウ(*Epeorus latifolium*)を用いた。この種は種の同定が容易であり、国内の河川では上流域から中流域にかけ最も一般的なカゲロウの一種である。また予備試験の結果から人工河川での飼育環境にも適していたことなどによる。これまで溪流に生息するカゲロウの特定種について重金属の慢性影響を室内実験で調べた報告は実験方法の制限などから見当たらないように思われる。したがって今回の報告は、実験方法自体についても検討を加え、水路の方式も1)循環式、2)循環一かけ流し式の併用、3)かけ流し式などの方式によりカゲロウに及ぼすカドミウムと銅の影響を解析したものである。

2. 実験方法

恒温室 (温度 $15 \pm 1^\circ\text{C}$, 光 2500 lx , 12L-12D) 内にステンレス板で作製した2本の水路を設置した。水路の全長, 幅, 側面の高さはそれぞれ6 m, 40cm, 30cmであり斜度は1/30である。以下の実験は水の流し方, 重金属の暴露方法等に若干の変更はあるがすべてこの2本の水路を基に行った。

エルモンヒラタカゲロウ (*Epeorus latifolium*) の幼虫は実験初期の一部 (筑波山・山口川) を除きすべて宇都宮市郊外の鬼怒川 (柳田橋上流) から採集した。サバーネット (メッシュサイズ $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$) で採集したカゲロウをビニール袋に入れ酸素を充満させた後バカンスクーラーで冷却して恒温室に運んだ。翌日又は1週間以内の順化期の後実験に供した。カゲロウは体長測定後水路に導入し, 以下の方法でカドミウム (CdCl_2 , 以下 Cd) 又は銅 (CuSO_4 , 以下 Cu) に暴露した。その後1週間ごとに体長を測定した。同時に付着藻類とカゲロウの重金属濃度, 付着藻の組成, 光合成色素量などを調べた。これらは方法-(4) に記す。

(1) 循環式水路による実験方法の検討

かけ流し式水路では排水処理の面で制約があるため当初循環式水路により実験結果を検討した。水路の末端に貯留水槽 (図1) を置き, その中に置いた水中ポンプにより水路に 260 l/min の流量で地下水を循環させた。水路を循環する水の全量は約 320 l である。水路の床面には 50 cm 間隔で高さ 5 cm の仕切板を取り付け約 8 cm の水深を得た。この実験では水中の Cd 濃度の変動, Cd による藻類の組成変化の有無, 藻類及びカゲロウの Cd 蓄積量を検討した。そのため, 1本の水路に Cd が 100 ppb になるよう Cd を添加し, 2日ごとに水路から 100 l の水を排出し新たに 100 ppb の Cd を添加した地下水 100 l を加えた。他の水路は対照水路とした。それぞれの水路にはステンレス製のカゴ (楕円形 $21 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$) を36個置き, その中に体長 11 mm 前後のカゲロウを15匹ずつ入れた。えさとしてカゲロウを採集した河川から得た石ころ (約 $10 \times 7 \times 3 \text{ cm}^3$) を3~4個ずつ入れ, 石

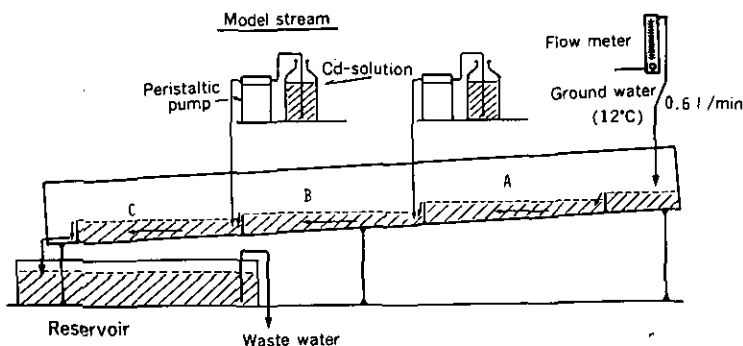


図1 モデル河川の略図
かけ流し式水路により対照区と2濃度を設定。

面の付着藻を摂食させた。カゲロウの体長、重金属の濃度、藻類の組成、光合成色素量の測定などは実験開始から1週間ごとに4週間後まで行った。

(2)〔循環一かけ流し式〕併用水路によるカドミウム(10ppb)の影響解析

カゲロウ(*E. latifolium*)の成長と羽化に及ぼすCdの影響を10ppbの濃度で検討した。方法(1)の循環式水路(260 l/min)に一定の流量(7 l/min)で調温水(11~12℃)を流入させ貯留水槽のサイホンから排出させた。この方法により水路の水の換水率は32回/dとなった。水路には前述のステンレスのカゴを2列に20個ずつ置いた。それぞれのカゴには球型の人工石(ϕ 45mm 磁製)を9個ずつ入れた。人工石の表面には水路に配置後40~50日で実験に十分量の付着ケイ藻が発生した。この段階でそれぞれのカゴに5又は9匹のカゲロウを体長を測定して入れた。水路にはCdの高濃度液(500ppm)をペリスタポンプにより連続的に供給し(200ml/d)10ppbとなるように設定した。1週間ごとにカゲロウの体長、付着藻とカゲロウのCd濃度、藻類の組成、光合成色素量を調べた。実験の後半ではカドミウムの供給を停止した。水中のCdは急速に消失するが藻類中のCdは緩慢に減少する。この段階で前述と同様にカゲロウを導入し、成長と羽化に及ぼす食物連鎖によるCdの影響を検討した。

(3)カドミウムと銅の濃度段階による影響(かけ流し式水路による)。

1本の水路(斜度1/30)を高さ7cmの塩ビ製の板で3区に仕切り、水路の上部から一定の流量(7 l/min)で地下水(12℃)を流した。水路は傾斜しているため各区の仕切板でダム状になり下流区の水は上流区へ混じらない(図1)。この実験ではCdやCuの影響を個体ごとに調べた。球型の人工石(ϕ 45mm)を支持台に取り付けこれをステンレス網のカゴ(7cm×7cm×9cm, メッシュサイズ1mm×1mm)に入れ、各濃度区に12個ずつ配置した。石面に十分量の付着藻が発生した段階でそれぞれのカゴにカゲロウを1個体ずつ導入した。一週間の順化期の後各区の上流部のペリスタポンプにより重金属を連続注入し、Cd又はCuの濃度が上流から対照、3, 10ppb、他の水路では30, 100, 300ppbとなるよう設定した。Cuではさらに対照、5, 10, 15, 20, 25ppbの濃度でも実験を行った。その後の影響(成長と羽化)、藻類組成、藻量(光合成色素量)、重金属濃度、食物連鎖による影響等は方法(1)と同様1週ごとに行い、最も長い場合で8週後まで実験を行った。

(4)影響の測定

1)カゲロウ(*E. latifolium*)

扁平にしたコマゴメビペットで取り扱った。体長の測定時にはカゴから時計皿の上に取り出し、まわりの水を除去して動きを止めた後実体顕微鏡に取り付けたマイクロメーターで測定した。測定後は水路のカゴに戻すか重金属分析用のサンプルとした。これらは15℃の恒温室内で行った。

2) 藻類

石面からブラシで採取し、遠心操作 (6,000R. P. M) により純水 (Milli-Q 水) で1回、0.1mM EDTA で2回洗浄した。光合成色素の測定には上記サンプルの一部を Glass Filter (Whatman GF/C) 上に取り、ガラスグライNDER (Potter タイプ) 中で90%アセトンにより抽出した。抽出液を分光度計 (ベックマン Model34) で測定し、色素量を得た。藻類組成としてケイ藻は酸 (KMnO_4 , H_2SO_4) 処理又はホルマリン固定のサンプルをそのまま1,000倍の検鏡により同定、計数を行った。細菌、ラン藻、緑藻はホルマリン固定サンプルを検鏡して調べた。

3) 重金属の分析

水は採水後約1%の硝酸 (重金属分析用) を添加し、フレーム (島津 AA-640-12型) 又はフレームレス (日立180-80型) 原子吸光装置により測定した。藻類は前記のように遠心操作で洗った一部を100℃で2日乾燥した。これを硝酸と過塩素酸 (重金属分析用) で分解し、純水 (Milli-Q 水) で希釈定容後上記の原子吸光装置で分析した。カゲロウは体長を測定後0.1mM EDTA で洗浄し、2日間100℃で乾燥した。これを藻類の場合と同様に分解し分析を行った。一部のカゲロウは消化管とそれ以外の部分に分けて分析を行った。なお、生物試料の重金属濃度はすべて $\mu\text{g/g}$ (dry weight) で表した。

3. 結果

(1) 循環式水路による実験方法の検討

循環式水路 (全水量320 l, 流量260 l/min) に100ppbの濃度で添加したカドミウム (以下, Cd) は翌日には半分以下の濃度に減少した。2日目以降, 1日置きに水路の水100 lを新たに調整した100ppbのCdを添加した地下水で交換した。20ppb附近まで減少していたCd濃度はその直後約40ppbまで回復するが, 2日後には再びおよそ半分の濃度に減少するパターンを繰り返した (図2)。実験14日後に水路の水のほとんどをCdを含まない水で交換した。その後毎日水路の水の約31%に当たる100 lの水をCdを含まない地下水で交換し続けたが, 10ppb以下の濃度に達するのに約10日間要し, その後の濃度減少はさらに緩慢であった (図2)。このように循環式水路では一定の濃度を維持するにも, また食物連鎖のみによる影響を検討するため水中からCdを除去するためにも適当でないことが分かった。表1は循環式水路でCdに暴露した付着ケイ藻 (酸処理による試料) の組成を実験1週後と1ヵ月後に対照水路と比較したものである (日数は図2と一致)。実験に用いた石は筑波山・山口川から得たものである (80年3月)。暴露7日後に10%以上の組成を示す種で30日後に対照と差が見られるのは *Achnanthes japonica* と *A. subhudsonis* で, 前者は対照では変化していないがCd-水路のものは約30%に減少, 後者では対照が約60%に減少しているがCd-水路では変化していない。 *A. minutissima* は重金属耐性種として知られ重金属汚染河川で最優先しているが¹³⁷Cd暴露30日後でも対照とCd水路間で明らかな差は認められなかった。

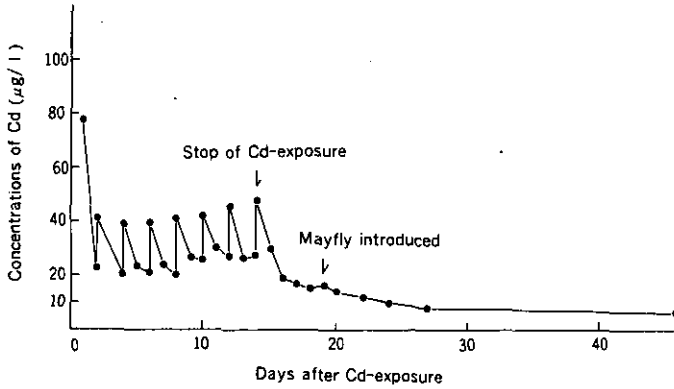


図2 循環式水路 (260 l/min) における Cd 濃度の変動

2日ごとに全水量 (320 l) の1/3を100ppbのCd-地下水で交換した。

附着藻類中のCd濃度は暴露1週後で約 $150\mu\text{g/g}$ (dry weight) となり、2週後では約 $450\mu\text{g/g}$ に達した(図3)。2週後からは水路の水の30%をCdを含まない水で交換し続けたが附着藻中の濃度は図3のようなパターンで減少し、 $200\mu\text{g/g}$ 付近からの減少は非常に緩慢であった。実験20日後に一部の石をカゴごと水路間で置き換えた。図3の破線部がその結果を示すが対照区に移した方がCd濃度の減少が早い。これはCd-水路に残存するCdが附着藻中のCd濃度の減少を遅らせていることを示している。

カゲロウも短期間に高濃度のCdを蓄積した。Cd暴露1週及び2週後にはそれぞれ約 $30\mu\text{g/g}$ 、 $100\mu\text{g/g}$ のCdを蓄積した(図4)。実験の後半からカゴごと石を水路間で交換しカゲロウのCd蓄積に及ぼす水(図2)と藻類(図3)の寄与を検討した。なおこの実験で用いたカゲロウは3月—4月初旬に筑波山・山口川から採集したもので体長が10mm前後と羽化期に近いものである。Cd水路の藻類を対照水路に移した場合では水中のCd濃度が低いことからほぼ藻類のみからの取り込みと見なされるがカゲロウのCd濃度は2週後に約 $25\mu\text{g/g}$ となった。一方、対照水路の藻類をCd水路に移した場合のそれは約 $60\mu\text{g/g}$ となったが、この期間の水中のCd濃度は15~8 ppb(図2)である。カゲロウは体の全体積に占める消化管(内容物を含む)の割合が大きく、かつCdを高度に含有した藻類によって占められているため、カゲロウのCd濃度の値に対する寄与は大きいものと考えられた。このため一部のカゲロウでは消化管全体(内容物を含む)を引き出し、これ以外の部分と二つに分けて分析した。その結果実験開始時からCdに暴露したものでは消化管におけるCdの量は1週後、2週後でそれぞれ体全体の78%、60%を示した。また水中のCd濃度が低下した段階(図2、19日後~)から暴露したもののそれは91%、92%とその値は極めて高い。一方カゲロウの乾重量に対する消化管(内容物を含む)の割合は $11.0\pm 1.9\%$ ($n=13$)であり、Cdは消化管とその内容物の部分に高濃度に存在していた。

循環式水路での実験をとおり、この実験系では定期的に水を交換してもCd濃度の変動が大きい

表1 カドミウムに暴露した水路における付着藻の組成変化 (%)

Species	Control-Channel		Cd-Channel	
	Exposure-Time		Exposure-Time	
	One Week	One Month	One Week	One Month
<i>Fragilaria pinnata</i>	1.0	0.5	0.2	
<i>F. vaucheriae</i>		0.9	2.1	0.5
<i>F. sp.</i>			0.2	0.9
<i>Synedra rumpens</i>	0.5	4.1	0.9	5.1
<i>Cocconeis placentula</i>	10.4	3.2	4.9	9.2
<i>Achnanthes japonica</i>	21.3	23.2	18.3	5.5
<i>A. clevei</i> var. <i>rostrata</i>	0.5		0.9	0.5
<i>A. lanceolata</i>	13.0	11.8	15.5	16.1
<i>A. lineariformis</i>	7.0	17.7	7.6	17.4
<i>A. heterostriata</i>	6.3	4.6	7.9	8.3
<i>A. minutissima</i>	0.2	3.2	0.5	3.7
<i>A. sp.</i>	0.7	0.9	2.6	0.9
<i>A. subhudsonis</i>	18.1	10.9	19.9	20.2
<i>A. sp.</i>	1.9		0.9	
<i>Navicula decussis</i>	1.0	1.4	1.2	
<i>N. secreta</i> var. <i>apiculata</i>	0.2		0.5	
<i>N. sp.</i>			0.2	
<i>Amphora ovalis</i> var. <i>pediculus</i>	4.4	4.1	4.2	3.2
<i>Cymbella sinuata</i>	3.6	3.6	5.8	2.3
<i>C. ventricosa</i>			0.2	
<i>Gomphonema intrictum</i> var. <i>pumila</i>	5.6	3.2	2.1	2.3
<i>Nitzschia fonticola</i>	2.4	3.2	2.1	0.9
<i>N. palea</i>	1.7	3.6	1.4	3.2
<i>N. frustulum</i>	0.2			

こと、また水中の Cd 濃度も容易に減少し難いことから食物連鎖のみによる影響を調べるのにも適当でないことが分かった。

(2) 循環-かけ流し式併用水路によるカドミウム (10ppb) の影響

循環式水路 (方法-(1)) の上流部から14℃の地下水を7 l/minの流量でかけ流した。水路の流

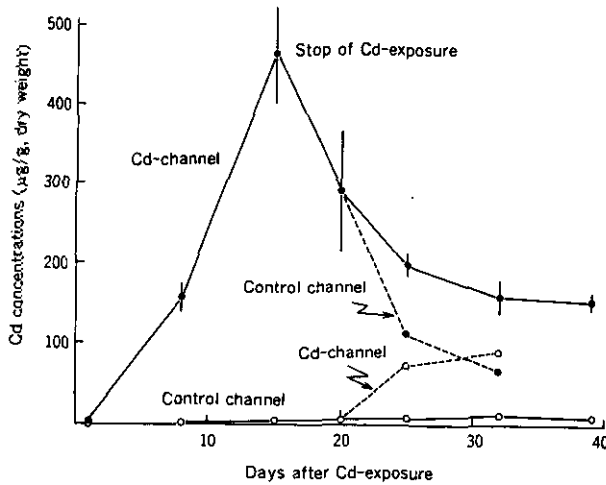


図3 循環式水路における付着藻のCd濃度 ($\mu\text{g/g}$ dry wt.)
14日以降Cdの添加を停止した。水中のCd濃度は図2に示す。

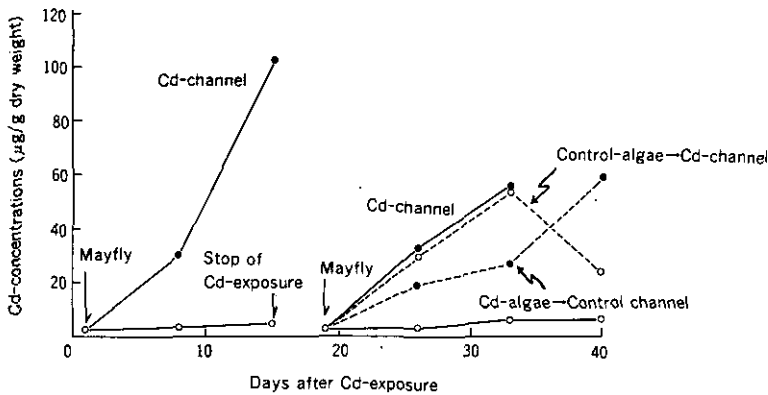


図4 異なった蓄積径路によりCdに暴露されたカゲロウのカドミウム濃度 ($\mu\text{g/g}$ dry wt.)

量は循環ポンプによる260 l/min と合わせ約267 l/min となり、7 l/min の分は水路下部の貯留水槽から排出させた。カゴに球型の人工石 ($\phi 45\text{mm}$) を9個ずつ並べて水路に配置すると約40日で実験に十分量のケイ藻を主成分とする付着藻が発生した。この時点から方法-(2)により一方の水路に10ppbのCdを流した。付着藻は球型の石のほぼ上半分に発生するが石1個当たりのクロロフィル-aの量を図5に示した。Cd暴露3週後までは対照とはほぼ同様な増加が見られるが、4週から6週ではCd水路のクロロフィル-aは対照の約70%と少な目である。フェオ色素も除々に増加しているが対照とCd水路間で顕著な差は認められない。6週後からクロロフィル-aに減少が見られるがこれは付着藻のはく離等によるものと考えられる。

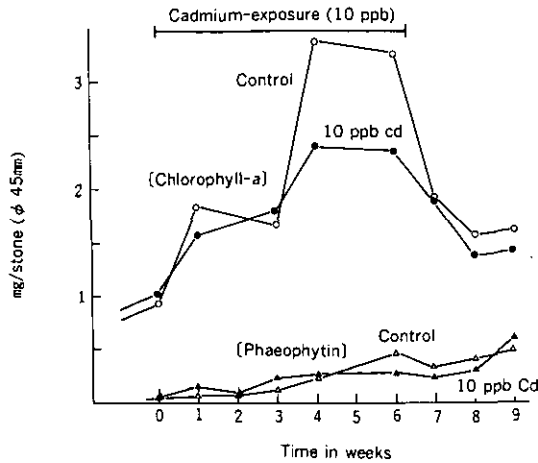


図5 カドミウム暴露 (10ppb) 水路の人工石 (φ45mm) 面に発生した付着藻のクロロフィルa量

Cd 暴露後の付着藻の組成変化を表2に示した。実験期間を通じて *Gomphonema Parvulum* が優先種であり、暴露開始時には99%であったが6週後までに対照水路では71%, Cd-水路では86%へと徐々に減少した。代りに *Navicula* sp. と *Nitzschia palea* の組成が増加し、6週後対照水路では前者が11.0%, 後者が17.4%となった。一方 Cd 水路ではそれぞれ5.1%, 7.6%であり対照の組成の約50%にとどまった。

付着藻類中の Cd 濃度を暴露開始時から1週ごとに測定したが6週後まではほぼ直線的に増加し、6週後で約500 μ g/g (dry weight) に達した (図6)。この値は重金属汚染河川での値と比較すると1けた高い値である。

1) カゲロウに及ぼす10ppb-Cd水の影響

水路に Cd を流し始めた翌日に体重8.5mm 前後のカゲロウを体長を測定し、5個体ずつ5個のカゴに入れその後の Cd 蓄積と成長・羽化に及ぼす影響を調べた。カゴには前述の Cd を蓄積したケイ藻を付着する人工石が9個ずつ入っている。カゲロウは81年6月鬼怒川 (水温20 $^{\circ}$ C) から採集した。このときのカゲロウは羽化に近く、早いものでは暴露2週後から羽化が始まった。成長には暴露3週後まで対照と差は認められなかった (図7)。暴露4週後まで25個体の死亡率、羽化率を同図に示した。Cd 水路では3週後、4週後に30%, 40%の個体が死亡したが対照水路では20%であった。4週後の羽化率でも対照が72%, Cd 水路では56%とその差は著しいものではないが Cd の影響が認められる。一方、同時に体長7mm 前後のカゲロウを9個体30日間 Cd 水路に暴露したが1週後の成長にやや遅れが見られたが、その後対照と差は認められなくなった。30日後までの死亡率、羽化数の積算値は対照水路では2個体と6個体、Cd 水路では3個体と5個体 (両水

表2 カドミウム (10ppb) に連続暴露した水路における付着藻の組成変化 (%)

Species	Cd-Exposure Time (Weeks)						Cd-Free(Weeks)	
	0	1	2	3	5	6	3	7
<u>Control-Channel</u>								
<i>Synedra rumpens</i>			0.3	1.3	0.3	0.3	0.9	18.9
<i>Achnanthes sp.</i>		1.3	1.0	0.9	1.3			
<i>A. lanceolata</i>								1.8
<i>Navicula sp.</i>	0.3	1.0	1.0	0.6	5.0	11.0		1.8
<i>N. pupula</i>							16.0	28.7
<i>Gomphonema parvulum</i>	99.7	97.0	96.5	96.3	86.8	71.0	33.8	3.0
<i>G. angustatum var. producta</i>							0.9	
<i>Nitzschia palea</i>		0.6	1.2	0.9	6.6	17.4	47.9	45.8
<u>Cd-Channel(10ppb)</u>								
<i>Synedra rumpens</i>			0.6	0.3	0.9	0.8	2.9	1.0
<i>Achnanthes sp.</i>	0.7	1.0	0.3	0.6	0.6	0.6		
<i>A. lanceolata</i>							1.0	
<i>Navicula sp.</i>	0.3		2.2	2.6	4.2	5.1	4.8	1.0
<i>N. pupula</i>							9.6	19.4
<i>Gomphonema parvulum v</i>	98.7	98.4	95.8	94.9	89.7	86.0	36.7	44.9
<i>G. angustatum var. producta</i>							1.0	2.0
<i>Nitzschia palea</i>	0.3	0.6	1.1	1.6	4.5	7.6	44.2	29.6
<i>Cyclotella sp.</i>								2.0

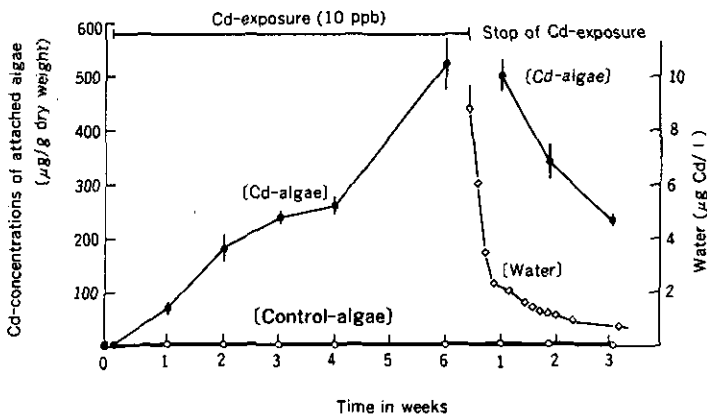


図6 カドミウム暴露 (10ppb) のモデル河川における付着藻中の Cd 濃度変化
実験 6 週後に Cd の供給を停止した。

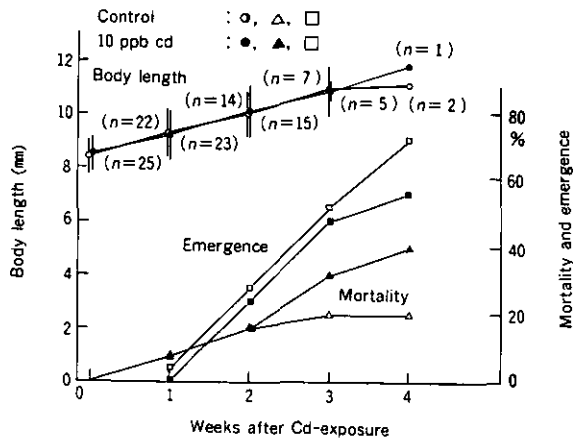


図7 10ppbのカドミウム暴露後のカゲロウ (体長8.5mm) の成長と死亡, 羽化率

路とも1個体は幼虫)となり, Cdによる明らかな影響は認められなかった。

2) 食物連鎖によるカドミウムの影響

水路に10ppbのCdを流し続けてから46日後にCdの供給を停止すると水中のCd濃度は急速に減少し5日後で2ppb, 10日後では1ppbとなった(図6)。一方藻類中のCd濃度の減少は緩慢であり, Cdの停止時には約550 $\mu\text{g/g}$ の濃度が4日, 10日, 18日後にはそれぞれ500, 350, 260 $\mu\text{g/g}$ と比較的ゆっくり減少した(図6)。この実験ではCdの供給を停止して4日後に体長を測定したカゲロウを1)の場合と同様に導入しCdを含有した藻類の摂食による影響を調べた。このときのカゲロウは81年8月鬼怒川(水温22.5 $^{\circ}\text{C}$)から採取したものである。

体長3.5mm前後のカゲロウをCd-藻類を付着した人工石が9個入ったカゴに16個体ずつ入れた。水中及び藻類中のCd濃度は図6のとおりである。Cd-藻類摂食後1週から3週後にかけて成長の阻害が認められるがその後成長速度に对照と差が認められなくなった(図8)。実験7週後までに大部分が羽化した, そのときの積算羽化数は对照が14個体(他に死亡1, 幼虫1)Cd-藻類摂食のものでは12個体(他に死亡1, 幼虫3)とCd-藻類摂食による顕著な影響は認められなかった。藻類のCd濃度はCdの供給停止後2週後までしか測定していないが(図6)他のデータ(図3, 図13)を見ると200 $\mu\text{g/g}$ のレベルからの減少は極めて緩慢であり, この実験の場合も同様の傾向で減少したものと考えられる。

成長段階によりCd-藻類摂食に対する感受性に差があるかどうかを調べるため体長8mm前後と体長9.5mm前後のグループのカゲロウを16個体ずつカゴに入れその影響を見た。実験期間(2週)中における付着藻のCd濃度は図6に一致し, 500-250 $\mu\text{g/g}$ である。この実験では実験期間中にCd-水路に残留しているCd(2ppb~1ppb)(図6)の影響も検討するため对照藻類をCd-水

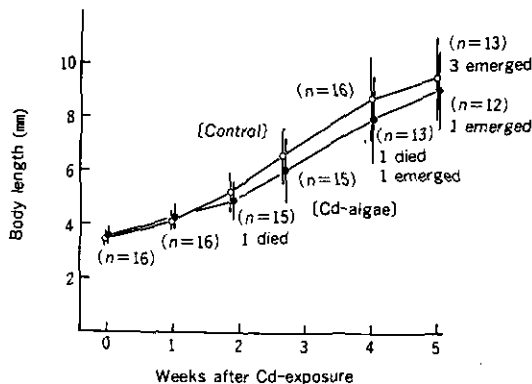


図8 カドミウムを蓄積した (500-250 μ g Cd/g) 附着藻を摂食したカゲロウの成長曲線

路へ、また Cd-藻類を対照水路へと置換してその影響も同時に検討した。図9にそれぞれの体長 (Mean \pm S. D., n), 死亡率, 羽化率を示している。体長 9 mm のものは Cd 暴露 1 週後に分析用サンプルとして用いた。体長 8 mm のカゲロウでは Cd-藻類摂食後の死亡率は 1 週後に 50%, 2 週後では 70% に達した。Cd-藻類を水中の Cd 濃度が無視できる対照水路に移した場合 (図9-(4)) の死亡率もほとんど同じであることから上記の死亡は食物連鎖のみによる Cd の影響と見なしてよいように思われる。さらに対照藻類及び対照藻類を Cd-水路に移した場合の 2 週後の死亡率が両者とも約 20% であることから、Cd 水路にわずかに残存している水中の Cd の影響も認められなかったものと言える。

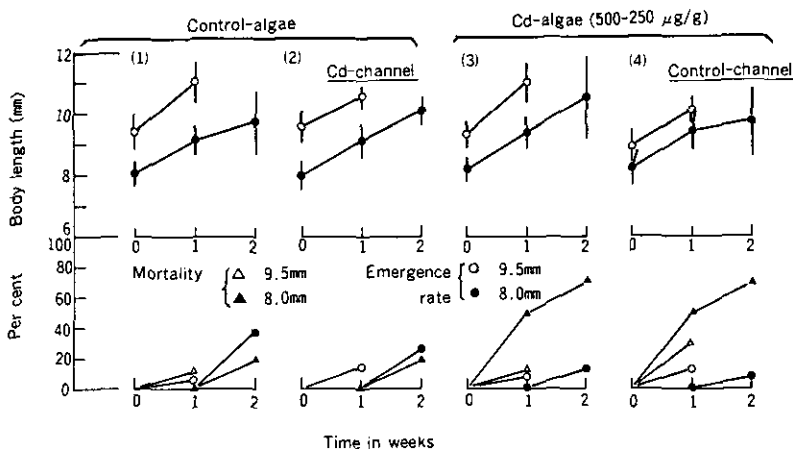


図9 食物連鎖により Cd に暴露した *E. latifolium* の死亡率, 羽化率に見られた成長段階 (体長 8.0 又は 9.5 mm) による感受性の差
(2)と(4)では水路間で附着藻を置換した。

成長段階による死亡率をCd-藻類摂食の1週間後と比較すると8mmのカゲロウの50%に対し9.5mmのものでは15%であり、成長段階によりCd-藻類に対する感受性に差があることが示唆された。羽化率は対照では2週後に40%となったが、Cd-藻類摂食のものでは15%にとどまった。一方、成長に関してはどの区でも明らかな影響は認められなかった。各実験の終了時に人工石面上の付着藻を採取しクロロフィル-aを計った(図10)。カゲロウが入っていない場合はクロロフィル-aが増加するのに対してカゲロウが入ったカゴの付着藻ではそれぞれ減少している。Cd-藻類の場合は2週後でも減少が少ないのは1週間後、2週後に約50%、70%のカゲロウが死亡し、摂食量が減少したためと思われる。また、体長9.5mmのカゲロウの1週間後でも対照及びCd-藻類の場合とも死亡率の高い方(図9の(1), (4))でクロロフィル-aの減少が小さかった。

