

有毒藍藻類産生毒 Microcystin の作物による
吸収蓄積および土壌内吸着に関する特性解析

2018 年 1 月

類家翔

有毒藍藻類産生毒 Microcystin の作物による
吸収蓄積および土壌内吸着に関する特性解析

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

持続環境学専攻

博士（環境学）学位論文

類家翔

論文概要

1. はじめに

世界各地の農業用灌漑用水源から有毒藍藻類産生毒 Microcystin 類 (MC) が依然として検出されており、灌漑用水を介した農作物への MC 散布による健康リスクの発生が強く懸念されている。この問題に対して、これまでに農地土壌の吸着作用および微生物分解作用等によって作物への MC 吸収・蓄積が阻止される可能性が指摘されている。しかしながら、土壌を構成する様々な要素による MC 吸着に関する報告は極めて少ない。一方、 $1,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ という高濃度曝露においては、土壌栽培であっても空芯菜 (*Ipomoea aquatica*) 可食部への MC 蓄積によるリスクの存在が示されており、更に中国の太湖北部で実際に栽培されたイネ可食部から MC が検出されたという報告も存在する。それ故、土壌の MC 吸着および上記作物の MC 吸収・蓄積特性について定量的に精査する必要がある。

本研究では上記の点を踏まえ、日本の土壌による MC 吸着特性および国産イネと空芯菜の MC 吸収蓄積特性を解析し、両者と既往報告との比較から日本国内におけるリスクの有無および水源管理方策の策定に資する成果を得ることを目的とした。

2. 実験方法

有毒藍藻類産生毒 MC の作物による吸収蓄積および土壌内吸着特性を検討するため、まず、様々な疎水性 MC-LR 吸着剤の報告を参考にして、疎水性有機態炭素を含有する黒ボク土 ((株)牧野、栃木県鹿沼市産) による MC-LR 吸着特性を滅菌条件下で検討した (第 2 章)。滅菌条件は 121°C 、20 分間のオートクレーブ処理で行ったが、これは分解菌等による MC 濃度減少を防ぐために行った。次に、良質なバレイショ栽培等で赤土が実際に使用されていることを考慮し、赤玉土 ((株)牧野、栃木県鹿沼市産) の有する MC 吸着特性も同様に検討した。その際、MC-LR の疎水性・親水性割合に対して pH の与える影響を考慮し、添加溶液 pH の MC 吸着特性に与える影響を検討すると同時に、MC-LR 以外の特性の異なる MC 種に対する日本の土壌の有する吸着特性を総合的に評価した (第 3 章)。イネおよび空芯菜の有する吸収能の検討には国産イネ (*Oryza sativa* cv. コシヒカリ) および空芯菜を用い、ガラスビーズを支持体とした無菌水耕栽培法を用いて検証を行った (第 4 章)。最後に、土壌の有する MC 吸着能および作物による吸収蓄積能を既往報告と比較し、国内における健康リスクおよび水源管理対策を検討した (第 5 章)。

3. 結果および考察

第 2 章の通り、滅菌黒ボク土の MC-LR 吸着率は 70 % 以上であり、添加濃度に関わらず吸着量は平衡濃度に比例することが分かった ($R^2 = 0.98$, 濃度範囲 $0 \sim 1,150 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)。MC は、その分子構造中に疎水性の強い構造を有するため、疎水性吸着剤の場合と同様に黒ボク土中の疎水性有機態炭素成分による疎水結合により MC が吸着除去されたと判断された。

一方、第 3 章の通り、滅菌赤玉土粉末による MC-LR 吸着率は 87 % 以上と、黒ボク土を上回る吸着能を有することが分かった。各土壌の含有有機態炭素量 (TOC) を別途測定したところ、赤玉土の TOC は黒ボク土の 5.8 分の 1 程度であり、含有有機物量には大きな差の存在する事が明らかとなった。従って、赤玉土の MC 吸着においては、黒ボク土の場合

の様な疎水結合とは異なる吸着機構が働いたことが分かった。親水性 MC-LR は周辺の pH によっては負電荷を有する可能性が指摘されており、赤玉土は部分的に正電荷を有することが報告されている。よって、赤玉土の有する正電荷が親水性 MC-LR (MC-LR⁻) の負電荷を吸着したと判断された。吸着等温線の Henry 式を用いて各土壌の吸着能に与える pH 影響を検討したところ、実環境中で観測される pH 範囲 (5.5 ~ 9.5) では黒ボク土の吸着能は影響を受けないことが明らかとなった。対して、赤玉土では pH 7.5 → 9.5 にかけて吸着能が減少することが分かった。この結果は、両土壌共に影響の緩和される初期 pH 範囲が存在したことを意味する。この点に関して、全濃度および初期 pH 条件における実験終了時の上澄水 pH が 5 ~ 6 の間を示し、かつ滅菌黒ボク土・赤玉土の pH (H₂O) が各々 5.7、5.4 であったことから、両土壌共に pH 緩衝作用が働いたことが原因と判断された。しかしながら、赤玉土では pH 緩衝作用が確認されたにもかかわらず、高い初期 pH 条件では吸着能が低下していた。これは粘土鉱物による pH 緩衝作用が同時に鉱物上に負電荷を商事つため、それによって高初期 pH では中和により発生した粘土鉱物上の負電荷と MC-LR⁻ とが反発し合ったと考えられた。富栄養化水圏の pH は 9.5 を超える場合もあるため、土壌が赤土を多く含む場合は水源の藍藻類発生量および pH 状態に細心の注意を払う必要がある。MC-RR、-YR、-LR の混合液を用いた非滅菌黒ボク土・赤玉土による吸着特性としては、黒ボク土および赤玉土共に全 MC 添加量の 90 % 以上を吸着可能であり、従って日本の土壌は非常に高い MC 吸着能を有することが明らかとなった。

作物の MC 吸収蓄積特性については第 4 章の通りであり、イネのコシヒカリによる MC-LR 吸収能は非常に低いことが分かった。空芯菜はコシヒカリと比較して可食部への高い蓄積能を示したが、既往報告も踏まえ、日本国内では土壌の存在によって作物への MC 移行は阻止可能であると判断された。よって、健康リスクも発生しないことが明らかとなった。

4. 結論

第 5 章にまとめた通り、日本の黒ボク土・赤玉土は MC に対して非常に高い吸着能を有することが明らかとなった。しかしながら、赤玉土では灌漑用水源の pH 上昇に伴い吸着力が減少するため、作物の健全な生育の観点からも、水源の pH 監視は重要といえる。また、国産イネのコシヒカリは MC-LR 吸収能が非常に低く、対して、空芯菜は高い蓄積能を有していたが、日本国内では土壌の存在によって、作物体への MC 吸収蓄積によるリスクは発生しないと判断された。本研究結果から灌漑用水源としての湖沼水などの水利用における安全性を評価する上での重要な知見を得ることができた。しかしながら、将来的に地球温暖化等により藍藻類の大量発生は頻度は増加する恐れがあるため、国内外を含めた水源における MC 濃度、pH および藍藻類の顕微鏡観察による監視、発生源対策として資源循環、経済活動を含めた持続可能な社会形成のためのバイオ・エコエンジニアリングの徹底した普及が最重要であるといえる。

目次

表目次	iii
図目次	iv
略語	vi
第1章 諸言	1
1-1 世界規模で発生する閉鎖性水域の富栄養化およびアオコの異常増殖	1
1-2 アオコの有毒藍藻類 <i>Microcystis</i> 属の生物・生態学的特徴	1
1-3 藍藻毒 Microcystin (MC)	3
1-3-1 藍藻類産生物質および肝臓毒 MC	3
1-3-2 MC の急性毒性発現機構	4
1-3-3 MC の慢性毒性発現機構および上水への影響	5
1-4 藍藻類産生毒 MC の農業活動に対して与える多大な影響	6
1-5 MC 吸収能が示唆および示された作物	8
1-6 農地への MC 散布による安全性リスクの有無	9
1-7 研究の目的	10
第2章 黒ボク土による MC-LR 土壌吸着特性	32
2-1 はじめに	32
2-2 実験方法	32
2-2-1 <i>M. aeruginosa</i> NIES-298 株の大量培養	32
2-2-2 供試用 MC-LR の粗製性および濃縮	33
2-2-3 MC-LR 吸着特性解析のための振盪時間の検討	34
2-2-4 黒ボク土による MC-LR 吸着特性解析	35
2-2-5 MC-LR 抽出および分析方法	35
2-2-6 吸着特性解析方法	36
2-3 実験結果	37
2-3-1 MC-LR 吸着平衡状態に至る振盪時間の推定	37
2-3-2 黒ボク土による MC-LR 吸着特性	38
2-4 考察	39
2-5 まとめ	40
第3章 黒ボク土・赤玉土による MC-LR 吸着特性に与える灌漑水源 pH 影響および滅菌 操作の有無による MC 吸着特性比較	52
3-1 はじめに	52
3-2 実験方法	53
3-2-1 黒ボク土・赤玉土による MC-LR 吸着作用に及ぼす pH 影響特性	53
3-2-2 非滅菌条件における各種 MC 混合溶液に対する黒ボク土・赤玉土の MC 吸着性	53
3-3 実験結果	53
3-3-1 滅菌黒ボク土・赤玉土の有する MC-LR 吸着率	53

3-3-2 滅菌黒ボク土・赤玉土による MC-LR 吸着特性評価のための吸着等温式の適合性検討	54
3-3-3 滅菌黒ボク土・赤玉土の MC-LR 吸着における Henry 吸着定数に及ぼす pH 影響	55
3-3-4 非滅菌黒ボク土・赤玉土による MC 吸着特性からの比較解析	55
3-4 考察	56
3-4-1 各土壌による MC-LR 吸着機構および pH 緩衝作用の影響	56
3-4-2 非滅菌条件における各土壌による MC 種吸着特性	58
3-5 まとめ	59
第4章 イネおよび空芯菜の初期生育における MC 吸収蓄積特性	76
4-1 はじめに	76
4-2 実験方法	77
4-2-1 無菌作物栽培法	77
4-2-2 植物体からの MC-LR 抽出および分析法	78
4-2-3 残存栄養塩濃度の分析方法	78
4-2-4 統計解析	79
4-3 実験結果	79
4-3-1 成長量解析	79
4-3-2 イネにおける栄養塩残存性	79
4-3-3 MC-LR 物質収支解析	80
4-3-4 MC-LR 蓄積特性	80
4-3-5 空芯菜におけるリスク評価	81
4-4 考察	82
4-4-1 物質収支解析の重要性	82
4-4-2 イネの生長阻害に関する過去の報告との比較	82
4-4-3 イネの MC-LR 曝露による栄養塩吸収阻害および窒素化合物の分泌	83
4-4-4 イネ・空芯菜の MC-LR 吸収蓄積特性解析	83
4-4-5 イネにおける品種間差比較	85
4-5 まとめ	86
第5章 農業用水源管理方策の検討	106
5-1 本研究で得られた成果	106
5-2 水源監視項目への追加の提案	106
5-3 バイオ・エコエンジニアリングによる安全な灌漑用水の確保	107
5-4 灌漑用水源で MC が発生してしまった際の対処法	108
5-5 今後の展望について	109
謝辞	111
参考文献	112
付録	

表目次

表 1-1.	各有毒物質の毒性レベルの比較-----	12
表 1-2.	有毒藍藻類と産生物質-----	13
表 1-3.	霞ヶ浦用水試料採取 3 地点における優占藻類の遷移過程-----	14
表 1-4.	霞ヶ浦用水試料採取 3 地点における MC 濃度-----	15
表 1-5.	世界各地の農業用水源(灌漑用水含む)における MC 検出濃度一覧-----	16
表 1-6.	MC 蓄積が示唆および確認された作物種-----	17
表 2-1.	MA 培地組成-----	41
表 2-2.	M-11 培地組成-----	42
表 2-3.	各添加濃度における黒ボク土の MC-LR 吸着率-----	43
表 2-4.	Langmuir 式の各線形化法により得られた定数の比較-----	44
表 3-1.	Langmuir 式から推定した各初期 pH における黒ボク土の MC-LR 吸着に関する 諸パラメータ(飽和吸着量(C _{max})、平衡定数(K)、決定係数(R ²))-----	60
表 3-2.	Langmuir 式から推定した各初期 pH における赤玉土の MC-LR 吸着に関する 諸パラメータ(飽和吸着量(C _{max})、平衡定数(K)、決定係数(R ²))-----	61
表 3-3.	Freundlich 式から推定した各初期 pH における赤玉土・黒ボク土の MC-LR 吸着 に関する諸パラメータ(KF、a、決定係数(R ²))-----	62
表 3-4.	各土壌による MC-RR、-YR、-LR 吸着量と吸着率-----	63
表 4-1.	木村氏 B 液組成-----	87
表 4-2.	各部位からの MC-LR 回収量および回収率-----	88
表 4-3.	空芯菜における MC-LR 回収量-----	89
表 4-4.	初期栄養塩濃度の検証結果-----	90
表 4-5.	現在までに明らかとなっているペプチドトランスポーター-----	91
表 4-6.	各イネ栽培品種(<i>O. sativa</i> cultivar.)の MC 吸収量比較-----	92

目次

図 1-1. 福島県の三春ダムの堤体部に吹きだまるアオコ	19
図 1-2. 中国の太湖北部湖岸周辺で観測されたアオコ	20
図 1-3. <i>Microcystis aeruginosa</i> の顕微鏡写真	21
図 1-4. 日本を含め広く検出されるやすい3種のMCの構造	22
図 1-5. MCの肝細胞内構造に与える影響	23
図 1-6. 本研究課題の背景構造	24
図 1-7. 霞ヶ浦用水の水路図	25
図 1-8. いさはや新池内のMC濃度の遷移状況	26
図 1-9. いさはや新池より観察された藍藻類	27
図 1-10. 霞ヶ浦用水試料採取地点の水温、pHおよびDO値	28
図 1-11. 南椎尾調整池(つくし湖)にて8月に採取した試料より確認された藍藻類	29
図 1-12. 霞ヶ浦(西浦)において8月に優占化していた珪藻類	30
図 1-13. 世界各地のアオコのマット状集積位置におけるMC濃度	31
図 2-1. 大量培養の様子	45
図 2-2. 10 mlのGilsonピペットマンにより採取した際の実際の水量の推定	46
図 2-3. 振盪時間における溶液中MC-LR濃度の変化	47
図 2-4. MC-LRの実添加濃度に対する吸着量	48
図 2-5. 黒ボク土によるMC-LR吸着等温線図	49
図 2-6. 黒ボク土のMC-LR吸着等温データに対する各線形化Langmuir式の適用	50
図 2-7. 線形化Freundlich式の適用結果	51
図 3-1. MC-LRのオクタノール・水分配比(Dow)に対するpH影響	64
図 3-2. 添加MC-LR量に対する各土壌の吸着率	65
図 3-3. 異なる初期pH条件下における各土壌のMC-LR吸着等温線および決定係数	66
図 3-4. 異なる初期pHが黒ボク土および赤玉土のHenry吸着定数 K_H に与える影響	67
図 3-5. 各土壌を用いた吸着試験終了時の上澄水中のpH	68
図 3-6. 黒ボク土および赤玉土によるMC-RR、-YR、-LR吸着量	69
図 3-7. MC-YRにおける初期実測濃度と吸着量のばらつきに関する土壌間比較	70
図 3-8. 各土壌のMC-RR、-YR、-LR吸着率	71
図 3-9. 赤玉土の有する陰イオン吸着容量のpH依存性	72
図 3-10. pHによるMC-LR形態別存在割合の定性的挙動	73
図 3-11. MC-RR、-YRおよび-LR予想される荷電部位の比較	74
図 3-12. 本研究成果における黒ボク土・赤玉土のMC吸着特性	75
図 4-1. 作物根中の物質移動経路	93
図 4-2. イネの葉(A)および根(B)の重量比較	94
図 4-3. 空芯菜の葉(A)および根(B)の重量比較	95
図 4-4. イネにおける実験終了時の硝酸、アンモニア、全窒素(A)、リン酸および全リン(B)の残存栽培溶液内濃度の比較	96

図 4-5.	イネの実験終了時における全窒素、全リン (A) およびリン酸 (B) の栽培溶液内 残存濃度と曝露 MC-LR 濃度との比較-----	97
図 4-6.	イネにおけるスタンダード試料 (A) と実試料中 (B) の MC-LR の HPLC クロマトグラム-----	98
図 4-7.	イネにおける MC-LR の初期および実験終了の実測濃度-----	99
図 4-8.	イネの葉および根における MC-LR 蓄積特性-----	100
図 4-9.	空芯菜の MC-LR 吸収蓄積特性-----	101
図 4-10.	曝露初期濃度対する HQ-----	102
図 4-11.	予想されるクウシンサイの根内における MC-LR 移動経路-----	103
図 4-12.	イネにおける MC-LR 吸収経路-----	104
図 4-13.	イネ冠根細胞におけるエンドサイトーシスによるヘモグロビン吸収の模式図--	105
図 5-1.	本研究のまとめ-----	110
図 5-2.	郊外地域を対象とした最重要発生源対策としてのバイオ・エコエンジニアリング 適用例-----	111

略語

Adda	3-amino-9-methoxy-2, 6, 8-trimethyl-10-phenyldeca-4, 6-dienoic acid
AEC	陰イオン交換容量 (Anion Exchange Capacity)
ANOVA	分散分析 (Analysis of variance)
BOD	Biochemical Oxygen Demand
DO	Dissolved Oxygen
Dow	オクタノール・水分配比
EHE	人への予測暴露量 (Expected Human Exposure)
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
HPLC	高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography)
HQ	ハザード比 (Hazard Quotient)
K _H	Henry 吸着定数
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometer
LD ₅₀	半数致死量 (50% lethal dose)
Log P	オクタノール・水分配係数
MC	Microcystin 類
MC-LR	Microcystin-LR
MC-LR ⁻	負電荷を有する親水性 Microcystin-LR
MC-RR	Microcystin-RR
MC-YR	Microcystin-YR
NIES 株	国立環境研究所微生物系統保存施設分譲株 (National Institute for Environmental Studies)
OATP	Organic Anion Transporting Peptide
PP	プロテインホスファターゼ (Protein Phosphatase)
TDI	耐容一日摂取量 (Tolerable Daily Intake)
TOC	全有機態炭素量 (Total Organic Carbon)
WHO	世界保健機関 (World Health Organization)

第 1 章 諸言

1-1 世界規模で発生する閉鎖性水域の富栄養化およびアオコの異常増殖

湖沼や内湾といった閉鎖性水域において、流入水由来の窒素、リン等の栄養塩化合物の蓄積により発生する富栄養化が世界的に深刻化している。日本国内では湖沼水質保全特別措置法に基づき 11 の湖沼が「指定湖沼」に登録されており、厳重に監視されている。その内訳は霞ヶ浦（茨城県）、印旛沼（千葉県）、手賀沼（千葉県）、琵琶湖（滋賀県）、児島湖（岡山県）、諏訪湖（長野県）、釜房ダム貯水池（宮城県）、中海（島根県および鳥取県）、宍道湖（島根県）、野尻湖（長野県）、八郎湖（秋田県）である（環境省，2015）。国外に目を向けると、近年は中国の太湖やデン池、巢湖等において富栄養化が深刻化している（Guo, 2007; Inamori et al., 2008; 水落, 2009; 浅野ら, 2011）。富栄養化は家庭排水、畜産排水等に由来する窒素、リン、カリウムといった栄養塩類の流入により生じる為、植物プランクトンの増殖等を引き起こし、淡水域ではアオコの発生、汽水域ではアオコおよび赤潮、海水域では赤潮等の現象を付随して起こす。図 1-1 は福島県にある三春ダム堤体部に吹きだまったアオコであり、表面にペンキを流したような様相を呈していることが分かる。また、図 1-2 は中国の太湖において観測されたアオコの様子であり、非常に広い範囲の湖岸付近にアオコの発生が認められる。アオコは微小な藻類が高密度で異常増殖して水面付近が緑色に変色する現象であり、集積プランクトンの優占化による生態系構成バランスの変化、水質悪化、透明度低下、悪臭、夜間における溶存酸素消費の大量消費による貧酸素状態の形成、魚類のえらの閉塞、水面表層への集積による底部への日光照射の遮断、産生毒による水生生物への影響等、非常に様々な問題を引き起こすことが知られている（稲森編, 2008）。よって、閉鎖性水域におけるアオコの発生に対しては細心の注意を払う必要がある。日本国内においては 11 の指定湖沼の内、霞ヶ浦、諏訪湖、琵琶湖等はアオコの発生が問題となっている（中村ら, 2004）。しかしながら、琵琶湖の北湖では水質指標の一つである全リンの年平均値が 2012 年段階で環境基準値以下を達成しており、現在でも環境基準地付近を推移している（滋賀県・京都府, 2012; 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター, 2016）。また、諏訪湖では 2005 年を除いて、1999 年以降アオコ発生量の減少が確認されている（朴, 2009; 中村ら, 2010）。対して、霞ヶ浦や八郎潟においては定期的にアオコが観測されており、対策が急がれている（岡野ら, 2015; 茨城県霞ヶ浦環境科学センター, 2016）。加えて、鳥取県の湖山池、東郷池といった指定湖沼以外でもアオコの発生が確認されており、水圏の富栄養化対策は喫緊の課題である（南條ら, 1998）。

1-2 アオコの有毒藍藻類 *Microcystis* 属の生物・生態学的特徴

アオコを形成する主な藻類は藍藻類であり、藍藻類の増殖には植物と同様に様々な元素が必要であるが、自然界では主に窒素とリンが不足しがちとなるため、閉鎖性水域への窒素、リンの流入、滞留は藍藻類の増殖能を高めてしまう。例として、日本国内で観測されるアオコにおいては窒素 1 mg から乾燥重量で約 10 mg、リン 1 mg から約 100 mg の藻体が発生すると報告されている（吉野編, 1999）。藍藻類は細胞内にガス胞と呼ばれる空隙を備

えており、このガス胞を膨らませることで水面下への浮上を行っている。ガス胞はシリンダー状の空胞（直径約 70 nm、長さ 300~400 nm）の集合体で、中には組成が空気とほぼ同等の気体が含まれており、光強度の弱い湖の底で形成されるガス胞によって細胞の比重が減少、細胞が浮上して水面に集積する。アオコが水面に多量に集積するのはこの為である。光強度が増すと光合成が活発になり、膨圧が上昇してガス胞はつぶれて細胞の比重増加により沈降するが、沈降後はガス胞が新たに形成されて再び上昇する（稲森編, 2008）。

日本で頻繁に観察される藍藻類はクロオコッカス目、ユレモ目、ネンジュモ目、スチゴネマ目に分類されている。クロオコッカス目には *Microcystis* 属等が属し、多数の単細胞が多糖類の粘質物を分泌して規則的、不規則的に集合した群体を形成する。ユレモ目には *Arthrospira* 属や *Planktothrix* 属、ネンジュモ目には *Anabaena* 属や *Aphanizomenon* 属、スチゴネマ目には *Umezakia* 属等が属しており、細胞が一行に並ぶ糸状態（トリコーム）を形成するのが特徴である（渡邊, 2007）。これら藍藻類の中でも、クロオコッカス目の *Microcystis* 属は夏から秋にかけて霞ヶ浦、諏訪湖など日本全国の富栄養湖で頻繁に発生する。*Microcystis* 属の大量発生は湖沼の景観を損ない、浄水処理障害や異臭味を生ずるだけではなく、産生毒 Microcystin 類（MC）は極めて問題であるため、湖沼の水質保全に関する諸対策のうちでも最も重要な課題の一つである。加えて、アオコの発生は魚類、家畜の斃死を招く恐れもある。

Microcystis 属は群体の形態等から *M. aeruginosa*、*M. viridis*、*M. novacekii*、*M. wesenbergii* 等の種に分類される。図 1-3 は *M. aeruginosa* の光学顕微鏡写真である。群体形態等により分類されてきた *Microcystis* 属であるが、分子生物学的手法を用いた系統解析によると種の多くが実質的に *M. aeruginosa* 一種にまとめることができ、群体形態は環境条件等によって引き起こされている可能性が指摘されている（Otsuka et al., 1998; Kondo et al., 2000）。実際に、国立環境研究所微生物系統保存施設の有する *Microcystis* 属はかつて種ごとに分類されていたが、現在は全て *M. aeruginosa* 一種に統一されている。但し、なぜ群体形態に大きな差が出るのかは未だ明らかとなっていないことには注意する必要がある。特に、上記の環境研究所の保存施設より分譲される NIES 株（国立環境研究所 微生物系統保存施設分譲株）は群体を形成しないが、自然環境から群体形成能を有したままの状態でも単離培養する方法も報告されている（矢木編, 1986）。従って、*Microcystis* 属藍藻を用いた実験では目的に合わせて NIES 株および実環境からの単離株をそれぞれ使い分ける必要がある。本論文で用いた MC は全て NIES 株より抽出したものであるため、全て *M. aeruginosa* 由来の MC であるといえる。

Microcystis 属は毒性物質 MC を生産するといわれている。表 1-1 は MC の毒性を半数致死量（LD₅₀: 試験動物の半数死亡時における用量）により他の毒物と比較したものであるが、MC の中でも極めて毒性の高い MC-LR の LD₅₀ はシアン化カリウムの約 60 倍であり、非常に危険であるといえる（吉野編, 1999）。現在、MC を生産すると報告されている藍藻種は *M. aeruginosa*、*M. viridis*、*M. ichtyoblabe*、*M. wesenbergii*、*Nostoc rivulare*、*Oscillatoria agardhii*、*O. tenue*、*Anabaena flos-aquae* 等である。特に *M. aeruginosa* の全ゲノムが解析されたこともあり、MC 生産遺伝子も特定されている。しかしながら、これまで MC 産生能

が認められた種においても単離株間で産生遺伝子の保持、非保持の差異が認められ、かつ MC 産生能が確認されていない株においても産生遺伝子が検出されている (T. Nishizawa et al., 2007)。従って、*Microcystis* 属は単離株毎に MC 産生能を有するものと有しないものが存在する為、水圏においては個体数のみならず MC 産生遺伝子に着目した分子生物学的手法の導入に関する検討が進んでいる。

1-3 藍藻毒 Microcystin (MC)

1-3-1 藍藻類産生物質および肝臓毒 MC

藍藻類は毒性物質以外にも、異味臭物質として主にカビ臭原因物質を生産可能な為、上水分野で問題となっている。カビ臭物質は主に 2-methylisoborneol (2-MIB) および geosmin であるが、極めて低濃度でも人間の嗅覚に感知されるため、水道法第 4 条に基づき厚生労働省令によって水質基準として共に $0.00001 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下という規制基準が設けられている (厚生労働省, 2015 年 4 月 1 日施行分)。また、藍藻毒に関しても様々な種において其々異なる有毒物質を産生することが知られている (表 1-2, 稲森ら, 2015)。しかし、株間でも産生するものと産生しないものが存在するため、アオコが大量発生したからと言って一概に有毒物質も大量産生されているとは断言できない。一般にアオコを形成する藍藻類の産生毒は、大きく分けて anatoxin-a、anatoxin-a(s)、saxitoxin 等の神経毒および MC、nodularin、cylindrospermopsin 等の肝臓毒に分けられる (稲森編, 2008)。中でも MC はその毒性の強さ、および主な産生藍藻である *Microcystis* 属が優占化し易いこともあり、精力的に研究がなされている。図 1-4 は MC の基本構造を図示したものである。その構造は、Adda (3-amino-9-methoxy-2, 6, 8-trimethyl-10-phenyldeca-4, 6-dienoic acid) に環状構造として D-グルタミン酸 (D-Glu)、N-メチルデヒドロアラニン (Mdha)、D-アラニン (D-Ala)、R1、D-β-メチルアスパラギン酸 (MeAsp)、R2 がペプチド結合しており、従って環状ヘプタペプチドである。R1、R2 に入るアミノ酸の違いにより、MC には 50 を超えるほど複数の構造異性体が存在し、日本では自然環境中から主に MC-RR (R₁:アルギニン、R₂:アルギニン)、-YR (R₁:チロシン、R₂:アルギニン)、-LR (R₁:ロイシン、R₂:アルギニン) がよく検出される。また、非リボソーム型のペプチドであることが明らかとなっている (稲森編, 2008)。

MC は肝臓毒である。急性毒性としては肝細胞症状として確認されているものは、主に胃腸炎、肝炎様症状、頭痛、吐き気、目の炎症、発疹、血中血小板の減少、長期間の下痢等である。急性毒性としては肝臓内出血や壊死による肝機能障害が挙げられる。海外では MC による家畜の斃死が報告されている (渡辺ら編, 1994; Krienitz et al., 2003)。一方、人間においては 1996 年にブラジルで MC 含有水を飲用した人工透析患者 54 人が死亡する事件が起きている (Jochimsen et al., 1998)。人間への直接的な死亡被害はこの他に報告されていない。しかしながら、慢性毒性として発癌プロモーター作用も報告されており (渡辺ら編, 1994)、発癌イニシエーターとの併用で癌化のリスクは高まるといえる。そのため、WHO (世界保健機関) では飲用水において MC-LR に対し $1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下という暫定濃度基準を設けており、各国に注意を呼び掛けている (WHO, 2011)。また、アオコの発生が多く確認されているオーストラリアでは全 MC に対し $1.3 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ という規制基準を設けている

(NHMRC, 2011)。近年、藍藻毒が問題視されているカナダでは飲料水の MC-LR 濃度のガイドラインとして $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ を用いている (Health Canada, 2002)。アメリカ合衆国のミネソタ州では WHO よりも厳しい $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ を基準値としている (MDH, 2017)。

1-3-2 MC の急性毒性発現機構

MC の毒性発現および生体内挙動については渡辺ら (1994)、Campos and Vasconcelos (2010) および朴 (2014) に詳しくまとめられている。MC は主に 2 つの細胞に影響を与えることが明らかとなっており、それは肝細胞と腹腔マクロファージである (渡辺ら, 1994)。

肝細胞に与える MC 毒性については朴 (2014) において大まかな挙動がまとめられている (図 1-5)。肝細胞内への MC 取り込みは胆汁酸輸送系のトランスポーターが担っており、具体的に MC-LR に関しては Organic Anion Transporting Peptide (OATP) の内、OATP-1b1 および OATP-1b3 が関与していると考えられている。OATP は胆汁酸の再利用および薬物の肝細胞取り込み等に関わるトランスポーターである。肝細胞内に取り込まれた MC はプロテインホスファターゼ 1、2A (PP1、PP2A) の活性阻害およびミトコンドリアに影響を与える。PP はタンパク質脱リン酸化酵素であり、細胞の糖代謝、細胞周期関連、DNA 複製、転写、翻訳等に関与している。よって PP の活性が阻害されると細胞内にリン酸化タンパク質が過剰に蓄積するが、タンパク質の中でも細胞骨格を構成するサイトケラチンは強くリン酸化されるため、肝細胞の膜構造変化を生じる (渡辺ら, 1994)。故に膜に依存する酵素やタンパク質、受容体活性等が崩壊し、細胞が破壊される。更に、ホスホリパーゼ A2 は細胞膜のリン脂質に作用してアラキドン酸とリゾリン脂質に加水分解するが、リゾリン脂質は受容体を介して細胞内へのカルシウム取り込みを加速させるため、細胞内カルシウム濃度が増加する。カルシウム濃度の増加はホスホリパーゼ A2 の活性を更に高めるためにリン脂質の分解も加速し、よってリゾリン脂質が多量に発生し細胞膜変化を加速させる。このようにして MC は肝細胞の形態および膜構造変化を引き起こすといわれている (渡辺ら, 1994)。一方、リン脂質の加水分解により生じるアラキドン酸はアラキドン酸カスケードという代謝系に入り、シクロオキシゲナーゼによってプロスタグランジン H₂ (PGH₂) が生成され、そこからトロンボキサン (TX) やプロスタグランジン (PG) が生成される。中でも 6-ケトプロスタグランジン F₁α (6-keto-PGF₁α) とトロンボキサン B₂ (TXB₂) が有意に増加するようであるが、6-keto-PGF₁α はプロスタグランジン I₂ (PGI₂) の安定型であり、TXB₂ はトロンボキサン A₂ (TXA₂) の安定型であるため、6-keto-PGF₁α と TXB₂ の蓄積は PGI₂ と TXA₂ の産生を意味する (渡辺ら, 1994)。TXA₂ は炎症反応のもっとも強い原因物質の 1 つであり、PGI₂ には血小板合成阻害作用があるため、これらの物質が増加すると、細胞の炎症が悪化し、血小板の減少による症状が発生すると考えられる。故に、MC はアラキドン酸カスケードを介した炎症作用を加速させる (渡辺ら, 1994)。

腹腔マクロファージに関しては、マウス由来の腹腔マクロファージを MC と共に培養した際にインターロイキン-1 (IL-1) および腫瘍壊死因子 (YNFα) の産生が確認されている (渡辺ら, 1994)。IL-1 や YNFα はサイトカインであり、IL-1 には炎症促進や発熱反応の誘導作用、YNFα には炎症反応を直接または間接的に促進させる炎症誘導活性が認められて

いる。また、IL-1 は PGE₂ の産生を誘導して中枢性発熱を起こす他に YNFα の産生も誘導し、YNFα もまた IL-1 の産生を誘導する。加えて、IL-1 と YNFα の作用により PG および TX の産生が促進される。また、MC は腹腔マクロファージの IL-1、YNFα、PGE₂、6-Keto PGF1α、TXB₂ の産生に関与することが明らかとなっており、従ってこれらの物質により炎症反応が起こるといえる。

以上のように、生体に取り込まれた MC は、OATP を介して肝細胞に侵入し、PP 活性を阻害して細胞を破壊、さらにアラキドン酸代謝を高めて炎症を起こす。一方で MC はマクロファージにも影響を与え、肝細胞と同様に炎症作用を促進させる。従って、急性毒性として肝臓が壊死するために死に至ると考えられている。