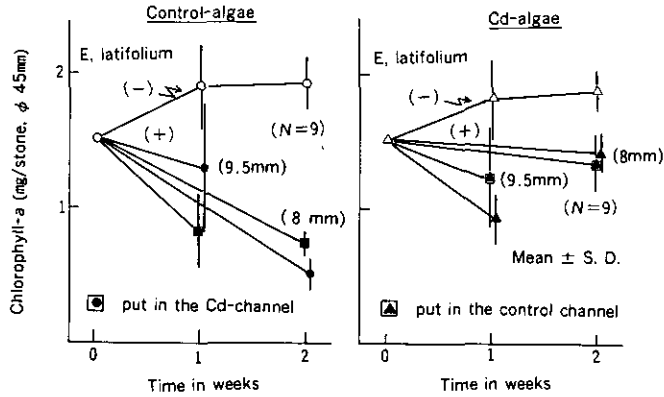


図10 カゲロウの摂食による付着藻の減少
クロロフィルaの測定による。

(3) 濃度段階によるカドミウム及び銅の影響 (かけ流し式水路による)

1) カドミウム (Cd) の影響

方法-(3)により水路中で1週間の順化期間を置いた後、12個体のカゲロウを個別に3, 10, 30, 100, 300ppbのCdに暴露した。水路の最上流部からは12℃の地下水を7 l/minの流量で流したがCd暴露3週間からは水中ポンプにより各濃度区間内でも水を循環させ(200 l/min)水路内の流量を増加させた。この実験におけるカゲロウは81年10月鬼怒川(水温14.5℃)で採集したものである。水路に35日間Cdを流し1週ごとに水中のCd濃度を測定したが対照から設定濃度順にN. D., 3.4±1.0, 10.5±1.5, 29.5±7.3, 92.2±23.2, 302.4±66.3 (Mean±S.D., n=5) ppbとほぼ設定通りの濃度を示した。

Cdに暴露したカゲロウの死亡率を図11に示した。100ppbでは2週後に、300ppbでは1週後にそれぞれ約50%の個体が死亡した。生残った個体の平均体長から、上記の濃度では生長が著しく抑制され、暴露1週以降はほとんど成長が停止した(図12)。30ppbでも暴露1週後から2週後にかけての生長率に対照との間で有意な差が認められた ($P < 0.05$)。一方、3 ppb, 10ppbでは3週間の暴露期間中成長に影響が認められなかった。3週後に生存個体のカドミウム濃度を測定した。10ppbのCdに暴露したものでも約250 $\mu\text{g/g}$ (dry weight) のCdを蓄積した。30ppb以上では水中の濃度に依存したカゲロウのCd蓄積は見られなかった(表3)。

2) 食物連鎖モデルによるCdの影響

前の実験でカゲロウをCdに3週間暴露したが水路にはさらに2週間Cdを流し、藻類中のCd

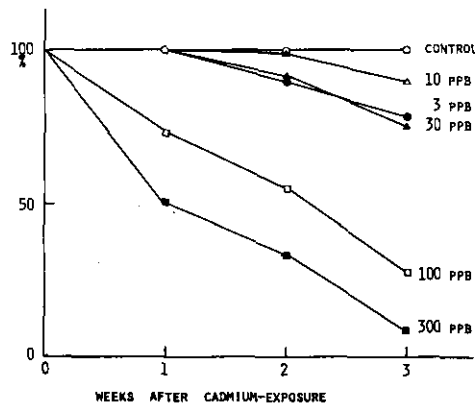


図11 種々の濃度のカドミウムに暴露されたカゲロウの生存率

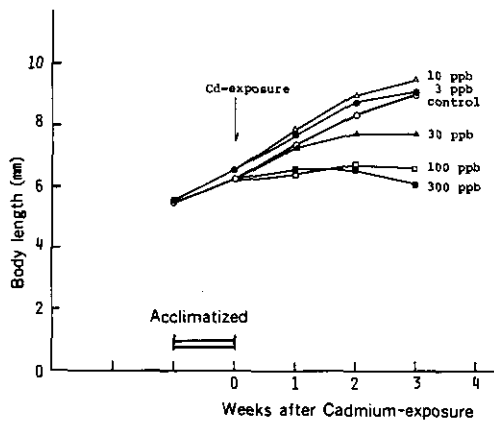


図12 モデル河川中で3週間カドミウムに暴露されたカゲロウの成長曲線

濃度を高めた(図13)。5 週後の各濃度区の藻類中の Cd 濃度は対照から300ppb 区までそれぞれ0.1±0.1, 16±1, 86±3, 249±8, 1210±29, 1351±141μg/g (Mean±S. D., n=3) となった。藻類の Cd 濃度は100ppb までは水中の Cd 濃度に従い増加したが300ppb では抑制された。5 週後から Cd の供給を停止したがかけ流し水路では水中の Cd 濃度は急速に減少した。300ppb の濃度区でも1.5時間後には 5 ppb 以下となり、翌日には 1 ppb 以下となった。一方、付着藻類中の Cd 濃度は図13のようなパターンで減少した。30ppb 以下で300μg/g 以下の Cd を蓄積した藻類では Cd 濃度の減少は極めて緩慢であった。100ppb と300ppb 区で Cd を蓄積した藻類では Cd の供給を停止後それぞれ12日と14日後に約50%の Cd 濃度に減少した (図13)。

藻類の組成を水路に Cd を流した 3 週後から調べた。ケイ藻が主であり図14に示す 3 種の優先種の他には *Navicula* sp., *Gomphonema parvulum*, *G. angustatum* var. *producta*, *Nitzschia* sp. などが見られた。対照, 3 ppb, 10ppb 区では付着藻類の組成に著しい変化はなく, *N. pupula* が50

表3 モデル水路でカドミウムに3週間暴露したカゲロウの Cd 濃度

Cd(ppb)	Cd(μg/g dry wt)
Control	5.5 ± 0.8 (n=11)
3ppb	58.6 ± 21.4 (n=5)
10 ppb	255.0 ± 33.4 (n=8)
30 ppb	277.6 ± 173.4 (n=6)
100 ppb	180.3 ± 42.4 (n=3)
300 ppb	All larvae died

Mean±S.D.(Sample No.)

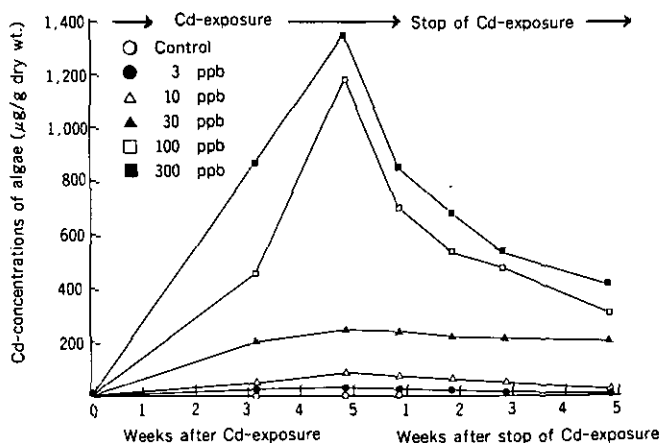


図13 モデル河川中でカドミウムに暴露した付着藻のカドミウム濃度と暴露停止後の濃度の減少

%から70%を占め、*S. rumpens* と *A. lanceolata* が5%から30%の間で変動した。一方、100ppb, 300ppb 区では *N. pupula* が減少し、代わりに *S. rumpens* の組成が著しく増加したが *A. lanceolata* には顕著な増減はなかった。

水路に Cd の供給を停止した翌日から体長 3 mm 前後のカゲロウを 1 個体ずつカゴに入れ Cd-藻類摂食による影響を 1 濃度当たり 12 個体で調べた。付着藻中の Cd 濃度は図13の 5 週間で降示されている。Cd-藻類摂食による死亡率の増加はどの Cd-濃度区でも認められなかった。これは体長 8 mm の材料を用いた場合 (図 9) とでは異なっており、成長段階によって感受性が変化することを示唆している。成長に明らかな抑制が認められたのは 300ppb 区のカゲロウであった (図15)。しかし藻類中の Cd 濃度が $800\mu\text{g/g}$ 以下に減少した 2 週間からは成長の回復が認められた (図15)。1 週ごとの体長の増加では実験 1 週後、2 週後に対照では 9.8 ± 5.5 (Mean \pm S. D., $n=12$), $8.0 \pm 4.4\%$ ($n=10$) に対し 300ppb 区のカゲロウを摂食した場合は 7.2 ± 4.9 ($n=11$), $5.7 \pm 5.6\%$ ($n=10$) と低かった。100ppb 以下の区のカゲロウの成長に影響は認められなかった。6 週後における生存個体は対照から 300ppb 区までそれぞれ 9, 8, 9, 8, 8, 8 個体であり、Cd の分析に供した (表 4)。この結果、カゲロウは藻類の Cd 濃度に従って食物連鎖系のみからも高濃度の Cd を蓄積することが分かった。

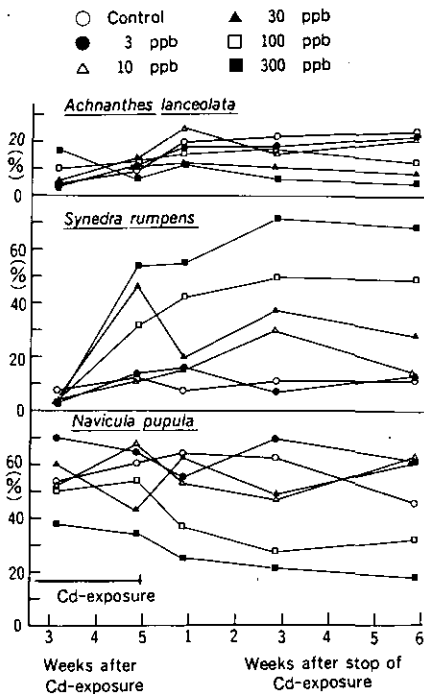


図14 カドミウム暴露停止後の付着藻類の組成変化

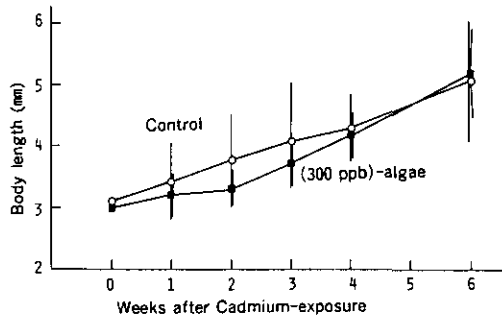


図15 300ppb の濃度で Cd を蓄積した付着藻 ($1,000\mu\text{gCd/g}$, 2 週の平均) を摂食したカゲロウの成長阻害

表4 カドミウムを蓄積した付着藻類を6週間摂食したカゲロウ中のCd濃度
付着藻中のCd濃度は図13のCd暴露停止後の濃度に一致

Cd-Algae	Cd Concentrations($\mu\text{g/g}$ dry wt) of <i>E. latifolium</i> fed Cd-Algae
Control	2.4 \pm 0.2 (n = 3)
3ppb-Algae	9.1 \pm 0.6 (n = 3)
10 ppb-Algae	19.2 \pm 14.8 (n = 3)
30 ppb-Algae	57.8 \pm 99.5 (n = 3)
100 ppb-Algae	106.7 \pm 18.0 (n = 3)
300 ppb-Algae	272.0 \pm 108.7 (n = 3)
Mean \pm S.D. (Sample No.)	

3) 銅 (Cu) の影響

体長4.5mm前後のカゲロウをCdと同様な方法により水路(水温12°C)内で1週間の順化期を置いた後3, 10, 30, 100, 300ppbのCuに暴露した。このときの材料は81年2月鬼怒川(水温12.5°C)にて採集したものである。CuはCdよりも急性毒性が高く、30ppbの場合では12個体の生存数は1週から3週後にかけて7, 4, 2個体に減少した。100ppb, 300ppbでは1週以内に全個体が死亡し、これらの区のCu-藻類は後述の食物連鎖による影響を調べる実験に用いた。一方、対照, 3 ppb, 10ppbのCuに暴露したカゲロウの成長曲線を図16に示す。成長率の平均値で比較しても対照と10ppbのCu暴露間に有意な差は認められなかった。また対照, 3 ppb, 10ppbにおける8週後までの生存数(幼虫), 死亡数, 羽化数の積算値は対照区では1, 0, 11個体, 3 ppb区では2, 2, 8個体, 100ppb区では0, 2, 10個体とCuの明らかな影響は認められなかった。またこの期間においてCuによる羽化の遅れも認められなかった。この結果Cuでは10ppbから30ppbの比較的狭い範囲で成長・羽化などに慢性的影響を及ぼす濃度があることが分かった。そのため5 ppbから25ppbまで5 ppbずつ増加したCu濃度で同様の実験を行った。用いたカゲロウは82年8月鬼怒川(水温23°C)から採集した。12°Cの水路で5日間の順化期を置いた後Cuに暴露した。この実験では夏期の材料を12°Cの水路に入れたためと考えられるが死亡率が全般に高かった。しかし25ppbのCuに暴露したカゲロウの死亡率のみが他のおよそ2倍と高く暴露2週で50%, 5週後では90%が死亡した。20ppb以下では対照との差は認められなかった。一方、成長曲線を図17に示すがCuの影響は15ppb以上で認められた。個体ごとに測定した成長率の平均値で比較すると10ppb以下では対照と有意な差は認められない。一方、15ppbと20ppbではCu暴露2, 3, 4, 6週後の成長率に対照と有意差が認められた。20ppbではCu暴露2週後から生長がほとんど抑制された。この実験からもCuが10ppb以下ではその影響が認められないが、15ppb-20ppb付近では成長に影響が認められ、羽化に至るまでの慢性影響をさらに検討する必要があると考えられる。

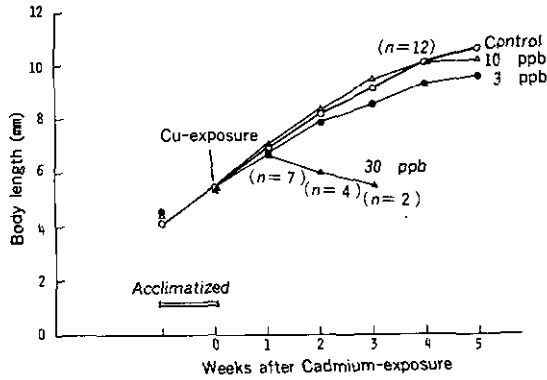


図16 モデル河川中で銅に暴露したカゲロウの成長曲線

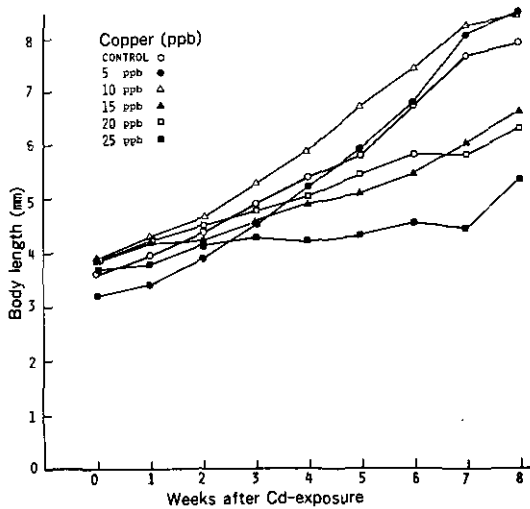
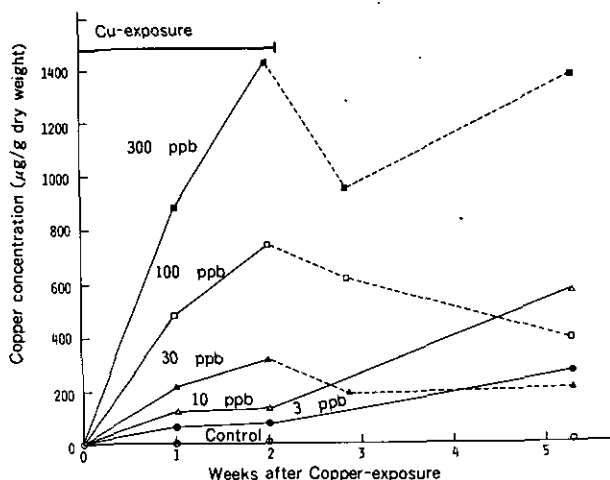


図17 モデル河川中で種々の濃度の銅に暴露したカゲロウの成長曲線

4) 食物連鎖モデルによる Cu の影響

銅は重金属汚染河川の付着藻中にも極めて高い濃度で含有されている³⁾¹¹⁾。そのため水生昆虫に及ぼす Cu の食物連鎖による影響を検討するため以下の実験を行った。前述の30ppb, 100ppb, 300 ppb の Cu を流した水路で Cu 暴露 2 週後に Cu の供給を停止した。水中の Cu 濃度は急速に減少し、翌日には対照区の0.45ppb とほぼ同じ値になった。Cu 暴露中及び Cu 供給停止後の藻類中の Cu 濃度は図18のように増減した。300ppb 区では Cu 暴露 2 週後に藻類中の Cu 濃度はおよそ1400 $\mu\text{g/g}$ に達し、暴露停止から 3 週間後まで変動があるが1000から1400 $\mu\text{g/g}$ の濃度範囲にあった。100ppb, 30ppb の場合も藻類の Cu 濃度は極めて緩慢に減少した。Cu の供給を停止した翌日に対照, 3 ppb, 10ppb 区の藻類をカゴに入れ、それぞれ30, 100, 300ppb 区に移し(対照区~10ppb 区の水路では

Cu 暴露を続けているため) Cu 藻類による影響を調べた。この時の藻類組成は *Navicula minima* が優先しており、次いで対照, 3, 10ppb 区では *Gomphonema parvulum*, 30から300ppb 区では *Nitschia frustulum* が多かった (表5)。一方 Cu の供給を停止して3週間後では対照区, 3 ppb 区では, *N. minima* の割合が減少し *G. parvulum* の割合が増えた。また30から300ppb の区では *Synedra rumpens* の割合が増加した (表5)。



03 図18 銅の暴露及び暴露停止後における付着藻中の Cu 濃度
破線部は暴露停止後の濃度変化。

表5 銅に連続暴露した人工水路における付着藻類の組成変化 (%)

Species	Cu-concentrations (ppb)					
	Control	3	10	30	100	300
<u>Exposure Time</u>						
<u>1 week</u>						
<i>Gomphonema parvulum</i>	38.4	36.0	12.0			
<i>Navicula minima</i>	61.4	64.0	88.0	95.1	88.6	89.9
<i>Nitschia frustulum</i>				2.4	7.6	6.7
<i>Synedra rumpens</i>				2.4	3.8	3.4
<u>3 weeks after stop of Cu-exposure</u>						
<i>G. parvulum</i>	51.2	66.0	8.3	1.0	+	
<i>N. minima</i>	45.1	21.7	89.7	74.2	78.4	77.1
<i>N. frustulum</i>			+	4.1	2.1	2.1
<i>S. rumpens</i>	3.7	12.4	2.1	20.6	19.6	20.8
						+, < 1%

このような付着藻を方法-(3)に従い、体長4.6mm前後のカゲロウ(83年3月鬼怒川採取、水温12℃)に摂食させ成長及び羽化に及ぼす影響を1週ごとに調べた。実験開始時からの藻類中のCu濃度は図18のピークからの減少部分に一致する。3 ppb, 10ppbの場合は測定していないが図13などから類推して72μg/g, 126μg/g(図18)から緩慢に減少して行ったものと考えられる。100 ppb 区のCu-藻類では成長にわずかの障害が認められ、300ppb 区の藻類では実験3週間後まで顕著な成長の障害が認められた(図19)。

個体ごとに測定した体長の増加(% per week)の平均値で見ても3 ppbと10ppb区のCu-藻類では実験期間を通じ対照と有意差は認められなかった。30ppb区以上のCu-藻類を摂食したカゲロウでは暴露1週間後から3週間後にかけて表6に示されるような成長の障害が認められた。Cu-藻類

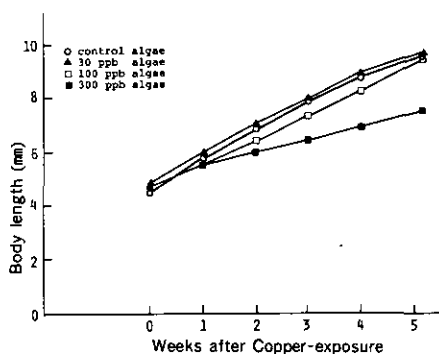


図19 銅を蓄積した付着藻を摂食したカゲロウの成長曲線
付着藻中の銅濃度は図18の破線部に一致する。

表6 銅を蓄積した付着藻を摂食したカゲロウの体長増加(% per week)
付着藻中のCu濃度は図18の破線部に示す(30, 100, 300ppb-Algae)。

Cu-Accumulated Algae	Weeks after Cu-exposure through the algae				
	1	2	3	4	5
Control	30.5±6.8 (12)	19.2±9.4 (12)	16.8±3.8 (11)	12.3±5.3 (11)	11.1±5.8 (8)
3 ppb-Algae	29.6±6.7 (12)	20.3±5.3 (8)	13.5±4.2 (8)	7.5±4.2 (8)	14.2±7.8 (6)
10ppb-Algae	26.4±4.9 (12)	21.9±5.3 (11)	14.1±5.3 (11)	9.2±3.4 (11)	6.3±4.0 (10)
30ppb-Algae	24.4±4.9* (12)	18.9±5.2 (12)	12.2±2.8* (12)	13.1±3.9 (12)	8.5±6.3 (12)
100ppb-Algae	21.4±6.4** (12)	16.0±4.3 (12)	14.3±3.3 (12)	13.0±4.0 (12)	17.7±7.9 (11)
300ppb-Algae	16.0±5.2** (12)	10.2±4.6** (12)	7.8±8.0** (11)	10.6±7.8 (10)	6.9±6.0 (10)

Mean±S.D. (n) * P<0.05, ** P<0.01 (t-test)

摂食 8 週間後までにおける死亡及び羽化の積算値を表 7 に示した。100 及び 300ppb 区の Cu-藻類を摂食したカゲロウではその影響が認められた。300ppb 区の藻類では成長が遅れ 4 個体が幼虫のまままでとどまった。また 100 及び 300ppb 区では死亡数が 4 個体となり他の区での 1 個体よりも多くなった。羽化数は対照では 10 個体となったが 300ppb 区の Cu-藻類を摂食したものでは 4 個体と半数以下である。人工石面上の付着藻はカゲロウにより端の方から根こそぎ摂食され、その跡が石の地はだとして白く残り、摂食された部分が明りょうに区別される傾向にあることが分かった。100 ppb, 300ppb 区の Cu-付着藻ではこの摂食の跡が著しく少なく、Cu の体内での直接的な阻害作用の他に、摂食量の減少も成長の抑制に関与していることが示された。

表 7 銅を蓄積した付着藻を 8 週間摂食したカゲロウ (12 個体) の死亡、幼虫、及び羽化個体の積算値
付着藻中の Cu 濃度は図 18 の破線部に示す。

Cu-accumulated Algae	Cumulative number			
	Died	Lost	Larvae	Emerged
Control-Algae	1	1	0	10
3ppb-Algae	1	5	0	6
10ppb-Algae	1	1	1	9
30ppb-Algae	0	0	1	11
100ppb-Algae	4	0	1	7
300ppb-Algae	4	0	4	4

4. 考 察

(1) 実験方法

循環式水路では水中の Cd 濃度は急速に減少し、1 日おきに約 30% の水を新たに調整した 0.1ppm の Cd-水で交換しても濃度の変動は大きかった。図 2 と水路を循環する水量 (320 l) から計算すると実験後の 1 週間以内では水中から 2 日間で約 6,000 μ g の Cd が消失する。また図 3 から付着藻 1 g (dry weight) 当たり 2 日間で約 50 μ g の Cd を蓄積した。したがって水中の Cd がすべて付着藻に蓄積したものと仮定すれば水路全体の藻量は約 120g と概算される。水路には 36 カゴ配置したが 1 カゴ中の石面付着藻は分析用のデータから約 200mg (dry wt.) であり、石面付着藻はおおよそ 7.2g と計算される。一方石面以外ではカゴの表面や水路の床面や側面にも付着藻が多量に発生してその量は石面上よりずっと多かった。そのため水中からの Cd 濃度の減少はその大部分が水路の付着藻類に蓄積したことによると考えられる。その他カゲロウへの蓄積、循環水路の配管系や壁面 (藻の発生しない部分) への吸着などがあるが、前者は質量の面からその量はわずかであり、

後者の量も藻類への蓄積に比べれば少ないものと考えられる。このため循環水路での流量(260 l/min)を持ちつつ一定のCd濃度を保つため循環水路に連続的にCd(10ppb)をかけ流した(7 l/min)。この方法により水路の換水率は32回/dとなり一定の濃度は保たれたが廃水量は1日約10tとなった。また循環式水路では1本の水路で1濃度の影響しか調べられなかった。そのため傾斜した水路をダム型に仕切って複数の濃度区を得た。水路の流量は冷水(12℃)の供給能力や排水量からの制限で7 l/minに限ったが、流量では循環式水路の約3%に減少し流速もほとんど止水状態になった。しかしカゲロウの生長速度の面から見ると流量、流速の減少による明らかな影響は認められなかった。ただし藻類のCd蓄積濃度に循環水路(図6)とかけ流し水路(図13)では4~5週目で約4.5倍の差があり、水温に2℃の差があるとしても流速が大きく関与していることが示された。流速が早ければ細胞の表面を常に新たなCd-水が移動することになりCdの蓄積が増大するものと考えられる。今回の実験ではあらかじめ球型の人工石上に充分量の付着藻類を発生させた段階からカゲロウを導入し重金属に暴露した。そのため比較的短期間では藻類の組成、光合成色素量に顕著な影響が認められなかったものと考えられる。人工石を水路に配置した直後から垂鉛を流した最近の実験では数100ppb以上の濃度で藻類の発生は著しく抑制された。一般にCdやCuはZnよりも毒性は高いので、最初から100ppb又は300ppbなどのCdやCuを流した場合は付着藻の発生量は著しく阻害されたものと考えられる。したがってカゲロウに対しCdやCuの直接的な影響の他に餌量の減少による間接的な影響も関与してくるものと考えられる。

(2) カドミウムの影響

流水式水路(12℃)における*E. latifolium*のLC-50値は7日後の場合およそ0.3ppm(図11)であった。一方ビーカー(500ml, 14℃)による亜急性毒性試験(通気による)では7日間のLC-50値は4.0(2.0~6.9, 95% C.L.) ppm(未発表)であり、暴露方法の違いにより約13倍の差があった。この差は流水式水路ではCd濃度がほぼ一定に保たれ、Cd-水は常にカゲロウの体表面上を移動すること、Cdを含有したえさを摂食したこと、両者でのCdの存在状態などによると考えられる。水温に2℃の差があるが、温度が高い方がむしろ毒性は高くなるので同じ温度ならLC-50の差はさらに大きくなるものと思われる。流水式水路で30ppbに暴露した場合成長は1週間後から著しく抑制された。今回の実験でその影響の有無が問題となるのは10ppbの濃度である。体長5~7 mmのカゲロウを用いた実験では10ppbのCdにより成長の阻害はほとんど認められなかった。しかし羽化期に近い材料を用いた場合は死亡率は高まり、羽化率にも阻害が認められるなど、カゲロウの生育段階によりCdに対する感受性に差があることが示された。しかし10ppbでは半数程度は羽化していることから、重金属汚染河川において10ppb前後のCdがこの種のカゲロウの生息を不可能にしているかどうかはむしろ疑問である。5ppbから30ppbの間でさらに長期の慢性影響を検討する必要があるものと考えられる。なお現在調査中の河川で汚染の強い地点では10ppb前後のCdは測定されている。ここでは*E. latifolium*は全く採集されず重金属耐性種のユスリカやカ

ゲロウなどが生息する。ところでこのような地点では Cu や Zn の濃度が Cd よりも Cu では一けた、Zn では二けた高く、Cu の実験や最近の Zn での実験結果から重金属汚染河川ではこれらの影響の方がより強いものと推測される。食物連鎖による影響試験で成長に明らかな影響が認められたのは付着藻中の Cd 濃度が 1300~700 (2 週間における変化) $\mu\text{g/g}$ の間であった。Cd-藻類に感受性が高かった体長 8 mm のカゲロウでも死亡率、羽化率に影響が認められたのは 500~200 $\mu\text{g/g}$ の間であった。200 $\mu\text{g/g}$ 以下のレベルでは生長、羽化に及ぼす影響は認められなかった。一方、我々の野外調査の結果では石面付着藻の Cd 濃度は最も高い場合でも 20 $\mu\text{g/g}$ 以下であった。石面付着物の灼熱減量は 80~90% を示し、そのほとんどは付着藻と藻類の遺がい、微生物などからなる有機物と考えられる。仮にしゃく熱後に残った 20% が Cd を溶出しなない鉱物としても、石面付着物中の有機物部分の Cd 濃度は乾重量が 0.8 倍になるので 1.25 倍になるにすぎない。食物連鎖による Cd の影響に関してこれまで数種類のモデル実験で検討してきた。被食者が藻類の場合に限るとミジンコ¹⁰⁾、止水性カゲロウ (*Cloeon* sp.)、ワムシ (*Brachionus urceolaris*)、ユスリカ (*Paratanytarsus parthenogeneticus*) などを捕食者として用いた。これらの実験でも藻類中の Cd 濃度が 200 $\mu\text{g/g}$ (dry weight) 以下ではその影響はほとんど認めることはできなかった。今回の結果とこれらの関連する結果からのみに限って推測すれば重金属河川においてカゲロウが食物連鎖により Cd の影響を受ける可能性は少ないものと考えられる。えさの面で言えば、重金属汚染河川では *Achnanthes minutissima* のような重金属耐性種が極めて高い優先度を示すなどその質的、量的な面での影響も検討を要するように考えられる。

(3) 銅の影響

今回の実験から 30 日間の実験期間では Cu は Cd よりも *E. latifolium* に対する毒性が高いことが示された。10ppb では成長や羽化に影響が認められず、30ppb では亜急性的致死濃度であることから、その間でのさらに長期の実験が必要と考えられた。現在調査中の重金属汚染河川では水中の Cu 濃度はむしろ 30ppb を超える場合が多い¹¹⁾。前述のようにこのような所では *E. latifolium* は生息していないが、今回の河川モデルの結果をそのまま適用する限りではこの種のカゲロウの生息を不可能にしている原因として水中の Cu だけでも十分な程である。

食物連鎖モデルの結果では付着藻類中の Cu 濃度が 1200 $\mu\text{g/g}$ 前後の場合カゲロウの生存率と成長速度に明らかな影響が認められた。一方、前記の調査において¹¹⁾ 石面付着物中の Cu 濃度は上流部の 5000 $\mu\text{g/g}$ 前後から下流部の 1000 $\mu\text{g/g}$ 台へと極めて高い値を示した。しゃく熱減量値は 80~90% であり、もし鉱物質部分から Cu が溶出していないと仮定すれば、有機物中の Cu 濃度はさらに高い値となろう。石面付着物中の Cu 濃度が高いことは渡辺・墨田⁹⁾、渡辺ら⁹⁾ などによっても報告されており、これらの報告でも Cd の濃度は二けた台で低かった。今回の実験結果から重金属汚染河川の水生昆虫は水中の Cu のみならず食物連鎖による Cu の影響を受けている可能性が示された。両者の影響の寄与であるが仮に水中の Cu が 10ppb 前後の所で石面付着物中の Cu 濃度が数 1000 $\mu\text{g/g}$

gの環境があるとすれば食物連鎖のみによるCuの影響も十分起こり得よう。石面付着物中で生物に摂食される有機物質のみの重金属濃度を正確に測定する必要があるように考えられる。

(4) 実験結果の適用

今回実験に用いたエルモンヒラタカゲロウ (*E. latifolium*) はモデル河川での実験系に好適な材料であった。伊藤¹²⁾は *Epeorus* (ヒラタカゲロウ属) を比較的無機汚染に弱い種類として挙げているが、水域によっては異なる傾向も認められるとしている。一方、渡辺・原田⁴⁾による市川の調査では *E. latifolium* は *Chironomidae* や *Baetis* sp. とともに鉱山廃水の影響の強い地点での優先種であった。井手・小島¹³⁾の報告でも *E. Latifolium* は重金属耐性種が優先する水域に出現する10種前後の中に入っている。また石崎・町田⁵⁾による佐須川の調査結果を見ても *E. latifolium* は *Baetis* と並び優先種であった。佐須川においては我々の調査でも *E. latifolium* が多数生息していることを見ている(未発表)。このように *E. latifolium* の重金属耐性については必ずしも評価が定まらないが、上記の報告などからむしろ耐性が強い部類に入るものと考えられる。今回のモデル河川で得られた実験結果を野外調査の結果¹¹⁾に濃度の面からそのまま適用する限りでは現在調査中の河川ではCuの影響は極めて高く、Cdのそれは低目であると言える。

一方、重金属の影響は水中における金属の存在状態に依存するとされている。河川水中の重金属は毒性の強いイオン状態の他にかなりの割合でフミン酸などの腐植酸、アミノ酸、ポリペプチド^{14,15)}、又は種々のサイズの浮遊物質に結合して存在するとされる¹⁶⁾。またpHや硬度の増加により炭酸塩、水酸化物としての割合が多くなる¹⁷⁾。重金属の毒性は有機物や浮遊物質に結合すると毒性が低下することが知られている¹⁸⁾。これらの他にも生物自体が銅と錯体を形成する物質を水中に産出することが報告されている^{19,20)}。

モデル河川に流した地下水のpHは常に高目でありpH 8附近であった。一方、かけ流し水路では水が1濃度区に滞留する時間は約5分程度と計算され、地下水にさらに有機物が混入する機会はほとんどないものと考えられる。これに対し重金属汚染河川では河川水は流下する途中で種々の物質が混入し、前述の非イオン状態になる機会が増大するものと考えられる。pHに関しては重金属汚染河川では中和作業が行われているとしても概して酸性又は弱酸性であった。このように重金属の毒性発現に対し、モデル河川と実際の河川ではそれぞれ正負の要因がある。モデル河川にCdを流した場合、附着藻中のCd濃度は極めて高くなったが、重金属汚染河川における附着物中の濃度は数10 μ g/g以下であった。このような差はCdの水中における存在状態の差に起因する面が大きいと考えられる。モデル河川と実際の河川での重金属の存在状態と重金属の毒性発現への影響を検討することが今後の重要課題であると考えられる。

これまで水銀以外では水生生物に対して最も毒性が高いとされるCdとCuについてその影響を調べてきた。一方、国内には約6,000箇所の休廃止鉱山があると推定されている(環境白書, 1975)²¹⁾。我々が現在調査しているごく限られた河川の調査結果を見てもCdやCuの他に亜鉛、鉛、鉄など

有害重金属の濃度は高い。今後は亜鉛や鉛などの影響試験、数種類の重金属による複合汚染の影響などもさらに検討する予定である。

5. まとめ

重金属が水生昆虫に及ぼす影響を解明する目的でカドミウム (Cd) と銅 (Cu) がカゲロウ (*Epeorus latifolium*) の成長及び羽化等に及ぼす影響をモデル河川による実験系で検討した。

(1) 方法

大流量と流速が必要な河川モデルとして循環一かけ流し式の併用水路が有効である。またかけ流し式水路ではダム状に水路を仕切ることにより 1 本の水路で複数の濃度区の実験が可能である。球型 (磁製) の人工石はカゲロウの生息環境としてのみならず、実験条件の均一化、藻類の定量採取、摂食状態の観察などモデル河川の底質として有効であった。

(2) Cd の影響

E. latifolium の成長は 30ppb の Cd により、暴露 1 週間後から著しく阻害された。10ppb では成長にほとんど影響が認められないが羽化期に近い材料では死亡率、羽化率に Cd の影響が見られた。食物連鎖モデルの実験から藻類中の Cd 濃度が $1,000\mu\text{g/g}$ (dry weight, 2 週間の平均) のレベルでは体長 3 mm のカゲロウの死亡率に影響が認められないが、成長には影響が認められた。しかし藻類中の Cd 濃度が $850\mu\text{g/g}$ (2 週間の平均) 以下の濃度区ではその影響は認められなかった。体長 8.5mm と 9.0mm のカゲロウでは Cd を含む藻類 ($500\text{--}200\mu\text{g/g}$) に対し前者の方が死亡率が高いなど感受性に成長段階により差があることが分かった。後者は羽化期に近いものである。

(3) Cu の影響

30ppb の Cu は *E. latifolium* に対し亜急性的致死濃度であり 15-20ppb でも成長を著しく阻害した。10ppb では成長、羽化期にその影響は認められなかった。食物連鎖モデルの実験から飼 (藻類) 中の Cu 濃度が $1,400\text{--}1,000\mu\text{g/g}$ の場合で生長の阻害が認められたが、これ以下の濃度区ではその影響が少なかった。

(4) 実験結果の適用

モデル河川の実験結果から Cd と Cu の毒性に顕著な差は認められず、亜急性的毒性は Cu の方がむしろ高目であった。一方、鉱山による重金属汚染河川では水中及び藻類中の濃度とも Cu の方が Cd よりも著しい高い場合が多い。これらの結果から鉱山による重金汚染河川では、Cd よりも Cu の方が水生昆虫に及ぼす影響が強いものと考察した。

引用文献

- 1) 御勢久右衛門(1960)：奈良県立里，川股西鉦山および和歌山県飯盛鉦山の廃水の河川生物におよぼす影響。日本生態学会誌，10，38-45.
- 2) 町田吉彦・石崎修造(1975)：長崎県内河川の底生動物相。(1)冬期の対馬佐須川と瀬川について。陸水学雑誌，36，122-130.
- 3) 渡辺仁治・墨田迪彰(1976)：梯川水系の川床付着物による重金属の濃縮と生物相。日水処理生物誌，12，65-72.
- 4) 渡辺直・原田三郎(1976)：鉦山廃水流入河川一市川一における底生動物相の回復について。兵庫県公害研究所研究報告，8，20-25.
- 5) 石崎修造・町田吉彦(1980)：長崎県内河川の底生動物相。(4)夏期の対馬佐須川と瀬川について。陸水学雑誌，41，19-23.
- 6) Letterman, R. D. and W. J. Mitsch (1978) : Impact of mine drainage on a mountain stream in Pennsylvania. Environ. Pollut., 17, 53-73.
- 7) Winner, R. W., M. W. Boesel and M. P. Farrell (1980) : Insect community structures as an index of heavy-metal pollution in lotic ecosystems. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37, 647-655.
- 8) Peckarsky, B. L. and K. Z. Cook (1981) : Effect of Keystone mine effluent on colonization of stream benthos. Ent. Soc. Amer., 10, 864-871.
- 9) 渡辺仁治・墨田迪彰・大柳実喜子・岩切未枝保(1977)：鉦山閉山後における梯川水系の生物相の変化と川床付着物。生物による重金属の濃縮。淡水生物，20，44-56.
- 10) Hatakeyama, S. and M. Yasuno (1981) : The effects of Cadmium accumulated *Chlorella* on the reproduction of *Moina macrocopa* (Cladocera). Ecotoxi. Environ. Safet., 5, 341-350.
- 11) 島山成久・安野正之・菅谷芳雄・佐竹潔・横山宣雄・福島悟(1983)：重金属汚染河川の生態影響調査(山形県3河川) I。環境及び生物試料中の重金属濃度。日本陸水学会・講演要旨集，p. 125.
- 12) 伊藤猛夫(1975)：無機汚染の生物指標。環境と生物指標2(日本生態学会環境問題専門委員会編)，13-39.
- 13) 井出嘉雄・小島力(1978)：河川水質汚濁回復力の研究。特に渡良瀬川の鉦毒水回復力の研究。用水と廃水，20，65-73.
- 14) Stiff, M. J. (1971) : The chemical states of copper in polluted fresh water and a scheme of analysis to differentiate them. Water Res., 5, 585-599.
- 15) Fogg, C. E. and D. F. Westlake (1955) : The importance of extracellular products of algae in freshwater. Proc. Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol., 12, 219-232.
- 16) Gibbs, R. J. (1973) : Mechanism of trace metal transport in rivers. Sci., 180, 71-73.
- 17) Patterson, J. W., H. E. Allen. and J. J. Scala (1977) : Carbonate precipitation for heavy metals pollutants. J. Wat. pollut. Cont. Fed., 49, 2397-2410.
- 18) Zitko, P., W. V. Carson. and W. G. Carson (1973) : Prediction of incipient lethal levels of copper to juvenile Atlantic salmon in the presence of humic acid by cupric electrode. Bull. Environ. Cont. Toxicol., 10, 265-271.
- 19) McKnight, D. M. and F. M. M. Morel (1979) : Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. Limnol. Oceanogr., 24, 823-837
- 20) Fish, W. and F. M. M. Morel (1983) : Characterization of organic copper-complexing agents released by *Daphnia magna*. Can J. Fish. Aquat. Sci., 40, 1270-1277.
- 21) 環境庁(1975)：環境白書。p. 481-482.

グッピーの成長及び産仔に及ぼす食物連鎖によるカドミウムの影響

畠山 成久¹

Accumulation and Chronic Effects of Cadmium on the Guppy (*Poecilia Reticulata*) Fed the Cadmium-Accumulated Midge Larvae (*Chironomus yoshimatsui*)

Shigehisa HATAKEYAMA¹

Abstract

Chronic effects of cadmium (Cd) on the growth and reproduction of the guppy (*Poecilia reticulata*) were studied using a food chain model composed of the midge (*Chironomus yoshimatsui*) larvae as a prey and guppies as a predator. The transfer rate of Cd from the Cd-dosed midge to guppy was between 0.5 to 1.0 per cent during the 30 days experiment. Growth rate of guppies fed the midge larvae dosed about 270 μg Cd/g (dry weight) for 30 days did not differ from that of control guppies. Cumulative numbers of fry produced by the adult guppies fed the midge larvae containing 210 ± 70 μg Cd/g for two months decreased about 80 per cent of the control. The percentage of premature parturition among those adults did not increase, and fry produced were all healthy.

Guppies had been fed the Cd-dosed midge larvae from young stage (age ; one month, body length ; 9.5mm) for seven months. Cumulative numbers of fry produced by the guppies fed the midge larvae dosed 500, 800 and 1,300 μg Cd/g for six months decreased to 79, 65 and 55 per cent of control, respectively. The effect of Cd on the reproduction of guppies fed the 500 μg Cd/g-dosed midge for seven months was equivalent to that of guppies exposed to 20 μg Cd/litre for the same duration. Cd of the guppy was highly concentrated in some organs such as intestine, liver and kidney when fed the Cd-dosed midge, indicating that such Cd-accumulation in the guppy was brought on mainly through the food, Cd-dosed midge larvae.

Mortality of the female guppies fed the larvae containing 1,300 μg Cd/g increased abruptly from sixth month after the experiment, whereas no male guppies died during the experiment.

1. 国立公害研究所 生物環境部千305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Environmental Biology Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1. はじめに

生物は食物連鎖によっても有害汚染物質を体内に蓄積しその影響を受けることは一般的に認められているところである。特に水生生物生態系では被食者もその捕食者も同一の汚染環境に生息している場合が多く、種々の水生生物は水中のみならず食物連鎖系によっても有害汚染物質を体内に蓄積し、その影響を受ける機会が大きいものと考えられる。

魚類は水界の食物連鎖系ではほぼ最上位にあり、各種の水生生物を餌として用いている。そのため食物連鎖による有害汚染物質の影響を検討することは重要である。従来、急性影響試験の場合は言うまでもなく、慢性影響試験でも有害汚染物質は通常水中に直接添加して行われてきた。カドミウム(以下 Cd とする)は生物に対し蓄積性が高い上、水銀や銅とともに水生生物にとって最も有害な重金属の一つである。そのため従来から各種の水生生物に対し、その影響が種々の面から検討されてきた。魚に対して餌中の Cd の影響を検討したものにコイやマダイを用いた小山・板沢らの一連の報告がある¹⁻⁴⁾。一方、Kumada ら⁵⁾もニジマスについて水中の Cd と餌中の Cd の蓄積性の違いを調べ、器官により暴露停止後の Cd 消失速度が異なることを報告している。また、Williams と Giesy⁶⁾は食物連鎖による Cd の蓄積性は低いものとしているが、このときの餌中の Cd 濃度は 1.13 $\mu\text{g/g}$ と比較的低いものであった。これら三者の報告ではいずれの場合も Cd を魚の人工飼料に染み込ませて実験に用いている。人工飼料では Cd を含んだ餌の調整は比較的容易なものと考えられ、餌中の Cd 濃度を任意に高めることができるであろう。しかし餌中の Cd の存在状態が生餌の場合とでは異なること、人工飼料は水中で崩壊し易く餌からの Cd の溶出が起こり、Cd の経口摂取量を正確に求め難いなど実験上難点が多いものと考えられる。

著者ら⁷⁾はタマミジンコ (*Moina macrocopa*) に Cd を 3 段階の濃度で蓄積させグッピーに対する Cd の食物連鎖による蓄積と成長に及ぼす影響について既に報告した。これは動物プランクトンは魚の餌として重要であるばかりでなく、無せきつい動物の場合でも Cd はメタロチオネインと同様の重金属結合タンパクに結合して存在していること⁸⁻¹³⁾などによった。さらにミジンコは魚により摂食されるまで生存していることから人工飼料などのように水中での崩壊がなく摂食量が算定し易く、ひいては餌に由来する Cd の取り込み量が求めやすいことなどにもよった。しかしミジンコの Cd 感受性は極めて高いため¹⁴⁻¹⁵⁾ミジンコ中の Cd 濃度を高めるのに制限があり、1 か月の実験期間中ではグッピーの成長に慢性的な成長阻害を引き起こすことはできなかった。

今回の研究は被食者として重金属に耐性を有するユスリカの幼虫を用い、Cd 濃度をさらに高め、かつ実験期間を延長することにより食物連鎖による Cd の生物濃縮と魚(グッピー)の成長、産仔に及ぼす慢性的影響を検討したものである。被食者としてユスリカ (*Chironomus yoshimatsui*) の 3~4 令幼虫を用いた。ユスリカは種々の環境汚染物質にも耐性があり¹⁶⁻¹⁹⁾、その現存量も豊富な上、実際に湖沼などで魚のよい餌となっている。またユスリカは重金属に耐性が高く、Cd を高濃度で蓄積させることが可能であり、体重がミジンコより大きいため給餌量を幼虫の匹数により調整できるなど食物連鎖による有害汚染物質の影響を調べるのに最適な被食者であると考えら

れた。本実験ではさらに水中に添加した Cd の慢性影響を調べ、これと食物連鎖による影響の結果を対比し、食物連鎖による慢性影響の特徴、汚染環境における水と餌由来の Cd の影響の度合などにつき検討を行った。

2. 材料と方法

(1) 被食者：ユスリカ (*Chironomus yoshimatsui*)

必要量のユスリカを毎日実験に供給するため下記の方法によった。ユスリカの受精卵(塊)を得るため恒温室 (25℃, 12L-12D) に採卵ケージ (0.7m×0.7m×1.2m) を設置した。この中に置いた二つの水槽 (47cm×28cm×11cm) に池の底泥と地下水を入れた。餌としては乾燥酵母 (商品名, エビオス) と微量のテトラミン (Tetramin-E) を加え、通気をしてユスリカを産卵させ継代飼育した。1 卵塊は通常約600個の受精卵からなるが上記と同じ飼育用の水槽に 3 卵塊を入れ、下記の条件で10日前後飼育することにより、3～4 齢のユスリカ幼虫を得た。飼育水として地下水 (pH8.0, 硬度 約60 as CaCO₃), 底質としてはガラスビーズ (φ 約200μm) を用いた。飼育環境と餌、通気に関しては上記の継代飼育の場合と同様である。ガラスビーズは半透明であるためユスリカ (赤色) の生育状態が確認し易く、幼虫の採取にも適当な底質であった。

(2) 捕食者：グッピー (*Poecilia reticulata*)

当研究所の水生生物実験棟で継代飼育している黄色系のグッピーを用いた。通常22～25℃の地下水で魚用人工飼料により継代飼育を行っている。

(3) 食物連鎖によるカドミウムの移行

前述の4 齢ユスリカを約500匹ずつ数え、それぞれ1, 2, 10ppm の Cd (CdCl₂にて調整) を含む水中で24時間暴露した。水として人工軟水²⁰⁾ 4 l を用い、23±1℃で通気を行った。24時間後ユスリカをネットに採取し流水で十分にすすぎ、体表の Cd を除去して毎日決まった匹数をグッピーに給餌した。以下これらのユスリカをそれぞれ 1 ppm Cd-ユスリカ, 2 ppm-Cd ユスリカ, 10ppm Cd-ユスリカと略記する。ユスリカの Cd 濃度は各濃度区から毎日30匹ずつ分取し、後記の方法で分析した。ガラス製の円筒 (φ 8 cm, 高さ14cm) の底に網 (網目0.4×0.4mm²) を張り、調温水をかけ流し (1 l/min) している水槽に36個並べた。実験にはこのような水槽をもう一槽用いた。円筒の底面を水槽の底から約 4 cm の位置に上げ、円筒内の水が常に入れ替わるよう配慮した。各々の円筒内にはグッピー (体重 170±14mg, n=40) を 1 個体ずつ入れ、毎日20匹ずつの Cd-ユスリカを給餌した。食べ残しがあった場合はその数を記録して除去した。実験10日, 20日, 30日後に各濃度区から 6 個体ずつのグッピーを取り出し 5～7 日の絶食期間を置いた後個別に Cd の分析に供した。他の残存グッピーについても 1 週ごとに体重を測定し、Cd-ユスリカ摂食が生長に及ぼす影響を調べた。

ユスリカの Cd 濃度とその摂食量 (匹数) を毎日測定し、グッピーが経口摂取した Cd の積算値を求めた。この値とグッピー中の Cd 量 (10, 20, 30 日後に測定) の比を食物連鎖による Cd の転移率⁷⁾として求めた。

(4) グッピーの産仔に及ぼす食物連鎖によるカドミウムの影響

産仔中のグッピーに及ぼす食物連鎖による Cd の影響を検討し、そのときの各臓器ごとの Cd 濃度を調べるため以下の実験を行った。60 l (30cm×60cm×35cm) の水槽内に産仔カゴ²¹⁾ (17cm×50cm×17cm, アミ目 3×3 mm²) を置き、この中に雄, 雌 9 匹ずつのグッピーの成魚を入れた。雌のグッピーはあらかじめ個別に飼育し、初産の正常なものから順に四つの水槽にプールしたものである。これらのグッピーに魚の人工飼料を給餌してあらかじめ 4 か月間産仔数を調べた。その後 5 ppm で 24 時間 Cd を蓄積させたユスリカ (以下 Cd-ユスリカ) を 2 か月間、1 水槽当たり毎日 3 g (湿重) 前後給餌し (対照に対し毎日湿重を同一にした) 産仔に及ぼす影響を調べた。このときのユスリカの Cd 濃度は 210±70 μg/g である。各水槽には連続して一定流量 (0.7 l/min) の調温水 (24±1 °C, 地下水) をかけ流した。No. 1 と No. 2 の水槽には対照—ユスリカを、No. 3 と No. 4 の水槽には Cd-ユスリカを給餌した。ただし No. 2 の水には No. 3 の水槽からオーバーフローした水を用いた。これは微量であるとしても、ユスリカや魚の排せつ物から水中に溶出する Cd の影響及びグッピーへの蓄積を検討するためである。実験期間中ユスリカの食べ残しはほとんど認められなかった。実験終了時に雌では各臓器ごとの Cd 濃度を雄では個体ごとに Cd 濃度を分析した。この場合、Gonad (卵巣) と Muscle 以外は少量なので 5 個体分をプールして分析に供した。他の 4 個体は暴露を停止して 40 日後に分析に用いた。

(5) 食物連鎖によるカドミウムの慢性影響

生後 1 か月のグッピーの稚魚 (体重 18.3±2.1 mg, 体長 9.5±0.4 mm, n=10) に Cd-ユスリカを 7 か月間毎日給餌し、成長、産仔、生存率に及ぼす食物連鎖による Cd の影響を検討した。4 齢ユスリカをそれぞれ 40, 80, 160 ppm の Cd を添加した人工軟水中で 24 時間 Cd を蓄積させた。グッピーは 60 l の流水式水槽 (0.7 l/min) に 25 個体ずつ入れた。Cd-ユスリカの給餌量は 1 日当たり 1.22±0.25 mg (湿重) と日によって変化はあったが 4 水槽当たり毎日同一量にそろえた。雌雄の判別がついた段階 (Cd-ユスリカ給餌 49 日後) で各水槽当たり雄雌、7 匹ずつとした。産仔開始時からは前述の産仔カゴ²¹⁾ に入れ、産仔数を毎日記録した。実験の後期には各水槽からオーバーフローする排水中で、生後 3 日目のグッピーを 80 日間飼育し、Cd-ユスリカや魚の排せつ物などから水中に溶出すると考えられる Cd の蓄積を同時に調べた。実験の終了時と Cd-ユスリカの給餌を停止して 40 日後に雌のグッピーでは各器官ごとの Cd を、雄では個体ごとに Cd の濃度を分析した。

(6) 水中に添加した Cd の影響

食物連鎖による Cd の影響と水中に添加した Cd による影響の差を検討するため以下の実験を行った。60 l の水槽に生後60日のグッピーを50個体ずつ入れ、2.5, 5, 10, 20ppb の Cd を含む飼育水に連続して暴露した。Cd の濃度と水質の保持のため毎日40 l の水の半分を排出し、新鮮な地下水 (20 l, 25°C) を入れ、飼育水が所定の濃度になるよう Cd の高濃度溶液を添加した。実験期間中は通気を行い、えさとして魚用の人工餌料を毎日 1 回食べ残しがない程度に与えた。

産仔開始時からは雌雄とも10個体ずつとし、産仔カゴに入れて、産仔数、早産、死産数を Cd 暴露 1 年後まで調べた。Cd 暴露 1 年後と、Cd 暴露終了 4 か月後に雌では各臓器ごとの Cd 濃度、雄では個体ごとの Cd 濃度を分析した。

(7) Cd の分析

生物試料 (ユスリカの幼虫, グッピー) を純水 (Milli-Q 水) で十分洗った後、100°C で 2 日間乾燥し乾重量を得た。その後重金属分析用の硝酸と過塩素酸 (和光, 有害金属測定用) で湿式分解し、純水 (Milli-Q 水) で希釈した後、フレイム (島津 AA-640-12型) 又はフレイムレス偏光ゼーマン (日立180-80型) 原子吸光光度計で分析した。ユスリカの場合は30~50匹を 1 サンプルとし、グッピーの雄では 1 個体、雌では Gonad, Liver, Muscle など比較的質量のある器官は 1 個体分を腎などの少量の臓器は 2~3 個体分を 1 サンプルとして分析した。すべてのデータは乾重量当たりの濃度で表した ($\mu\text{g/g dry weight}$)。

3. 結果

(1) 食物連鎖による Cd の移行

表 1 にユスリカ (*Chironomus yoshimatsui*) に対する重金属の急性毒性試験の結果を示した。ユスリカは重金属に耐性があることは多くの河川調査²²⁻²³⁾や湖沼の調査¹⁶⁾からも示されているが、ここでもそれは明らかであり、タマミジンコで著者が得た結果¹⁵⁾と比較すると Cd に対し 48h-LC50 値で約 3,000 倍の耐性があることが示された。

1 ppm, 2 ppm, 10ppm の Cd を添加した人工軟水に 24 時間暴露したユスリカ幼虫の Cd 濃度を表 2 に示した。1 ppm, 2 ppm, 10ppm における Cd 濃縮係数はそれぞれ約 129, 88, 27 と高いものではないが Cd の処理濃度が高いことから 10ppm ではおよそ $270\mu\text{g/g (dry wt)}$ の Cd を蓄積した。このようなユスリカを 1 日当たり 20 匹ずつ給餌したグッピーの Cd 濃度を図 1 に示した。1 ppm と 2 ppm Cd-ユスリカの場合その差は顕著でないが、10ppm Cd-ユスリカを給餌したグッピーでは 30 日後にほぼ $4\mu\text{g/g}$ の Cd 濃度に達した。一方、10ppm Cd-ユスリカを給餌した同じ水槽内でネットで仕切ることにより対照のユスリカを 30 日間給餌したグッピー中の Cd 濃度は、 $0.07 \pm 0.05\mu\text{g/g}$ ($n = 6$) と低い値であり図 1 の Cd 蓄積はほとんど Cd-ユスリカの摂取によってもたらされたものと見なし得る。またいずれの濃度区でも 30 日後ではまだ平衡に達しなかった。Cd-ユ

スリカの摂取によるグッピーへのCdの転移率を表3に示した。1 ppmと2 ppm-Cdユスリカの場合が0.5%前後、10ppm Cd-ユスリカの場合で、0.9%台といずれも低く、実験期間による差もほとんど認められなかった。すなわち、Cd-ユスリカを摂取することによりグッピーの体内に取り込まれたCdの全量は、実験期間を通じ1%弱しか魚体中に残存していなかった。表4は10ppm Cd-ユスリカ(表2)を30日間給餌したグッピーの体重を10日ごとに測定し食物連鎖によるCdの成

表1 ユスリカ(*Chironomus yoshimatsui*)に対する重金属の48時間-半数致死濃度(ppm)

タマジシンコでの値と比較した。

Metals	(A)	(B)	(A)/(B)
	<i>Chironomus yoshimatsui</i>	<i>Moina macrocopa</i>	
HgCl ₂	1.4	0.0017	824
CuSO ₄	2.7		
CuCl ₂	5.8	0.047	123
Al ₂ (SO ₄) ₃	133.2		
CdCl ₂	212.6	0.071	2994
ZnSO ₄	468.9		
ZnCl ₂		1.2	
FeSO ₄	1216.1		
MnCl ₂	1021.2	23.7	43
Pb(NO ₃)	1228.1		
PbCl ₂		0.43	
KMnO ₄	0.8		
K ₂ CrO ₇	7.6	0.74	10

表2 カドミウムに24時間暴露したユスリカ幼虫のカドミウム濃度
カドミウムは人工軟水に添加した。

Cadmium concentrations of midge larvae exposed to Cd-solution for 24 hours. ($\mu\text{g/g}$ -dry weight, Mean \pm S. D.)	
Control	0.43 \pm 0.41 (n = 8)
1 ppm	129.3 \pm 48.3 (n = 21)
2 ppm	176.3 \pm 65.0 (n = 21)
10 ppm	274.0 \pm 75.9 (n = 8)

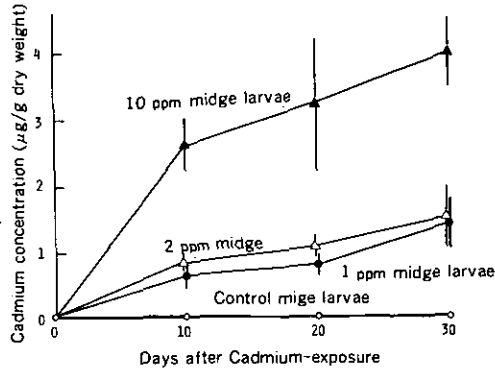


図1 カドミウムを蓄積したユスリカを30日間給餌したグッピーのカドミウム濃度 (Mean±S. D. n=3~6)

ユスリカのカドミウム濃度は表2に示す。

表3 食物連鎖モデルにおけるユスリカからグッピーへのカドミウムの転移率
ユスリカのCd濃度は表2に示す。

	Days after Cd-exposure through midge larvae		
	10	20	30
1 ppm	0.50±0.21	0.52±0.08	0.56±0.17
2 ppm	0.52±0.15	0.40±0.08	0.44±0.15
10 ppm	0.98±0.15	0.85±0.27	0.98±0.15

$$\text{Transfer rate} = \frac{\text{Cd}(\mu\text{g}) \text{ in fish body}}{\text{Cd}(\mu\text{g}) \text{ uptaken by guppy through midge larvae}} \times 100$$

表4 カドミウムを蓄積したユスリカを給餌したグッピーの体重増加(%)
ユスリカのカドミウム濃度は274±76µg/g (dry wt.)。

Days after Camium Exposure	Control midge larvae	Cd-dosed midge larvae	t-test
5	16.1± 3.5 (n=20)	20.3± 5.0 (n=20)	P<0.01
10	38.3± 5.9 (n=20)	47.9± 7.1 (n=20)	P<0.05
20	85.9± 12.7 (n=14)	94.4± 12.2 (n=14)	P>0.05
30	164.9± 18.8 (n=10)	181.3± 32.5 (n=8)	P>0.2

長に及ぼす影響を調べたものである。30日の実験期間内ではCd-ユスリカ摂取による成長の阻害は全く認められず、実験5日後、10日後ではむしろCd-ユスリカを給餌したグッピーの方が体重の増加が大きく30日後の体重はおよそ2.8倍となった。

(2) 産仔中のグッピーに対する食物連鎖によるCdの影響

初産の正常な9個体の雌と、同数の雄からなる四つの水槽であらかじめ4か月間産仔数を調べた(表5)。その後5 ppm, 24時間処理により $210 \pm 70 \mu\text{g/g}$ ($n=16$)のCdを蓄積させたユスリカを毎日給餌し産仔数に及ぼす影響を調べた。グッピーはほぼ1か月周期で産仔を行うので表5

表5 食物(Cd-ユスリカ, $210 \pm 70 \mu\text{g Cd/g}$)をとおしたカドミウムがグッピー成魚の産仔に及ぼす影響

Exposure		Pre-Exposure				Cd-Exposure	
		1 st Month	2 nd Month	3 rd Month	4 th Month	1 st Month	2 nd Month
No.1 Control	Live fry	16.9	10.4	14.0	10.4	21.7	39.2
	Dead fry	0.9	0.6	0.3	0.3	0.4	0.2
	Eyed embryo	0.2	0.5	0	0.1	0.1	0
	undeveloped embryo	0.1	0.2	0	0	1.0	0
	Total	18.1	11.7	14.3	10.8	23.2	29.4
No.2 Waste water from No.3	Live fry	14.9	12.7	16.7	8.0	7.0	22.8
	Dead fry	0.5	0.7	0.9	0.3	0.3	0.2
	Eyed embryo	0.2	0.1	0.4	0.3	0	0
	Undeveloped embryo	0	0	0.1	0.6	1.8	1.0
	Total	15.6	13.5	18.1	9.2	9.1	24.0
No.3 Cd-accumulated midge larvae	Live fry	17.8	9.3	10.6	6.0	16.9	25.6
	Dead fry	0.6	0.9	0.8	0.2	0.9	0
	Eyed embryo	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1
	Undeveloped embryo	0	0	0	0.1	1.8	1.7
	Total	18.5	10.3	11.7	6.5	19.7	27.4
No.4 Cd-accumulated midge larvae	Live fry	20.6	12.6	10.2	11.4	25.8	27.3
	Dead fry	1.9	0.8	0.3	0.3	0.1	0
	Eyed embryo	0.9	0.2	0	0.3	0.2	0
	Undeveloped embryo	0.5	1.3	1.5	1.3	4.3	0
	Total	23.9	14.9	12.0	13.3	30.4	27.3

Numericals indicate numbers per female per month.