1-3-3 MC の慢性毒性発現機構および上水への影響

MC の慢性毒性としては発癌プロモーター作用が知られている（渡辺ら編，1994）。Nishiwaki-Matsushima et al. (1992) は、ラットにおいて発ガンイニシエーターのジエチルニトロソアミン（DEN : diethylnitrosamine）との併用投与試験から、MC が発癌プロモーター作用を有することを確認している。また、MC は様々な細胞内タンパク質に直接または間接的に影響を及ぼすことが明らかになりつつある（Campos and Vasconcelos, 2010）。中でも PP 活性阻害を介した Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II（CaMK II : Ca²⁺/calmodulin-dependent multifunctional protein kinase II）、細胞分裂に関与するセリン/トレオニンキナーゼの 1 つである NeK2、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MAPKs: Mitogen-activated protein kinase）、DNA 二重鎖切断修復酵素の 1 つである DNA 依存性プロテインキナーゼ（DNA-PK: DNA-dependent protein kinase）、癌化抑制を含めた様々な細胞機能制御に関与する p53 遺伝子（p53）への作用が挙げられる。更に、ミトコンドリア膜透過性遷移現象（Outer-membrane-permeabilization transition of the mitochondria）にも関与する可能性が示唆されているが、これはミトコンドリアの膜電位低下により ATP 合成が停止する現象であり、アポトーシスの引き金となるものである（Campos and Vasconcelos, 2010）。

このように MC は急性毒性以外においても、様々な細胞内構造に対して PP 活性阻害作用およびミトコンドリア影響を介して様々な影響を与える為、非常に危険な物質である。しかしながら、細胞内においてはグルタチオン抱合作用（Glutathione conjugation）により還元型グルタチオン（GSH: Reduced glutathione）が付加され、最終的に G 糖タンパク質（G-gp: G-glycoprotein）を介して肝細胞外へ排出されるといわれている（図 1-5）。故にグルタチオン抱合能を越える量の MC が肝細胞内に取り込まれた場合、細胞外への排出が間に合わず毒性が発現すると考えられる。いずれにしても MC は非常に毒性が強いため、摂取しないように心がけることが大切である。湖沼等でのリラクゼーションを除けば、可能性の高い MC 摂取経路として真っ先に予想されるのは水道水への混入である。この点について、日本国内では上水処理の最終工程で塩素消毒を行っているが、この塩素消毒は MC の不活化に効果的であることが分かっている。加えて、現在様々な浄水場で取り入れられている活性炭処理やオゾン処理といった高度処理法も MC の不活化に効果的である（須藤編, 2004）。よって、飲料水を介した MC 摂取による健康被害は日本国内においてまず問題

とならない。ただし、多量の塩素投入は残存する微量有機物と反応で生成されるトリハロメタンの増加を引き起こすため、水源の MC 濃度は低く抑えるべきであることは言うまでもない。一方で国外に目を向けると、2007 年に中国の太湖においてアオコの異常増殖により一時的に上水供給が停止する事態となっている（浅野ら, 2011）。2011 年にはアメリカカナダ両国に跨る五大湖の 1 つ、エリー湖において記録的なアオコの発生が観測され、その多さから取水制限がかけられている（National Science Foundation, 2013）。この件は Yahoo ニュース等でも取り上げられるほどの出来事であった。よって日本国外においては富栄養化に伴うアオコ発生の抑制が急務であるといえる。

1-4 藍藻類産生毒 MC の農業活動に対して与える多大な影響

農業とアオコの問題は一見関係ないように思えるが、灌漑用水の水源として湖沼や調整池を用いている例は非常に多い。農林水産省（2012）は農業用貯水池の管理者を対象にアオコに関するアンケートを行っており、23 %の施設においてアオコによる被害が発生したと回答されている。よって、農業用水源におけるアオコの発生は現に起きているといえる。*Microcystis* 属の発生が確認された調整池も存在する（吉永ら, 2004）。先述の指定湖沼においても、例えば八郎湖は農業用灌漑用水源として実際に利用されているため、産生された MC が灌漑用水を介して畑や水田に散布される可能性は非常に高い。つまり、MC を蓄積した作物が出荷され、消費者のもとに届いてしまう恐れがあるといえる（図 1-6）。

上記の八郎湖については、秋田県立大学のグループによりアオコの発生や MC 濃度の推移が長期的に観測されている。しかしながら、アオコや MC の発生状況に関して詳細に検討されている水源は少ないであろう。そこで本論文では、長崎県諫早市に位置する『いさはや新池』および茨城県に位置する『霞ヶ浦（西浦）』の 2 地点について、藍藻毒 MC 発生状況の調査を行った。調査期間はいさはや新池、霞ヶ浦で其々 2015 年 8 月～12 月、2015 年 4 月～2017 年 3 月までであり、調査地点は其々 3 地点とした。MC 濃度の分析は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて行った。いさはや新池は農林水産省の諫早湾干拓事業によって 1997 年に湾が閉め切られ、堤防内が淡水化され形成された水圏である。この事業は湾内の一部を干拓することで農地確保と水源の確保、また高潮、洪水対策として行われたものであるが、淡水化されたいさはや新池からはアオコが確認されており、灌漑用水を介した干拓地への産生毒散布が懸念される。霞ヶ浦については、富栄養化は進行しているが、重要な灌漑用水取水源でもある。図 1-7 は霞ヶ浦用水の水路図であるが、霞ヶ浦の西浦湖岸に存在する霞ヶ浦揚水機場（霞ヶ浦用水管理所、独立行政法人 水資源機構）より、トンネルを通り筑波山を越えて、八幡揚水機場および筑波山麓の南椎尾調整池（つくし湖）に貯留される。そこから下流部の農地へ灌漑用水が流れ込む仕掛けとなっている（霞ヶ浦用水建設推進協議会、2007）。つまり、霞ヶ浦用水はまさに藍藻類産生毒が農地に散布されている恐れがある地域といえる。

図 1-8 にいさはや新池試料採取地点における MC-RR、-YR、-LR 合算値を示した。表層水において MC は検出されているものの、濃度は WHO の飲料水質ガイドライン推奨値である $1\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ を下回っていた。よって非常に低濃度であるといえる。また、底泥において

は稀に検出されるのみであった。つまり底泥中に長期間に亘って MC が蓄積し続けることはないといえる。プランクトンについても、表層水中からは *M. aeruginosa* や *M. wesenbergii* が確認されることもあったが、別属の藍藻類である *Arthrospira* 属が優占化する月が多かった(図 1-9)。この属には食用藍藻類として広く利用されているスピルリナが属しており、毒性等の問題は低いと考えられる。プランクトン観察結果はまた、いさはや新池で優占する藍藻類が *Microcystis* 属から *Arthrospira* 属に遷移している可能性も示唆している。

図 1-10 に霞ヶ浦用水試料採取地点における水温、pH、DO のグラフを示しが、水温の低下に反して pH、DO 共に高い値を示しており、特に DO は明らかに飽和溶存酸素濃度を越える値を示していた。これらは富栄養状態を示唆するものである。また、プランクトンを観察したところ、南椎尾調整池において 8 月の試料から藍藻類が確認された。図 1-11 はその観察された藍藻類の顕微鏡写真である。種としては *Anabaena affinis*、*M. aeruginosa*、*M. wesenbergii* であり、いずれも優占化していた。よって、これらの藍藻類の産生した藍藻毒が灌漑用水を介して農地に散布されている可能性がある。興味深いことに、調整池内で藍藻類が優占化していたにもかかわらず、霞ヶ浦（西浦）の優占種は珪藻類の *Aulacoseira granulata* および *A. ambigua* であった(図 1-12)。つまり、直接の水源地である霞ヶ浦で藍藻類の優占化が認められない場合でも、貯留地である南椎尾調整池では藍藻類が優占化していたという事である。継続して観察を行った結果、表 1-3 に示すように優占種は遷移しており、多くの場合で珪藻類の *A. granulata* および *A. ambigua* が優占化していた。よって、*Microcystis* 属の優占化が認められたのは 8 月の南椎尾調整池試料のみであり、長期的な優占化は認められなかった。一方、石田場揚排水樋門地点より 9 月に *Aphanizomenon* 属が確認されている。確認されたのは 9 月のみであるが、*Aphanizomenon* 属も毒を生産する可能性があるため、注意が必要であるといえる。各月の MC 濃度は表 1-4 に示したとおりであり、幸い、南椎尾調整池で *Microcystis* 属の優占化していた 8 月は、表層濾過水より MC は検出されなかった。これは *Microcystis* 属が産生した MC を基本的に藻体内に保持するため、藻体外には蓄積していなかったと考えられる。MC は *Microcystis* 属藻体が何らかの損傷もしくは寿命を迎えた際に藻体外に溶出する。事実、9 月は *Microcystis* sp. が優占化していなかったにもかかわらず MC-LR が検出されており、これは 9 月に入り活性の低下した藻体から MC が溶出したためと考えられる。いずれにしても、MC の検出されたのは 9 月のみであり、かつ、濃度も WHO の飲料水質ガイドライン推奨値である $1\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ を下回っていた。つまり、非常に低い濃度であるといえる。

以上の結果から、上記 2 地域において藍藻類が確認されたものの、MC の濃度は非常に低いことが明らかとなった。しかしながら、水源より MC が検出されているため、依然としてリスクは存在するといえる。また、世界各地の農業用水源に目を向けると、表 1-5 に示すように様々な国の水源から様々な濃度の MC が検出されていることが見て取れる (Corbel et al., 2014)。実際は調査されていないだけで、更に多くの水源において藍藻毒の存在する可能性がある。加えて、アオコがマット状に高密度で集積している場所の MC 濃度は極めて高いため、表 1-5 に示した各地の MC 濃度は目安でしかない。図 1-13 は稲森(2002)で報告された世界各地の湖沼中 MC 濃度であるが、表 1-5 と比べて非常に高い値を示して

いる。これは図 1-13 の値がアオコのマット状に集積した箇所における濃度を示すからであり、集積部と非集積部の間ではこれほどまでに大きな濃度差が存在することを意味するものである。従って、灌漑用水を介した農地への MC 散布問題を検討する際は、非常に広い濃度幅もしくは濃度の最大値を考慮して行う必要があるといえる。

農林水産省（2012）も水源にてアオコが発生した場合の参考マニュアルを公開しているが、その中に藍藻毒 MC に関する項目はない。それは恐らく、従来の農学分野においてアオコは灌漑用水スプレー部の目詰まりを引き起こす厄介者としてのみ認識されてきたためと考えられる。

農作物への MC 散布および蓄積可能性に対して、世界的にはスコットランドの Codd ら（ダンディー大学）の研究グループを中心に、近年では欧州屈指の農学系研究所であるフランス国立農業研究所（INRA）もこの問題に取り組んでいる。この点からも、本研究において取り上げる作物への藍藻毒曝露問題が世界的に注目を浴びていることを窺い知ることができる。日本においては筑波大学名誉教授の鈴木光剛氏により様々な検討がなされており、著書を通じて藍藻毒 MC の作物曝露問題における対策の重要性を指摘している（鈴木, 2003）。また、朴ら（信州大学）のグループや稲森ら（公益財団法人 国際科学振興財団 バイオエコ技術開発研究所）のグループによって長い期間をかけて精力的に検討されてきている。

1-5 MC 吸収能が示唆および示された作物

作物は基本的に窒素、リン等の多量必須元素およびマンガン、ホウ素等の微量必須元素を吸収して生長するが、窒素は還元的環境下ではアンモニアイオン (NH_4^+)、酸化的環境下では硝酸イオン (NO_3^-) として、リンはリン酸イオン (H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-}) として吸収される。また、カリウムはカリウムイオン (K^+) として吸収され、生体内の大部分にイオン状態で存在する（森ら編, 2001）。これらの養分はリービッヒの最少律に従い、必要な養分の量に対して供給量の割合が最小のものによって植物の成長が制限される（E. P. オダム, 1991）。よって、「植物は無機元素を吸収して成長する」とする無機栄養説が養分吸収の基本である。しかしながら、それは植物が有機物を吸収しない、ということの意味するものではない。例えば、植物根は各種のアミノ酸や尿素 ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)、グルコース ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)、ショ糖 ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) 等を吸収することが可能であり、麦や水稻といったイネ科植物は鉄分吸収のために根からムギネ酸類という物質を分泌して鉄をキレートし、根から再吸収するという方法をとっている（森ら編, 2001）。この場合は特定のトランスポーターを用いて吸収されるが、植物根がアミノ酸を吸収する例の一つである。

MC は環状ヘプタペプチドであり、かつ分子量が約 1,000 と、先に上げた有機化合物と比較しても非常に大きい化合物である。今のところ肝細胞における OATP の様に、植物の MC 吸収に関与する機構が植物に存在するかどうかは全く不明な状況である。しかしながら、数少ない研究者らによって様々な作物種が MC を吸収可能、もしくは可能性のある結果が得られている。表 1-6 はこれまでに報告された、MC を吸収したとされる作物種を一覧にまとめたものである。可能な限り最新の知見を含めたが、この表の中で分析方法に

ELISA と記載されている報告は信頼性が低いと判断される。その理由は、現在広く使用されている MC 分析用 ELISA キットは MC を一括で検出するものであるが、MC 以外の物質も検出してしまう可能性を完全に排除できないためである（彼谷邦光, 2002; 佐野友春, 2012; Lefebvre, 2013）。生体試料であれば更に注意が必要である。対して、分析方法に放射性同位体および LC-MS/MS 等が記載されている作物種については MC 種自体を検出しているため、MC 吸収能を有すると判断できる。

作物の MC 吸収に関する報告の中で、恐らく最も古いものが Kurki-Helasma et al. (1998) によるカラシ (*Sinapis alba*) 実生への ^3H -dihydro-MC-LR の添加実験である。以降、表 1-6 に示したように様々な作物種において検討が進められてきた。同時に生著阻害の有無も検討されており、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 初期葉において MC 散布による光合成阻害作用が報告されており、ブロッコリー (*Brassica oleracea* var. *italica*) では低濃度 MC であっても生長阻害の起きる可能性が指摘されている (Abe et al., 1996; Järvenpää et al., 2007)。また、スベリヒユ科植物のポーチウカは MC の吸収除去および分解能を有する可能性が報告されている (Isobe et al., 2014)。これらの報告は、MC 吸収能が幾つかの種または広く様々な種に備わっている可能性を示唆するものである。また、Abe et al. (1996) の報告は作物の葉細胞が MC 影響を受けたことを意味するが、それが細胞膜タンパク質への影響か、もしくは細胞内に取り込まれたためのものなのかは判断の難しいところである。いずれにしても、MC が作物生長に悪影響を及ぼす可能性があることを示唆するものであるといえる。また、植物体による MC 取り込み機構が明らかとなれば、植物の栄養吸収機構に新たな知見が加えられることが予想される。

1-6 農地への MC 散布による安全性リスクの有無

既往報告の多くは、作物単体への MC 曝露による吸収蓄積特性試験から蓄積特性を評価している。しかしながら、大規模な栽培工場を除いて、実際の作物は土壌の上に存在している。よって、土壌栽培における MC の作物蓄積の検証が極めて重要である。神蔵ら (2014) は上記の点について、小松菜 (*Brassica rapa* var. *perviridis*)、キャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*)、空芯菜 (*Ipomoea aquatica*) を、赤玉土、黒ボク土および腐葉土を同体積比で混合した土壌に播種し、土壌表面に MC-LR を 30 日間継続添加して栽培する実験を行っている。その結果、添加濃度 $1,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ の空芯菜試料を除き、MC-LR は作物体から検出されなかった。加えて、物質収支解析の結果、添加した MC-LR の大半が消失していた。この原因として、土壌吸着および微生物分解が考えられた。また、稲森ら (2015) は更にアオジソ (*Perilla frutescens* var. *crispa*) およびナス (*Solanum melongena*) においても検証しており、同様の結果を得ている。神蔵ら (2014) の報告ではクウシンサイにおいてリスクありと評価されたが、添加濃度が $1,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ と WHO の飲用水質ガイドライン推奨基準値である $1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ と比較して極めて高濃度のものであったため、より低濃度の曝露に対してはリスク無しと判断している。ここで重要な点は、土壌が MC の農地からの除去に寄与している点である。同様の現象を東 (2000) も報告している。東は霞ヶ浦用水地区内の実土壌に対して、同じく霞ヶ浦用水に含まれるアオコの懸濁液を実際に散布し、土壌内におけ

るアオコの生存および MC の挙動を検証しており、その結果、アオコは土壌表層に局在し、その後分解消失したと報告している。上記の神蔵ら(2014)、稲森ら(2015)および東(2000)の報告は、いずれも土壌が MC の作物への曝露に対して緩衝帯、防御帯として機能し得ることを示すものである。この緩衝作用は主に、土壌吸着および微生物分解によって進行することが予想される。つまり、農地に散布された *Microcystis* 属は土壌表層に集積し、そこから溶出した MC が土壌粒子表面に集積、微生物分解によって土壌内から除去されることが考えられる。ここで注意すべき点は、微生物分解と作物吸収は同時に進行するという事である。もし、微生物の MC 分解活性が低ければ、神蔵ら(2014)の空芯菜の結果のように分解前に作物に吸収されてしまう恐れがある。この、灌漑用水源におけるアオコ発生初期の段階において、土壌の有する吸着作用が非常に大きな役割を演じることとなる。つまり、土壌間隙水中から土壌粒子表面に MC を拘束してしまえば、相対的に可吸態 MC 濃度は減少することになり、作物吸収のリスクも低減され得るといえる。MC 吸着に関しては、これまでは河川における浮遊性物質による MC 吸着特性、砂質土を用いた MC 吸着除去能、活性炭や泥炭等を用いた MC 吸着剤の開発等において様々な報告が見られる(Lambert et al., 1996; Pendleton et al., 2001; Yan et al., 2006; Sathishkumar et al., 2010)。しかしながら、農地土壌による MC 吸着現象に主眼を置いた研究報告は中国の実土壌を用いた Chen et al.(2006) および Bobo et al. (2008) 以外に見当たらないのが現状である。加えて上記の報告では中国の実土壌を用いているため、土壌中のどのような要素が吸着に寄与するかは解析が困難であった。この、土壌によって実際にどれだけの MC が吸着除去され得るかについて、ほとんど検証が進んでいないと指摘されている(Machado et al., 2017; Miller and Russell, 2017)。しかしながら、この点は実際の対策、政策決定において非常に重要であるといえる。

上記の予測に対して、一方では $1,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ という高濃度曝露条件においては土壌栽培であっても空芯菜 (*Ipomoea aquatica*) 可食部へ MC が蓄積し、それによってリスクの生じる事が報告されている(神蔵ら, 2014)。加えて、中国の太湖北部沿岸地域で実際に栽培された中国産イネの可食部からも、ELISA 法による分析であるが MC が検出されている(Chen et al., 2012)。故に、土壌の有する MC 吸着能およびイネ、空芯菜の有する MC 吸収・蓄積能について、早急に定量的検証を行う必要があるといえる。

1-7 研究の目的

本研究では上記の点を踏まえ、『日本産土壌による MC 吸着特性』および『イネ・空芯菜の有する MC 吸収・蓄積能』を定量的に明らかとすることで、日本国内における健康リスクの有無およびリスク低減に寄与する要因を推定し、それに基づき農業用灌漑用水源管理方策の策定に資する成果を得ることを目的として検討を行った。また、得られた成果を基に、日本国外における対策についても考察を行った。土壌の有する MC 吸着能の解析に用いる供試土壌には、神蔵ら(2014)の用いた土壌構成要素を参考に、日本産土壌である黒ボク土および赤玉土を対象として其々の有する MC 吸着特性の検討を行った。また、イネの有する MC 吸収・蓄積能の検討に用いた供試作物には日本産イネであるコシヒカリを採用し、既往報告との比較解析を行った。

具体的には、まず第 2 章では黒ボク土を対象に MC 暴露に対する吸着作用からの緩衝効果を検討し、第 3 章では更に赤玉土を供試土壌に加えて pH 影響を評価、第 4 章では日本産イネのコシヒカリおよび空芯菜について MC 吸収・蓄積特性を検討した。その後、第 5 章においてこれまで得られた成果を統合し、藍藻類に対する水源管理・対処策の検討を通して、灌漑用水を含めた農業用水中が藍藻類 *Microcystis* 属産生毒素 MC に汚染された場合の対応マニュアルの策定に資する成果を得ることを最終目標として検討を行った。

表 1-1. 各有毒物質の毒性レベルの比較

Toxin	LD ₅₀ (μg · kg ⁻¹)
Botulinum toxin	0.0003
Cliguatoxin	0.35
Tetrodotoxin	8
Saxitoxin	10
Dioxine	20
MC-LR	80
Okadic acid	200
Cholera toxin	250
MC-RR	600
MC-YR	100
Anatoxin-a(s)	40~50
Potassium cyanide	5,000

(出典：吉野編, 1999)

表 1-2. 有毒藍藻類と産生物質

Toxic algae	Toxin
<i>Anabaea flos-aquae</i>	Anatoxin-a MC variant
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	アフアントキシン シアノギノシン
<i>Microcystis aeruginosa</i>	MC variant
<i>Microcystis viridis</i>	MC variant
<i>Nodularia spumigena</i>	ノデュラリン
<i>Oscillatoria agardhii</i>	MC variant

注) Anatoxin-a とアフアントキシンは神経毒で、それ以外は肝臓毒である。
株によって毒性物質を持つ場合と持たない場合がある。

(出典：稲森ら, 2015)

表 1-3. 霞ヶ浦用水試料採取 3 地点における優占藻類の遷移過程

調査地点	サンプリング日				
	2015/8/19	9/18	10/23	11/25	12/8
南椎尾 調整池	<i>M. aeruginosa</i>	<i>A. granulata</i>	<i>Bacillaria</i> sp.	<i>A. granulata</i>	<i>A. granulata</i>
	<i>M. wesenbergii</i>	<i>A. ambigua</i>		<i>A. ambigua</i>	<i>A. ambigua</i>
	<i>A. affinis</i>				<i>Synedra</i> sp.
水ノ口	<i>A. granulata</i>		<i>A. granulata</i>	<i>A. granulata</i>	<i>A. granulata</i>
揚排水樋門	<i>A. ambigua</i>		<i>A. ambigua</i>	<i>A. ambigua</i>	<i>A. ambigua</i>
	<i>A. granulata</i>	<i>A. granulata</i>	<i>A. granulata</i>	<i>A. granulata</i>	<i>Synedra</i> sp.
石田場	<i>A. ambigua</i>	<i>A. ambigua</i>	<i>A. ambigua</i>	<i>A. ambigua</i>	<i>Stephanodiscus</i>
揚排水樋門	(<i>Microcystis</i> sp.)	<i>Aphanizomenon</i> sp.			sp.
		<i>Pediastrum</i> sp.			

表 1-4. 霞ヶ浦用水試料採取 3 地点における MC 濃度

	サンプリング日				
	2015/8/19	9/18	10/23	11/25	12/8
南椎尾調整池					
MC-RR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MC-YR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MC-LR	N.D.	0.10	N.D.	N.D.	N.D.
水ノ口揚排水樋門					
MC-RR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MC-YR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MC-LR	N.D.	0.05	N.D.	N.D.	N.D.
石田場揚排水樋門					
MC-RR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MC-YR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MC-LR	N.D.	0.06	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. : 検出限界値未満 (0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)

表 1-5. 世界各地の農業用水源（灌漑用水含む）における MC 検出濃度一覧

Country	Location		Type	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	Reference
Algeria	Lake	Oubeira	MC-LR	3-29,163	Nasri et al., 2008
China	Lake	Taihu	MC-LR	34.2	Liu et al., 2011
Finland	-	Prästträsket	MC-LR	42	Spoof et al., 2003
Japan	Lake	Inbanuma	Total MC	52	Ueno et al., 1996
	Lake	Suwa	Total MC	3.61	Park et al., 1998
Kenya	Lake	Naivasha	MC-LR	0.041	Krieniz et al., 2013
Morocco	River	Lalla takerkoust	Total MC	95.4	El Ghazali et al., 2011
New Zealand	Lake	Rotoiti	MC-LR	10-760	Wood et al., 2006
	Lake	Rotoehu	MC-LR	23	
Tunisia	Dam	Lebna	MC-LR	5.485	El Herry et al., 2008
Turkey	Lake	Kovada	MC-LR	0.73-48.5	Gurbuz et al., 2009
United States	-	SanFrancisco estuary	MC-LR	0.02	Lehman et al., 2007

(出典 : Corbel et al., 2014, 一部改変)

表 1-6. MC 蓄積が示唆および確認された作物種

作物名	学名	文献	分析法	備考
シロガラシ	<i>Sinapis alba</i>	Kurki-Helasma et al., 1998, <i>Toxicon</i> , 36, 1921-1926	放射性 同位体	実生
キャベツ	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	東照雄, 2000, 霞ヶ浦用水地区畑地灌漑 調査研究報告書 (平成 11 年度) 85-95	不明	作物状態不明
セイヨウ アブラナ	<i>Brassica napus</i> <i>Oryza sativa</i> cv. 両優培九	Chen et al., 2004, <i>Toxicon</i> , 43, 393-400	ELISA	実生
イネ	<i>O. sativa</i> (品種不明)	Chen et al., 2012, <i>Ecotox.</i> <i>Environ. Safe.</i> , 76, 193-199	ELISA	中国太湖北岸の栽培米
	<i>O. sativa</i> cv. 淮稻 8	Liang et al., 2016, <i>Environ. Earth Sci.</i> , 75:505	ELISA	結果要注意
グリーンピース	<i>Pisum sativum</i>			
サヤエンドウ	<i>Pisum sativum</i> var. <i>saccharatum</i>			
ヒヨコ豆	<i>Cicer arietinum</i>			
ヤエナリ	<i>Vigna radiata</i>			
サヤマメ 大豆	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Glycine max</i>	Peuthert et al., 2007, <i>Environ.</i> <i>Toxicol.</i> , 22, 436-442	ELISA	実生
ムラサキ ウマゴヤシ	<i>Medicago sativa</i>			
レンズ豆	<i>Lens culinaris</i>			
トウモロコシ	<i>Zea mays</i>			
小麦	<i>Triticum aestivum</i>			

(次ページへ)

トマト	<i>Solanum lycopersicum</i>	Romero-Oliva et al., 2014, <i>Ecotox. Environ. Safe.</i> , 102, 121-128	LC-MS/MS	実栽培作物より検出
	<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>MicroTom</i>	Gutiérrez-Praena et al., 2014, <i>Toxins</i> , 6, 1837-1854 Corbel et al., 2016, <i>Sci. Total Environ.</i> , 541, 1052-1058	LC-MS/MS	可食部から検出
コマツナ	<i>Brassica rapa</i> var. <i>perviridis</i>	Kanzo et al., 2013, <i>J. Bioind. Sci.</i> , 2, 12-16 Song et al., 2009, <i>Ecol. Eng.</i> , 35, 1589-1598	HPLC	刈取り可能な状態
クウシンサイ	<i>Ipomoea aquatica</i>	神蔵ら, 2014, 水処理生物学会誌, 50, 15-22	ELISA	生態工学に使用
ブロッコリー	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	Maejima et al., 2014, <i>KJEE</i> , 47, 19-30	HPLC	30日間曝露継続 実生
キャベツ	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>			
パセリ	<i>Petroselinum crispum</i>			
イノンド	<i>Anethum graveolens</i>	Mohamed and Al Shehri, 2009, <i>J. Hazard. Mat.</i> , 172, 310-315	ELISA	実栽培作物より検出
ルッコラ	<i>Eruca vesicaria</i>			
ハツカダイコン	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>sativus</i>			
レタス	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. sativa</i> cv. <i>Vanda</i>	Cordeiro-Araújo et al., 2016, <i>Sci. Total Environ.</i> , 566-567, 1379-1386	LC-MS/MS	発芽後40日栽培された作物を利用
リンゴ	<i>Malus pumila</i>	Chen et al., 2010, <i>Ecotox.</i> , 19, 796-803	ELISA	実生

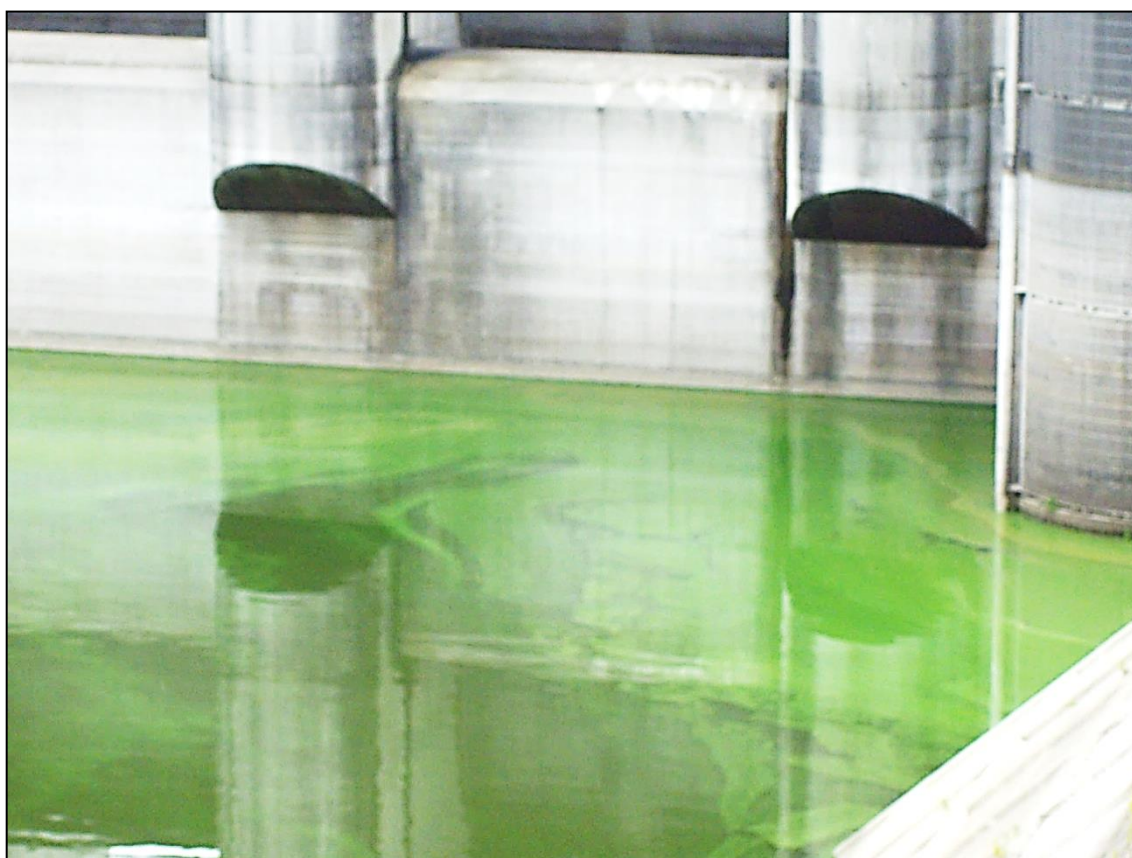


図 1-1. 福島県の三春ダムの堤体部に吹きだまるアオコ（2009年9月8日筆者撮影）



図 1-2. 中国の太湖北部湖岸周辺で観測されたアオコ（2016 年 6 月 1 日筆者撮影）

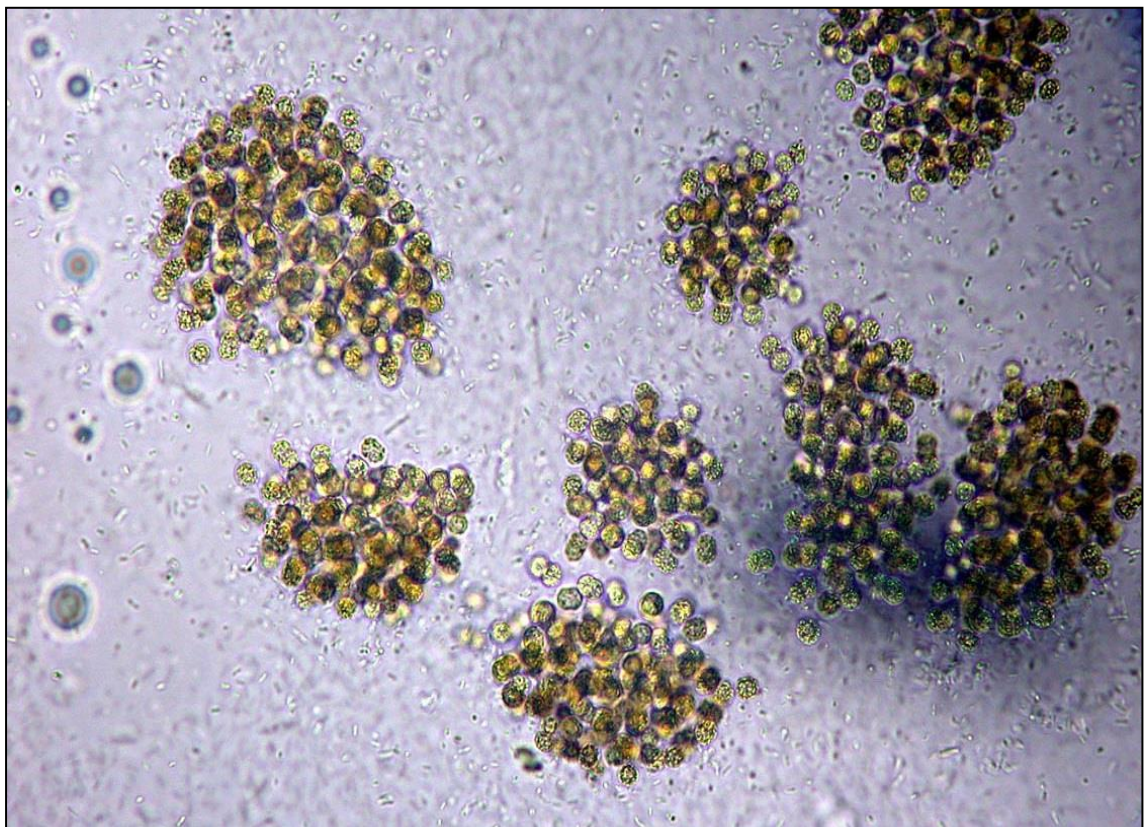
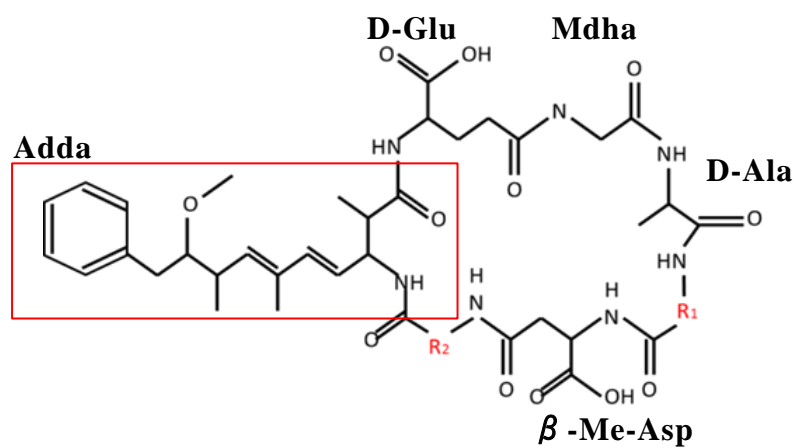