には雌1個体当たりの月間平均産仔数を示した。Cd-ユスリカ給餌前の4か月間の月間産仔数は水槽・1から水槽・4にかけ 12.9 ± 3.2 , 13.1 ± 3.8 , 10.9 ± 5.0 , 13.7 ± 4.7 (Mean \pm S. D., $n=4$) と水槽・3でやや少な目だが有意差は認められなかった。Cd-ユスリカ給餌後の月間産仔数を対照と比較すると最初の1か月間では対照の77.9% (No. 3), 118.9% (No. 4), 2か月目ではそれぞれ65.3%, と69.6%となり, 減少する傾向が認められた。No. 2の水槽は対照のユスリカを給餌したが水はNo. 3からオーバーフロー (0.7l/min) したものをを用いた。産仔数は1か月目で著しく少なく, 2か月目でも低目である。この原因については, No. 3水槽からの老廃物による影響, 個体差が積み重なったことなど考えられるが明らかではない。いずれにしても後述するようにNo. 3水槽内の排せつ物やユスリカなどから水中に溶出したCdの影響ではないものと考えられる。グッピーの産仔に及ぼす影響を有機リン系殺虫剤について調べた結果²¹⁾では胚又は発眼卵の段階での早産の割合が著しかったが, Cd-ユスリカではそのような傾向は認められなかった。Cd-ユスリカを2か月給餌した実験の終了時に雌のグッピーの諸器官のCd濃度を調べた(表6)。対照のユスリカを給餌した場合には各器官のCd濃度は $0.47 \mu\text{g/g}$ 以下であった。一方, Cd-ユスリカを給餌したグッピーではGill, Intestine, Liver, KidneyなどのCd濃度はそれぞれおよそ4.0, 13.0, 33.1, $42 \mu\text{g/g}$ に高まった (No. 3とNo. 4の平均)。No. 3水槽からの排水中で対照ユスリカを給餌したがグッピー (No. 2) では対照と比較し, Gill, Liverなどで約4倍の濃度となった。しかし, Cd-ユスリカ給餌ではLiverのCd濃度は対照の約90倍になりこれらのCd蓄積はほとんどCd-ユスリカを摂食したことによると見なされた。

表6 食物(Cd-ユスリカ)をとおしてカドミウムに2か月間暴露したグッピー(雌, 成魚) 諸器官のカドミウム濃度($\mu\text{g/g}$ dry weight)

Organs	Aquarium No.			
	No. 1 Control	No. 2 Waste water from No. 3	No. 3 Cd-accumulated midge larvae	No. 4 Cd-accumulated midge larvae
Gill	0.41	1.92	3.95 (2.70)	4.02 (2.73)
Intestine	0.16	0.37	15.74 (19.01)	10.22 (10.14)
Liver	0.37	1.47	30.28 (63.64)	35.88 (74.55)
Kidney	0.47	0.72	34.30 (75.92)	51.55 (62.56)
Gonad	0.06	0.05	0.10 (0.60)	0.22 (1.30)
Muscle	0.03	0.02	0.16 (0.75)	0.22 (0.60)

Values in parentheses are those of Guppies reared in Cd-free condition for 40 days after the end of Cd-exposure.

Cd-ユスリカの給餌を停止後 Cd を含まない水と餌で40日間飼育したグッピーの Cd 濃度は Gill で約68%に減少したが Intestine ではほとんど変化せず, Liver, Kidney ではむしろ Cd 暴露停止時の約2倍, Gonad, Muscle でも数倍の値を示した(表6)。一方, 雄のグッピーでは消化管内に残存する Cd-ユスリカの影響を少なくするため Cd-ユスリカの給餌を停止後7日間絶食させて分析した。対照のグッピーの Cd 濃度は $0.02\mu\text{g/g}$ であるが, Cd-ユスリカ給餌のものでは約 $2.5\mu\text{g/g}$ となった。また Cd-ユスリカ水槽からの水で対照ユスリカを給餌したものでは $0.28\mu\text{g/g}$ となり, 水中に溶出した Cd による蓄積の寄与はおよそ全蓄積量の10%程度と見なされた。このように水からの Cd の蓄積は少ないものであり, 前記の No.2 水槽(表5)の産仔数の低下は Cd 以外の要因によるものと考えられる。

(3) 食物連鎖による Cd の慢性的影響

40ppm, 80ppm, 及び160ppm のカドミウムに24時間暴露したユスリカの Cd 濃度を図2に示した。ユスリカはほぼ Cd の処理濃度に比例し40ppm, 80ppm, 160ppm でそれぞれ500, 800, 1300 $\mu\text{g/g}$ 前後の Cd を蓄積した。このようなユスリカを流水式の水槽に入れた生後1か月で25個体のグッピーに毎日給餌した。図2の破線部は24時間後の食べ残しユスリカを採集してプールしたものの Cd 濃度であるが1/2 ~ 1/3 に減少していた。しかし大部分のユスリカは給餌直後から数時間以内に捕食されるのでほぼ実線部に近い Cd 濃度のユスリカを捕食したものと見なされる。ユスリカに高濃度の Cd を蓄積させることによるえさの質的变化を検討するため Cd-ユスリカの C-N 比を求めた(表7)。Cd の処理濃度とともに窒素の割合がわずかに減少しているが対照との間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

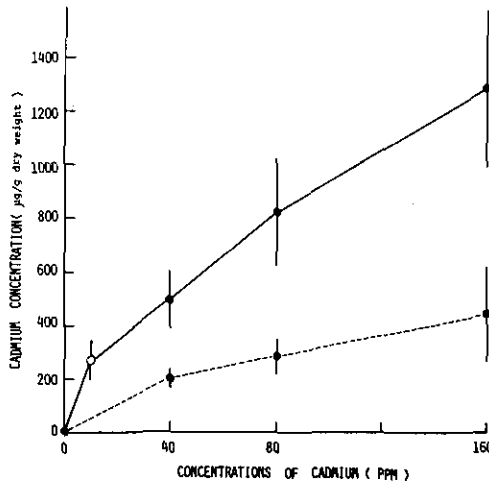


図2 カドミウムに24時間暴露したユスリカ中のカドミウム濃度
破線部は浄水に戻し, 24時間後の濃度を示す (Mean±S. D.)。

Cd-ユスリカを給餌して20日後に全個体のグッピーの体重を測定したが測定値に濃度間の有意差は認められなかった。ただし雌雄の個体数に表8の48日後に示されるような差があり160ppm Cd-ユスリカ区では対照に比し雌の割合が多かった(表8)。25個体の内から3個体ずつを分析に供したが、160ppm Cd-ユスリカを給餌したグッピーでは既に約17 μ g/gのCdを蓄積していた(表9)。Cd-ユスリカを給餌して45日前後から全個体の雌雄の判別が可能となったが、48日後に雌雄別に全個の体重を測定した(表8)。雄ではユスリカのCd濃度による体重の差は認められず実験時の18.3mgからそれぞれ210mg前後に成長した。一方、雌ではCd-ユスリカによる成長の阻害が顕著であり対照では410mg前後になったが160ppm Cd-ユスリカ区では280mg前後にとどまった。死亡は実験35日後に160ppm Cd-ユスリカ区で1個体起こった。実験49日後からは雌雄とも7個体ずつにそろえ以後の産仔に及ぼす影響を調べた。

実験21日後から40日後にかけ6回、食べ残しユスリカを全部回収し、給餌量との差から1日当たりの摂食量を求めた。対照から160ppm Cd-ユスリカ区まで 0.96 ± 0.23 , 1.03 ± 0.20 , 0.82 ± 0.24 , 0.80 ± 0.28 mg/22個体/d($n=6$)と対照と40ppm Cd-ユスリカ区では差が認められないが80ppm,

表7 Cd暴露(24時間)ユスリカ幼虫のC/N比, 乾/温度(%)及び乾重
ユスリカ中のCd濃度は図2に示す。

Cd-dosed Larvae	C/N Ratio	Dry wt / Wet wt (%)	Body wt/Indiv (μ g, dry wt.)
[control]	35.2 \pm 2.9	13.7 \pm 0.3	254 \pm 49
[40ppm]	36.9 \pm 1.5 ($P > 0.2$)	13.3 \pm 0.3	274 \pm 46
[80ppm]	37.9 \pm 2.1 ($P > 0.1$)	13.3 \pm 0.5	236 \pm 79
[160ppm]	38.2 \pm 1.7 ($P > 0.05$)	13.6 \pm 0.6	244 \pm 33

Mean \pm S.D., ($n=5$) P ; t -test

表8 カドミウム蓄積ユスリカを連日給餌したグッピーの体重変化(mg, 湿重)
ユスリカ中のCd濃度は図2に示す。

Days after the Cd-exposure		Body weight of guppy fed Cd-dosed midge larvae			
		[Control]	[40ppm]	[80ppm]	[160ppm]
20	M, F	98 \pm 26 (25)	110 \pm 24 (25)	112 \pm 25 (25)	109 \pm 21 (25)
48	M	209 \pm 29 (15)	215 \pm 25 (10)	209 \pm 27 (11)	208 \pm 14 (8)
	F	413 \pm 67 (7)	333 \pm 65 (12)	294 \pm 73 (10)	281 \pm 61 (13)
225	M	245 \pm 46 (4)	284 \pm 29 (4)	284 \pm 44 (4)	247 \pm 12 (4)
210~250	F	1,422 \pm 333 (7)	1,535 \pm 199 (7)	1,703 \pm 469 (5)	1,306 (1)

M; Male, F; Female, Body weight (mg, wet wt.), Mean \pm S.D. (No. of individuals)

表9 カドミウムを蓄積したユスリカを長期間給餌したグッピー（雄）のカドミウム濃度

ユスリカ中のCd濃度は図2に示す。

Days after the Cd-exposure		Cd concentrations of the guppy ($\mu\text{g/g}$ dry wt)			
		[Control]	[40ppm]	[80ppm]	[160ppm]
20	M, F	0.1 ± 0.1 (3)	6.3 ± 0.9 (3)	12.8 ± 2.4 (3)	17.3 ± 5.6 (3)
55	M	0.3 ± 0.1 (3)	10.1 ± 2.3 (3)	13.2 ± 1.8 (3)	18.5 (1)
	F		7.7 ± 2.4 (3)	14.1 ± 2.2 (3)	17.7 ± 2.6 (3)
225	M	0.2 ± 0.1 (4)	16.9 ± 6.2 (4)	28.6 ± 11.5 (4)	48.5 ± 21.7 (4)
265*	M	0.2 ± 0.1 (3)	13.2 (1)	16.0 ± 1.8 (4)	27.5 ± 6.3 (3)
80**	M, F	<0.1 (5)	0.7 ± 0.2 (5)	0.9 ± 0.2 (5)	1.5 ± 0.2 (5)

M; Male, F; Female Mean \pm S.D., (No. of individuals)

*) Rearing for 40 days after the stop of 225 days Cd-exposure.

**) Rearing for 80 days with commercial fish food in the waste water from the aquaria supplied the Cd-dosed midge larvae.

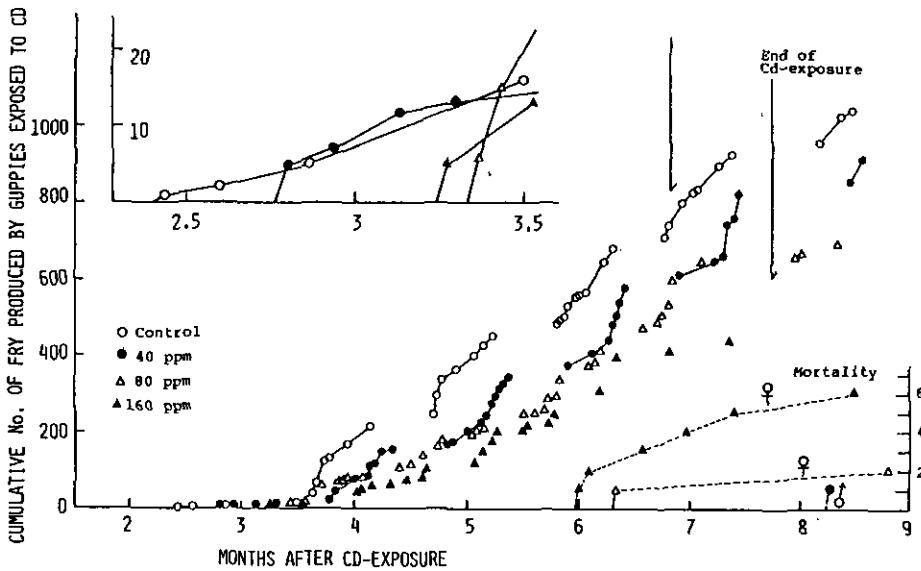


図3 カドミウムを蓄積したユスリカを給餌したグッピーの積算産仔数（雌7個体当たり）

6か月以降図（右下）のような死亡が起こった。

160ppm Cd-ユスリカ区ではグッピーの摂食量がやや減少した。

対照のユスリカを給餌したグッピーは実験2.5か月後から産仔が始まったが80ppm, 160ppm Cd-ユスリカ区のグッピーでは約1か月遅れた(図3)。死亡は160ppm Cd-ユスリカ区で実験6か月以降から起こり雌では最終的に7個体の内6個体, 80ppm Cd-ユスリカ区では2個体が死亡した。一方, 雄では40ppm Cd-ユスリカ区では8か月後に1個体のみが死亡した。

産仔は対照と40ppm Cd-ユスリカ区に図3に実線で結んだ周期性が認められ, 各周期の終わりで積算産仔数を比較すると40ppm Cd-ユスリカ区の産仔数は対照の約71, 75, 84, 89%の値で推移した。80ppm Cd-ユスリカ区では明らかな周期は区別できないが, 実験後6か月以前の産仔数は対照の約50%, それ以後ではその差はむしろ小さくなった。一方, 160ppm Cd-ユスリカ区では80ppm Cd-ユスリカ区よりわずかに少ない産仔や続いたが6か月以降は雌の死亡率が急速に高まった(図3)。

実験7か月後から2.5か月後にかけて産仔を行った雌を産仔後2日以内に取り出しCdの分析に供したが, その数は対照から160ppm Cd-ユスリカ区までそれぞれ6, 4, 2, 1個体である。表10に各器官ごとのCd濃度を示した(Mean±S. D.)。下段(b)の値は実験7.5か月後にCd-ユスリカの給餌を停止しその後40日間Cdを含まない水とえさで飼育した個体のものである。40ppm Cd-ユスリカを給餌したグッピーでもえら, 消化官, 肝臓, 腎臓などのCd濃度はおよそ12, 88, 217,

表10 カドミウムを蓄積したユスリカを7か月給餌したグッピー(雌) 諸器管のカドミウム濃度(μg/g dry wt.) Mean±S. D. (N)

Organs		[Control]	[40ppm]	[80ppm]	[160ppm]
Gill	a)		11.81±4.87 (4)	31.50	(2) 46.1 (1)
	b)	1.13±1.76 (6)	7.09±3.46 (3)	26.50	(2)
Intestine	a)		88.35±29.40 (4)	136.95	(2) 658.90 (1)
	b)	0.57±0.73 (6)	15.13±3.58 (3)	50.35	(2)
Liver	a)		216.83±61.97 (4)	237.00	(2) 398.45 (1)
	b)	0.48±0.81 (6)	309.60±88.32 (3)	529.75	(2)
Kidney	a)		87.95	(2) 262.90	(2) 85.14 (1)
	b)	1.96±1.72 (4)	116.70	(1) 133.25	(2)
Gonad	a)		0.78±0.16 (4)	1.94±0.71 (3)	1.59 (1)
	b)	0.01±0.09 (6)	0.85±0.19 (3)	2.6	(2)
Muscle	a)		1.38±0.66 (4)	2.06±0.93 (3)	2.70 (1)
	b)	0.05±0.25 (6)	1.64±0.32 (3)	2.94	(1)

a) Sacrificed during Cd-exposure (7 months)

b) Sacrificed at 40 days after the end of Cd-exposure

No. of samples are shown in parentheses

88 $\mu\text{g/g}$ (乾重量)に高まった。卵巣、筋肉でも対照と比較すると約80倍又は30倍の濃度になった。Cdの暴露を停止して40日後では腸管、えらのCd濃度は低下したが、肝臓、腎臓、筋肉などではCd濃度の減少は認められず、80ppm Cd-ユスリカ区の腎臓以外はむしろ1.1倍から2.2倍の範囲で高くなった。雄は小さいので器官ごとの分析は困難なため個体ごとに分析した(表9)。雄もCd濃度に従って高濃度のCdを蓄積し、160ppm Cd-ユスリカ区では48.5 \pm 21.7 $\mu\text{g/g}$ と極めて高い値を示した。また暴露を停止して40日後でも約57%のCd濃度が得られた。一方、Cd-ユスリカを給餌した水槽からの排水(0.7l/min)中で魚用の人工飼料により80日間飼育したグッピーの稚魚のCdは160ppm Cd-ユスリカ槽からの水の場合でも約1.5 $\mu\text{g/g}$ にとどまった(表9)。これに対し実験54日後における40ppm, 80ppm, 160ppm Cd-ユスリカ区のグッピーのCd濃度はそれぞれ8.9, 13.7, 18.1 $\mu\text{g/g}$ であった(雌雄の平均)。したがってこれらの値と表9の225日後の値からCdがこの間で直線的に増加したとするとCdユスリカ給餌80日後の値はそれぞれ10.1, 16.0, 22.7 $\mu\text{g/g}$ 程度と計算される。水中のCdによる蓄積の値(表9)はこれらの値のそれぞれ7.6%, 5.5%, 6.6%となりCd-ユスリカを摂食したグッピー中のCdは大部分食物を経て蓄積したものと見なし得る。ところでCd-ユスリカからグッピーへの転移率は1%以下の低いものであった。大部分は固型排せつ物として体外に排出したものと考えられたので、実験期間中6回、Cd-ユスリカ給餌24時間以内に排せつされた固型排せつ物を採集し純水ですすいだ後、Cdの分析を行った。40, 80, 160ppm Cd-ユスリカ給餌における値はそれぞれ987 \pm 463, 1112 \pm 314, 2036 \pm 184 $\mu\text{g/g}$ と極めて高い値を示した。これらは元のユスリカ中の濃度のそれぞれ約2倍, 1.3倍, 1.6倍である。また10ppm Cd-ユスリカの場合は499 \pm 75 ($n=3$)でありユスリカのCd濃度の1.8倍を示した。

(4) 水中に添加したCdの慢性的影響

Cd暴露70日後における雌雄別の体重と魚体中のCd濃度を表11に示した。Cdによる生長の阻害は雌雄のグッピーで認められるが雌で顕著である。雌では5 ppbまではCdによる成長の阻害は認められないが、10ppbと20ppbではそれぞれ対照の82%, 52%の体重を示した。魚体中のCd濃度もCdの処理濃度に従って増大した。雌雄の差は少ないが雄の方でやや高いCd濃度が得られ、20 ppbでは雌の6.54 \pm 0.73 $\mu\text{g/g}$ に対し雄では7.73 \pm 0.88 $\mu\text{g/g}$ ($n=5$)である。産仔はCd暴露2.5か月後から始まったが図4に雌1個体当たりの平均積算産仔数を示した。2.5ppbと5 ppbではCdの阻害効果は全く認められず対照よりも産仔数はむしろ多めであった。暴露6か月から12か月後における10ppbと20ppb暴露の月間積算産仔数はそれぞれ対照の67~80%, 72~95%の間で推移し、両者ともCdの影響を受けたが濃度間による差はほとんど認められなかった。雌1個体が1か月間に産出した死産と早産の個数を産仔開始からCd暴露1年後まで2か月間の平均値として示した(表12)。実験期間による明らかな増減は認められないので、全期間の平均で比べるとCd処理による死産の増加は認められなかった。胚や発眼卵による早産数は実験期間を通した平均値で見ると、Cd-ユスリカ区で多くなっているが対照との間に有意差は認められなかった ($P>0.05$)。

表11 カドミウム70日間暴露したグッピーの体重とカドミウムの濃度
生後60日のグッピーを実験に用いた。

Cadmium Conc. (ppb)	female		male	
	Body weight (mg, wet)	Cd-Conc ($\mu\text{g/g}$ dry wt.)	Body weight (mg, wet)	Cd-Conc ($\mu\text{g/g}$ dry wt.)
Control	502 \pm 153	0.05 \pm 0.03	228 \pm 36	0.07 \pm 0.06
2.5	603 \pm 89	0.82 \pm 0.19	211 \pm 17	0.82 \pm 0.13
5	601 \pm 147	1.33 \pm 0.22	188 \pm 57	1.50 \pm 0.21
10	412 \pm 129	3.42 \pm 0.59	183 \pm 34	3.63 \pm 0.41
20	263 \pm 44	6.54 \pm 0.73	165 \pm 45	7.73 \pm 0.88

Mean \pm S.D., (n=4)

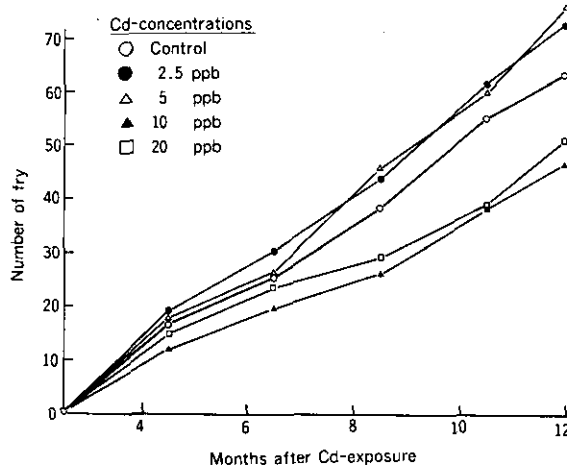


図4 カドミウムに12か月暴露したグッピーの積算産仔数 (雌9~10個体の平均)

また、各月ごとに見ても Cd の暴露期間によってその割合が増える傾向は認められなかった。

Cd 暴露1年後に雌では各臓器ごとの、雄では個体ごとの Cd 濃度をそれぞれ5個体分を用いて分析した(表13, 表14)。またこのときの雌雄の体重を表15に示したが、雌では10ppb, 20ppbで体重の減少が認められ10ppbでは対照の約81%となった。一方、雄では体重の減少は認められなかった。各臓器の Cd 濃度はえら、消化管、肝臓、腎臓などではほぼ暴露濃度に比例して高濃度の Cd を蓄積し、20ppbでの平均はそれぞれの器官でおよそ27, 50, 560, 114 $\mu\text{g/g}$ となった。また10ppbと20ppbでは卵巣と筋肉でも1~4 $\mu\text{g/g}$ の Cd の蓄積が見られた。このように10ppbと20ppbでは産仔数に Cd の濃度に依存した差が認められなかったが、Cd の濃度に関しては処理濃度に従った増加がそれぞれの臓器、雄では個体で見られた。Cd 暴露の停止4か月後ではえらと消化管では

10~40%にCd濃度が減少したが、肝臓ではCd-ユスリカ給餌の場合と同様むしろ増加する傾向が認められた。また同時に肝臓中の亜鉛と銅の濃度を測定したがCdの長期暴露により、これらの重金属濃度も高まった。亜鉛ではCdの処理濃度に従い対照のおよそ2~8倍、銅では1.5倍から8.7

表12 カドミウム暴露グッピーの死産、早産数 (平均値/雌/月)

Cadmium Conc. (ppb)		Months after the Cd-exposure					Mean±S.D. (n=5)
		3~4	5~6	7~8	9~10	11~12	
Control	D. f	0.30	1.15	1.15	1.30	1.15	1.01±0.40
	P. b	0	0.10	0.10	0	0.80	0.20±0.34
2.5	D. f	0.85	1.25	1.20	1.80	0.85	1.19±0.39
	P. b	0	0.35	0.10	0.10	0.10	0.13±0.13
5	D. f	0.40	0.50	1.05	0.95	1.45	0.87±0.43
	P. b	0	0.30	0.40	0.60	0.77	0.41±0.29
10	D. f	0.45	1.10	0.25	0.70	0.50	0.60±0.32
	P. b	0.25	0.85	0.70	0.10	0.60	0.50±0.31
20	D. f	0.50	0.30	0.75	0.95	1.99	0.74±0.35
	P. b	0	1.40	0.40	0.15	0.10	0.41±0.57

D. f; Dead fry P. b; Premature birth

Numerals indicate mean numbers produced per femal per month.

表13 12か月間カドミウムに暴露したグッピー(雌) 諸器官中のカドミウム濃度(μg/g dry wt.)

		Cadmium-Concentrations (ppb)				
		Control	2.5	5	10	20
Gill	a)	0.4±0.3(3)	9.8± 2.6(3)	13.7± 3.6(4)	12.8± 5.5(3)	27.3±12.2 (4)
	b)		1.0± 0.4(3)	1.5± 0.3(3)	5.0± 2.2(3)	10.1± 3.1(3)
Intestine	a)	2.6±1.3(3)	6.7± 3.0(3)	6.0± 2.9(4)	13.6± 3.0(5)	49.5± 33.7(3)
	b)		1.2± 1.0(3)	2.0± 1.2(3)	5.4± 4.3(3)	9.4± 0.9(3)
Liver	a)	0.5±0.3(5)	32.8±16.6(5)	110.2±63.1(5)	276.2± 48.9(5)	561.2±244.4(5)
	b)		63.4±24.4(4)	109.9±52.8(4)	341.7±180.5(4)	440.1±141.8(3)
Kidney	a)	0.8	45.1 (2)	45.8±33.6(3)	72.4± 19.9(4)	113.6± 80.5(3)
	b)		14.4± 5.9(3)	16.4± 9.9(3)	63.9± 14.1(3)	85.9± 18.8(3)
Gonad	a)	0.2±0.1(5)	0.2± 0.4(5)	0.1± 0.1(5)	1.1± 1.5(5)	2.7 (2)
	b)		0.3± 0.2(4)	0.2± 0.1(4)	0.5± 0.2(4)	0.5± 0.2(3)
Muscle	a)	0.3±0.2(4)	0.4± 0.2(4)	0.4± 0.3(5)	1.2± 0.6(5)	4.3± 3.2(3)
	b)		0.2± 0.1(4)	0.2± 0.1(4)	0.8± 0.3(4)	1.1± 0.2(3)

Mean±S. D., (n=3 to 5)

a) Sacrificed after the 12 months Cd-exposure.

b) Sacrificed on 40th day after the stop of Cd-exposure.

倍となった(表16)。なおこの傾向は Cd-ユスリカによる餌をとおしたカドミウム蓄積の場合も認められた。雄のグッピーでも Cd の処理濃度に比例して Cd 濃度の増加が見られ、20ppb 暴露1年後では約31 μ g/g の Cd を蓄積した(表14)。これらの値は Cd の暴露停止4か月後でもほとんど減少しなかった。

Cd 暴露1年間における死亡は対照区ではなかったが、雌では実験の後期に2.5, 5, 10ppb で1個体、20ppb では3個体が死亡し、雄では5 ppb で1個体、20ppb では2個体が死亡した。

表14 カドミウムに12か月間暴露及び暴露停止40日後におけるグッピー雌のカドミウム濃度 (μ g/g dry wt.)

Days of Cd-exposure	Cadmium-Concentrations (ppb)				
	Control	2.5	5	10	20
360	0.2 \pm 0.1(5)	5.0 \pm 0.8(5)	8.4 \pm 1.2(5)	15.2 \pm 2.5(5)	30.8 \pm 4.3(4)
400*	0.1 \pm 0.1(5)	4.5 \pm 1.6(5)	8.3 \pm 1.3(5)	13.9 \pm 3.4(5)	24.3 \pm 4.4(5)

Mean \pm S.D., (n = 4 to 11)

*) Reared for 40 days after the stop of Cd-exposure (360th day) without exposing to cadmium.

表15 カドミウムに12か月暴露したグッピー成魚の体重

Cadmium Conc (ppb)	Body weight (mg wet wt.)	
	Female	Male
Control	1,016 \pm 170 (10)	229 \pm 35 (10)
2.5	1,002 \pm 125 (9)	225 \pm 18 (10)
5	951 \pm 153 (9)	215 \pm 22 (9)
10	846 \pm 147 (9)	235 \pm 34 (10)
20	821 \pm 117 (7)	229 \pm 20 (8)

Mean \pm S.D., (n = 7 to 10)

表16 カドミウム暴露1年後におけるグッピー雌肝臓中のCd, Zn, Cu濃度 (μ g/g dry wt.)