図 1-3. *Microcystis aeruginosa* の顕微鏡写真



MC type	R_1	R_2
MC-RR	Arginin	Arginin
MC-YR	Tyrosine	Arginin
MC-LR	Leucin	Arginin

図 1-4. 日本を含め広く検出されるやすい 3 種の MC の構造

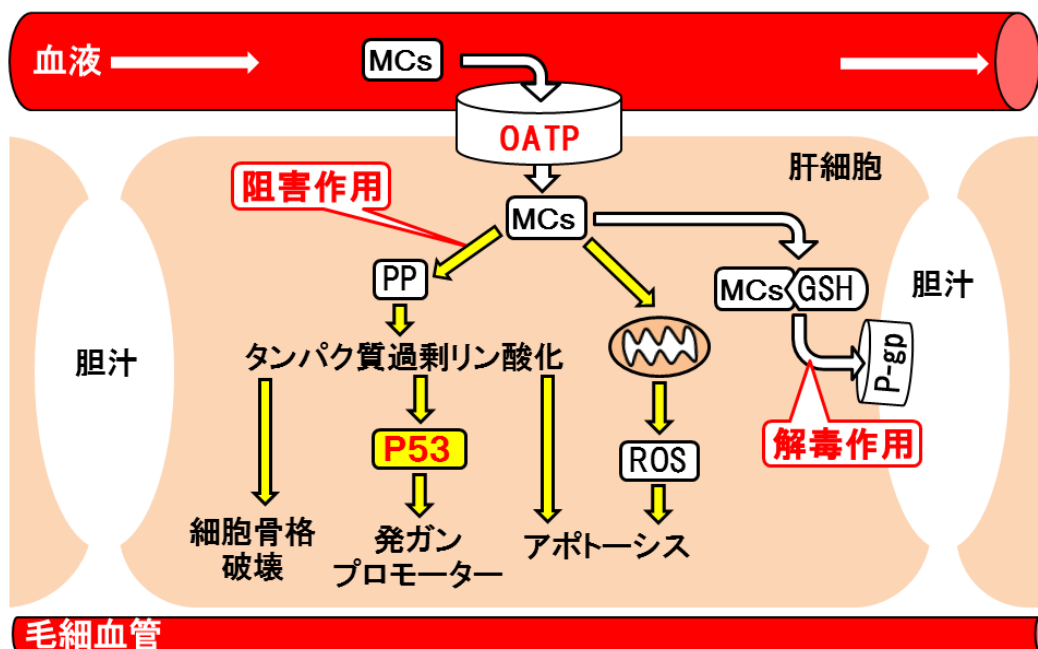


図 1-5. MC の肝細胞内構造に与える影響（出典：朴, 2014,一部改変）

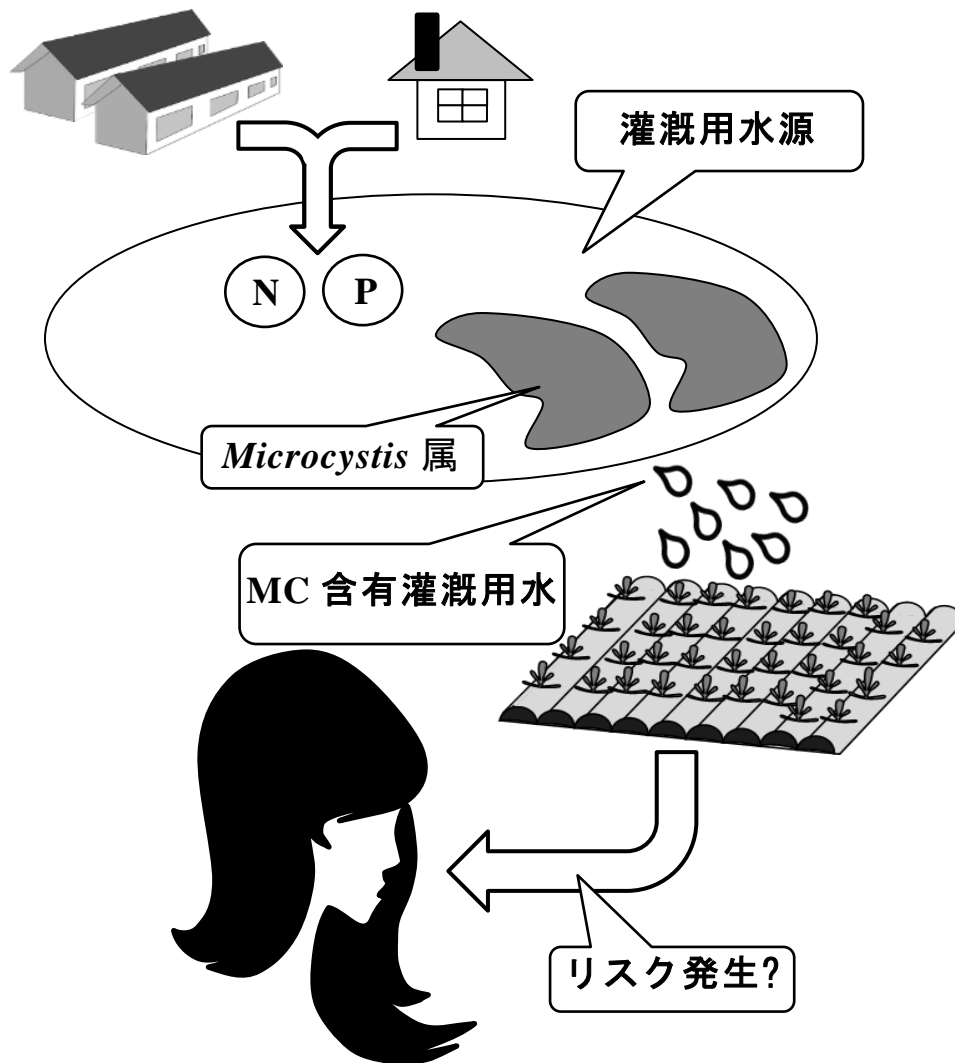


図 1-6. 本研究課題の背景構造

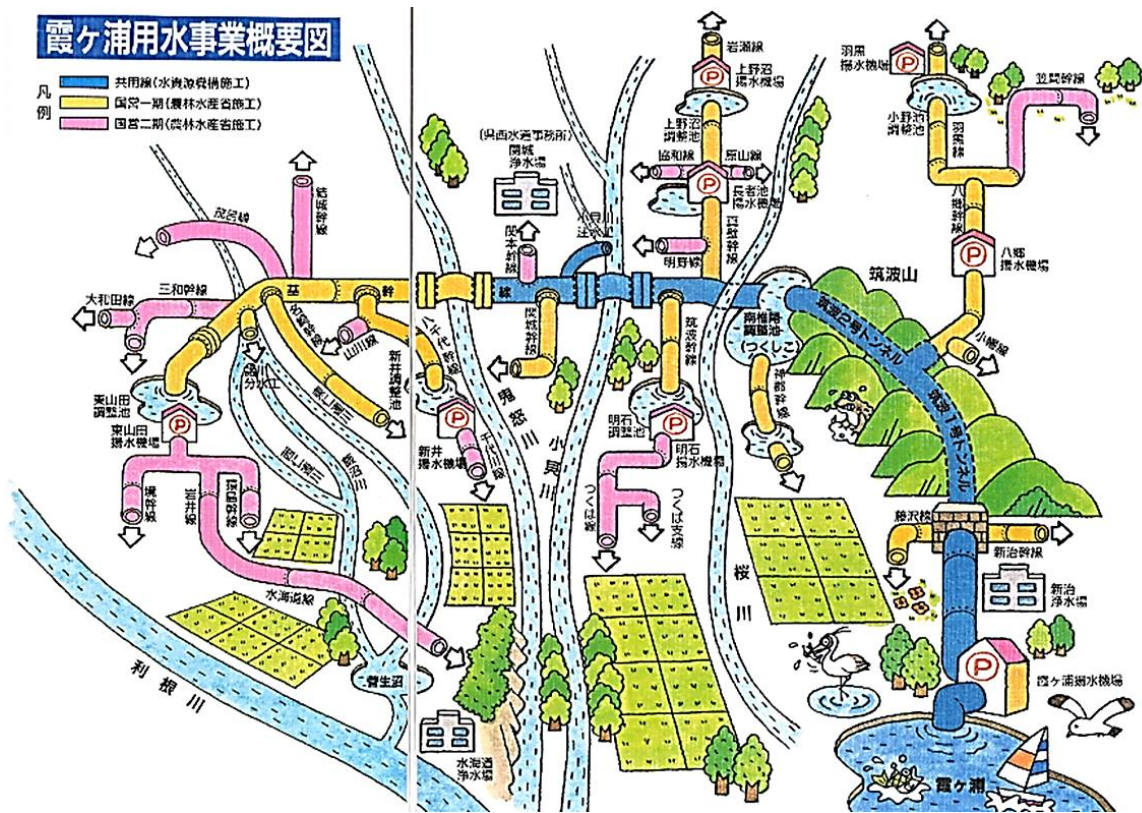


図 1-7. 霞ヶ浦用水の水路図 (出典：霞ヶ浦用水建設推進協議会, 2007)

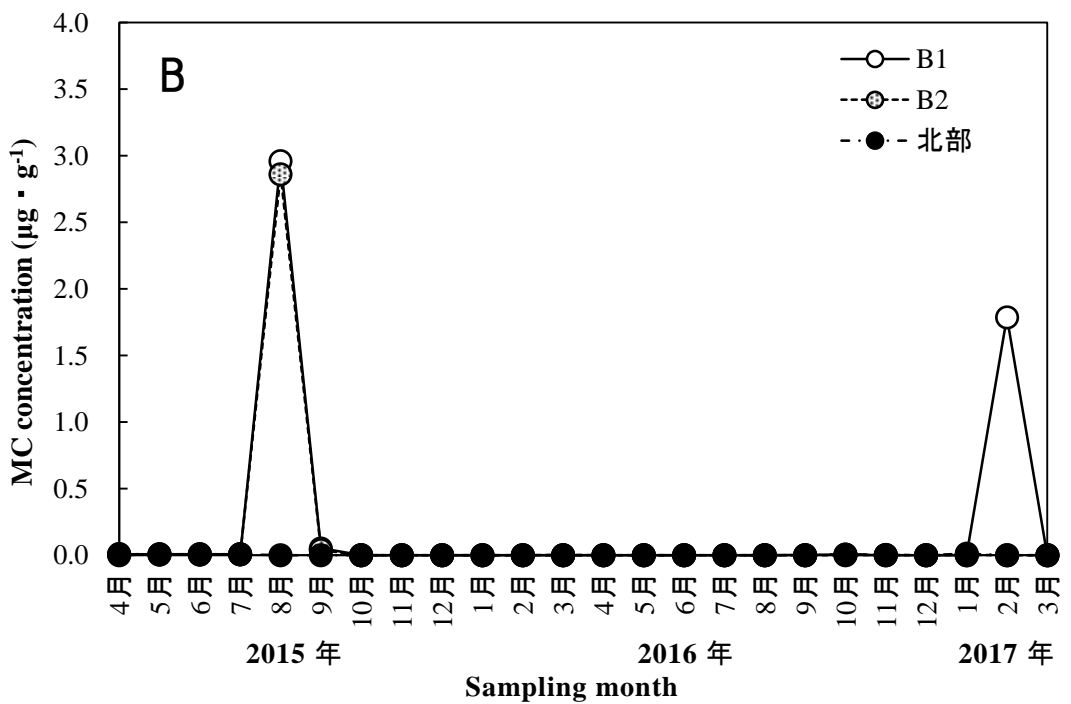
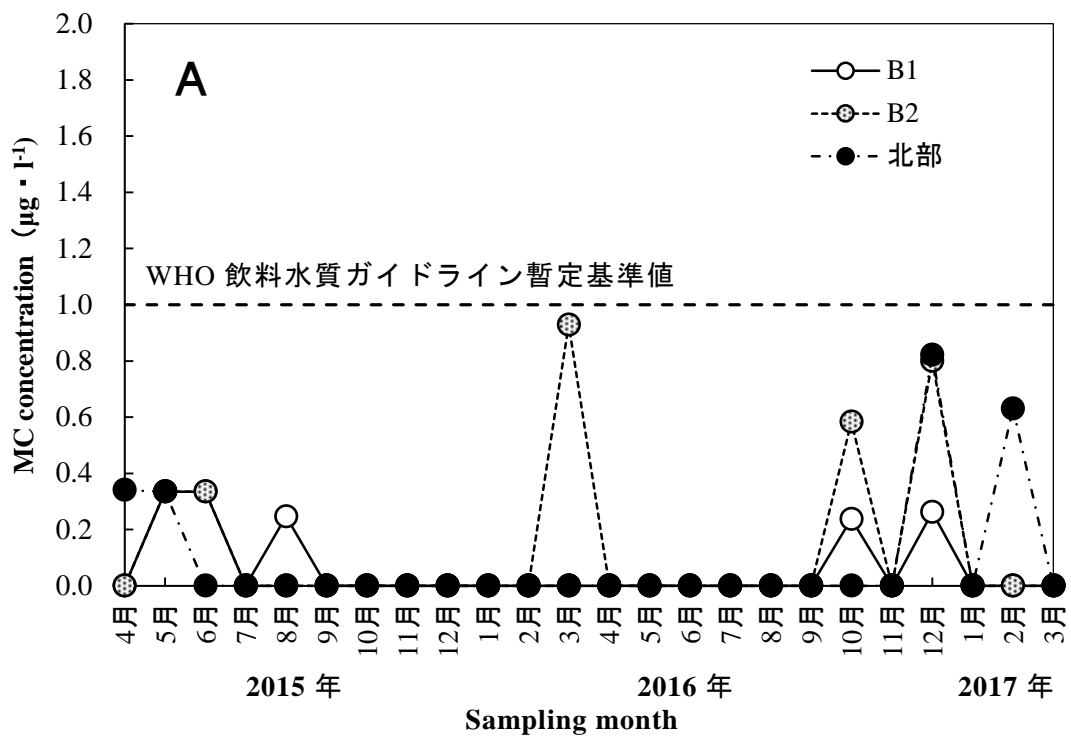


図 1-8. いさはや新池内の MC 濃度の遷移状況
A-表層水, B-底泥

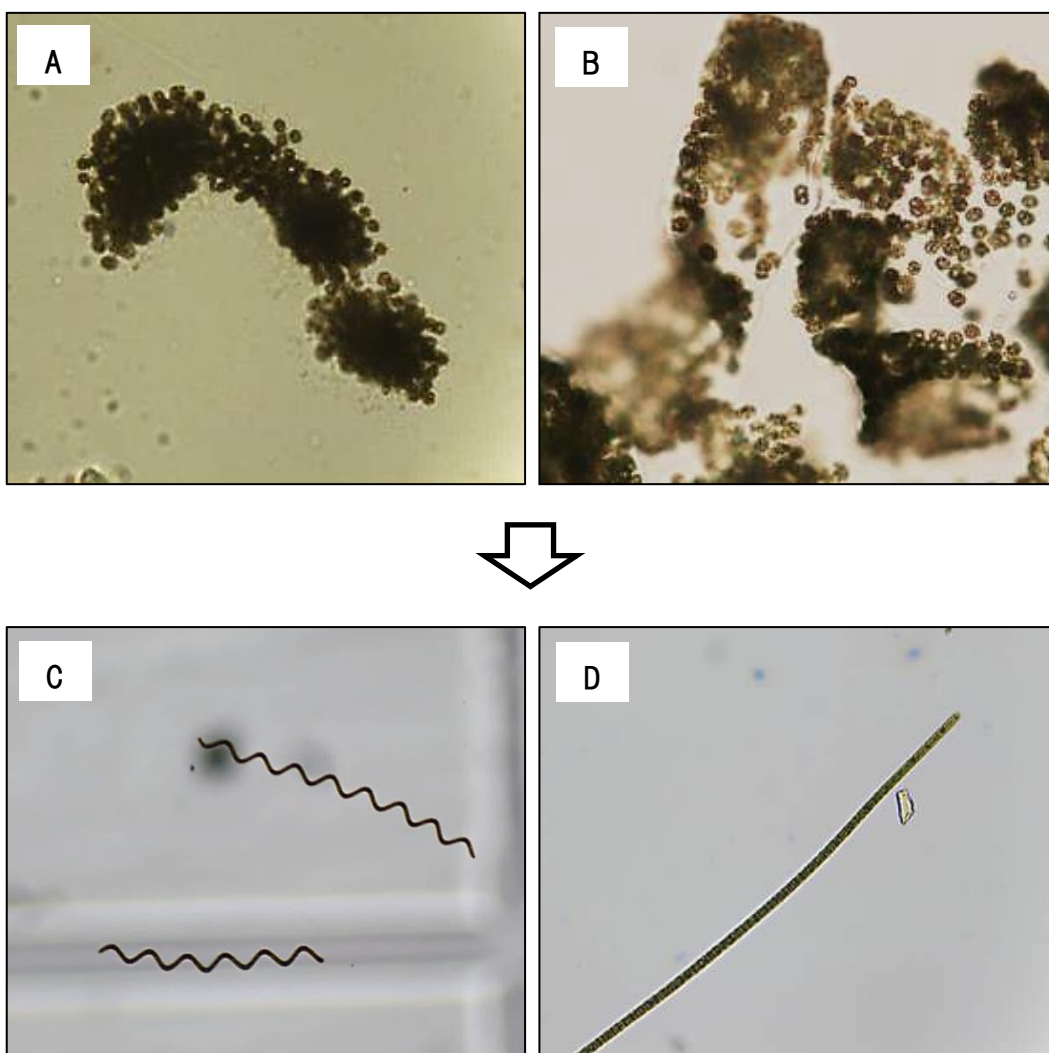


図 1-9. いさはや新池より観察された藍藻類

A-*Microcystis aeruginosa*、B-*M. wesenbergii* は以前観察された藍藻類、
C-*Arthrospira* 属、D-*Oscillatoria* 属は最近観察された藍藻類である。

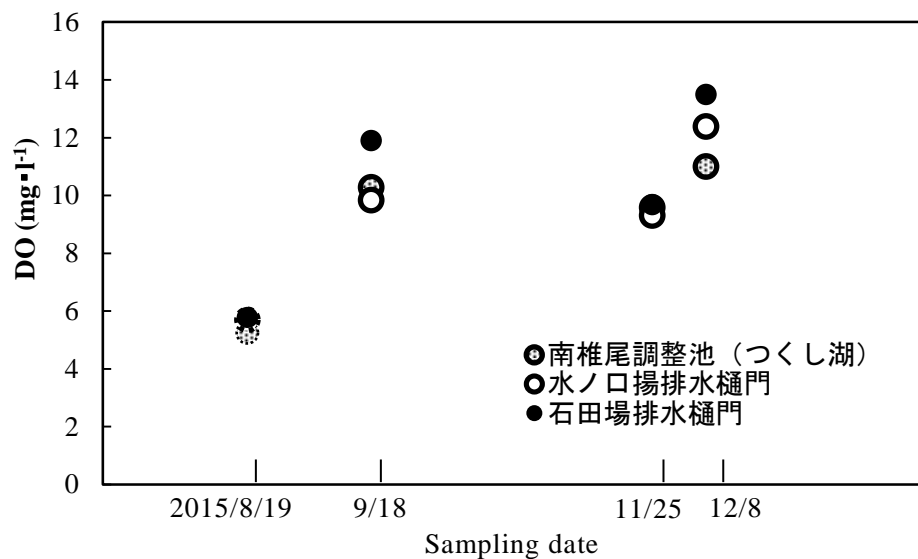
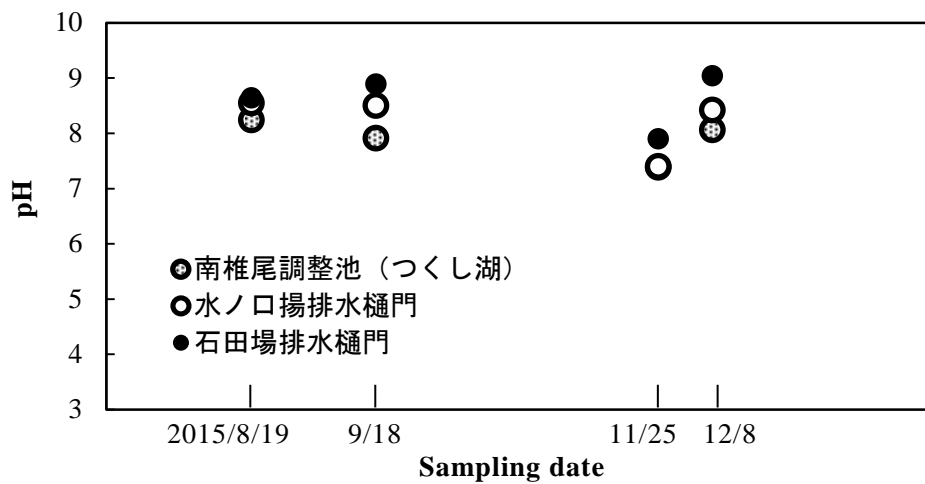
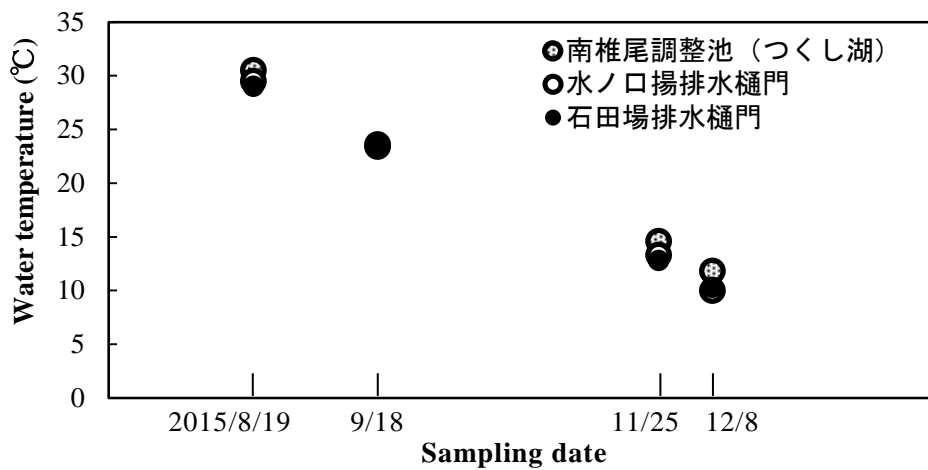


図 1-10 霞ヶ浦用水試料採取地点の水温、pH および DO 値
(8/19 の DO 値は校正不良のため参考値)

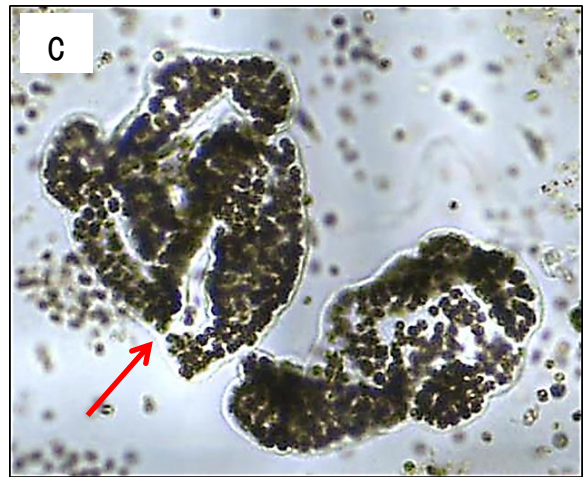
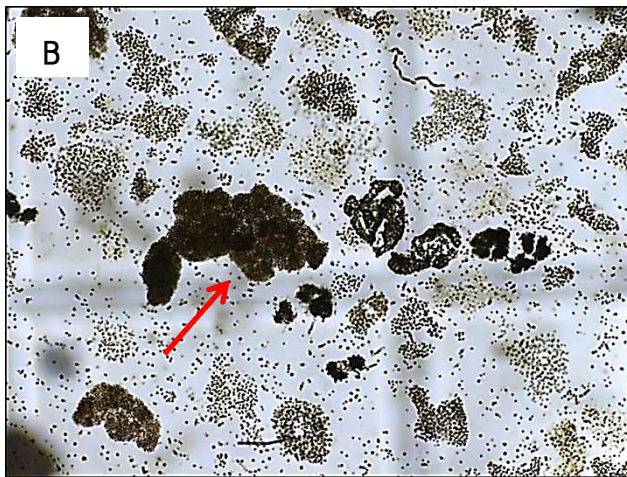


図 1-11 南椎尾調整池（つくし湖）において 8 月に採取した試料より確認された藍藻類
各赤矢印は以下の藍藻類を示す。

A-Anabaena affinis, *B-Microcystis aeruginosa*, *C-M. wesenbergii*

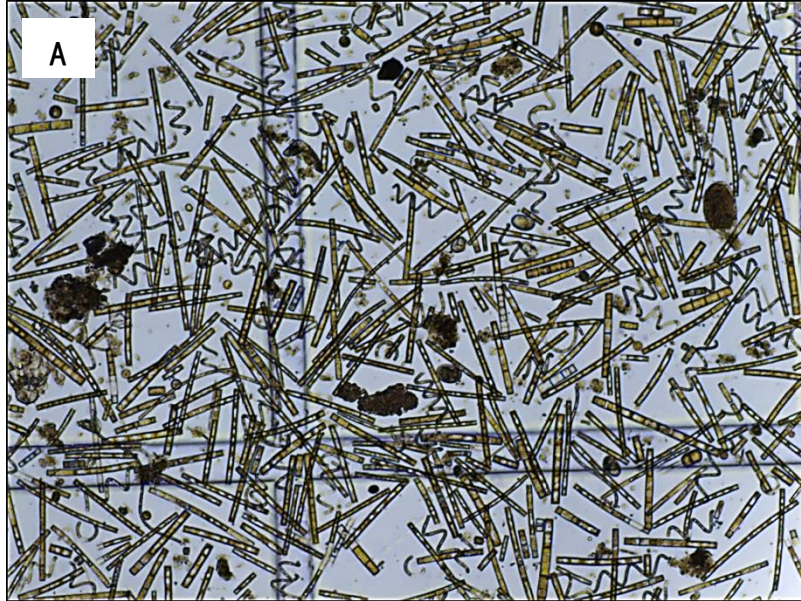


図 1-12. 霞ヶ浦（西浦）において 8 月に優占化していた珪藻類
A-螺旋状のものが *Aulacoseira ambigua*、棒状のものが全て *A. granulata* である。
B-*A. granulata* の細胞先端には針状の突起（赤矢印）が存在する。

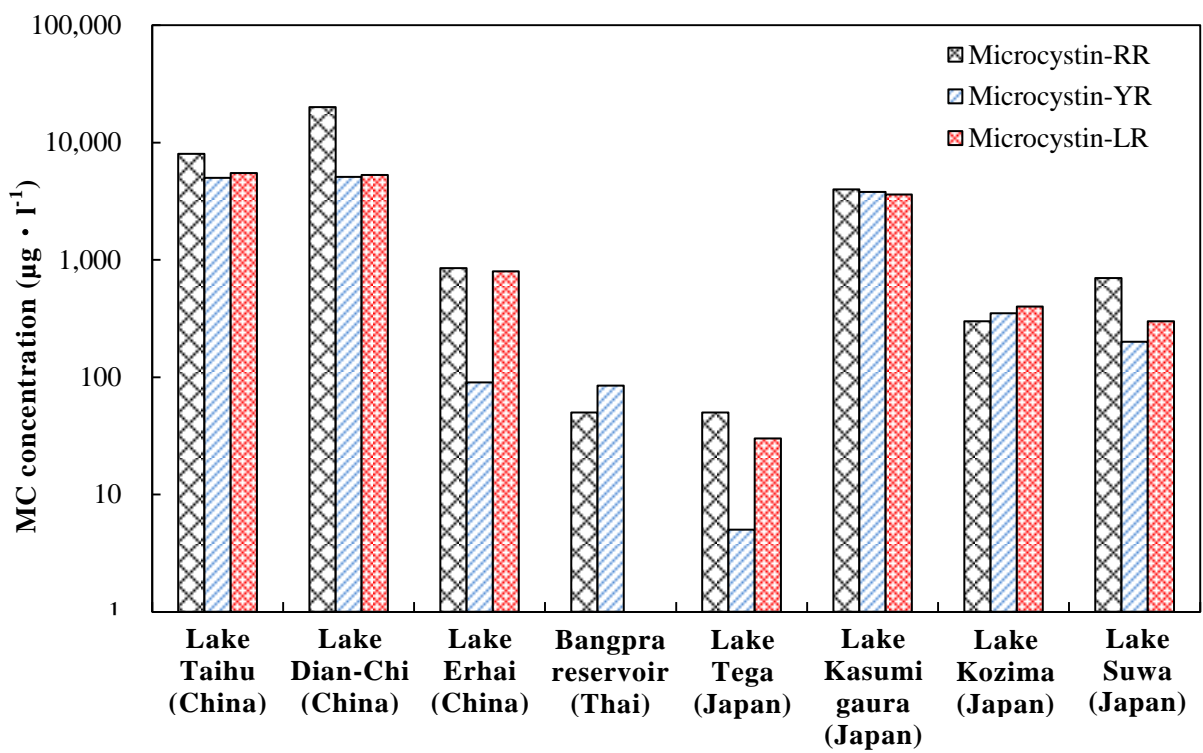


図 1-13. 世界各地のアオコのマット状集積位置における MC 濃度 (出典: 稲森, 2002)

第2章 黒ボク土による MC-LR 土壌吸着吸着特性

2-1 はじめに

農地土壌内における MC の挙動についてはまだ不明な点が多い。MC は Adda という構造を有するが、この部分は疎水性が高く、その特性がクロマトグラフィー分析にも活用されている。一方、日本の土壌は多くが黒土または黒ボク土と呼ばれる黒色の土で、関東ローム層の表層などはまさに黒土である（羽鳥, 1975; 加藤, 1976）。これは火山噴出物が堆積することで形成された赤土層の上に塵やほこり等の有機物が同時に堆積したためであり、加えて粘土鉱物等も含まれているというもので、非常に複雑な構造を有する。黒ボク土の黒色は有機物を含んでいることも理由の一つである。これらの中の有機態炭素成分は疎水性物質を吸着し易いことが知られている。例として農薬を挙げると、化学物質の疎水性、親水性割合を示す指標である分配係数（オクタノール・水分配係数, Log P）が高い農薬は、有機態炭素割合の多い土壌に吸着、保持され易いと考えられる。事実、農薬の土壌残留性等を検討する際にも吸着能を有機態炭素量換算することがある（小林, 2000）。Ward and Codd (1999) は HPLC の保持時間を利用して、様々な化学物質の Log P と HPLC 保持時間の相関式から、内挿法によって MC-LR、-LY、-LW および-LF の Log P を推定しており、それぞれ 2.92、3.46、3.58、3.56 と報告している。よって先に上げた 4 つの MC は疎水性が高いと予想され、日本の黒ボク土は潜在的に高い MC 吸着能を有する可能性がある。

吸着現象について簡単にまとめておく。吸着現象は物理学的には発熱反応に該当するが、それは以下の理由による。吸着現象とは吸着質が吸着剤表面に束縛される現象である。それは自由度の減少を意味し、熱力学においてエントロピー変化量 ΔS が負になるという事である。また、吸着剤は吸着質を自発的に吸着するため、自由エネルギー変化量も同様になると考えられる。これを温度一定におけるギブスの自由エネルギーで表せば、 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ の ΔG と ΔS が負のため、 $T\Delta S < 0$ 、よって $-T\Delta S > 0$ となるため、 $\Delta H < 0$ となる。よって、吸着現象は一般的に発熱反応である。以上から明らかなように、吸着現象は温度の影響を受け易い現象である。それ故に吸着特性の検討においては温度を一定（恒温）とする必要があり、手法の一つとして恒温振盪法が有効であるといえる。しかしながら、これまでに報告されてきた多くの報告でこの点が無視されている。Wu et al. (2011) は太湖底泥の有する MC 吸着能を検討しており、この点をしっかりと考慮して考察を進めているが、農地土壌に関する報告は無い。よって本研究では一般的に広く行われている手法に則り、温度一定条件における MC 吸着特性の検討を行った。また、MC の中でも毒性が極めて高く、広く検出されやすく、疎水性吸着剤をはじめとして様々な研究がなされている MC-LR を対象として土壌吸着能を検討した。実験はまず系が平衡状態へ至る時間を検討した後に、黒ボク土による MC-LR 吸着能の詳細な検証を行った。