Cadmium Conc (ppb)	Concentrations of metals (μ g/g dry wt)		
	Cadmium	Zinc	Copper
Control	0.5 \pm 0.3	14.4 \pm 11.8	5.4 \pm 4.8
2.5	32.8 \pm 16.6	36.8 \pm 10.1	9.4 \pm 7.5
5	110.2 \pm 63.1	38.8 \pm 23.7	11.9 \pm 7.9
10	276.2 \pm 48.9	53.5 \pm 41.6	47.5 \pm 37.0
20	561.2 \pm 244.4	116.1 \pm 53.3	38.1 \pm 20.3

Mean \pm S.D., (n = 3 to 5)

4. 考 察

ユスリカからグッピーへのCd転移率は実験期間を通じて1%以下(表3)であったが、この値はユスリカのCd濃度がグッピーへ給餌後も変化しないものとして計算した値である。ところでユスリカ中のCd濃度は比較的減少し易く、10ppm Cd-処理ユスリカでは24時間後にユスリカのCd濃度は給餌時の 76.7 ± 5.8 ($n=5$)%に減少していた。そのため前記の転移率はやや過小評価したことになるためその度合いを計算してみた。グッピーに給餌したユスリカの大部分は給餌直後から8時間以内に捕食されるので仮に平均して給餌6時間にすべてのユスリカが一度に捕食されるものとする。またユスリカ中のCd濃度が24時間後まで一定速度で減少するものとするれば6時間後のCd濃度は上記の24時間後の値を使用して、給餌時の94.2%となる。これから計算すると転移率は $1/0.942=1.062$ 倍となり過小評価の度合いは約6%とそれ程大きいものではないと考えられる。

今回の実験で得られたCdの転移率をミジンコを被食者として用いた同様の実験の結果⁷⁾と比較してみる。タマミジンコを10ppbと20ppbのCdに3日間暴露して約125と170 $\mu\text{g/g}$ のCdを蓄積させ、これを1か月間グッピーに給餌した。このときのCd転移率は実験期間により減少したが3.4%(10日後)から1.6%(30日後)であった。この値をCd濃度が同じレベルのユスリカを被食者とした場合と比較するとミジンコを用いた場合の転移率が1.7倍から4.5倍大きかった。このような差異が生じた要因の一つとして被食者中でのCdの存在状態が考えられる。タマミジンコではCd暴露24時間後でもホモジネート上澄中のCdは大部分低分子タンパク質であるメタロチオネインに結合していた¹³⁾。一方、ユスリカではメタロチオネイン分画へのCdの移行は比較的ゆっくり進み、Cd暴露2日後でも大部分のCdは高分子のタンパク質分画に存在していた²⁴⁾。ミジンコとユスリカを被食者として用い食物連鎖による影響を検討する場合、Cdの転移率以上に両者間の差が大きいのはCdの濃縮係数である。24時間後で比較するとミジンコのCdの濃縮係数はユスリカのおよそ100倍であり(畠山、未発表)、水からだけの濃縮を考えると同一環境ではミジンコはユスリカのCd濃度の100倍程度となり、その捕食者に及ぼす影響も大きくなる。

被食者が高濃度のCdを蓄積したため体の諸成分に変化が起こり、餌の質的变化によるCd以外の間接的な影響を及ぼすことが考えられる。湿重に対する乾重量(%)は対照から80ppm Cd-ユスリカ区までCd処理による差はなく(表7)、湿重でそろえた餌量は乾重でも同一であった。今回の実験結果で80ppm、160ppmのCd処理によりユスリカの窒素の割合が減少する傾向が認められたが対照との差は有意ではなかった。一方、Rathoreら²⁵⁾はユスリカ(*Chironomus tentans*)を高濃度のCdに1時間暴露するとユスリカ中のタンパク質が26~34%減少したことを報告している。今回の処理濃度でも、Rathoreら²⁵⁾が用いた濃度に近いものがあり、処理時間も長いのでユスリカ中のタンパク質量が減少した可能性は充分考えられる。また、グッピーの肝臓で見られたようにCdへの暴露により、CuやZnの濃度が増加した。これは後述するメタロチオネインによるものと考えられるがユスリカでも処理時間を延長すればZnやCuなどの金属濃度に変化が起こることが予想される。

他の水生生物を用いた食物連鎖のモデル実験でも食物連鎖による影響は急性的には現れにくいことが示された^{7,26)}。今回の実験でも Cd の濃度が $1200\mu\text{g/g}$ のユスリカを20日間、又は $270\mu\text{g/g}$ のユスリカを30日間給餌した場合でもグッピーの成長は全く阻害されず、後者ではむしろ対照よりも体重の増加が大きかった。また、産仔中のグッピーに対して Cd 濃度が $220\mu\text{g/g}$ のユスリカを2か月間給餌した場合の積算産仔数は対照の約70%を保った。一方、稚魚の段階から $800\mu\text{g/g}$ Cd 濃度のユスリカを給餌し続けた場合でも積算産仔数は対照の50~60%を保ち慢性的な暴露により Cd の影響が2か月暴露の場合より著しく高くなることもなかった。

食物連鎖をとおして見られた影響を Cd を直接水中に添加した場合と比較して見る。Cd の濃度が約 $500\mu\text{g/g}$ の40ppm Cd-ユスリカを稚魚の段階から給餌したグッピーの月間産仔数は対照の70%~90%を保った。一方、水中に10ppb 又は20ppb の Cd を添加した場合の産仔数も対照の67%~93%とほぼ同様の減少を示した。我々の河川調査の結果では水中の Cd 濃度が10ppb 前後のところでは、今回実験に使用したものとは全く別種だがユスリカ中の Cd 濃度は最大でも $10\mu\text{g/g}$ であった。したがって今回の実験結果と限られた野外調査の結果のみから推測すれば自然界で Cd が食物連鎖により魚の成長や再生産に影響を及ぼす程度は水中の Cd に比し少ないものと予測される。一方、重金属によって汚染された河川や湖沼の生物調査は数多くなされているがユスリカは常に重金属耐性種として見られている^{16,22,23)}。また湖沼など水中の重金属は最終的には底質に移行すると言われている^{27,28)}。したがってユスリカなどの底生動物は水中の濃度から予測される以上に底質から重金属を濃縮することが考えられる。

グッピーは食物と水の両経路から高濃度の Cd を蓄積した。産仔数に同程度の影響があったユスリカの Cd 濃度が $500\mu\text{g/g}$ と水中に10ppb 又は20ppb の Cd を添加した場合で各器官の Cd 濃度を比較した。餌中の Cd は主として消化管から、水中の Cd はえらから吸収される。したがってえらの Cd 濃度は Cd を水中に添加した場合の方が高いものと予想されたが、Cd-ユスリカを給餌した場合 ($32\mu\text{g/g}$) と同様の値であった。一方、消化管では Cd-ユスリカを給餌した方が数倍高めである。肝臓では Cd を水中に添加した方が高く、20ppb では約 $560\mu\text{g/g}$ となり Cd-ユスリカ ($500\mu\text{g/g}$) の場合の約2倍となった。一方、腎臓では Cd-ユスリカ給餌の方が水中に Cd を添加したものの数倍の値を示した。これらは餌による Cd と水中からのそれでは体内での挙動に違いがあることを示唆している。その一つとして、メタロチオネインに結合した Cd は消化管から直接腎臓に移行する経路があることが報告されている²⁹⁾。また Kumada ら⁵⁾によると餌由来で蓄積した Cd の半減期は水中から蓄積した Cd の場合よりも短いがこのような結果も両経路による蓄積性の違いを示唆している。

低濃度 Cd の長期暴露によりグッピー肝臓の Zn と Cu の濃度も高まった。魚類でもメタロチオネインが誘導されることは報告されているので³⁰⁻³²⁾、この現象は Cd により誘導された重金属結合性タンパク質であるメタロチオネインに Zn や Cu が結合した結果によるものと考えられる。メダカ (*Oryzias latipes*) を用いた Cd の急性毒性試験の結果では³³⁾、雌の方が雄よりも Cd に耐性が

あることが示された。一方、今回の Cd-ユスリカによる慢性影響試験では雌の方が多数死亡した。急性と慢性影響の違いがあるにせよ Cd の蓄積経路の違いにより、耐性が雌雄で異なったものになった。なお飼中の Cd による死亡率は小山・板沢²⁾によると 5700 μg Cd/g のえきで 15 日以降に 80%、1700 μg Cd/g で 25% であった。また今回の実験で Cd を水に添加した慢性影響では 20ppb、1 年間でいずれも 10 個体のうち雌が 3 個体、雄が 2 個体死亡し、Cd に対する耐性に雌雄間の顕著な差は認められなかった。

ユスリカ-グッピーを用いた系により食物連鎖による Cd が魚の生長や産仔に及ぼす影響を検討した。残された問題点が多いが、2~3 挙げれば、今回の実験ではユスリカを 1 日間 Cd に暴露して Cd-ユスリカを用意した。そのためメタロチオネインの生合成は少なく²⁴⁾、ユスリカ体内でメタロチオネインに結合した Cd の割合は少なかったものと考えられる。またグッピーは産仔 1 か月以降のものを用いたが、産仔直後からの食物連鎖による影響は調べていない。ふ化直後の稚魚が捕食可能なワムシ、若齢のミジンコなどの生物を用いた実験が必要であると考えられる。

5. まとめ

モデル実験によりカドミウムが食物連鎖によって魚の生長や再生産に及ぼす慢性的影響を検討した。被食者としてユスリカ (*Chironomus yoshimatsui*) 幼虫、捕食者としてグッピー (*Poecilia reticulata*) を用いた。

ユスリカの幼虫に Cd を約 130, 180, 220 $\mu\text{g}/\text{g}$ (dry weight) の濃度で蓄積させ、これを毎日決まった量グッピーに 30 日間給餌した。ユスリカからグッピーへの Cd の転移率は実験期間を通じ 0.5~1% と低い値であった。Cd が約 270 $\mu\text{g}/\text{g}$ のユスリカを 30 日間給餌してもグッピーの成長に影響は認められず、体重は実験開始時の 2.8 倍になった。

4 か月間産仔を続けたグッピーに Cd 濃度が約 210 $\mu\text{g}/\text{g}$ のユスリカを 2 か月間給餌した。最初の 1 か月間では産仔数(平均)は対照の約 98%、次の月では約 80% に減少した。グッピー諸器官の Cd 濃度は著しく高くなったが、これらはほとんど食物連鎖をとおした Cd の蓄積であることを示した。

ユスリカにおよそ 500 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、1300 $\mu\text{g}/\text{g}$ (dry weight) の Cd を蓄積させこれを毎日、7 か月間グッピーへ稚魚の段階から給餌し、その慢性影響を調べた。グッピーの Cd 濃度が 500 $\mu\text{g}/\text{g}$ の場合、積算産仔数は産仔開始から 4 か月後まで対照の 70~90% で推移した。800 $\mu\text{g}/\text{g}$ の場合では対照の約 50%、1300 $\mu\text{g}/\text{g}$ の場合では 40% 前後を保った。しかし 1300 $\mu\text{g}/\text{g}$ の Cd-ユスリカ給餌のグッピーでは 6 か月以降雌の死亡が急増した。一方、雄では死亡がなく雌雄で食物連鎖による Cd に対し耐性が異なった。

水中に 10 又は 20 $\mu\text{g}/\text{litre}$ の Cd を添加した場合と Cd 濃度が 500 $\mu\text{g}/\text{g}$ のユスリカを給餌した場合とでグッピーの産仔数に同程度の慢性影響が認められた。両者の場合とも諸器官に高濃度の Cd を蓄積した。消化管、腎臓、肝臓などでは蓄積経路によって 2~数倍の濃度差があったがその他の器官では顕著な差異はなかった。

引用文献

- 1) 小山次郎・板沢靖男 (1977) : カドミウム経口投与の魚に対する影響—I, 血液および骨の分析的所見. 日本水産学会誌, 43, 523—526.
- 2) 小山次郎・板沢靖男 (1977) : カドミウム経口投与の魚に対する影響—II, 形態学的所見. 日本水産学会誌, 43, 527—533.
- 3) 板沢靖男・小山次郎 (1978) : カドミウム経口投与の魚に対する影響—III, マダイとコイの比較. 日本水産学会誌, 44, 891—895.
- 4) 小山次郎・藤田守・板沢靖男 (1979) : カドミウム経口投与の魚に対する影響—IV, コイおよびマダイにおける細胞学的所見. 日本水産学会誌, 45, 429—436.
- 5) Kumada, H., S. Kimura and M. Yokote (1980) : Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish, 46, 97—103.
- 6) Williams, D. S. and J. P. Giesy (1978) : Relative importance of food and Water Sources to Cadmium uptake by *Gambusia affinis* (Poeciliidae). Environ. Res., 16, 326—332.
- 7) Hatakeyama, S. and M. Yasuno (1982) : Accumulation and effects of cadmium on guppy (*Poecilia reticulata*) fed cadmium-dosed *Cladocera* (*Moina macrocopa*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 29, 159—166.
- 8) Olafson, R. W. and J. A. J. Thompson (1974) : Isolation of heavy metal binding proteins from marine Vertebrates. Mar. Biol., 28, 83—86.
- 9) Noël-Lambot, F. (1976) : Distribution of cadmium, zinc and copper in the mussel, *Mytilus edulis*. Existence of cadmium-binding proteins similar to metallothioneins. Experientia, 32, 324—326.
- 10) Olafson, R. W., R. G. Sim and K. G. Boto (1979) : Isolation and chemical characterization of the heavy metal binding protein, metallothionein, from marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol., 62, 407—416.
- 11) Overnell, J. and E. Trehwella (1979) : Evidence for the natural occurrence of (cadmium, copper) -metallothionein in the crab *Cancer pagurus*. Comp. Biochem. Physiol., 64, 69—76.
- 12) Suzuki, K. T., M. Yamamura and T. Mori (1980) : Cadmium-binding proteins induced in the earthworm. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 9, 415—424.
- 13) Yamamura, M., S. Hatakeyama and K. T. Suzuki (1983) : Cadmium uptake and induction of cadmium-binding Protein in the waterflea (*Moina macrocopa*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 30, 298—302.
- 14) Biesinger, K. E. and G. M. Christensen (1972) : Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolisms of *Daphnia magna*. J. Fish Res. Bd Can., 29, 1691—1700.
- 15) Hatakeyama, S. and M. Yasuno (1981) : Effects of cadmium on the periodicity of parturition and brood size of *Moina macrocopa* (Cladocera). Environ. Pollut. (Ser. A), 26, 111—120.
- 16) Wentzel, R. and A. McIntosh (1977) : Sediment contamination and benthic macroinvertebrate distribution in a metal impacted lake. Environ. Pollut., 14, 187—193.
- 17) Wentzel, R., A. McIntosh and G. Atchison (1978) : Evidence of resistance to metals in larvae of the midge *Chironomus tentans* in a metal contaminated lake. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 20, 451—455.
- 18) Anderson, R. L., C. T. Walbridge and J. T. Fiandt (1980) : Survival and growth of *Tanytarsus dissimilis* (Chironomidae) exposed to copper, cadmium, zinc, and lead. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 9, 329—335.
- 19) Hatakeyama, S. and M. Yasuno (1981) : A method for assessing chronic effects of toxic

- substances on the midge, *Paratanytarsus parthenogeneticus*-Effects of copper. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10, 705-713.
- 20) 田端健二 (1972) : ヒメダカを供試魚とする TLm 標準試験法の提案. 用水と廃水, 14, 51-56.
 - 21) Yasuno, M., S. Hatakeyama and M. Miyashita (1980) : Effects on reproduction in the guppy (*Poecilia reticulata*) under chronic exposure to temephos and fenitrothion. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25, 29-33.
 - 22) 町田吉彦・石崎修造 (1975) : 長崎県内河川の底生動物相, (1) 冬期の対馬佐須川と瀬川について. 陸水学雑誌, 36, 122-130.
 - 23) 渡辺直・原田三郎 (1976) : 鉱山廃水流入河川一市川一における底生動物相の回復について. 兵庫県公害研究所・研究報告, 8, 20-25.
 - 24) Yamamura, M., K. T. Suzuki, S. Hatakeyama and K. Kubota (1983) : Tolerance to cadmium and cadmium-binding proteins induced in the midge larva, *Chironomus yoshimatsui* (Diptera, Chironomidae) Comp. Biochem. Physiol., 75C, 21-24.
 - 25) Rathore, H. S., P. K. Sanghvi and H. Swarup (1979) : Toxicity of cadmium chloride and lead nitrate to *Chironomus tentans* larvae. Environ. Pollut., 18, 173-177.
 - 26) Hatakeyama, S. and M. Yasuno (1981) : The effects of cadmium-accumulated chlorella on the reproduction of *Moina macrocopa* (Cladocera). Ecotoxicol. Environ. Safety., 5, 341-350.
 - 27) 寺島泰・菅原正孝・鈴木秀男 (1979) : 水中重金属の底質への移行機構について. 水質汚濁研究, 5, 23-30.
 - 28) 青山勲・西崎日佐夫 (1981) : 湖沼における重金属の分布と動態. 生態化学, 4, 3-15.
 - 29) Cherian, M. G. (1979) : Metabolism of orally administered cadmium-methallothionein in mice. Environ. Health Perspect., 28, 127-130.
 - 30) Marafante, E. (1976) : Binding of mercury and zinc to cadmium-binding protein in liver and kidney of gold fish (*Carassius auratus L.*) Experientia., 32, 147-150.
 - 31) Noël-Lambot, F., C. H. Gerday and A. Disteche (1978) : Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. Comp. Biochem. Physiol., 61C, 177-187.
 - 32) 山本義和・石井知幾・池田静徳 (1978) : 魚類の銅代謝に関する研究-III, コイ肝臓におけるメタロチオネイン様タンパク質の存在. 日本水産学会誌, 44, 149-153.
 - 33) 春日清一 (1980) : メダカにおけるカドミウム急性毒性の雌雄差. 日本水産学会誌, 46, 1073-1076.

ユスリカ幼虫のカドミウムに対する耐性と カドミウム結合タンパク質の誘導*

山村 充¹・畠山成久²・鈴木和夫¹

Tolerance to Cadmium and Cadmium-binding Proteins Induced in the Midge Larva, *Chironomus Yoshimatsui* (Diptera, Chironomidae)

Mitsuru YAMAMURA¹, Shigehisa HATAKEYAMA² and Kazuo T. SUZUKI¹

Abstract

The midge larva (*Chironomus yoshimatsui*) was exposed to cadmium (10 μ g/ml) for two days. A large portion of cadmium taken up rapidly into the insects was bound to the high molecular weight proteins and was rapidly discharged in control water. Low molecular weight cadmium-binding protein was slowly induced in the larva by cadmium exposure, and the protein was a mixture of four isoproteins and showed characteristic properties of metallothionein. The high tolerance of the midge larva to acute cadmium exposure was not explainable by induction of the cadmium-binding proteins.

1. はじめに

重金属の毒性は多くの水生昆虫について調べられているが、それらの研究は主に水質判定基準などの観点から行われている。川、湖、沼などの底質に生息するユスリカ幼虫は汚染が進んだ水環境の中で優占種となることが知られている。中でも *Chironomus yoshimatsui* の幼虫は水環境の汚染に最も強い種類の一つである¹⁾。

*本論文は下記に発表した内容をまとめたものである。

Yamamura, M., K. T. Suzuki, S. Hatakeyama and K. Kubota (1983) : Tolerance to cadmium and cadmium-binding proteins induced in the midge larva, *Chironomus yoshimatsui* (Diptera Chironomidae).
Comp. Biochem. Physiol., 75C, 21-24.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 国立公害研究所 生物環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Environmental Biology Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

メタロチオネインはシステインに富む低分子量（分子量=約10,000）の重金属結合タンパク質で、生体内に入った重金属を分子内に結合することにより重金属の解毒の役割を果たすことが示唆されている²⁾。メタロチオネインはこれまで貝^{3,4)}、カニ^{5,6)}、魚^{7,8)}などの水生生物でその誘導が報告されているが、昆虫ではメタロチオネインの誘導に関する報告はない。

そこで、本研究は *Chironomus yoshimatsui* の幼虫を用いて、Cd 暴露による昆虫でのメタロチオネインの誘導を調べるとともに、ユスリカ幼虫の Cd に対する耐性とメタロチオネインの誘導との関連を検討した。なお、カワゲラに取り込まれた Cd が浄水中で速やかに消失するという報告があるため⁹⁾、本研究では Cd に暴露したユスリカ幼虫をさらに浄水で飼育して蓄積した Cd 量の変化も調べた。

2. 方 法

3 齢から 4 齢のユスリカ幼虫 (*Chironomus yoshimatsui*) を $10\mu\text{g/ml}$ の Cd を含む地下水中に餌を与えながら 2 日間飼育した。その後、Cd を蓄積したユスリカ幼虫を Cd を含まない地下水の中でさらに 3 日間飼育して消化管、えらなどに非特異的に吸着された Cd を除いた。ユスリカ幼虫は Cd 暴露開始後から毎日、一定量をサンプリングし、 0.1mM EDTA 溶液、蒸留水の順で洗った。この一部を湿式灰化 ($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4 = 5 : 1, \text{v/v}$) し、原子吸光法により Cd 並びに生体必須金属の亜鉛 (Zn) と銅 (Cu) の濃度を測定した。残ったユスリカ幼虫は 4 倍量の抽出液中でホモジナイズして遠心し、蓄積した Cd の存在形態の検討に用いた。

Cd の存在形態の検討には Sephadex G-75 カラムによるゲルろ過法と TSK gel G3000SW カラムを用いた高速液クロマトグラフィー原子吸光法 (HPLC-AAS 法)¹⁰⁾ によった。

3. 結 果

Chironomus yoshimatsui の幼虫は Cd に対して高い耐性を示し、Cd を高濃度に蓄積した。このユスリカ幼虫を $25\mu\text{g/ml}$ の Cd に 3 日間暴露した場合、ユスリカ湿重量当たりの Cd 量はおよそ $200\mu\text{g/g}$ にも達した。本研究では $10\mu\text{g/ml}$ の Cd に 2 日間暴露し、その後 Cd を含まない浄水中でさらに 3 日間飼育した。そのときの Cd 濃度の変化と生体必須金属である Zn 及び Cu の濃度を図 1 に示す¹¹⁾。ユスリカ幼虫は暴露時間に比例して Cd を蓄積し、2 日後にはユスリカ中の Cd 濃度は $73.7\mu\text{g Cd/g}$ 湿重量にまで達した。しかし、浄水中で飼育するとユスリカ中の Cd は急速に失われ、2 日後には取り込まれた量の半分にまで減少した。せきつい動物においてメタロチオネインとの関連が示唆されている Cu と Zn の濃度は Cd 暴露により 24 時間以内に低下していた。低下した Zn 濃度は浄水中で飼育する間にコントロールレベルまで回復したが、Cu 濃度は低下したままであった。

ユスリカ中の Cd は約 60% がホモジネート上清中に回収された。図 2 はそのホモジネート上清を Sephadex G-75 カラムに添加したときのカラムからの Cd の溶出パターンを示したものである¹¹⁾。

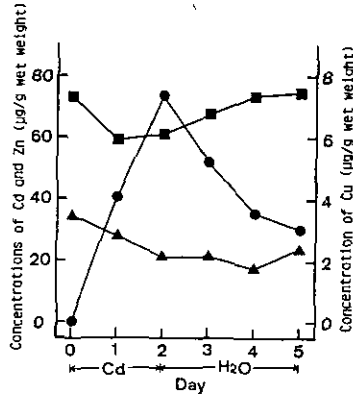


図1 ユスリカ幼虫へのCdの蓄積と、Cu、Zn濃度の変化¹¹⁾
 ●—●, Cd; ■—■, Zn; ▲—▲, Cu

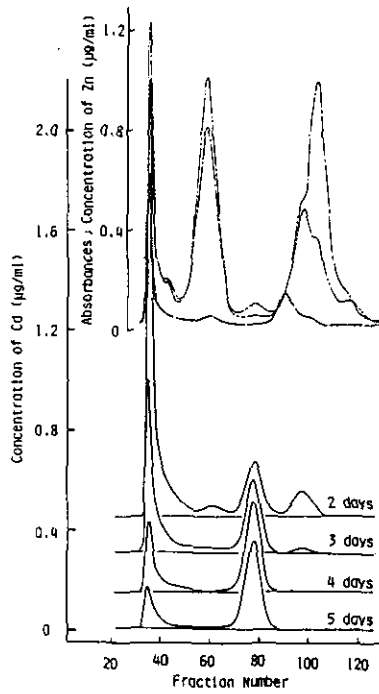


図2 ユスリカ幼虫から得られたホモジネート上清のSephadex G-75クロマトグラム¹¹⁾

図1の説明で示したと同じユスリカ幼虫のサンプルを0.1M Tris-HCl緩衝液(4倍量, %)中でホモジナイズした。その170,000g上清の5 mlをSephadex G-75カラム(2.6×90cm)に添加して、10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.6)により溶出した。溶出液は5 mlずつ分画して、金属濃度及びUV吸収を測定した。上段のZn及びUV吸収のパターンは5日目の上清のものである。—, Cd; - - -, Zn; - - - -, 254 nm; - - - -, 280nm.

Cdの溶出パターンとともに、実験5日目のユスリカ上清におけるZn並びに254と280nmのUV吸収のパターンも示した。UV吸収のパターンはユスリカ上清中の生体成分が主に高分子量タンパク質の分画、ヘモグロビン分画と塩分画に分かれていることを示している。Cd暴露の間、蓄積されたCdは主に高分子量タンパク質の分画に存在し、わずかにヘモグロビン分画及び塩分画に分布していた。これらの分画のCdはユスリカ中のCd濃度の低下に伴って減少したが、対照的にヘモグロビン分画と塩分画の間にある小さなCdピーク ($V_e/V_0=2.2-2.5$) は浄水中で飼育している間も増加し、最後には主たるピークとなった。この低分子量タンパク質の分画 ($V_e/V_0=2.2-2.5$) における254nmの吸収はCdピークが大きくなるのに伴って上昇したが、280nmの吸収には変化が見られなかった。

図3は図2に示したと同じホモジネート上清をHPLC-AAS法により調べたときのクロマトグラムである¹¹⁾。SW3000カラム上でのCdの溶出パターンはほぼSephadex G-75カラム上のものと一致した。保持時間11.0分と18.7分のCdピーク(これらはそれぞれカラムの排除容積とヘモグロビン分画に相当する)はユスリカ中のCdの消失に伴って減少した。低分子量分画のCd結合タンパク質(Sephadex G-75カラム上で $V_e/V_0=2.2-2.5$ に溶出)はSWカラム上で荷電状態の異なる20.1, 20.3, 22.8と25.5分の4成分に分かれた。これら四つのCdピークはSephadex G-75カラム上で $V_e/V_0=2.2-2.5$ に溶出されるCdピークの増加に伴って大きくなった(図2と図3参照)。

メタロチオネインに結合したCdはCuの添加により他の生体成分に結合する金属に影響を与えることなく特異的にCuに置換される¹²⁻¹⁴⁾。そこで、ユスリカ幼虫に誘導されるCd結合タンパク質の性質をCuとの置換反応により調べた。Cuを添加すると、低分子量分画のCdピークは、高

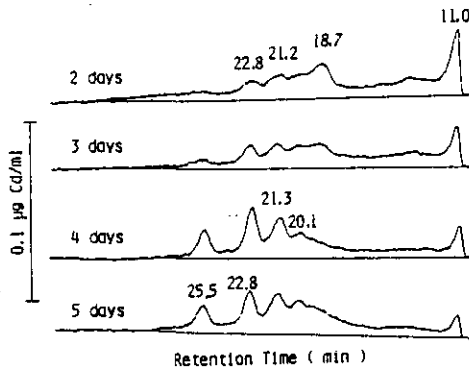


図3 ユスリカ幼虫から得られたホモジネート上清の高速液クロマトグラフ-原子吸光法(HPLC-AAS法)による分析¹¹⁾

図2の各サンプル(上清)100 μ lをSWカラムに添加し、50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)を1.0ml/分の流速で流して溶出した。原子吸光分光光度計の感度は図中に示したように設定した。11.0分のCdピークはカラムの排除容積に相当する。

分子量タンパク質やヘモグロビンに非特異的に結合した Cd ピークには変化を与えず、ほとんど消失した(図4参照)¹¹⁾。また、Cuにより置換された Cd 結合タンパク質は同じ位置に Cu 結合タンパク質として溶出された(図5参照)¹¹⁾。これらの結果はユスリカ幼虫に誘導される Cd 結合タンパク質がメタロチオネインと同様に Cu に対する置換反応の性質を持つことを示すものである。

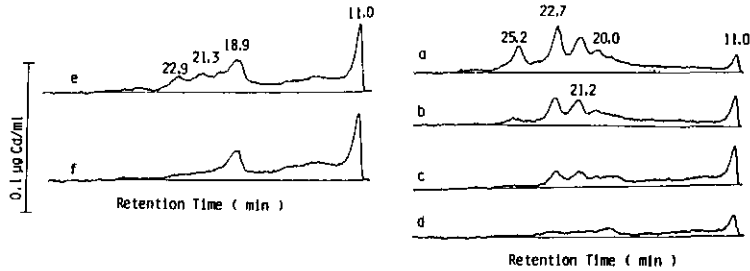


図4 ユスリカ幼虫に誘導される Cd 結合タンパク質の特異的 Cu 置換の性質¹¹⁾
 4日目の上清100 μ lに Cu⁺を0(a), 0.07(b), 0.13(c), 0.27 μ g(d)を加えて HPLC-AAS 法により分析した。また対照として2日目の上清100 μ lに Cu⁺を0(e), 0.13 μ g(f)添加したものを示してある。

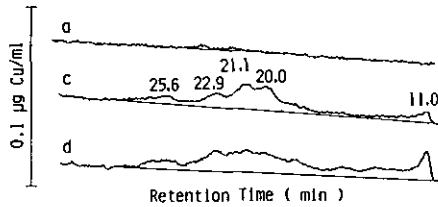


図5 Cd 結合タンパク質に特異的に置換した Cu のクロマトグラム¹¹⁾

図4の各サンプル(a, c, d)を HPLC-AAS 法で分析して、置換した Cu をモニターした。

4. 考察

ユスリカ (*Chironomus yoshimatsui*) の幼虫は高濃度に Cd を蓄積したが、蓄積した Cd の大部分はユスリカを Cd を含まない浄水中で飼育すると速やかに失われた。このような Cd の取り込みと消失はカワゲラでも報告されており、急速に消失する Cd は幼虫の消化管やえらに非特異的に吸着されたものと考えられる⁹⁾。また、ユスリカ幼虫に蓄積された Cd の約 60% は可溶性分画に抽出された。上清中の Cd は主に高分子量タンパク質の分画、ヘモグロビン分画及び塩分画に溶出されたが、それらの Cd ピークはユスリカ幼虫から Cd が消失するのに伴って低下した。しかし、低分子量の Cd 結合タンパク質に結合した Cd のピークは暴露後も徐々に増加した。これらの結果はユスリカ幼虫による Cd の消化管やえらへの吸着が速く、また高濃度になるにもかかわらず、実際の

体内へのCdの取り込みが極めて遅いことを示唆している。

ユスリカ幼虫に誘導されるCd結合タンパク質は、せきつい動物に誘導されるメタロチオネインが普通ZnとCuを含むのに対し、ほとんどZnとCuを含まなかった。ユスリカ幼虫のCd結合タンパク質はほ乳動物のメタロチオネインより小さな分子量を持っており、このCd結合タンパク質 ($V_e/V_0=2.2-2.5$) はラットのメタロチオネイン ($V_e/V_0=1.8-2.2$) よりも遅れてSephadex G-75カラムから溶出された。このCd結合タンパク質は254nmに吸収を持ち、280nmの吸収をほとんど持たなかったが、このことはこのCd結合タンパク質がメタロチオネインと同様にシステインに富み、芳香族アミノ酸を欠くことを示唆している¹⁵⁾。さらに、Cd結合タンパク質中のCdが添加したCuにより特異的に置換を受けることもこのタンパク質がCuに対して高い親和性を有するメルカプチド結合を持つことを示唆している^{13,14)}。したがって、このようなメタロチオネインに特徴的な性質から、ユスリカ幼虫に誘導されるCd結合タンパク質はメタロチオネインと考えられた。しかし、ユスリカ幼虫のCd結合タンパク質は4種類のイソタンパク質の混合物であり、その数は甲かく類の2種類と環形動物の多種類の間であった^{5,6,16)}。

メタロチオネインは重金属の解毒に関与しているが、ユスリカ幼虫におけるメタロチオネインの誘導は極めて遅く、*Chironomus yoshimatsui*の幼虫がCdに対して示す耐性をメタロチオネインの誘導により説明することはできなかった。

5. まとめ

ユスリカ幼虫 (*Chironomus yoshimatsui*) を10 μ g/mlのCdに暴露して、ユスリカ幼虫へのCdの蓄積を調べた。ユスリカ幼虫はCd暴露によりCdを体内に急速に取り込んだが、そのユスリカ幼虫をCdを含まない水に移して飼育すると、蓄積したCdの大部分は速やかに体内から消失した。Cd暴露によるユスリカ幼虫に低分子量のCd結合タンパク質の誘導が認められたが、それらは4種類のイソタンパク質の混合物であった。しかし、これらのCd結合タンパク質の誘導は極めて遅く、*Chironomus yoshimatsui*の幼虫に見られる高いCd耐性はCd結合タンパク質の誘導によるものではないことが明らかとなった。

謝 辞

本研究に際し、我々を暖かく励まして下さった環境生理部長 久保田憲太郎博士に感謝します。

引用文献

- 1) Sasa, M. (1978) : A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud., No. 3, 63p.
- 2) Kägi, J. H. R. and M. Nordberg (eds) (1979) : "Metallothionein", Basel, Birkhäuser Verlag, 378 p.
- 3) Noël-Lambot, F. (1976) : Distribution of cadmium, zinc and copper in the mussel, *Mytilus edulis*. Existence of cadmium-binding proteins similar to metallothioneins. *Experientia*, 32, 324-326.
- 4) Howard, A. G. and G. Nickless (1977) : Heavy metal complexation in polluted molluscs I. Limpets (*Patella vulgata* and *Patella intermedia*). *Chem.-Biol. Interac.*, 16, 107-114.
- 5) Olafson, R. W., R. G. Sim and K. G. Boto (1979) : Isolation and chemical characterization of the heavy metal-binding protein, metallothionein from marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, 407-416.
- 6) Overnell, J. and E. Trehwella (1979) : Evidence for the natural occurrence of (cadmium, copper)-metallothionein in the crab *Cancer pagurus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 64C, 69-76.
- 7) Olafson, R. W. and J. A. J. Thompson (1974) : Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar. Biol.*, 28, 83-86.
- 8) Noël-Lambot, F., Ch. Gerday and A. Distèche (1978) : Distribution of Cd, Zn and Cu in the liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61C, 177-187.
- 9) Clubb, R. W., A. R. Gauffin and J. L. Lords (1975) : Acute cadmium toxicity studies upon nine species of aquatic insects. *Environ. Res.*, 9, 332-341.
- 10) Suzuki, K. T. (1980) : Direct connection of high-speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to an atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis: Metallothionein. *Analyt. Biochem.*, 102, 31-34.
- 11) Yamamura, M., K. T. Suzuki, S. Hatakeyama and K. Kubota (1983) : Tolerance to cadmium and cadmium-binding proteins induced in the midge larva, *Chironomus yoshimatsui* (Diptera, Chironomidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 75C, 21-24.
- 12) Rupp, H. and U. Weser (1974) : Conversion of metallothionein into Cu-thionein, the possible low molecular weight form of neonatal hepatic mitochondriocuprein. *FEBS Lett.*, 44, 293-297.
- 13) Suzuki, K. T. and T. Maitani (1981) : Metal-dependent properties of metallothionein. Replacement *in vitro* of zinc in zinc-thionein with copper. *Biochem. J.*, 199, 289-295.
- 14) Suzuki, K. T., M. Yamamura and T. Maitani (1980) : Chromatographic properties of metallothioneins on a gel permeation column: Changes induced by replacement of cadmium with cuprous and cupric ions. *J. Liq. Chromatogr.*, 3, 1385-1397.
- 15) Kägi, J. H. R. and B. L. Vallee (1961) : Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. *J. Biol. Chem.*, 236, 2435-2442.
- 16) Suzuki, K. T., M. Yamamura and T. Mori (1980) : Cadmium-binding proteins induced in the earthworm. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 9, 415-424.

タマミジンコにおけるカドミウムの蓄積と カドミウム結合タンパク質の誘導*

山村 充¹・畠山成久²・鈴木和夫¹

Cadmium Uptake and Induction of Cadmium-binding Protein in the Waterflea, *Moina macrocopa*

Mitsuru YAMAMURA¹, Shigehisa HATAKEYAMA² and Kazuo T. SUZUKI¹

Abstract

The zooplankton, *Moina macrocopa*, exposed to cadmium (20 µg Cd/l) took up the metal and attained a maximum level in 72 hr. At this time, the concentrations of zinc and copper in *M. macrocopa* were not affected. Most of cadmium accumulated in the animals was bound to the low molecular weight cadmium-binding protein. The protein had an apparent molecular weight smaller than that of rat metallothioneins and was a mixture of two isoproteins.

1. はじめに

Cdは蓄積性の汚染物質で、水生生物は食物と水を通してCdを体内に取り込む。WilliamsとGiesyはCdCl₂に浸した飼料を小魚に食べさせた場合、食物からCdの有意な取り込みはなかったと報告している¹⁾。一方、畠山らは実験的食物連鎖系を用いて食物を通したCdの影響を報告している²⁾。グッピーはCdを蓄積したタマミジンコを餌として与えてもほとんど影響を受けなかったが、これをヒドラが捕食した場合は、水から直接取り込んだ場合よりもCdの影響が大きかったと報告されている³⁾。

*本論文は下記に発表した内容をまとめたものである。

Yamamura, M., S. Hatakeyama and K. T. Suzuki (1983): Cadmium uptake and induction of cadmium-binding protein in the waterflea, *Moina macrocopa*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 30, 298-302.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 国立公害研究所 生物環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Environmental Biology Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

動物プランクトンは多くの水生生物にとって重要な食物の一つであり、食物連鎖を通してのCdの影響を研究するには最も適当と思われる。しかし、動物プランクトン中のCdの存在形態については報告がない。そこで、本研究は動物プランクトンの1種、タマミジンコを用いてCdの蓄積と蓄積されたCdの化学形態を明らかにすることを目的として実施した。

2. 方法

当研究所の池から得られたタマミジンコ (*Moina macrocopa*) を通気した水槽 (23℃) の中で餌を与えながら飼育した。Cdを水槽中の水 (地下水; 硬度80-84ppm) に加えて20 μ gCd/lの濃度になるようにし、この水は毎日新しいものと交換した。タマミジンコは暴露開始0, 24, 48, 72時間後に採集して蒸留水で洗い、2倍量の0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH7.4, 0.25M グルコース) の中でホモジナイズした。ホモジネートは4℃で170,000g, 60分間超遠心して上清を得た。ホモジネート及びその上清中のCd, 亜鉛 (Zn), 銅 (Cu) 濃度は湿式灰化 (HNO₃: HClO₄ = 5 : 1, v/v) して原子吸光法により測定した。

上清中のCdの化学形態はSephadex G-75カラムを用いたゲルろ過法により調べた。Sephadexカラムにより分離された低分子量Cd結合タンパク質は限外ろ過法 (Diaflo UM-2膜を使用) で濃縮した後、TSKgel G3000SWカラムを用いた高速液クロ-原子吸光法 (HPLC-AAS法)⁴⁾により分析した。

3. 結果と考察

図1はタマミジンコをCdに暴露したときのタマミジンコへのCdの蓄積を示す⁵⁾。ホモジネート中のCd濃度は暴露72時間後までに最大に達した。このとき、ホモジネート中のCu及びZn濃度は影響を受けなかった (Zn及びCuのコントロール値はそれぞれ2.8と0.29 μ g/mlであった)。ホモジネート中のCdの約60%が上清分画に抽出され、上清中のCd濃度はタマミジンコへのCd蓄積に伴って増加した。

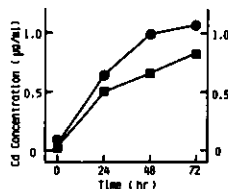


図1 Cd暴露によるタマミジンコへのCdの取り込み⁵⁾

タマミジンコをCd (20 μ gCd/l) に暴露して、各時間 (0, 24, 48, 72時間) ごとに一部を採取した。集めたサンプルは2倍量 (v/w) の0.1M Tris-HCl緩衝液中でホモジナイズし、170,000g, -60分間遠心して上清を得た。ホモジネートとその上清は湿式灰化した後、金属濃度を測定した。

上清中のCdはSephadex G-75カラム上で三つの分画(排除容積, $V_e/V_0=1.4-1.8$ と低分子量タンパク質の分画)に分かれて溶出された(図2参照)⁵⁾。上清中のCdの50%以上が低分子量タンパク質の分画($V_e/V_0=2.0-2.4$)に溶出され, そのピークはタマシジコへのCdの蓄積に伴って大きくなった。上清中のZnはUVのクロマトグラムによく似た分布のパターンを示し, 主に高分子量タンパク質の分画と塩分画に溶出された。低分子量Cd結合タンパク質($V_e/V_0=2.0-2.4$)は少量のZnとCuを含んでいたが, その量はCd結合タンパク質が増加しても変化しなかった。

軟甲類に誘導されるメタロチオネインはほ乳類のメタロチオネインと同じ分子量(約6,000)を持つと報告されている^{6,7)}。しかし, タマシジコに誘導されるCd結合タンパク質はほ乳類のメタロチオネインより分子量が小さいため, ラットのメタロチオネイン($V_e/V_0=1.8-2.2$)より遅れて

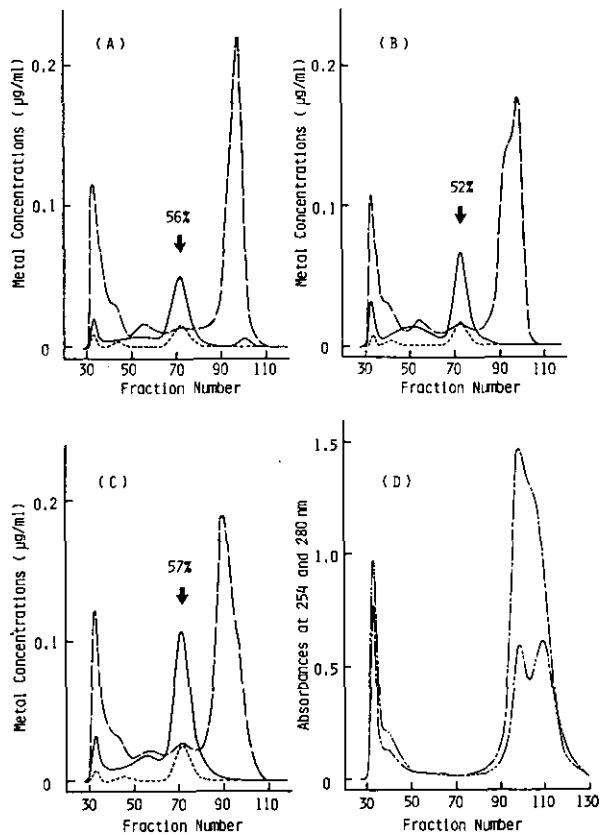


図2 Cdに暴露されたタマシジコ上清のSephadex G-75クロマトグラム⁵⁾
 図1の説明で示したと同じ上清各10mlをSephadex G-75カラム(2.6×90cm)に添加して, 10mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.6)により溶出した。溶出液は5mlずつ分画し, 金属濃度とUV吸収を測定した。(A), (B), (C)はそれぞれ暴露24, 48, 72時間後の上清の溶出パターンである。(D)は(C)のUV吸収を示している。—, Cd; — — Zn; ·····, Cu; — — — — 254nm; — — — —, 280nm,

溶出された。

タマミジンコ中に誘導された Cd 結合タンパク質はアルカリ性の緩衝液中で陽イオン交換カラムの性質を持つ SW 3000カラムを用いてさらに分析を行った⁴⁾。ラットのメタロチオネインの I 型と II 型が 20.4 分と 19.5 分に溶出される条件のもとで、タマミジンコの Cd 結合タンパク質は 21.5 分と 22.8 分の 2 つのピークに分離された (図 3 参照)。

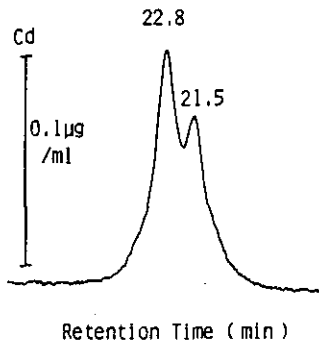


図 3 タマミジンコ中に誘導された Cd 結合タンパク質の高速液クロマトグラフィー原子吸光法 (HPLC-AAS 法) による分析⁵⁾

Sephadex カラムにより分離した Cd 結合タンパク質を Diaflo UM-2 限外ろ過膜を用いて濃縮し、HPLC-AAS 法により分析した。

これらの結果からタマミジンコ中に蓄積した Cd は主に低分子量の Cd 結合タンパク質に結合して存在することが明らかとなった。また、この Cd 結合タンパク質はほ乳類のメタロチオネインより小さな分子量を持ち、2 種類のイソタンパク質から成ることが示された。

4. まとめ

動物プランクトンのタマミジンコを $20\mu\text{g/l}$ の Cd に暴露すると、タマミジンコは Cd を取り込み、暴露開始 72 時間後までにタマミジンコ中の Cd 濃度は最大に達した。このとき、タマミジンコ中の Zn と Cu の濃度に影響は見られなかった。タマミジンコ中に蓄積された Cd は主に低分子量の Cd 結合タンパク質に結合して存在した。このタンパク質はラットのメタロチオネインより小さい分子量を持ち、2 種類のイソタンパク質の混合物であった。

謝 辞

本研究に際し、我々を暖かく励まして下さった環境生理部長 久保田憲太郎博士に感謝します。

引用文献

- 1) Williams, D. R. and J. P. Giesy Jr. (1978) : Relative importance of food and water sources to cadmium uptake by *Gambusia affinis* (Poeciliidae). Environ. Res., 16, 326-332.
- 2) Hatakeyama, S., M. Yasuno and M. Miyashita (1979) : Effect of heavy metals on the food-chain system of cladocera (*Moina macrocopa*) and hydra (*Pelmatohydra robusta*). Jpn. J. Water Pollut., 2, 163-172.
- 3) Hatakeyama, S. and M. Yasuno (1982) : Accumulation and effects of cadmium on guppy (*Poecilia reticulata*) fed cadmium-dosed cladocera (*Moina macrocopa*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 29, 159-166.
- 4) Suzuki K. T. (1980) : Direct connection of high-speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis : Metallothionein. Analyt. Biochem., 102, 31-34.
- 5) Yamamura, M., S. Hatakeyama and K. T. Suzuki (1983) : Cadmium uptake and induction of cadmium-binding protein in the waterflea (*Moina macrocopa*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 30, 298-302.
- 6) Olafson, R. W., R. G. Sim and K. G. Boto (1979) : Isolation and chemical characterization of the heavy metal-binding protein metallothionein from marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol., 62B, 407-416.
- 7) Overnell, J. and E. Trehwella (1979) : Evidence for the natural occurrence of (cadmium, copper) -metallothionein in the crab *Cancer pagurus*. Comp. Biochem. Physiol., 64C, 69-76.

シマミミズへのカドミウムの蓄積と誘導される メタロチオネインの性質

山村 充¹・鈴木和夫¹

Cadmium Accumulation and Characterization of Metallothionein Induced in the Earthworm

Mitsuru YAMAMURA¹ and Kazuo T. SUZUKI¹

Abstract

Earthworms, *Eisenia foetida*, grown in composts of different cadmium concentrations accumulated cadmium in a dose-dependent manner and the cadmium was bound to three different molecular weight cadmium-binding proteins induced in the earthworm. The three proteins were stable to heat treatment and accompanied by a concomitant increase of absorbance at 254 nm and not at 280nm. Each of the three proteins is a mixture of isoproteins. One of the 3 different molecular weight cadmium-binding proteins induced in the earthworm was characterized as metallothionein; this characterization was based on a high cysteine and cadmium content, low molecular weight, heat-stability, and mercaptide bonding.

1. はじめに

これまで、水生生物における Cd の存在形態の研究は主に蓄積した Cd の毒性との関連から行われてきた。そのため対象となる水生生物は魚、カニ、貝などの比較的大型の、しかも生存期間が長いものが中心であった。しかし、最近、食物連鎖を通じた捕食生物への Cd の影響が報告され¹⁾、下等な水生生物での Cd の存在形態の解明が、生態系での Cd の毒性を考えていく上で、重要であることが示唆されている。そこで、本研究では、貝よりも下等な環形動物の一種のシマミミズに

*本論文は以下に発表した論文をまとめたものである。

Suzuki, K. T., M. Yamamura and T. Mori (1980) : Cadmium-binding protein induced in the earthworm. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 9, 415-424.

Yamamura, M., T. Mori and K. T. Suzuki (1981) : Metallothionein induced in the earthworm. Experientia, 37, 1187-1189.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

ついて、Cdの蓄積と蓄積されたCdの存在形態を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

シマミミズ (*Eisenia foetida*) を異なる濃度のCdを含んだ堆肥中で30日間飼育した²⁾。表1はその堆肥中の金属濃度を示したものである³⁾。30日後、シマミミズを濡れたろ紙を乗せたペトリ皿に移して48時間放置し、消化管の内容物を排せつさせた。こうして得られたシマミミズを4倍量の0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4, 0.25M グルコース) 中でホモジナイズし、170,000g, 60分間 (4℃) 超遠心してその上清を得た。

ホモジネート上清中のCdの化学形態の分析はSephadex G-75カラムを用いたゲルろ過法とTSKgel G3000SWカラムを用いた高速液クロマトグラフィー原子吸光法(HPLC-AAS法)⁴⁾により行った。また、Cd結合タンパク質の性質の検討には、400 μ gCd/g乾重量のCdを含んだ堆肥中で60日間飼育したシマミミズを用いた。

表1 堆肥中の金属濃度³⁾

Exp. No.	source of Cd ^a	Concentrations of metals (μ g/g dry compost)							
		Cd	Zn	Cu	T-Cr ^b	Pb	T-Hg ^c	As	Ni
1	control	1.3	652	102	d	d	d	d	d
2	+Cd (NO ₃) ₂	41.6	635	96.5	d	d	d	d	d
3	+Cd (NO ₃) ₂	81.2	625	95.1	d	d	d	d	d
4	+Cd (NO ₃) ₂	180	643	101	d	d	d	d	d
5	+Cd (NO ₃) ₂	511	644	99.0	29	52	0.58	3	23

a. CdはCd (NO₃)₂として添加した。

c. 総水銀量。

b. 総クロム量。

d. 濃度はExp. 5と同じである。

3. 結果と考察

堆肥中のCd濃度とシマミミズに蓄積されたCd量の関係を図1に示した³⁾。堆肥中のCd濃度が高くなるのに伴い、シマミミズ中に蓄積するCdの量も増加した。ホモジネート中のCdはほとんど上清中に回収され、上清中のCdは分子量の異なる三つのCd結合タンパク質に結合した状態で存在した(図2参照)³⁾。これら三つのCd結合タンパク質をSephadexカラムから溶出される順にEW-I, EW-II, EW-IIIと呼ぶことにする。これらのCd結合タンパク質の誘導に伴って、EW-IからEW-IIIの各分画で254nmの吸収が増大したが、280nmの吸収には変化が見られなかった。また、これらのCd結合タンパク質はともに熱に安定で、80℃, 10分間の熱処理でも上清中のCdの分布に変化は見られなかった。ゲルろ過法及びHPLC-AAS法によりEW-IとEW-IIIの分子量はそれぞれ63,000-70,000と2,000程度と推定された。EW-IIは分子量がほ乳動物のメタロチ

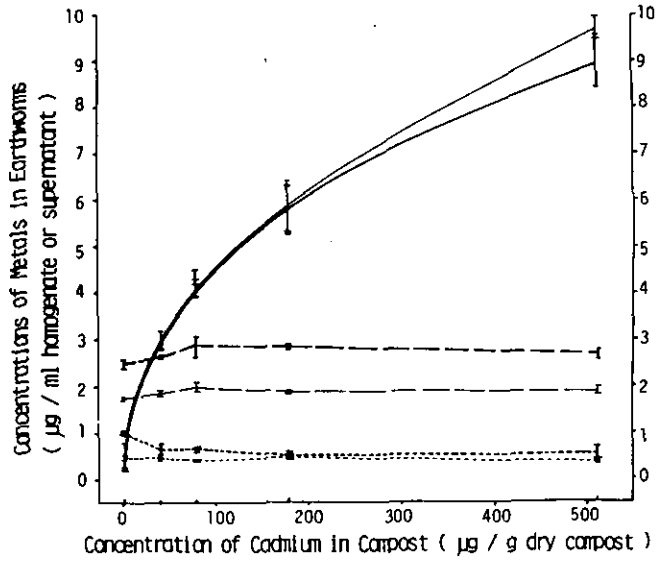


図1 堆肥中のCd濃度とシマミミズ中の金属濃度との関連³⁾
シマミミズを4倍量(%)の0.1M Tris-HCl緩衝液中でホモジナイズし、170,000 g, 60分間遠心して上清を得た。ホモジネート及びその上清中の金属濃度は湿式灰化した後、原子吸光法により測定した。濃い線はホモジネート、また薄い線は上清を示す。—, Cd; ---, Zn; ·····, Cu

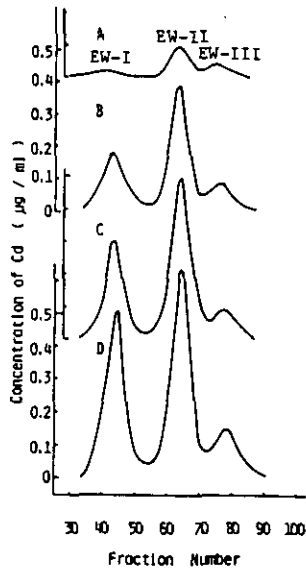


図2 Cdを蓄積したシマミミズ上清のSephadex G-75カラム上でのCdの分布³⁾
表1のcontrol(A), Exp. No 2(B), 3(C), 4(D)に相当する上清8 mlをSephadex G-75カラム(2.6×90cm)に添加し、10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.6)により溶出した。Aは等量、またB, C, Dは4倍量の0.1M Tris-HCl緩衝液中でホモジナイズした。

オネインに近く、見かけの分子量は14,000と推定された。図3はゲルろ過により分子量の大きさを分けたEW-IからEW-IIIの各Cd結合タンパク質をHPLC-AAS法により分析した結果である³⁾。各タンパク質はさらに何本かのピークに分かれ、これらの分子量の異なるタンパク質はともにかくつかのタンパク質の混合物であることが明らかになった。

分子量がメタロチオネインに近いEW-IIは3種類のイソタンパク質からなり(図4参照)、その内の一つのタンパク質(EW-II B)について性質を検討した。表2はそのアミノ酸分析の結果を示す⁵⁾。このタンパク質は15.4%のシステインを含み、芳香族アミノ酸をほとんど含まなかった。また、結合している金属は主にCdで、Zn, Cuは少量しか含まれなかった。アミノ酸分析の結果は254nmに吸収を持ち、280nmの吸収をほとんど持たないUVスペクトルの特徴と一致するものである(図5参照)⁵⁾。溶液のpHを下げると254nm付近のUV吸収は消失したが、これはメルカプチド結合(金属-イオウ結合)の解離によるタンパク質からのCdの遊離と一致していた。これらのすべての性質はこのイソタンパク質がメタロチオネインであることを示唆するものである。

本研究はシマミズに蓄積されたCdが分子量の異なるCd結合タンパク質に結合して存在することを明らかにした。これらのCd結合タンパク質の内、分子量がほ乳動物のメタロチオネインに近いEW-IIはメタロチオネインと認められた。また、これら分子量の異なるCd結合タンパク質を他の動物に与えたとき、Cdの体内分布に差が見られることを別に発表した⁶⁾。

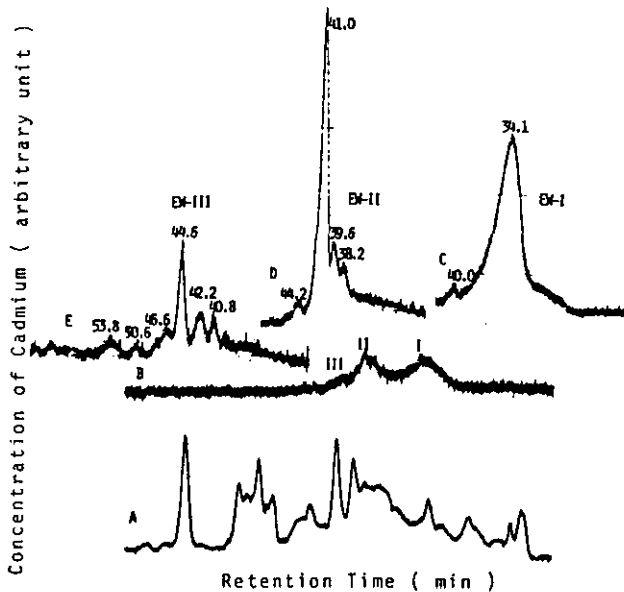


図3 シマミズCd結合タンパク質のHPLC-AASによる分析³⁾

表1のExp. No. 5に相当する上清200 μ lをSWカラム(21.5 \times 600mm)に添加し、50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.6)、流速3.75ml/分で流して溶出した。溶出液中のCd(B)と280nmのUV吸収(A)を連続的に測定した。またゲルろ過により分離したEW-I(C)、-II(D)、-III(E)のCd結合タンパク質をDiaflo UM-10限外ろ過膜を用いて濃縮した後、分析を行った。

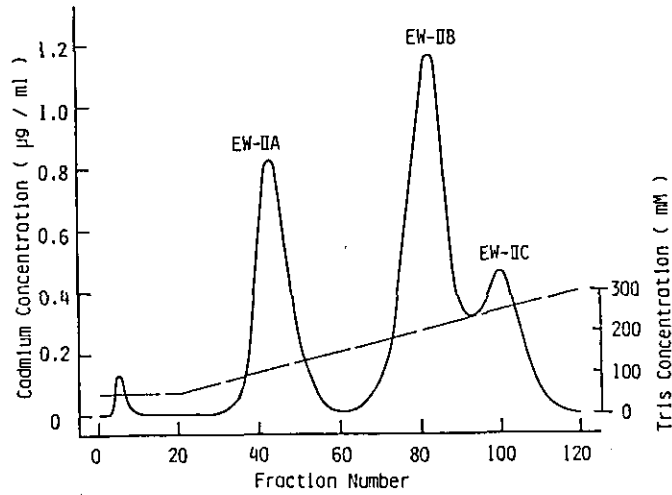


図4 シマミズCd結合タンパク質 (EW-II) の DEAE Sephadex A-25カラムによる分析⁵⁾
 ゲルろ過により分離した Cd 結合タンパク質 EW-II を DEAE Sephadex A-25カラム (1.6×20cm) に添加し, Tris-HCl 緩衝液 (pH8.6) の50mM から300mM の直線的な濃度こう配により溶出した。

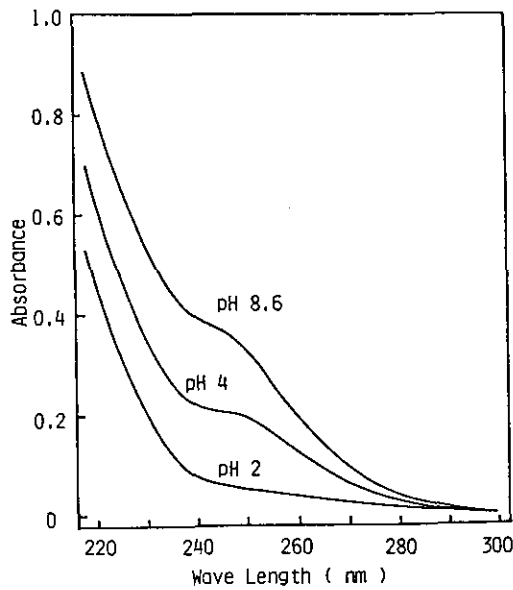


図5 pH に依存するシマミズCd結合タンパク質 (EW-II B) の UV 吸収スペクトルの変化⁶⁾
 UV 吸収スペクトルは10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.6) 中で測定した。また, pH は 1 N HCl を加えて調整した。

表2 シマミミズ Cd 結合タンパク質 (EW-II B) のアミノ酸組成及び金属含量⁵⁾

Amino acid composition	Mole % ^a	Residues ^b Molecule
Half-cystine	15.4	14
Aspartate	9.8	9
Threonine	5.7	5
Serine	6.1	6
Glutamate	8.5	8
Glycine	17.0	15
Alanine	10.0	9
Valine	4.6	4
Methionine	-	-
Isoleucine	2.2	2
Leucine	5.1	5
Tyrosine	-	-
Phenylalanine	Trace	Trace
Lysine	8.6	8
Histidine	-	-
Arginine	3.0	3
Proline	4.0	4
Metal content(mole%) : Cd 93.9, Zn 2.8, Cu 3.3		
SH/metal ratio : 2.4		
Total sugar :-		

a. EW-II B は 6 N HCl 中 110°C, 20 時間加水分解した。メチオニンとハーフシスチンは過ギ酸酸化した後分析した。糖と金属の含量は硫酸-フェノール法⁹⁾と原子吸光法により測定した。

b. イソロイシンを 2 残基として計算した。

4. まとめ

シマミミズは堆肥中に含まれる Cd の濃度に比例して Cd を蓄積した。シマミミズに蓄積した Cd は新たに誘導された分子量の異なる三つの Cd 結合タンパク質に結合して存在した。これらの Cd 結合タンパク質は熱処理に対して安定で、254nm に吸収を持っていたが、280nm の吸収は欠いていた。分子量の異なる Cd 結合タンパク質はさらにいくつかのイソタンパク質の混合物で、その内の一つのイソタンパク質は、高いシステインの含量、分子量、熱安定性及びメルカプチド結合の存在などから、メタロチオネインと認められた。

謝 辞

本研究に際し、シマミミズを提供して下さった日本下水道事業団（現島根大農学部）の森忠洋博士並びに我々を暖かく励まして下さった環境生理部長 久保田憲太郎博士に感謝します。

引 用 文 献

- 1) Hatakeyama, S., M. Yasuno and M. Miyashita (1979) : Effects of heavy metals on the food-chain system of cladocera (*Moina macrocopa*) and hydra (*Pelmatohydra robusta*). Jpn. J. Water Pollut., 2, 163-172.
- 2) Mori, T. and Y. Kurihara (1979) : Accumulation of heavy metals in earthworms (*Eisenia foetida*) grown in composted sewage sludge. Sci. Rep. Tohoku. Univ. Biol., 37, 289-297.
- 3) Suzuki, K. T., T. Mori and M. Yamamura (1980) : Cadmium-binding proteins induced in the earthworm. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 9, 415-424.
- 4) Suzuki, K. T. (1980) : Direct connection of high speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to an atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis : Metallothionein. Analyt. Biochem., 102, 31-34.
- 5) Yamamura, M., T. Mori and K. T. Suzuki (1981) : Metallothionein induced in the earthworm. Experientia, 37, 1187-1189.
- 6) Suzuki, K. T., M. Yamamura and T. Mori (1980) : Metabolic fate of earthworm cadmium-binding proteins in rats. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 9, 519-531.

両生類に対する重金属の影響 I
アフリカツメガエルへの重金属の蓄積と存在状態並びに必須金属への影響*

鈴木和夫¹・山村 充¹

Effects of Heavy Metals on Amphibia I
Accumulation and Chemical Forms of Heavy Metals, and
Effects on Essential Metals in *Xenopus laevis*

Kazuo T. SUZUKI¹ and Mitsuru YAMAMURA¹

Abstract

Amphibia are phylogenetically situated at a higher position among animals that constitute the aquatic ecosystem of fresh water. Effects of heavy metals on an amphibian animal, *Xenopus laevis* were investigated through a model food chain on the viewpoints of accumulation and chemical forms of cadmium and its effect on essential metals. As cadmium is present mostly bound to metallothionein in the living bodies, rabbit livers were prepared as feed to *Xenopus laevis* by injecting cadmium into rabbits and accumulating cadmium as bound to metallothionein. The amount of cadmium accumulated through the feed into the liver and kidneys of *Xenopus laevis* was extremely low and most of cadmium in the feed was found in the excreta. Effects of cadmium in the feed on essential metals in the liver and kidneys of *Xenopus* were not observed.

The concentration of copper in the liver of *Xenopus* was different from frog to frog and it was dependent on the amount of copper bound to metallothionein even in the control animals. Metallothionein was induced in the liver and kidneys of *Xenopus*

*本論文は以下の各論文についてまとめたものである。

Suzuki, K. T. and Y. Tanaka (1983) : Induction of metallothionein and effect on essential metals in cadmium-loaded frog *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74C, 311-317.

Suzuki, K. T., Y. Tanaka and R. Kawamura (1983) : Properties of metallothionein induced by zinc, copper and cadmium in the frog *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75C, 33-37.

Suzuki, K. T., H. Akitomi, Y. Tanaka, R. Kawamura and M. Yamamura (1983) : Metallothionein induced in Amphibia. *Eisei Kagaku*, 29, p-51.

Yamamura, M. and K. T. Suzuki (1983) : Metallothionein induced in the frog *Xenopus laevis*. *Experientia*, 39, 1370-1373.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

by loading cadmium, copper and zinc. Properties of *Xenopus* metallothionein was compared with those of mammalian metallothionein and several differences between the two metallothioneins were clarified as follows: i) *Xenopus* metallothionein was shown to be slightly lower in molecular weight than rat metallothionein on gel chromatography. However, amino acid analysis indicated that *Xenopus* metallothionein might be smaller in molecular weight than rat metallothionein. ii) Although two molecular species that differ in amino acid composition are known to be present as mammalian metallothionein, only one isomethalothionein was present and induced in the liver and kidneys of *Xenopus*. iii) *Xenopus* metallothionein was highly susceptible to oxidation and the metals bound to metallothionein were less stable compared to those in rat metallothionein.