2-2 実験方法

2-2-1 *M. aeruginosa* NIES-298 株の大量培養

本研究で用いた MC-LR は全て大量培養藻体より抽出して用いた。藻体には独立行政法

人 国立環境研究所 微生物系統保存施設より分譲された *Microcystis aeruginosa* NIES-298 株を採用し、MA 培地 (表 2-1, 市村, 1979) により継代培養したものを、M-11 培地 (表 2-2) を用いて 10 L の大量培養を行った。M-11 培地は矢木および須藤 (1981)、萩原ら (1984) 以降、広く用いられている培地であり、組成については上記の微生物系統保存施設ホームページ (<http://mcc.nies.go.jp/02medium.html#m11>) 掲載のものに従い使用した。継代培養は 300 ml の三角フラスコを用い、人工気象器内で 25°C、照度 5,000~10,000 Lux (12 時間サイクル) で行った。大量培養にはポリカーボネート製の大型透明丸型瓶 (10 L、NALGENE)、通気用、外部との空気交換用、内容物採取用の 3 つの穴をあけたシリコン栓 (26 号)、金属の細い管、木下式ガラスボールフィルター (501G、フィルター球径 φ10 mm、木下理化学工業株式会社、生産終了)、エアーポンプ、シリコンチューブおよび攪拌子を用いた。金属管はシリコン栓の 3 つの穴にそれぞれ通し、丸型瓶の外になる側の金属管端全てと内側となる側の 2 つにチューブを繋ぎ、かつ内側のシリコンチューブの 1 つに木下式ガラスボールフィルターを設置した。丸型瓶に攪拌子と培地を入れた後、上記のシリコン栓で栓をし、瓶の外側にあるチューブの口すべてに Vent Filter (Millex[®]、気体、有機溶剤用、pore size: 0.2 μm、Millipore) を着け、必要箇所をアルミホイルで覆った後に、121°C、40 分の条件でオートクレーブ滅菌を行った。その後、継代培養している *M. aeruginosa* NIES-298 株をクリーンベンチ内で移植し、Vent Filter 越しにエアーポンプで空気を送りながら、12 時間サイクルで卓上灯のような簡易光源下で、攪拌子によって攪拌しながら培養を行った (図 2-1)。エアーポンプには家庭で金魚等を飼育する際に用いるものと同様であった。クリーンベンチ内における株の移植量は 1 L あれば十分であるが、*M. aeruginosa* NIES-298 株は M11 培地によく育つため、100~200 ml ほどでも十分に大量培養可能である。培養温度は室温とし、期間は 1 ヶ月以上とした。藻体は培養後、45 ml の遠沈管 4 本を用いて遠心分離することで液体部分と藻体部分を分離した。液体部分は濾過後、固相抽出により濾液からの MC の精製を行った。藻体については凍結乾燥させ、乾燥粉末に 5 % 酢酸溶液を添加し、超音波処理、振とう処理 (110 min⁻¹、30 分以上)、遠心分離の後に夾雑物をろ過し、固相抽出により抽出液から MC の精製を行った。

2-2-2 供試用 MC-LR の粗製性および濃縮

MC の精製操作は固相抽出によって行った。カラムには ODS カラム (Presep[®]-C C18 Plus Cartridge、和光純薬工業) を用いた。操作手順は以下の通りであった。即ち、セットアップは 100 % の HPLC 用メタノール 5 ml を 2 回 (通液速度制限なし)、その後に約 20 ml の空気を 2 回、さらに超純水 20 ml を 2 回通液した後に、再度約 20 ml の空気を 2 回通すことで行った。本実験で用いた ODS カラムは前処理用かつ 20 ml プラスチックシリンジの先に装着可能な為、2 度の通気に於いて実際は空のシリンジで空気を押し出した形となる。上記セットアップ後は各地点から採取したサンプルをカラムに通液したが、その際に流出液が一滴一滴落ちる状態を判別できる程度の速度で行った。通液速度の管理はペリスタポンプ (定量送液ポンプ EYELA MP-1000、東京理化学工業株式会社) によって行った。サンプルの通液後、20 % の HPLC 用メタノール 5 ml と超純水 15 ml を混合したものをカラムに通し、

この時も流出液が一滴一滴落ちるのが判別できる速度で行い、これを2回繰り返して夾雑物質の除去を図った。その後、100% HPLC用メタノール3~5 mlを通してカラムに吸着したMCをスピッツ管または試験管に溶出させて回収した。その回収溶液を、今度はSilicaカラムを用いて以下のように精製を行った。Park et al. (2007)のMC抽出方法を参考に、15 mlの100% HPLC用メタノールでセットアップを行い、ODSカラムの回収溶液を水滴の一滴一滴落ちるのが判別できる速度でカラムに通し、その後、20 mlの100% HPLC用メタノールを、これも同様に水滴の一滴一滴落ちるのが判別できる速度で通液して夾雑物の除去を行い、70%のHPLC用メタノールで最終的にMCを溶出させた。回収溶液は40~60℃の湯煎にかけ、空気を吹き付けて溶液部を揮発し、HPLC用メタノールを0.5~1% v/vとなるように添加した後に、Milli-Qを溶媒として溶解させて添加用MC-LR溶液とした。

*M. aeruginosa*の生産するMCには様々な物が存在するが、アジアを中心に広く検出されるMCはMC-RR、MC-YR、MC-LRの3種であるといわれている。*M. aeruginosa* NIES-298株は上記3種の内MC-LRのみを生産することが知られている(Yasuno et al., 1998)。よって、本論文において、*M. aeruginosa* NIES-298株を基にしたMC抽出液を総じてMC-LR添加溶液として用いた。

2-2-3 MC-LR 吸着特性解析のための振盪時間の検討

MC-LR吸着特性の供試土壌としては、市販の黒ボク土(株式会社牧野)を用いた。この黒ボク土は株式会社牧野曰く、栃木県鹿沼市の関東ローム層において、地表面より3cmの深度から採取したものである。黒ボク土はあらかじめ不純物を除去した後に、乳鉢で塊を潰し、細菌の影響を除くために121℃、20分でオートクレーブ滅菌したものをを用いた。振盪試験はMiller et al. (2005)の方法を基にして行った。即ち、300 mlの三角フラスコに黒ボク土10 gと滅菌MC-LR溶液50 mlを入れてフラスコの口に栓をし、恒温振盪機で恒温振盪(110 min⁻¹、30℃)を行った。MC-LRの初期設定濃度は500 µg · l⁻¹とした。振盪中、10 ml用ピペットマン(Gilson)を用いて、振盪開始から2、3、4、23、25、29、46、51時間経過時にフラスコ内の黒ボク土混合液を1 mL採取し、濾過した後に濾液中のMC-LR濃度を測定した。

各時点で採取したサンプル1 mlには黒ボク土粒子が含まれているため、実際の溶液体積を別途測定する必要があった。そこで、滅菌黒ボク土10 gと超純水50 mlを300 ml容三角フラスコで混合し、そこから10 ml用ピペットマン(Gilson)を用いて1 ml、5 ml、10 mlずつサンプリングし、それを蒸発皿に移した後に、105℃で2時間乾燥させ、乾燥前後の重量変化分を超純水体積として求めた。その際、超純水の密度は1 g · cm⁻³とした。結果は図2-2の通りであり、このグラフから10 ml用ピペットマン(Gilson)を用いて1 mlサンプリングした際の実際の溶液体積を0.98 mlとして、MC-LR濃度解析の際に用いた。以上の実験は、全て繰り返し数を3として行った。採取量は1 ml、5 ml、10 mlの3条件のみであるが、MC-LR濃度測定時の実際の採取量は1 mlであり、図2-2から内挿法により十分に実溶液量を推定可能と判断した。

2-2-4 黒ボク土による MC-LR 吸着特性解析

供試土壌は同じく黒ボク土（株式会社牧野）を使用した。実験方法は前節（2-2-3）での振盪時間の検討時と同様に、三角フラスコに滅菌黒ボク土 10 g と滅菌 MC-LR 溶液 50 ml を入れ、パラフィルムでフラスコの口を封じた後に、恒温振盪機で 110 min^{-1} 、 30°C で振盪を行った。振盪時間は前節で求めたものを採用し、振盪中はできるだけ光が当たらないように努めた。振盪終了後、フラスコ内の内容物を 2 本の 45 ml 遠沈管に移し入れ、遠心分離を行って上澄み液回収し濾過、濾液中の MC-LR 量の分析を行った。黒ボク土による MC-LR 吸着量は、添加量と、振盪終了後の濾液中濃度の差分を土壌添加量 10 g で除すことによって算出した。MC-LR 添加濃度については $50\text{-}1,000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ の広い範囲を対象とした。添加溶液の pH 調整は行わなかったが、実際に測定したところでは $\text{pH } 5.4 \pm 0.3$ の範囲であった。また、すべての濃度系列を 3 連で行ったため、繰り返し数は 3 である。

2-2-5 MC-LR 抽出および分析方法

MC-LR 濃度の測定は HPLC によって行った。まず、各サンプルをろ過した後に、ODS カラムを用いて濾液から MC-LR の抽出を行った。ODS カラムの使用方法は 2-2-2 節と同様であるが、抽出操作の高速化のために固相抽出用マニホールド（ジーエルサイエンス株式会社）を用い、12 試料同時に抽出操作を行った。また、計算式における Sample volume は 2-2-3 節に記載の通り、 0.98 ml とした。カラムから溶出させてメタノールを除去した後、残留物を HPLC 用移動相溶液 1 ml に溶解させ、HPLC 用シリンジフィルター（Millex[®]-LG、pore size: $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 、Millipore）で濾過したものを HPLC 用ガラスバイアルに入れて分析試料とし、PTFE/ニトリルパッキン（日電理化硝子株式会社）で栓をして分析まで -20°C で冷凍保存した。ここで HPLC 用移動相溶液は MC-RR、-YR、-LR 分析用に調整したものであり、100 % HPLC 用メタノールと 0.05 M に調整したリン酸緩衝液（ $\text{pH } 3.0$ ）を体積比で 55 : 45 となるよう混合したものである。また、リン酸緩衝液は 0.05 M のリン酸 2 水素ナトリウム・2 水和物溶液を 0.05 M のリン酸で $\text{pH } 3.0$ となるまで混合したものである。

MC の分析には HPLC（Shimadzu 20 A series、島津製作所）を用いた。移動相は前述の通りであり、カラムは逆相 ODS カラム（STR ODS-II、 $150\times 6.0 \text{ mm}$ 、粒子径 $5 \text{ }\mu\text{m}$ 、信和加工株式会社）とし、カラムオープン温度は 40°C 、流速は $1.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 、UV/Vis 検出器により MC の検出を行い、検出波長には 238 nm を用いた。先に述べた通り MC はその構造中に疎水性の高い Adda という構造を有しているため、逆相クロマトグラフィーが分析法として有効である。また、この Adda 中に存在する供役二重結合の極大吸収波長が 238 nm であるため、測定波長として用いられている。

HPLC を用いた微量物質分析の為、測定においては毎回 Standard 溶液の分析も行った。*M. aeruginosa* の生産する MC には様々な物が存在するが、先に述べた通りアジアを中心に広く検出される MC は MC-RR、MC-YR および MC-LR の 3 種であるといわれている。そこで、Standard 溶液は上記 3 種類の MC の混合物とした。作成方法は以下の通りである。まず、クリーンベンチ内にて精製 MC-RR（ $250 \text{ }\mu\text{g}$ 、和光純薬）、MC-YR（ $100 \text{ }\mu\text{g}$ 、和光純薬）、MC-LR（ $500 \text{ }\mu\text{g}$ 、和光純薬）の全量を、HPLC 分析用メタノールにより各々 $25 \text{ mg}\cdot$

Γ¹となるように調製した。調製後の各 MC をそれぞれ 1 ml ずつピペットで取り 1.5 ml のエッペンチューブに移し、適量の移動相溶液で混合した後に、移動相溶液であらかじめ共洗いしておいた 50 ml のメスフラスコに入れて 50 ml まで移動相溶液でメスアップして十分に混合し、Standard 溶液とした。よって、Standard 溶液中の MC-RR、-YR、-LR 濃度は全て 500 μg · l⁻¹ である。

各サンプル中の MC 濃度の算出は、HPLC によって得られた Standard 溶液と各サンプル間の検出ピーク面積または高さの比から、以下の式に従い計算した。

$$\text{MC variant concentration } (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{\text{Sample peak}}{\text{Standard peak}} \cdot 500 (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) \cdot \frac{1 (\text{mL})}{\text{Sample volume (mL)}}$$

ここで、Sample volume とは、固相抽出に用いた試料溶液の体積 (ml) を指す。固相抽出を介して最終的に 1 ml の移動相溶液に濃縮した際の濃縮倍率分だけ希釈するため、Sample volume で除しているわけである。

2-2-6 吸着特性解析方法

吸着特性および吸着能は、一般に吸着等温線を用いて解析される。吸着等温線とは吸着量と平衡濃度の間に見られる関係である。ここでの平衡濃度とは、水溶液と黒ボク土間において MC-LR が平衡状態に至ったときの水溶液中濃度の事であり、つまり本実験においては振盪実験終了時の濾液中の濃度を指す。吸着等温式には理論式、実験式を含めて実に多くのものが提唱されているが、代表的なものとして以下の 3 つを挙げた。

$$C_s = K_H \cdot C_e \text{----- Henry 式} \quad (\text{比例式})$$

$$C_s = \frac{C_{\text{max}} \cdot K \cdot C_e}{1 + K \cdot C_e} \text{----- Langmuir 式} \quad (\text{理論式})$$

$$C_s = K_F \cdot C_e^{1/a} \text{----- Freundlich 式} \quad (\text{実験式})$$

C_s : 吸着量 (μg · kg⁻¹)

C_e : 平衡濃度 (μg · l⁻¹)

K_H : Henry 定数 (l · kg⁻¹)

C_{max} : Langmuir 式における飽和吸着量 (μg · kg⁻¹)

K : 平衡定数 (l · μg⁻¹)

K_F : Freundlich 式の吸着定数 (μg^{(a-1)/a} · l^{1/a} · kg⁻¹)

a : Freundlich 式の吸着定数

この中で、Langmuir 式は酵素反応速度論における Michaelis-Menten 式や微生物増殖反応における Monod 式と全く同様の式である。また、各式の両辺において平衡濃度を無限の方向に極限をとると分かるように、Henry 式、Freundlich 式は共に正に発散してしまい収束しな

い。よって Henry 式、Freundlich 式の 2 式からは飽和吸着量（最大吸着量）を求めることはできず、決定可能な式は上記の中では Langmuir 式のみであることには注意する必要がある。

吸着等温式の各定数を求める際は其々の式を線形化し、最小二乗法によって求めた各線形化定数から推定することが可能である。Langmuir 式においては Michaelis-Menten 式の場合と同様、逆数変換等により、主に 3 つの線形化法がある。以下にその線形化 Langmuir 式をまとめた。

$$\frac{1}{C_s} = \frac{1}{C_{max} \cdot K} \cdot \frac{1}{C_e} + \frac{1}{C_{max}} \text{-----} \textcircled{1}$$

$$\frac{C_e}{C_s} = \frac{1}{C_{max}} \cdot C_e + \frac{1}{C_{max} \cdot K} \text{-----} \textcircled{2}$$

$$C_s = -\frac{1}{K} \cdot \frac{C_s}{C_e} + C_{max} \text{-----} \textcircled{3}$$

Freundlich 式の場合は、両辺を対数化することで線形化 Freundlich 式を得ることができる。

$$\ln C_s = \ln K_F + 1/a \cdot \ln C_e$$

しかしながら、Langmuir 式の場合は Michaelis-Menten 式と同様に変換の仕方によって誤差の影響を受けやすくなる。特に①の変換は逆数の形をとっているため、低濃度実験における誤差が非常に拡大されやすく、高い実験精度が求められる。それを回避する方法として、非線形最小二乗法を用いたカーブフィッティングが挙げられる。これは線形化前の式を直接実験データに当てはめるという手法で、Microsoft Office Excel のアドオンの一つ、Solver 機能を用いても行う事ができる。非線形最小二乗法とは、端的に言えば理論値と実測値の差の二乗の合計値が最も小さくなるように、理論式の定数を逐次変えながら何度も繰り返し計算を行うものである。本論文では基本的に線形化 Langmuir 式を用いて適応可能性の検討を行ったが、場合によっては非線形最小二乗法の適応も考慮して解析を行った。

2-3 実験結果

2-3-1 MC-LR 吸着平衡状態に至る振盪時間の推定

フラスコ内の MC-LR 濃度の変化を図 2-3 に示した。この図から、2 時間後までに急激な濃度減少の起きていることが明らかとなった。また、それ以降では上澄水中 MC-LR 濃度が一定値に収束しており、その値は $200 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 付近であった。この結果は、日本の黒ボク土が MC-LR 吸着能を有することを示すものである。また、濃度が一定値に収束したということは平衡状態に達したということであり、加えて細菌等による濃度減少の影響は受けなかったことを示すものである。

本結果から、2~4 時間以上の恒温振盪を行えば十分に平衡状態に達することが明らかと

なった。ただし、Miller et al. (2005) や Wu et al. (2011) は振盪時間として 24 時間を採用しており、それらとの整合性を図る上でも、本研究における振盪時間は 24 時間とし、以下の黒ボク土による MC-LR 吸着特性試験を行った。

2-3-2 黒ボク土による MC-LR 吸着特性

MC-LR 添加量と吸着量の関係について、吸着率としてまとめたものが表 2-3 である。この表から明らかなように、黒ボク土は添加量の内、約 70 %の MC-LR を吸着除去可能であることが明らかとなった。これは、黒ボク土質の農地に灌漑用水を介して MC-LR が散布された場合、約 70 %は確実に黒ボク土に吸着されるという事を意味するものである。

図 2-4 は、MC-LR 添加濃度の実測値と土壤吸着量の関係を示したものである。図からも明らかなように、両者の間には決定係数 $R^2=0.9985$ という非常に高い直線関係が見られた。これは、添加濃度に比例して多くの MC-LR が吸着され得るという事である。また、同図から、黒ボク土質の農地に灌漑用水を介して MC-LR が散布された場合、

$$\begin{aligned} \text{Adsorption amount } (\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}) \\ = 3.75 \cdot \text{Concentration in the irrigation water source } (\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}) \end{aligned}$$