1. はじめに

両生類はせきつい動物の系統発生的な面からみると、無顎類、魚類から両生類を経ては虫類、鳥類そしては哺乳類へと進化したとされている中で、水中のみの生活から陸上の生活にも適応できるようになった動物として重要な地位を占めている。また両生類は少なくともその生活史の一時期を必ず水中でそれも淡水の水環境で過ごさなければならない動物である。淡水の水界生態系を構成する動物としては両生類は最も進化している動物と言えるであろう。そのことは水界生態系を構成する動植物の内では、食物連鎖という観点からみても最も高位にあると考えられる。しかし両生類が水界生態系の汚染によってどのような影響を受けるかという観点からの研究は少ない。

現存する両生類は大きくは無尾類、有尾類と無足類に3大別されるが、それらの内で最も種類が多いものは無尾類、いわゆるカエルである。今回このカエルを用いて重金属が両生類にどのような影響を与えるか検討した。両生類の飼育には、一般的には水と陸の二つの環境が必要とされる。また一般的にみられるカエルは舌を使って陸上の動く小動物を捕捉し食する。そのため餌としては生きていた小動物を供しなければならず、実験動物として飼育するのはそれほど容易でない。このようなカエルの内でも、無舌亜目に属するカエルはその命名からわかるように舌がない。この類のカエルは、無尾類のなかでは進化が遅れており、幼生いわゆるオタマジャクシのときから、成獣いわゆるカエルに至る全生涯を水中で過ごし、陸上で生活をしない。また舌がないため、水中の餌を前足を使って口にかきこむようにして食する。そのため餌としては顕舌亜目のカエルのように必ずしも生きていたえさを必要とせず、ほ乳動物の肝臓などでも飼育できる。そのため他のカエルと比べると実験動物としてははるかに飼育しやすい。このような理由から両生類の中では無尾類の無舌亜目に属するアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*, ゼノパスと一般的に呼ばれることもある) が最もよく実験動物として用いられている。

本実験においては、食物連鎖実験のモデルとして、カドミウムを蓄積させたウサギの肝臓を与え、そのカドミウムがどのようにアフリカツメガエルに蓄積されるのか。またアフリカツメガエルの肝臓や腎臓中の必須金属にはどのような影響を与えるかという点を調べた。次に肝臓や腎臓

中ではカドミウムやそれに類似した金属である亜鉛と銅がどのような存在状態をとっているかという点を明らかにした。

カドミウムは動物の肝臓や腎臓に蓄積することが知られており、そのような臓器中ではメタロチオネインと呼ばれるタンパク質に結合しているために毒性を示さないとされている¹⁾。メタロチオネインはこのようにカドミウムなどの解毒に関与するタンパク質として注目されるとともに、銅や亜鉛のような生体に必須な重金属の生体内の代謝に関与しているタンパク質としても注目されている²⁾。メタロチオネインは最初にウマの腎皮質に存在するカドミウムと亜鉛の結合タンパク質として発見されたが、その後広くほ乳動物一般の臓器にも存在することが明らかにされた³⁾。さらに鳥類や魚類などのせきつい動物を始め、無せきつい動物や微生物、高等植物にもメタロチオネインないしメタロチオネイン様タンパク質が存在または誘導されることが知られている⁴⁾。しかし両生類にメタロチオネインが存在するかどうか、また存在する場合、そのタンパク質としての性質や特徴が他のメタロチオネインとどのような関連にあるのか、そしてせきつい動物の系統発生という観点からみたとき、魚類や鳥類、ほ乳類との関連はどのようになっているか、などの点は全く検討されていない。本実験においては、両生類の重金属に対する耐性機構を明らかにする上で、メタロチオネインがどのような役割りをになっているかという点を、両生類のメタロチオネインの性質を明らかにする過程で検討することも意図した。

2. 実験方法

雌性（体重約90g）と雄性（体重約50～55g）のアフリカツメガエル（推定年齢約3年）を購入し、プラスチックのケージ（ラット飼育用ケージ、30×35×18cm）にくみ置き水道水約10lを入れ、1ケージ当たり10匹ずつ室温（約24℃）で飼育した。水は2～3日に1度交換した。

食物連鎖モデル実験としてはウサギ（雌性、体重3～4kg）にカドミウムを投与し（塩化カドミウムをカドミウムとして0.5mg/kg体重、12回/2週間、皮下投与）、最終投与3日後に屠殺して得た肝臓を用いた。アフリカツメガエル10匹当たり20g（約3～5mm角に細切したもの）を2日ごとに与えた。コントロール群にはカドミウムを投与していないウサギの肝臓を同様に与えた。コントロール群及びカドミウム投与群のウサギの肝臓中のカドミウムなどの金属濃度を表1に示す²⁾。カドミウムを投与したウサギの肝臓中のカドミウムはほとんどメタロチオネインに結合していたため、この群の餌をメタロチオネイン（MT）含有ウサギ肝臓とした。

表1 アフリカツメガエルの飼料として用いたウサギの肝臓中の金属濃度²⁾

	Cd	Zn	Cu	Fe	Ca	Mg
Control	N. D.	32.0	3.66	70.8	n. d.	160
MT-containing	121	92.0	5.37	64.8	9.48	154

μg/g 湿重量；N. D., 検出限界以下；n. d., 未測定。

アフリカツメガエルの肝臓と腎臓中の金属濃度は各組織から約0.2gをとり、1 mlの混酸（硝酸：過塩素酸＝5：1 V/V）で湿式灰化した後に、蒸留水で5 mlに希釈したものを試料とした。原子吸光分光器（AAS, 日立 AA170-50A）（アセチレンガスを使用）により各金属濃度を測定した。

ウサギの肝臓及びアフリカツメガエルの肝臓と腎臓中のカドミウム、亜鉛と銅の分布は、各臓器を5倍量の0.1M トリス塩酸緩衝液（pH7.4, 0.25M グルコース含有、溶存酸素は使用前に窒素ガスを通気することにより除去）中、氷冷下窒素ガス気流中でテフロン-ガラス製のホモジナイザーを用いてホモジナイズし、170,000gで1時間超遠心した上清を用いて調べた。

臓器の上清中の金属の分布は、SW カラム（東洋曹達製、7.5×75mmのプレカラム付のTSKgel G3000SW, 7.5×600mm）を装着した高速液体クロマトグラフ（HPLC）の検出器としてAASを用いるHPLC-AAS法によった。上清0.1mlをカラムに添加し、脱気した50mM トリス塩酸緩衝液（pH8.0）を流速1.0ml/分で溶出させた。254と280nmの吸収はフローセルを用いて紫外検出器（アルテックスモデル152）によって連続的に検出し、金属濃度はカラム溶出液を直接AASに導くことによって連続的に検出した。

3. 結果

（1）食物連鎖モデル実験

食物連鎖モデルとしてカドミウムをメタロチオネインとして含むウサギの肝臓を、アフリカツメガエルに投与した。そのとき用いたウサギ肝臓の上清中のカドミウムの分布は、図1に示すようにほとんどメタロチオネインに結合していた²⁾。飼料のウサギ肝臓中では2種類のイソタンパク質に結合しているカドミウムも、カエルから排せつされたときには図1にみられるように、SWカラム上ブロードなピークを示す複雑な化合物に変化していた²⁾。このときのカエルの肝臓と腎臓中の金属濃度を調べた結果を表2に示す²⁾。カエル1匹当たりでは約2.2mgのカドミウムを与えたにもかかわらず、肝臓と腎臓に蓄積したカドミウムはカエル1匹につきそれぞれ約1.0と0.5 μ gであり、ほとんどのカドミウムが排せつされていることを示した。また表2にみられるように両臓器中の亜鉛、銅、鉄、カルシウム及びマグネシウムの濃度と含量にもほとんど影響がみられなかった²⁾。肝臓中の銅はカドミウム含有飼料を与えた群で下っていたが、動物の個体差が著しく、他の実験結果を考慮に入れると本実験で有意な差がみられたのは偶然である可能性が高い。

（2）カドミウムの投与によるカドミウム結合タンパク質の誘導と必須金属濃度への影響

カエルへの食物連鎖によるカドミウムの蓄積が少なく、肝臓と腎臓中のカドミウムの存在状態を明らかにできなかったため、非経口的にカドミウムを投与することにより、カドミウムの分布を調べた。図2に示したように、カドミウム塩を投与すると、SWカラム上でメタロチオネイン分画にあたる位置に主なカドミウムのピークがみられた²⁾。またカドミウムをメタロチオネインとし

て含む溶液を非経口的に投与すると図 2b のようなカドミウムの分布がみられた²⁾。図 2a はカドミウム塩の投与によってアフリカツメガエルにメタロチオネインと思われるタンパク質が誘導されることを示唆している。また図 2b はラットなどにメタロチオネインを投与した場合との比較から、投与したメタロチオネインの一部が分解されるとともに、カエルのメタロチオネインとみなされるタンパク質が誘導されつつあることを示している²⁾。

アフリカツメガエルにラットの肝臓から分離したメタロチオネインを非経口的に投与したときに、カエルの肝臓や腎臓中の金属濃度はどのような影響を受けるか明らかにしたものが表 3 である²⁾。またカドミウム塩をカエルに連続投与したときの肝臓と腎臓中の金属濃度については表 4 に示した²⁾。表 3 にみられるようにカドミウムをメタロチオネインに結合させて投与するとカドミウムは腎臓に選択的に蓄積する。一方カドミウム塩を連続投与するとカドミウムは肝臓と腎臓に蓄積し、前者への蓄積では雌雄の差はみられなかったが、後者への蓄積では雌雄で差がみられた(表 4)²⁾。またカドミウムが蓄積してもそれに伴った亜鉛や銅の蓄積はみられず、ほ乳動物において一般的にみられる結果とは異なっていた¹⁾。

カドミウム塩を連続投与したときの肝臓上清中のカドミウムの分布を図 3 に示す²⁾。図 2a に示

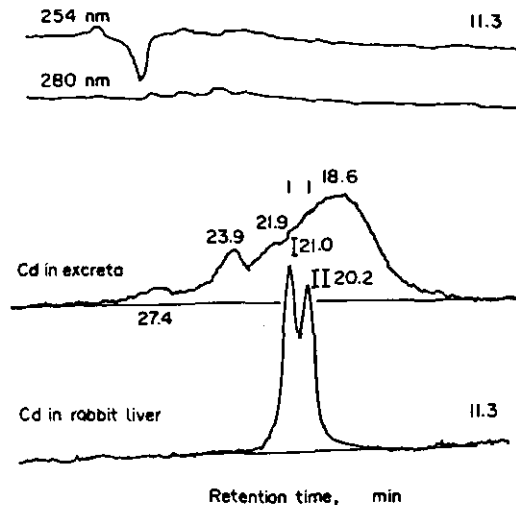


図 1 カエルの飼料として用いたウサギ肝臓の上清中のカドミウムの分布とカドミウムを含むウサギ肝臓を与えたカエルの排せつ物中のカドミウムの分布²⁾
MTを含むウサギ肝臓細片をカエルが完全に食した後に飼育水を交換し、その24時間後の飼育水を実験に用いた。飼育水の上清(2300g, 10分間)をダイアフローUM-10膜を用いた限界ろ過法により10倍に濃縮した。ろ過液中のCdは飼育水中に存在した量の3%以下であった。濃縮液0.1mlをSWカラムに添加した。下側のCdの図はMTを含むウサギの肝上清中のCdの溶出図を示す。IとIIはそれぞれMT-Iと-IIを示す。

表2 コントロール及びカドミウムを含むウサギの肝臓を与えたカエル肝臓と腎臓中の金属濃度²⁾

	Body wt(g)		Liver to		Liver											
	Before	After	Liver wt	body wt	Cd		Zn		Cu		Fe		Ca		Mg	
			wt (g)	ratio (%)	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Control	51.3 (7.2)	54.6 (7.2)	2.79 (1.04)	4.50 (1.04)	0.16 (0.03)	0.45 (0.16)	12.3 (1.0)	27.2 (5.1)	12.2 (6.7)	31.9 (18.6)	319 (111)	777 (182)	6.58 (1.63)	18.3 (1.0)	126 (11)	281 (49)
MT-containing liver	52.2 (3.3)	52.4 (4.6)	2.35 (0.56)	4.54 (0.94)	0.53 (0.10)	1.41 (0.37)	13.7 (1.3)	36.7 (6.6)	4.45 (1.46)	12.1 (3.7)	264 (70)	686 (118)	7.18 (1.54)	18.6 (2.2)	129 (8)	342 (38)

	Kidney to		Kidney											
	Kidney wt	body wt	Cd		Zn		Cu		Fe		Ca		Mg	
	(g)	ratio (%)	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Control	0.227 (0.039)	0.433 (0.072)	0.34 (0.14)	0.07 (0.02)	19.6 (2.3)	4.21 (0.57)	2.08 (0.19)	0.48 (0.03)	82.9 (8.7)	17.8 (2.4)	75.0 (33.8)	15.4 (5.1)	130 (18)	28.0 (5.1)
MT-containing liver	0.226 (0.046)	0.431 (0.089)	2.56 (1.17)	0.55 (0.17)	22.9 (3.3)	5.30 (0.96)	2.61 (0.40)	0.60 (0.11)	86.4 (23.4)	18.8 (3.4)	70.4 (39.1)	15.4 (7.8)	123 (19)	28.2 (4.9)

雄性のカエルにコントロール又はMTを含有するウサギの肝臓を与えた。値は5試料の平均±標準偏差で示した。体重は給飼実験の直前と直後で測定した。A, $\mu\text{g/g}$ 湿重量で示した金属濃度, B, μg /全組織として示した金属含量。

した腎臓上清中の分布と全く同じパターンを示しており、カドミウムはメタロチオネイン分画に254nmの吸収を伴って溶出された。また図3に示したメタチオネイン様タンパク質の熱に対する安定性を調べるため、図3に用いた上清を80°C10分間熱処理した結果を図4に示した。メタロチオネイン分画のカドミウムのみが残っており、このタンパク質が熱に対して安定であることを示していた。

(3) カドミウム結合タンパク質のメタロチオネインとしての同定

カドミウム塩の連続投与によってアフリカツメガエルの肝臓と腎臓中にメタロチオネインと思われるカドミウム結合タンパク質が誘導されることが示された。このカドミウム結合タンパク質がメタロチオネインであるかどうかという点を明らかにするため以下の実験を行った。ほ乳動物ではカドミウム以外の重金属で亜鉛と銅によってメタロチオネインが誘導されることがよく知られている¹⁾。そこでアフリカツメガエルにも亜鉛塩と銅塩を投与し、肝臓と腎臓中の金属濃度の変化を調べるとともに、それら臓器中の亜鉛と銅の分布についても検討した。表5に示したように亜鉛投与によって肝臓と腎臓中の亜鉛濃度は増加したが、特に肝臓中の銅濃度は有意に低下し、金属間の相互作用がみられた。また銅を投与すると両臓器中の銅濃度が増加したが、肝臓中ではコントロールのカエルでもかなり銅濃度の高い個体が存在するとともに投与群でも個体差が著しいため、有意な変化としては観察されなかった。また亜鉛濃度への影響はいずれの臓器において

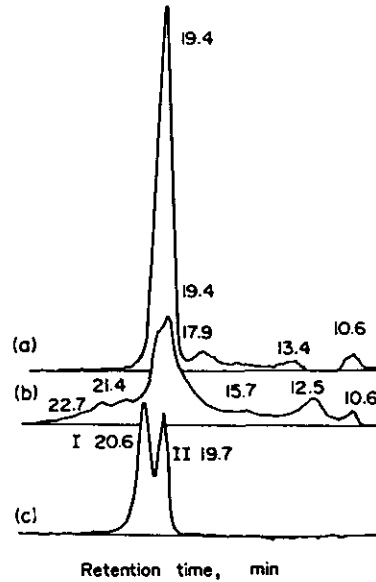


図2 カドミウム塩(a)とメタロチオネイン(b)を投与したカエル腎臓中の上清並びに投与したメタロチオネイン溶液中のカドミウムの分布²⁾
 カエルに Cd^{2+} (a)または MT(b)を筋注した。腎臓を5倍量の0.1M トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)中でホモジナイズし、そのホモジネートを170000g 1時間超遠心した。上清(a, b)と注射に用いた MT 溶液(c)を0.1ml ずつ SW カラムに添加した。I と II はそれぞれラット肝の MT-I と-II を示す。またカラムの排除容量は保持時間10.6分に相当する。

も見いだされなかった。

コントロールのカエルの肝臓上清中にも、メタロチオネインと推定されるカドミウム結合タンパク質と同じ溶出位置に銅のピークが見いだされた(図 5B)⁴⁾。この銅のピークは亜鉛を投与すると肝臓中の銅濃度が低下するのに伴って小さくなったが、同じ溶出位置に亜鉛のピークが増加した(図 5C, 5D)。また銅を投与した肝臓の上清中にメタロチオネイン分画中の銅のピークが増加しており(図 5E)、肝臓中の亜鉛と銅濃度の増減がメタロチオネイン分画中の両金属によることが示された⁴⁾。コントロールの肝臓中の銅濃度はカエルの個体による差が著しいことを述べたが、これらカエルの各個体の銅濃度も、上清のメタロチオネイン分画中の銅ピークの大小と密接な関連があることも確認した。

ほ乳動物のメタロチオネインに結合している亜鉛はカドミウムを添加するだけで容易に置換される。また亜鉛とカドミウムは銅によって容易に置換される。このようにメタロチオネインに結合している金属は、より親和性の高い金属によって容易に置換されるという他の金属タンパク質にはみられない特徴を有する⁵⁾。そこでアフリカツメガエルのメタロチオネイン分画中にみられる

表3 ラットの肝臓のメタロチオネインを投与したカエルの肝臓中の金属濃度²⁾

	Body wt(g)		Liver to		Liver											
	Before	After	Liver wt(g)	body wt ratio (%)	Cd		Zn		Cu		Fe		Ca		Mg	
					A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Control	55.7 (6.2)	53.9 (5.7)	1.23 (0.17)	2.30 (0.31)	0.26 (0.07)	0.30 (0.05)	15.0 (1.5)	17.7 (2.2)	30.0 (40.2)	32.4 (39.1)	822 (156)	960 (132)	8.10 (1.28)	9.50 (1.21)	168 (6)	199 (24)
MT single injection	56.1 (5.4)	53.4 (5.2)	1.42 (0.31)	2.65 (0.64)	0.83 (0.25)	1.19 (0.41)	15.2 (1.5)	21.4 (3.7)	26.6 (15.5)	37.0 (22.9)	534 (136)	744 (173)	6.71 (0.69)	9.52 (1.86)	159 (9)	277 (49)

	Kidney to		Kidney											
	Kidney wt(g)	body wt ratio (%)	Cd		Zn		Cu		Fe		Ca		Mg	
			A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Control	0.150 (0.026)	0.278 (0.031)	0.60 (0.21)	0.09 (0.03)	17.3 (1.4)	2.50 (0.27)	9.15 (1.73)	1.33 (0.29)	140 (15)	20.2 (2.9)	92.6 (81.9)	13.4 (12.1)	167 (14)	24.1 (2.3)
MT single injection	0.175 (0.003)	0.326 (0.043)	68.2 (15.5)	11.2 (1.5)	16.4 (1.3)	2.76 (0.44)	24.3 (7.6)	4.10 (1.36)	127 (15)	21.8 (5.8)	57.2 (96.9)	10.6 (18.6)	146 (11)	24.7 (4.0)

Zn と Cu を Cd の 2% 以下含んでいるラットの肝 MT を雄性のカエルに、MT 中の Cd とし て 0.3mg/kg 体重を 1 度筋注し、その 26 時間後にと殺した。コントロールのカエルには蒸留水 (0.1ml/カエル) を投与した。値は 5 試料の平均±標準偏差として示した。A、 $\mu\text{g/g}$ 湿重量で示した金属濃度、B、 μg /全組織として示した金属含量。

亜鉛、カドミウム及び銅ピークについても、金属の置換実験を行い、これらのピークがメタロチオネインに結合している金属によるものかどうか検討した。図 6 に示したように、アフリカツメガエルの肝臓上清のメタロチオネイン分画に存在する亜鉛のピークはカドミウム (A, B, C,) 及び銅 (D, E) によって容易に置換されること、またカドミウムは銅 (E, G, H) によって置換されることが明らかとなった⁴⁾。

アフリカツメガエルのメタロチオネインは試料を保存中、SW カラム上の挙動が変化することが観察され、ラット等のほ乳類のメタロチオネインに比べて不安定であることが推定された。そこでどのような条件のもとで、どのような変化が起こるかという点を明らかにするための実験を行った。図 7 に示すように酸素が存在し、温度が高い状態に保つと、新鮮な試料では、単一なカドミウムのピークとして観察されるものが、2 個のピークへと変化することが明らかとなった⁴⁾。SW カラム上でより遅く溶出されるような変化は、ラットのメタロチオネインでは分子内酸化によって説明されている⁵⁾。図 7 にみられる変化も分子内酸化によるジスルフィド結合が関与しているものと推定された。またこのような分子内酸化がアフリカツメガエルのメタロチオネインでは容易に起こるため、試料の調製等には特別な注意が必要となった。

(4) アフリカツメガエルのメタロチオネインの性質

アフリカツメガエルのメタロチオネインの性質が以上のようにいくつかの点では乳動物のもの

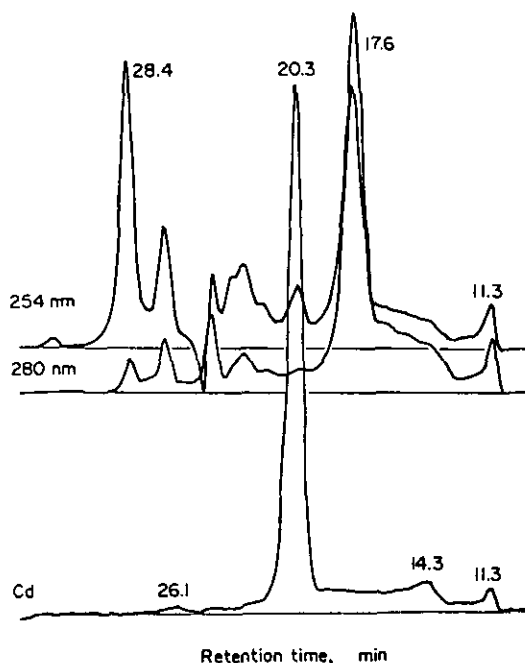


図3 カドミウム塩を投与したカエルの肝臓上清中のカドミウムの分布²⁾
 カエルに Cd^{2+} を 0.5mg Cd/kg 体重ずつ6回筋注射し、最終投与4日後にと殺した。
 肝臓を5倍量の 0.1M トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) 中でホモジナイズし、 170000g で
 1時間超遠心した。上清 0.1ml を SW カラムに添加した。カラムの排除容量は 11.3
 分に相当する。

とは異なることが示された。せきつい動物の系統発生を考慮に入れたとき、両生類のメタロチオネインをどのように位置付けできるのか。またほ乳動物などの重金属に対する耐性機構との関連で、両生類のメタロチオネインがどのような役割を担っているのかという点を明らかにする目的で、アフリカツメガエルのメタロチオネインの性質をさらに検討した。

図8に示した図は、これまでのメタロチオネインの分離に最もよく用いられてきたセファデックス G-75カラム上で、ラットのメタロチオネインとアフリカツメガエルのメタロチオネインの溶出パターンを比較したものである⁹⁾。この図ではアフリカツメガエルのメタロチオネインの方がわずかに早く溶出され、分子量がラットのものよりもわずかに大きいことが示唆された。さらにセファデックスカラムで分離したラットの亜鉛-チオネインとアフリカツメガエルのメタロチオネインを陰イオン交換カラム上で分離すると図9に示したような分離パターンを示した⁶⁾。この図はアフリカツメガエルのメタロチオネインの電荷がラットのものより負に荷電していることを示している。また分離操作中にアフリカツメガエルのメタロチオネイン中のカドミウムの一部がラットのメタロチオネイン中の亜鉛と置換してしまうことも示している。

アフリカツメガエルのメタロチオネインの分子量は図8などからも推定されるが、通常の子

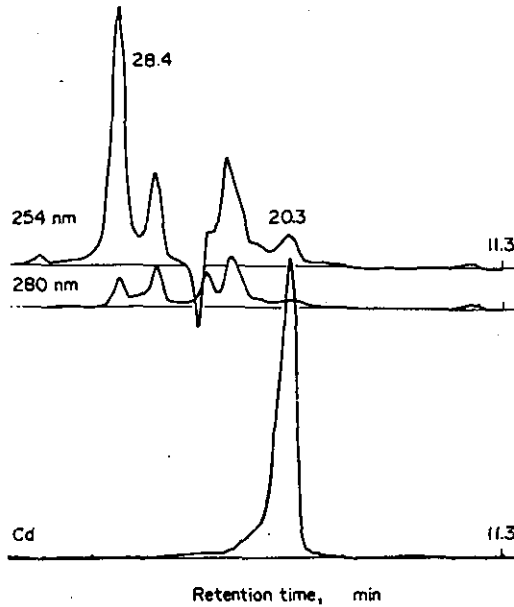


図4 カドミウム塩を投与したカエルの肝臓可溶性分画を熱処理した上清中のカドミウムの分布²⁾

図3に用いた肝上清を窒素気流下80℃で10分間熱処理し、それから10000gで1分間遠心した。熱処理した上清0.1mlをSWカラムに添加し、HPLC-AAS法でCdの分布を明らかにした。

量推定法に従った結果を図10に示す⁶⁾。

分子量がチトクロームCより大きいことが推定されたが、これはほ乳動物のメタロチオネインで見られるものと同じであった⁷⁾。またメタロチオネインに結合している金属の酸に対する安定性並びに250nm付近にみられる吸収がカドミウムとシステインのチオール基によるメルカプチド結合によるものであることを確認するための実験も行った。図11にみられるように250nm付近の吸収は溶液のpHを酸性側に低下させることにより消失し、この吸収帯がメルカプチド結合の電荷移動に由来することが明らかとなった。また280nm付近に吸収がみられず、芳香族アミノ酸が含まれていないという、メタロチオネインの一般的な性質をも示した⁶⁾。

精製したメタロチオネインのアミノ酸組成を調べたところ、表6に示すようにシステイン含量が高く、芳香族アミノ酸を含んでいないことが明らかとなった⁶⁾。このアミノ酸分析の結果も含めて、アフリカツメガエルにカドミウムを投与して得られるカドミウム結合タンパク質はメタロチオネインの性質をすべて備えていることが明らかとなった。

表4 カドミウム塩を連続投与したカエルの肝臓と腎臓中の金属濃度²⁾

	Body wt(g)		Liver to		Liver												
	Before	After	Liver wt(g)	body wt ratio (%)	Cd		Zn		Cu		Fe		Ca		Mg		
					A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
♂	Control	50.4 (4.4)	48.2 (4.4)	1.26 (0.38)	2.84 (0.64)	0.14 (0.03)	0.15 (0.02)	14.6 (2.3)	16.1 (3.7)	27.0 (15.2)	28.9 (14.5)	201 (46)	211 (23)	11.4 (4.7)	10.6 (1.9)	131 (15)	146 (32)
	Cd	55.4 (5.9)	55.8 (5.8)	1.32 (0.26)	2.40 (0.39)	33.9 (8.3)	42.0 (2.9)	15.7 (2.3)	19.9 (2.7)	16.4 (16.5)	21.8 (23.5)	177 (78)	220 (86)	5.91 (0.49)	7.74 (0.06)	132 (6)	169 (8)
♀	Control	96.6 (8.2)	95.6 (8.1)	2.74 (0.69)	2.86 (0.67)	0.17 (0.07)	0.41 (0.08)	13.6 (1.0)	35.0 (4.1)	21.9 (19.2)	50.4 (35.7)	169 (33)	503 (86)	8.73 (0.68)	24.2 (2.9)	140 (9)	335 (53)
	Cd	92.6 (6.9)	94.8 (6.7)	2.43 (0.63)	2.59 (0.71)	30.8 (8.6)	69.1 (6.1)	17.0 (1.4)	39.9 (8.9)	25.8 (18.1)	58.5 (38.1)	196 (34)	455 (94)	9.78 (1.33)	23.0 (6.5)	148 (7)	349 (87)

	Kidney to		Kidney												
	Kidney wt(g)	body wt ratio (%)	Cd		Zn		Cu		Fe		Ca		Mg		
			A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
♂	Control	0.165 (0.042)	0.346 (0.102)	0.38 (0.06)	0.06 (0.01)	20.3 (2.5)	3.49 (0.56)	2.62 (0.54)	0.44 (0.06)	172 (38)	29.0 (4.2)	64.1 (34.9)	10.7 (5.5)	134 (13)	23.0 (3.5)
	Cd	0.229 (0.030)	0.406 (0.068)	37.9 (6.6)	8.98 (2.15)	15.7 (1.4)	3.70 (0.64)	3.22 (0.73)	0.75 (0.12)	123 (20)	29.3 (8.1)	23.7 (9.6)	5.40 (1.76)	131 (7)	30.9 (4.3)
♀	Control	0.370 (0.058)	0.387 (0.066)	0.29 (0.05)	0.10 (0.02)	17.4 (1.0)	6.34 (0.93)	2.21 (0.73)	0.79 (0.23)	86.8 (12.8)	31.3 (2.5)	91.1 (56.8)	34.1 (20.3)	123 (5)	46.9 (6.7)
	Cd	0.341 (0.036)	0.361 (0.034)	25.2 (5.6)	8.77 (1.04)	17.7 (0.6)	6.30 (0.77)	4.12 (1.20)	1.44 (0.30)	91.7 (11.5)	32.7 (6.3)	44.0 (25.9)	16.3 (12.3)	122 (8)	43.2 (4.5)

雄性と雌性のカエルに Cd^{2+} を 0.5mg/kg 体重ずつ 6 回筋注した。コントロールのカエルには蒸留水 (0.1ml /カエル) を投与した。実験中は給飼しなかった。値は 5 試料の平均土標準偏差で示した。A, $\mu\text{g/g}$ 湿重量で示した金属濃度, B, μg /全組織で示した金属含量。

4. 考 察

汚染重金属の侵入経路としては、口、皮膚並びに気道が考えられるが、両生類の場合には前二者によるものが主たる経路であり、かつ重要と考えられる。経口による重金属の侵入の場合には食物と飲料水を通した侵入に分けることができるが、特に後者の場合に皮膚を通した影響と区別できない可能性が高い。今回の実験では食物中に含まれるカドミウムの影響を調べることを主目的としたため、動物性の食物中のカドミウムの存在形態として最も可能性の高い、メタロチオネインに結合したカドミウムについて検討した。その結果ウサギの肝臓中に存在するメタロチオネインに結合したカドミウムはほとんどカエルの体内には残留せず、排せつされてしまうことが明らかとなった。またこのような存在形態をとっているカドミウムを投与しても肝臓や腎臓中の必須金属濃度にはほとんど影響を与えないことも明らかになった。

魚類については汚染重金属の主たる侵入経路は一般的には、えら、次いで消化管とされている。両生類の場合にはえらからの侵入はないが、それに代わって皮膚からの侵入を考えなければなら

表5 亜鉛塩及び銅塩を連続投与したカエルの肝臓と肝臓中の金属濃度⁴⁾

	Body wt(g)		Liver to		Liver											
	Before	After	Liver body wt wt(g)	ratio (%)	Cd		Zn		Cu		Fe		Ca		Mg	
					A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Control	55.7	53.9	1.23	2.30	0.26	0.30	15.0	17.7	30.0	32.4	822	960	8.10	9.05	168	199
	6.2	5.7	0.17	0.31	0.07	0.05	1.5	2.2	40.2	39.1	156	132	1.28	1.21	6	24
Zn	57.7	56.6	1.58	2.79	0.12	0.18	35.8	55.8	6.92	11.9	617	950	7.79	12.0	162	250
	7.3	6.7	0.22	0.31	0.04	0.07	5.5	11.5	6.75	14.3	122	229	1.30	2.9	2	45
Cu	56.2	54.4	1.51	2.78	0.15	0.25	17.8	27.7	41.5	67.8	678	1080	7.03	11.1	167	260
	5.1	5.2	0.21	0.24	0.06	0.12	3.7	6.5	24.9	47.7	140	335	0.72	2.6	14	33

	Kidney body wt wt(g)		Kidney to		Kidney											
			Kidney body wt ratio (%)		Cd		Zn		Cu		Fe		Ca		Mg	
					A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Control	0.150	0.278	0.60	0.09	17.3	2.50	9.15	1.33	139	20.2	92.6	13.4	167	24.1		
	0.026	0.031	0.21	0.03	1.5	0.27	1.73	0.29	15	2.9	81.9	12.1	14	2.3		
Zn	0.197	0.349	0.33	0.06	53.6	10.0	7.08	1.33	102	19.0	334	57.0	155	29.1		
	0.037	0.053	0.06	0.01	6.3	1.5	0.60	0.18	18	3.3	380	64.0	7	4.5		
Cu	0.188	0.337	0.38	0.08	15.8	3.15	28.7	5.59	114	22.6	141	29.1	155	31.1		
	0.028	0.042	0.19	0.05	1.3	0.61	4.4	0.52	19	5.8	136	30.1	15	7.6		

各群10匹の雄性のカエルに蒸留水（コントロール，0.1ml），酢酸亜鉛（Zn，5 mg Zn/kg 体重）と塩化銅（Cu，1 mg Cu/kg 体重）を毎日5日間筋注し，最終投与1日後にと殺した。実験中は給飼しなかった。値は5試料の平均±標準偏差で示した。

A：μg/g 湿重量で示した金属濃度 B：μg/全組織で示した金属含量

ない。全生活史を水中で過ごすアフリカツメガエルの場合には，特に皮膚からの侵入が重要な問題となると考えられ，今後の検討課題となった。

アフリカツメガエルの肝臓中には銅が多く含まれているとともに，各個体によってその濃度が著しく異なることがわかったが，その原因については不明である。しかし肝臓中の銅濃度の高低が，メタロチオネインに結合している銅量，したがってメタロチオネイン量に依存していることが示され，重金属の代謝とメタロチオネインが密接に関連していることが両生類においても示唆された。

せきつい動物のメタロチオネインの内では，ほ乳動物のものが最もよく検討されている¹⁾。ほ乳動物のメタロチオネインは61個のアミノ酸で構成されており，その内の20個までをシステインが占めている。このメタロチオネインにはシステイン以外のアミノ酸組成が異なる2種類のイソタンパク質が存在することが知られている。ほ乳動物以外のせきつい動物としては鳥類でニワトリ⁷⁾やウズラ⁸⁾など，魚類でヒラメ⁹⁾，コイ¹⁰⁾，ウナギ¹¹⁾，カツオ¹²⁾，サケ¹³⁾，フナ¹⁴⁾などのメタロチオネインが明らかにされている。しかし両生類のメタロチオネインについては本報告が初めてであり，系統発生的にみても興味ある結果が得られた。

魚類のメタロチオネインに関しては分子種が1種類のもの（ヒラメ，サケ）と2種類のもの（コ

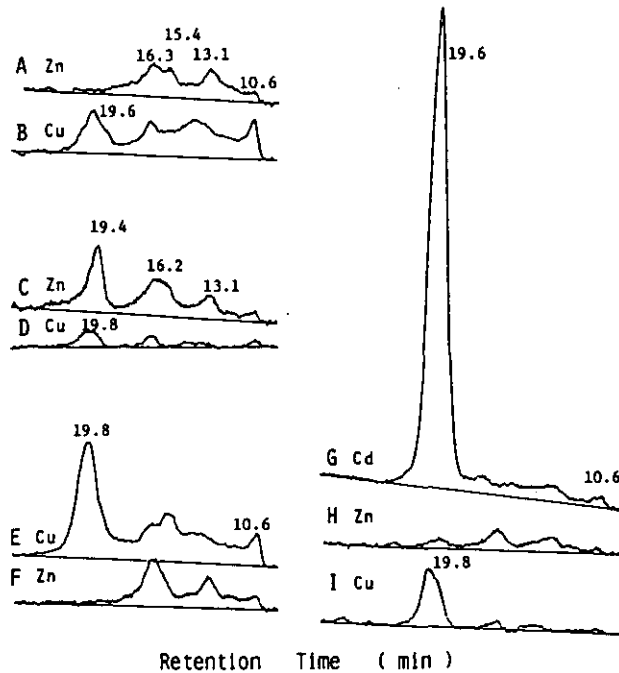


図5 蒸留水、亜鉛塩、銅塩及びカドミウム塩を投与したカエルの肝臓上清中の亜鉛、銅カドミウムの分布⁴⁾

表5に示した肝臓上清中のZnとCuの分布をHPLC-AAS法によって求めた。図G、HとIは塩化カドミウム(0.5mg Cd/kg体重、12日間に10回)を20匹の雌性のカエル(肝臓中のCdの濃度は、 $57.4 \pm 5.8 \mu\text{g/g}$ 湿重量)に投与することによって得た肝臓の上清の分布図を示す。カラムの排除容量は10.6分に相当する。

イ、ウナギ、カツオ、フナ)が存在し、魚類の内の進化の程度と関係があるかどうか興味のあるところである。アフリカツメガエルでは分子種が1種類であったが、他のカエルではどのようになっているか。カエルの進化との関連があるかなどについても興味ある問題を提起している¹⁵⁾。

5. まとめ

淡水の水界生態系を構成する動物の内では高等動物に属する両生類に対する重金属の影響を検討した。両生類の内では最も実験動物化されているアフリカツメガエルを用い、食物連鎖モデルによるカドミウムの蓄積と存在状態並びに必須金属濃度への影響を明らかにした。動物体内ではカドミウムはほとんどメタロチオネインに結合しているため、ウサギにカドミウムを投与し、肝臓にカドミウムをメタロチオネインとして蓄積させた後、その肝臓をアフリカツメガエルに与えた。カエルの肝臓と腎臓に蓄積されたカドミウム量は極めて低く、大部分が排せつされていた。また肝臓と腎臓中の必須金属濃度への影響はみられなかった。

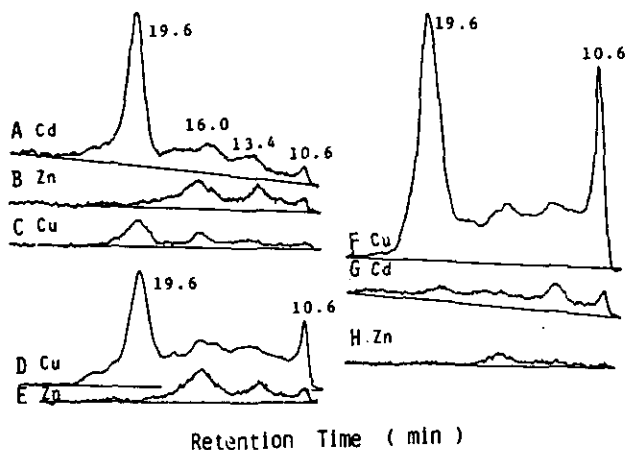


図6 亜鉛を投与して得た肝上清中の亜鉛をカドミウム (A, B, C) と銅 (D, E) で、またカドミウムを投与して得た肝上清中のカドミウムを銅 (F, G, H) で置換したときの亜鉛、銅及びカドミウムの分布の変化⁴⁾

図5の溶出図CとD (ZnとCuの濃度はそれぞれ2.88と0.37 $\mu\text{g/ml}$)に相当する肝上清中に、2 mol当量のCd (A, B, C) 又はCu (D, E) を窒素気流下に添加し、10分間放置した。図5の溶出図G, HとI (Cd, Zn, Cuの濃度はそれぞれ10.9, 2.99と1.37 $\mu\text{g/ml}$)に相当する肝上清に、上清中のCdに対して2 mol当量のCu (F, G, H)を添加した。図5の溶出図CとDは、*in vitro*でCdを添加することにより、図6 A, B, Cに変化した。また *in vitro*でCuを添加することにより図6 DとEのように変化した。図5の溶出図G, HとIは図6 F, GとHに変化した。カラムの排除容量は10.6分のピークに相当する。

アフリカツメガエルの肝臓中の銅濃度には通常のものでも著しい個体差がみられたが、この銅濃度はメタロチオネインに結合した銅量に依存した。カドミウム、銅及び亜鉛を投与すると肝臓と腎臓にメタロチオネインが誘導された。アフリカツメガエルのメタロチオネインをほ乳動物のメタロチオネインと比較した結果、以下の点が明らかにされた。i)分子量はゲルクロマトグラフィでは、ほ乳類のメタロチオネインよりわずかに大きいことを示したが、アミノ酸分析の結果では逆にわずかに小さい可能性を示した。ii)イソタンパク質の分子種はほ乳動物などが2種類存在するのは違って1種類しか存在しなかった。iii)アフリカツメガエルのメタロチオネインは酸化的变化を受けやすく、また結合している金属の安定性も、ラットのメタロチオネインより低かった。

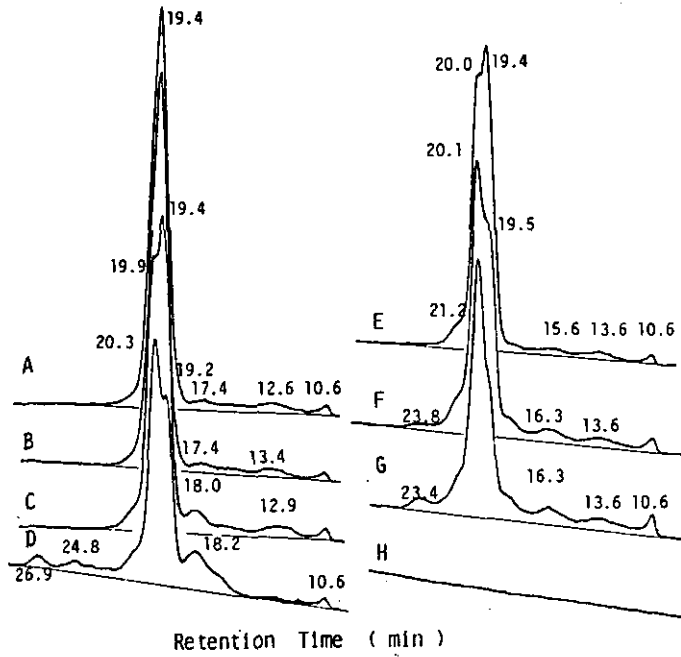


図7 カドミウム塩を投与したカエルの肝臓上清中のメタロチオネインの分解に伴ったカドミウムの分布の変化⁴⁾

図5の溶出図Gに相当する上清中のCdの溶出図は下記表に示した条件で保存することにより図のように変化した。

Profile	A	B	C	D	E	F	G	H
Temperature (°C)	-20	-20	+20	+20	+20	+20	+20	+20
Sealed gas	N ₂	O ₂	N ₂	N ₂	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂
Duration (days)	8	8	1	8	1	2	3	8

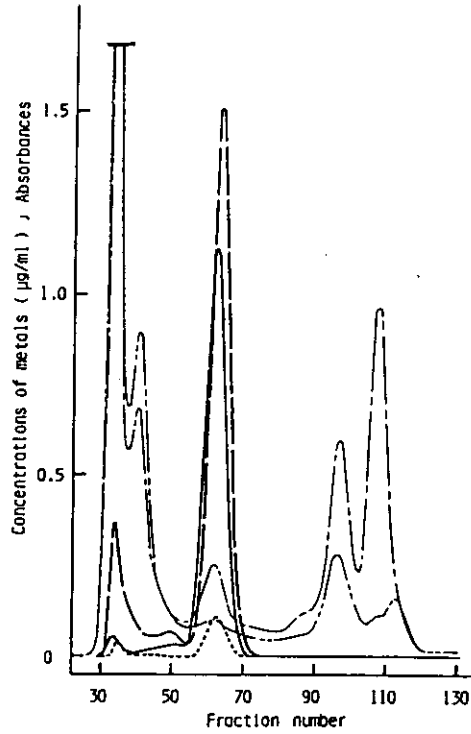


図8 セファデックスカラムによるカドミウムを投与したアフリカツメガエルの肝上清とラットの亜鉛-チオネインのクロマトグラム⁹⁾

カエルにカドミウムを筋注し、肝臓を4倍量の0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4, 0.25M グルコース含有) 中でホモジナイズ後、170000g で60分間超遠心した。上清 5 ml をラットの Zn-チオネイン (Zn を 50µg 含む) と混合し、セファデックス G-75カラム (2.6×90cm) に添加した。カラムを 10m M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) で溶出し、5 ml ずつ分取した。各フラクションの Cd, Zn と Cu の濃度を原子吸光法 (日立170-50A) で測定した。254と280nm の吸収は分光器 (日立220) でモニターした。Cd (—), Zn (---), Cu (····), 254nm (——), 280nm (-----)

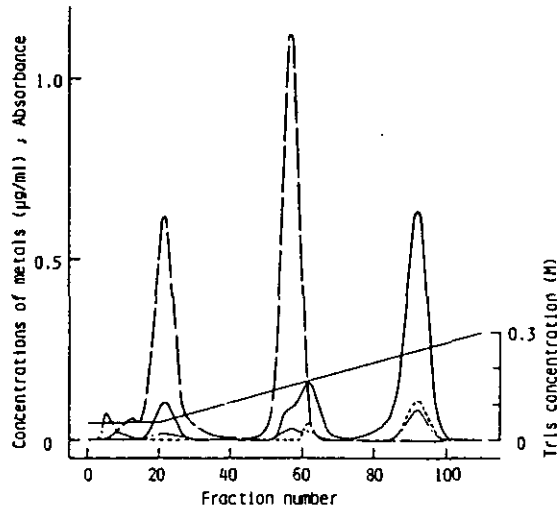


図9 DEAE セファデックスカラムによるアフリカツメガエルとラットのメタロチオネインのクロマトグラム⁶⁾

セファデックス G-75カラムで分離したカエルの Cd, Cu-チオネインとラットの Zn-チオネインを混合し, DEAE セファデックス A-25カラム (1.6×20cm) に添加した。両チオネインはトリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) の75から300m M までの直線的濃度こう配により溶出させ, 3 ml ずつ分取した。Cd, Zn と Cu の濃度は原子吸光法で測定した。Cd (——), Zn (— — —), Cu (·····), 254nm (——)

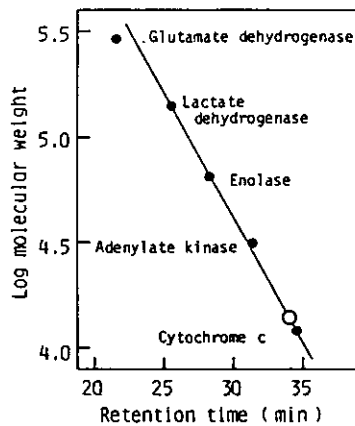


図10 アフリカツメガエルの分子量の推定⁶⁾

カエルのメタロチオネインとその分子内酸化生成物をマーカートンパク質とともに TSKgel G 3000 SW カラム (7.5×75mm のプレカラム付のカラム, 7.5×600mm) に添加した。カラムは0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0, 0.2M NaCl 含有) を流速0.7 ml/分で流した。白丸はカエルのメタロチオネインを示す。分子内酸化生成物は元のメタロチオネインと同じ位置に溶出された。

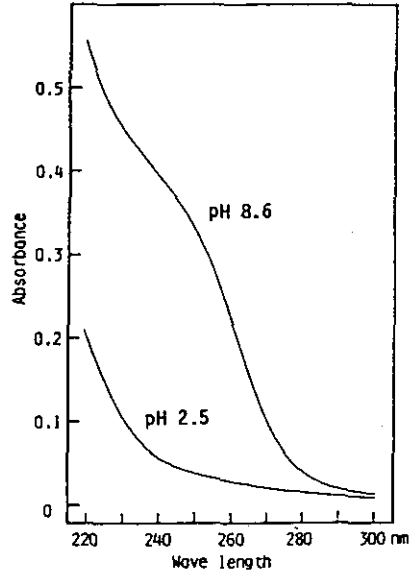


図11 アフリカツメガエルのメタロチオネインの吸収スペクトルの pH 依存性⁶⁾

精製したカエルのメタロチオネイン (pH8.6の10mM トリス塩酸緩衝液 2 ml 中に Cdを5.7 μ g 含む) の紫外吸収スペクトルを日立220型分光器で測定した。1 N 塩酸溶液により pH2.5に調整した。

表6 アフリカツメガエルのメタロチオネインのアミノ酸組成と金属含量^{a)}

Amino acid composition	Mol% ^a	Residues ^b Molecule
Aspartic acid	6.7	3.9
Threonine	5.5	3.2
Senine	13.1	7.7
Glutamic acid	7.2	4.2
Proline	2.8	1.6
Glycine	6.6	3.9
Alanine	3.4	2.0
Valine	1.2	0.7
Half-cystine	38.9	22.9
Methionine	1.7	1
Isoleucine	-	-
Leucine	0.7	0.4
Tyrosine	-	-
Phenylalanine	-	-
Lysine	11.1	6.5
Histidine	1.1	0.6
Arginine	-	-
Metal content (mol%) : Cd 93.3, Zn -, Cu 6.7		
SH/metal ratio : 2.7		

a. 37 μ g の Cd を含むカエルのメタロチオネインを 6 N の塩酸 0.5ml 中で 110°C, 20 時間加水分解した。half-cystine とメタロチオネインは過ギ酸酸化後分析した。値は全残基に対する % で示した。

b. メチオニンを 1 分子当たり 1 残基存在すると仮定した。

謝 辞

本研究は当研究所の久保田憲太郎環境生理部長並びに東邦大学理学部の滝本道明教授の励ましのもとに、東邦大学理学部の田中康宣並びに秋富博之の両君が卒業論文の一部として行ったものである。これらの人々並びに河村涼子博士に深甚なる謝意を表す。また発光分光法による金属濃度の測定は当研究所計測技術部の西川雅高氏によるものである。同氏に対して感謝します。

引用文献

- 1) Kägi J. H. R. and M. Nordberg., eds, (1979) : "Metallothionein". Basel, Birkhäuser Verlag, 378p.
- 2) Suzuki K. T. and Y. Tanaka (1983) : Induction of metallothionein and effect on essential metals in cadmium-loaded frog *Xenopus laevis*. Comp. Biochem. Physiol., 74C, 311-317.
- 3) Suzuki K. T. (1980) : Direct connection of high-speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis : metallothionein. Analyt. Biochem., 102, 31-34.
- 4) Suzuki K. T., Y. Tanaka and R. Kawamura (1983) : Properties of metallothionein induced by zinc, copper and cadmium in the frog *Xenopus laevis*. Comp. Biochem. Physiol., 75C, 33-37.
- 5) Suzuki K. T. and T. Maitani (1981) : Metal-dependent properties of metallothionein. Replacement *in vitro* of zinc in zinc-thionein with copper. Biochem. J., 199, 289-295.
- 6) Yamamura Y. and K. T. Suzuki (1983) : Metallothionein induced in the frog *Xenopus laevis*. Experientia, 39, 1370-1373.
- 7) Weser U., H. Rupp, F. Donay, F. Linnemann, W. Voelter, W. Voetsch and G. Jung (1973) : Characterization of Cd, Zn-thionein (metallothionein) isolated from rat and chicken liver. Eur. J. Biochem., 39, 127-140.
- 8) Yamamura M. and K. T. Suzuki (1984) : Induction and characterization of metallothioneins in the liver and kidney of Japanese quail. Comp. Biochem. Physiol., 77B, 101-106.
- 9) Overnell J. and T. L. Cooms (1979) : Purification and properties of plaice metallothionein, a cadmium-binding protein from the liver of the plaice (*Pleuronectes platessa*). Biochem. J., 183, 277-283.
- 10) Kito H., Y. Ose, V. Mizuhira, T. Sato, T. Ishikawa and T. Tazawa (1982) : Separation and purification of (Cd, Cu, Zn)-metallothionein in carp hepatopancreas. Comp. Biochem. Physiol., 73C, 121-127.
- 11) Noël-Lambot F., Ch. Gerday and A. Disteche (1978) : Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothionein. Comp. Biochem. Physiol., 61C, 177-187.
- 12) Takeda H. and C. Shimizu (1982) : Purification of metallothionein from the liver of skipjack and its properties. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 48, 717-723.
- 13) Ley III, H. L., M. L. Failla and D. S. Cherry (1983) : Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 74B, 507-513.
- 14) Yamamura M. and K. T. Suzuki (1983) : Characterization of metallothionein induced in the fish *Carassius auratus langsdorfi*. Eisei Kagaku, 29, 100-104.
- 15) Suzuki K. T., H. Akitomi, Y. Tanaka, Y. Kawamura and M. Yamamura (1983) : Metallothionein induced in Amphibia. Eisei Kagaku, 29, p-51.

国立公害研究所特別研究成果報告

- 第 1 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究——霞ヶ浦を対象域として——昭和51年度。(1977)
第 2 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究——昭和51, 52年度 研究報告。(1978)

(改 称)

国立公害研究所研究報告

- 第 3 号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
(日本産ユスリカ科 *Chironomus* 属9種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
- 第 4 号 スモッグチャンバーによる炭化水素—窒素酸化物系光化学反応の研究——昭和52年度 中間報告。(1978)
- 第 5 号 芳香族炭化水素—窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究——昭和51, 52年度 研究報告。(1978)
- 第 6 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅱ)——霞ヶ浦を中心として。——昭和53年度。(1979)
- 第 7 号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
(日本産ユスリカ科20種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
- 第 8 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和52, 53年度 研究報告。(1979)
- 第 9 号 スモッグチャンバーによる炭化水素—窒素酸化物系光化学反応の研究——昭和53年度 中間報告。(1979)
- 第 10 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究——昭和51~53年度 特別研究報告。(1979)
- 第 11 号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
- 第 12 号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
(コンピュータ制御装置を利用したフレイムおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
- 第 13 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
(多摩川に発生するユスリカの研究
——第1報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係——
——第2報 その一支流に見出された Chironominae 亜科の20種について——)
- 第 14 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究——昭和53, 54年度 特別研究報告。(1980)
- 第 15 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和54年度 特別研究報告。(1980)
- 第 16 号 計測車レーザーレーダーによる大気汚染遠隔計測。(1980)
- 第 17 号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果——臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究——昭和53, 54年度 特別研究報告。(1980)

- 第 18 号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
(環境標準試料「リョウブ」の調製, 分析および保証値)
- 第 19 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅲ) — 霞ヶ浦 (西浦) の湖流 — 昭和53, 54年度.
(1981)
- 第 20 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅳ) — 霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖
水環境に及ぼす影響 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 21 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅴ) — 霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価 —
昭和53, 54年度. (1981)
- 第 22 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅵ) — 霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量 — 昭和53,
54年度. (1981)
- 第 23 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅶ) — 湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究 —
昭和53, 54年度. (1981)
- 第 24 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅷ) — 富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関す
る研究 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 25 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅸ) — [*Microcystis*] (藍藻類) の増殖特性 — 昭和53,
54年度. (1981)
- 第 26 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅹ) — 藻類培養試験法による A G P の測定 — 昭和53,
54年度. (1981)
- 第 27 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅺ) — 研究総括 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 28 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究 — 昭和54, 55年度 特別研究報告. (1981)
- 第 29 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthocladiinae recorded at the summer survey and their distri-
bution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
— 第3報 夏期の調査で見出されたエリユスリカ亜科 Orthocladiinae 各種の記載と, その分
布の下水汚染度との関係について —
— 第4報 南浅川の冬期の調査で見出された各種の分布と記載 —)
- 第 30 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究 — 昭和54, 55年度 特別研究報
告. (1982)
- 第 31 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和55年度
特別研究報告. (1981)
- 第 32 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究 — 環境大気中における
光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究1) — 昭和54年度 特別研究報告. (1982)
- 第 33 号 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究 — 大気運動と大気拡散過程のシミュレーション
— 昭和55年度 特別研究報告. (1982)
- 第 34 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和55年度 特別研究報告. (1982)
- 第 35 号 環境面よりみた地域交通体系の評価に関する総合解析研究. (1982)
- 第 36 号 環境試料による汚染の長期モニタリング手法に関する研究 — 昭和55, 56年度 特別研究報告.
(1982)
- 第 37 号 環境施策のシステム分析支援技術の開発に関する研究. (1982)
- 第 38 号 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)
(環境標準試料「池底質」の調製, 分析及び保証値)
- 第 39 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和56年度 特別研究報告. (1982)

- 第 40 号 大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和56年度 特別研究報告。(1983)
- 第 41 号 土壤環境の遠隔計測と評価に関する統計学的研究。(1983)
- 第 42 号 底泥の物性及び流送特性に関する実験的研究。(1983)
- 第 43 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)
 Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June with description of 15 new species.
 Part 6. Description of species of the subfamily Orthoclaadiinae recovered from the main stream in the June survey.
 Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
 (多摩川に発生するユスリカ類の研究
 — 第 5 報 本流に発生するユスリカ類の分布に関する 6 月の調査成績とユスリカ亜科に属する 15 新種等の記録 —
 — 第 6 報 多摩本流より 6 月に採集されたエリユスリカ亜科の各種について —
 — 第 7 報 多摩本流より 3 月に採集されたユスリカ科の各種について —)
- 第 44 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究。 — 環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究 2) — 昭和54年度 特別研究中報告。(1983)
- 第 45 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和53年~55年度 特別研究報告。(1983)
- 第 46 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和54, 55年度 特別研究報告 第 1 分冊。(1983)
- 第 47 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和54, 55年度 特別研究報告 第 2 分冊。(1983)
- 第 48 号 水質観測点の適正配置に関するシステム解析。(1983)
- 第 49 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 50 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (I) — 霞ヶ浦の流入負荷量の算定と評価 — 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 51 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (II) — 霞ヶ浦の湖内物質循環とそれを支配する因子 — 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 52 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (III) — 霞ヶ浦高浜入における隔離水界を利用した富栄養化防止手法の研究 — 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 53 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (IV) — 霞ヶ浦の魚類及び甲殻類現存量の季節変化と富栄養化 — 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 54 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (V) — 霞ヶ浦の富栄養化現象のモデル化 — 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 55 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VI) — 富栄養化防止対策 — 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 56 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VII) — 湯の湖における富栄養化とその防止対策 — 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 57 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VIII) — 総括報告 — 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 58 号 環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究 — 昭和55~57年度 特別研究総合報告。(1984)

- 第 59 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 光化学スモッグチャンバーによるオゾン生成機構の研究 — 大気中における有機化合物の光酸化反応機構の研究 — 昭和55~57年度 特別研究報告 (第1分冊). (1984)
- 第 60 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 光化学エアロゾル生成機構の研究 — 昭和55~57年度 特別研究報告 (第2分冊). (1984)
- 第 61 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究1) — 昭和55~57年度 特別研究報告 (第3分冊). (1984)
- 第 62 号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究 — 昭和56~58年度 特別研究中間報告. (1984)
- 第 63 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究 — 昭和56年度 特別研究報告. (1984)
- 第 64 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究 — 昭和54~56年度 特別研究総合報告. (1984)
- 第 65 号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 1. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響 — 第1分冊)
- 第 66 号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 2. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響 — 第2分冊)
- 第 67 号 環境中の有害物質による人の慢性影響に関する基礎的研究 — 昭和54~56年度 特別研究総合報告. (1984)
- 第 68 号 汚泥の土壌還元とその環境に関する研究 — 昭和56~57年度 特別研究総合報告. (1984)
- 第 69 号 中禅寺湖の富栄養化現象に関する基礎的研究. (1984)
- 第 70 号 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park (1984)
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park.
(日光国立公園の湖沼のユスリカに関する研究
— 第1部 日光国立公園の湖のユスリカの生態学的研究 —
— 第2部 日光国立公園の湖沼に生息するユスリカ類の分類学的, 形態学的研究 —)
- 第 71 号 リモートセンシングによる残雪及び雪田植生の分布解析. (1984)

Report of Special Research Project the National Institute for Environmental Studies

- No. 1* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1976. (1977)
- No. 2* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1977. (1978)

[Starting with Report No. 3, the new title for NIES Reports was changed to:]

Research Report from the National Institute for Environmental Studies

- No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1977. (1978)
- No. 5* Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on Cultured Cells – Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1977-1978. (1979)
- No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
- No. 8* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1978. (1979)
- No.10* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1978. (1979)
- No.11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No.12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
- No.13 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
- Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
- Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
- No.14* Studies on the effects of organic wastes on the soil ecosystem – Progress report in 1978-1979. (1980)
- No.15* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1980)
- No.16* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- No.17* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes – Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region – Progress report in 1978-1979. (1980)
- No.18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
- No.19* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Lake current of Kasumigaura (Nishiura) – 1978-1979. (1981)
- No.20* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Geomorphological and hydrometeorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment – 1978-1979. (1981)

- No.21* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.22* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.23* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Applicability of trophic state indices for lakes – 1978-1979. (1981)
- No.24* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Quantitative analysis of eutrophication effects on main utilization of lake water resources – 1978-1979. (1981)
- No.25* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Growth characteristics of Blue-Green Algae, *Mycrocystis* – 1978-1979. (1981)
- No.26* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Determination of argal growth potential by algal assay procedure – 1978-1979. (1981)
- No.27* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Summary of researches – 1978-1979. (1981)
- No.28* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Progress report in 1979-1980. (1981)
- No.29 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
 Part 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
 Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
- No.30* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment – Progress report in 1979-1980. (1982)
- No.31* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1980. (1981)
- No.32* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1979 – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 1). (1982)
- No.33* Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region – Simulation of atmospheric motions and diffusion processes – Progress report in 1980. (1982)
- No.34* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution – Research report in 1980. (1982)
- No.35* Comprehensive evaluation of environmental impacts of road and traffic. (1982)
- No.36* Studies on the method for long term environmental monitoring – Progress report in 1980-1981. (1982)
- No.37* Study on supporting technology for systems analysis of environmental policy – The evaluation laboratory of Man-environment Systems. (1982)
- No.38 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)
- No.39* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution – Research report in 1981. (1983)
- No.40* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1981. (1983)
- No.41* Statistical studies on methods of measurement and evaluation of chemical condition of soil. (1983)
- No.42* Experimental studies on the physical properties of mud and the characteristics of mud transportation. (1983)
- No.43 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)

- Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June, with description of 15 new species.
- Part 6. Description of species of the subfamily Orthocladiinae recovered from the main stream in the June survey.
- Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
- No.44* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1979 – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 2). (1983)
- No.45* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Outlines of special research project – 1978-1980. (1983)
- No.46* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Research report in 1979-1980, Part 1. (1983)
- No.47* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Research report in 1979-1980, Part 2. (1983)
- No.48* Study on optimal allocation of water quality monitoring points. (1983)
- No.49* The development and evaluation of remote measurement method for environmental pollution – Research report in 1982. (1984)
- No.50* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Estimation of input loading in Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.51* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – The function of the ecosystem and the importance of sediment in natural cycle in Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.52* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Enclosure experiments for restoration of highly eutrophic shallow Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.53* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Seasonal changes of the biomass of fish and crustacea in Lake Kasumigaura and its relation to the eutrophication. – 1980-1982. (1984)
- No.54* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Modeling the eutrophication of Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.55* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Measures for eutrophication control. – 1980-1982. (1984)
- No.56* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – *Eutrophication in Lake Yunoko*. – 1980-1982. (1984)
- No.57* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Summary of researches. – 1980-1982. (1984)
- No.58* Studies on the method for long term environmental monitoring – Outlines of special research project in 1980-1982. (1984)
- No.59* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen-sulfur oxides system – Photochemical ozone formation studied by the evacuable smog chamber – Atmospheric photooxidation mechanisms of selected organic compounds – Research report in 1980-1982, Part 1. (1984)
- No.60* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen-sulfur oxides system – Formation mechanisms of photochemical aerosol – Research report in 1980-1982, Part 2. (1984)
- No.61* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen-sulfur oxides system – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere. – Research report in 1980-1982, Part 1. (1984)

- No.62* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems – Progress report in 1980-1983. (1984)
- No.63* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment – Progress report in 1981. (1984)
- No.64* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Final report in 1979-1981. (1984)
- No.65 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Part 1. (1984)
- No.66 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Part 2. (1984)
- No.67* Studies on unfavourable effects on human body regarding to several toxic materials in the environment, using epidemiological and analytical techniques – Project research report in 1979-1981. (1984)
- No.68* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil – Research report in 1981-1983. (1984)
- No.69* Fundamental studies on the eutrophication of Lake Chuzenji – Basic research report. (1984)
- No.70 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park – Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park. – Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park. (1984)
- No.71* Analysis on distributions of remnant snowpack and snow patch vegetation by remote sensing. (1984)

* in japanese

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

No. 62

国立公害研究所研究報告 第62号

(R-62-'84)

昭和59年3月31日発行

編集 国立公害研究所編集委員会

発行 環境庁国立公害研究所

茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

印刷 フクダ工芸株式会社

東京都中央区新川1-3-3

Published by the National Institute for Environmental Studies

Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

March 1984