という関係式から、灌漑用水源の MC-LR 濃度の値を用いて土壤吸着量を推定可能な事が明らかとなった。

図 2-5 は、MC-LR 平衡濃度と吸着量の関係を示したものである。図から、両者の間には決定係数 $R^2=0.9764$ という高い直線関係のあることが分かった。即ち、平衡濃度の上昇に対して、吸着量は比例的に増加するという事である。MC-LR 平衡濃度と吸着量に高い相関が得られたことから、先に示した 3 つの吸着等温式の中では比例式である Henry 式を違和感なく当てはめることが可能であり、その際の Henry 定数として $14.81 \cdot \text{kg}^{-1}$ という値が得られた。一方で、他の吸着等温式として Langmuir 式および Freundlich 式の適応を試みた。図 2-6 は 2-2-6 節に記載の線形化 Langmuir 式①~③を当てはめたものであるが、これらの一連の図を比較すると、Langmuir 式に関しては線形化法によって決定係数 R^2 の値に非常に大きな差異の存在することが明らかとなった。表 2-4 はこれら線形化毎の各定数および R^2 値をまとめたものであるが、各線形化法によって C_{max} も K も大きく変動しており、一致しなかった。但し、線形化 Langmuir 式②および③は両辺の構成から R^2 値は参考値として扱うべきである。また、Microsoft office excel による繰り返し計算によって推定した Langmuir 式の各定数も合わせて表 2-4 に記載したが、 C_{max} が飛び抜けて高い値となってしまった。よって、本実験で得られた黒ボク土による MC-LR 吸着等温線データに対する Langmuir 式の適応は困難であるといえる。

Freundlich 式においては図 2-7 の通り非常に高い適合性が見られた。その際の Freundlich 式の定数 a および K_F は其々 1.09 、 $21.5 \mu\text{g}^{0.083} \cdot \text{l}^{0.92} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($=\mu\text{g}^{(1.09-1)/1.09} \cdot \text{l}^{1/1.09} \cdot \text{kg}^{-1}$) であった。よって、黒ボク土質土壤の有する吸着特性については、間隙水中の MC-LR 濃度の値から、

$$C_s = 21.5 \cdot C_e^{1/1.09}$$

という式を用いることで精度よく吸着量を推定できることが明らかとなった。

2-4 考察

本実験によって、黒ボク土は添加 MC-LR の 70 % を吸着可能であることが分かった (表 2-3)。今回の実験に用いた土壌の質量は 10 g、添加溶液量が 50 ml であったため、振盪実験中の土壌は冠水状態にあったといえる。しかしながら、実際の農業環境において灌漑用水量に対する土壌の量は圧倒的に多い。つまり、添加された MC-LR は約 70 % が黒ボク土に吸着されるが、それが土壌の至る所で起きたとすれば、最終的にはほとんどの添加 MC-LR が黒ボク土に吸着されると予測される。また、吸着平衡に至るまでの時間も非常に短かったことから、添加された MC-LR は速やかに黒ボク土に吸着されることが明らかとなった (図 2-3)。神蔵ら (2014) では、黒ボク土、赤玉土、腐葉土の混合土からなる土壌を用いた栽培作物への MC-LR 添加実験において添加量の大部分が土壌吸着もしくは微生物分解された可能性が示唆されていたが、本実験結果によって黒ボク土を含めた土壌吸着の寄与の大きいことが示されたといえる。一方で、農地外流出という観点から考えれば、土壌中に MC-LR が留まるということは地下浸透による地下水への MC-LR 汚染が同時に防げるという事であり、農地土壌中で分解菌等による MC-LR 分解が進むことで、農地が一つの MC 分解除去装置としても機能し得ることになる。Chen et al. (2006) は中国の武漢および昆明より採取された実畑土壌を用いて MC-LR の鉛直方向の浸透試験を行っており、人工雨として 0.01 M の塩化カルシウム溶液を滴下した場合、添加 MC-LR の内の 73.2~88.9 % が土壌流出水から検出されたと報告している。よって、土壌の有する MC-LR 吸着能が低い場合、農地を介した地下水への MC-LR 汚染は無視できないものとなる。ここで、Chen et al. (2006) の Henry 定数を本研究の結果と比較すると、驚くべきことに本研究の Henry 定数の方が 14 倍以上の高い値を示していた。このことから、日本の黒ボク土は非常に高い MC-LR 吸着能を有すると考えられる。

黒ボク土による MC-LR 吸着機構については不明なところも多いが、MC-LR 分子中の Adda 部分が高い疎水性を有する事、様々な疎水性吸着剤による MC-LR 吸着除去能が報告されている事 (Lambert et al., 1996; Pendleton et al., 2001; Yan et al., 2006; Sathishkumar et al., 2010)、黒ボク土が有機物に富む土壌である事を考慮すれば、有機態炭素成分中の疎水性物質による疎水結合によって、MC-LR が黒ボク土に吸着されたと考えることができる。吸着等温式による解析では、Langmuir 式は実験結果への適合率が低く、対して Freundlich 式は良く適合することが明らかとなった。Freundlich 式は様々な実験データに適合しやすいといわれているが、中でも活性炭等のような疎水結合が強く働き、かつ吸着剤表面が不均一な場合においても適合可能であるといわれている (安部, 2002)。一方、Langmuir 式は吸着サイトと吸着質間の 1 対 1 対応を仮定しており、吸着剤表面の不均一性等は考慮されていない。よって、本実験における黒ボク土の吸着特性には適応が困難であったといえる。このことは同時に、疎水結合が中心的役割を果たした可能性を示唆するものでもある。ただし、

図 2-5 のような吸着等温線中に頭打ちとなる領域のプロットが無い場合、Langmuir 式の各定数を決定することは難しい。よって、MC-LR 添加濃度を今以上に濃くした場合は吸着量が飽和し、Langmuir 式が適合できる可能性はある。しかしながら、本実験で用いた添加濃度の最大は $1,150 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ と非常に高濃度であるため、これ以上の高濃度を用いた実験は現実的ではない。

疎水結合が中心的な吸着機構であるのならば、負電荷を有しやすい土壌構成要素、例えば粘土鉱物等は MC-LR を吸着しにくいはずである。加えて、MC-LR の疎水性は、存在している水溶液の pH によって変化することが指摘されている (de Maagd et al., 1999; Liang et al., 2011)。つまり、添加溶液の pH により MC-LR の疎水性・親水性の存在割合が変化してしまい、今回の実験で得られたような黒ボク土による高い MC-LR 吸着能力が得られない可能性がある。図 1-10 でも示したように、富栄養化の進行は昼間の pH 上昇を引き起こす傾向がある。よって、富栄養化が過度に進行した灌漑用水源において MC-LR が生産された場合、pH が黒ボク土の MC-LR 吸着能に影響を及ぼすことが十分考えられる。次章ではこの点について、より詳細な検討を行った。

2-5 まとめ

黒ボク土による MC-LR 吸着における平衡状態到達時間は振盪開始から 2~3 時間であったが、他の文献との整合性をとるために恒温振盪時間は 24 時間とした。黒ボク土は添加量の 70 % の MC-LR を吸着可能であることが分かった。これは黒ボク土中の有機態炭素成分による疎水結合によって MC-LR が吸着されたと考えられた。また、添加初期濃度と吸着量の関係は比例式で表現可能であり、比例係数は 3.75 であった。吸着等温線としては Henry 式および Freundlich 式が良く適合し、各式の定数は其々 K_H が $14.8 \text{l} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 K_F が $21.5 \mu\text{g}^{0.083} \cdot \text{l}^{0.92} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 a が 1.09 と算出された。これらの式を用いることで、灌漑用水源中および土壌間隙水中の MC-LR 濃度から黒ボク土による吸着量を推定可能であるといえる。

表 2-1. MA 培地組成

Components	Amount
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 mg
KNO_3	100 mg
NaNO_3	50 mg
Na_2SO_4	40 mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50 mg
$\beta\text{-Na}_2$ glycerophosphate	100 mg
Na_2EDTA	5.0 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.0 mg
ZnCl_2	0.5 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5.0 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.8 mg
H_3BO_3	20 mg
Bicine	500 mg
Distilled water	1 L
pH	8.6

(引用：市村, 1979)

表 2-2. M-11 培地組成

Components	Amount
Na_2CO_3	30 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40 mg
NaNO_3	100 mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg
K_2HPO_4	10 mg
Distilled water	1 L
pH	8.0

(引用：国立環境研究所 微生物系統保存施設ホームページ)

表 2-3. 各添加濃度における黒ボク土の MC-LR 吸着率

Initial concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)		Adsorption percentage (%)
Setting	Actual	
0	0 \pm 0	0 \pm 0
50	44.7 \pm 1.2	80.4 \pm 2.7
100	84.9 \pm 5.3	76.0 \pm 1.9
250	222 \pm 5.6	73.6 \pm 6.3
400	443 \pm 1.7	75.3 \pm 1.9
500	408 \pm 17	69.6 \pm 1.3
600	657 \pm 17	73.8 \pm 1.0
750	856 \pm 8.5	77.1 \pm 1.5
1,000	1,150 \pm 38	74.7 \pm 2.7

表 2-4. Langmuir 式の各線形化法により得られた定数の比較

線形化式	Cmax ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	K	R ²
①	5.00×10^3	4.12×10^{-3}	0.98
②	2.00×10^4	8.10×10^{-4}	0.13 (参考)
③	3.77×10^3	7.79×10^{-3}	0.05 (参考)
(非線形最小二乗法)	4.00×10^6	3.71×10^{-6}	(残差平方和 3.49×10^5)



図 2-1. 大量培養の様子

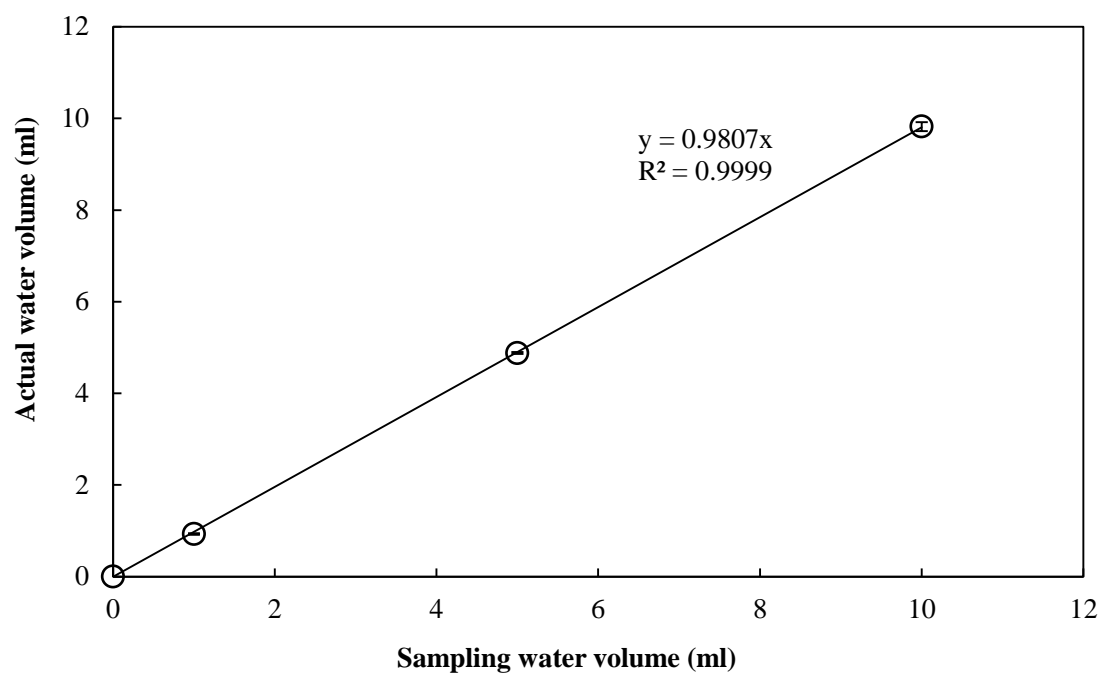


図 2-2. 10 ml の Gilson ピペットマンにより採取した際の実水量

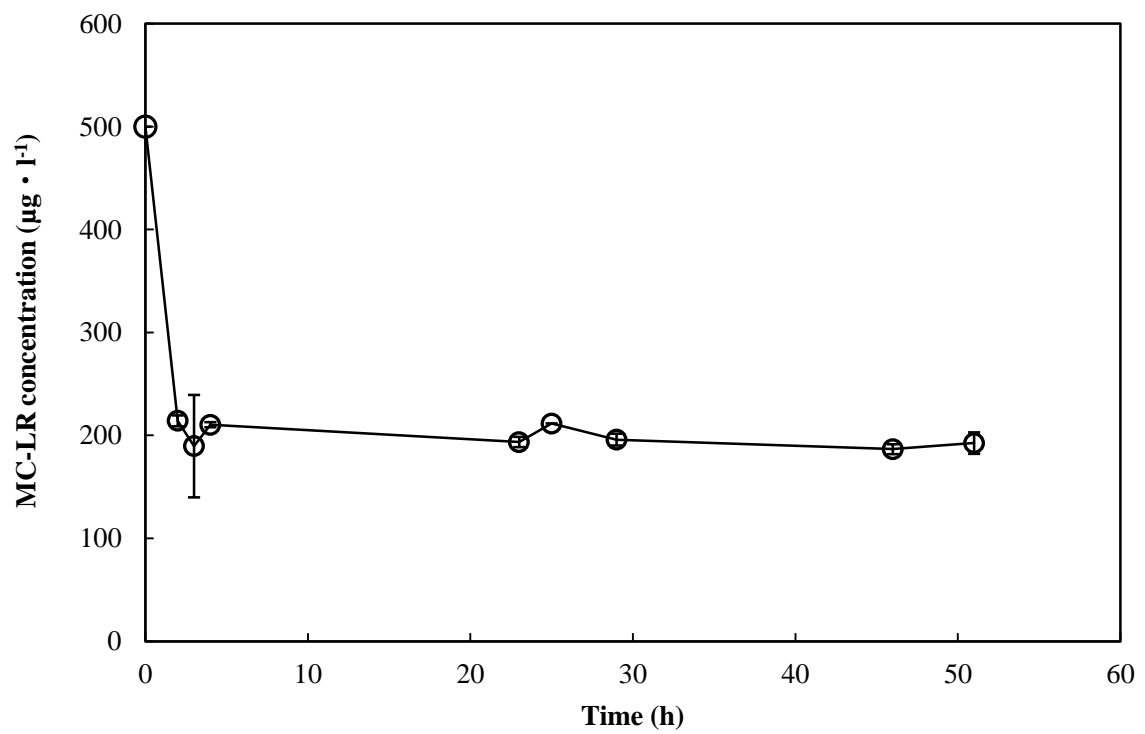


図 2-3. 振盪時間における溶液中 MC-LR 濃度の変化

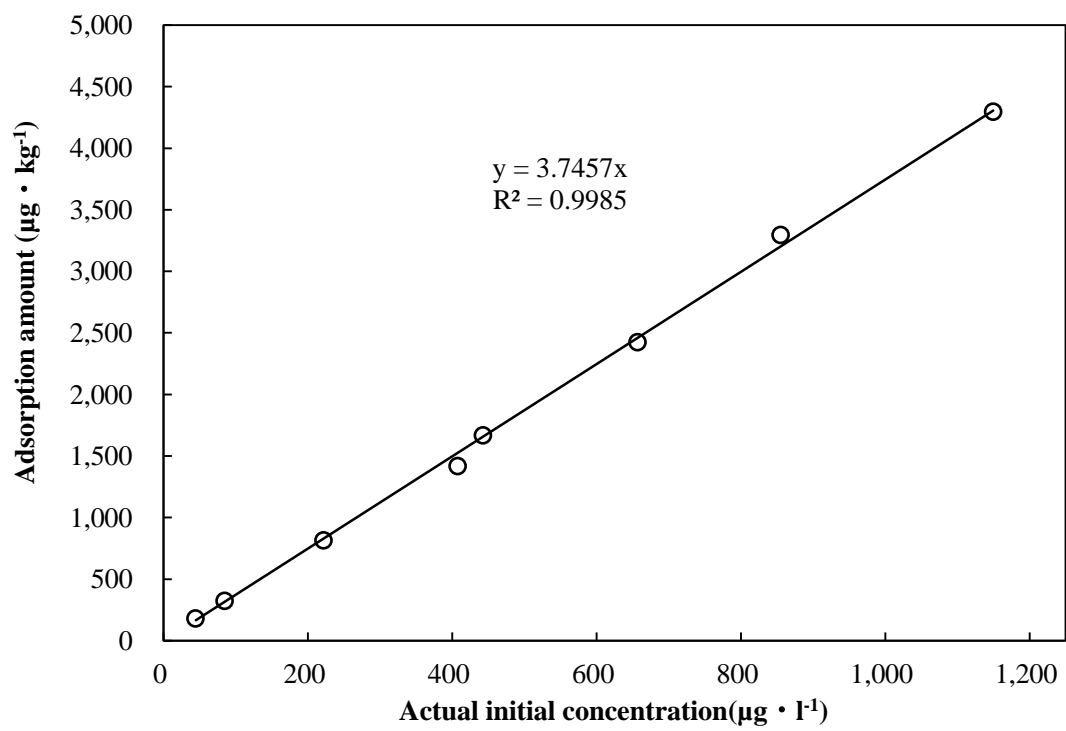


図 2-4. MC-LR の実添加濃度に対する吸着量

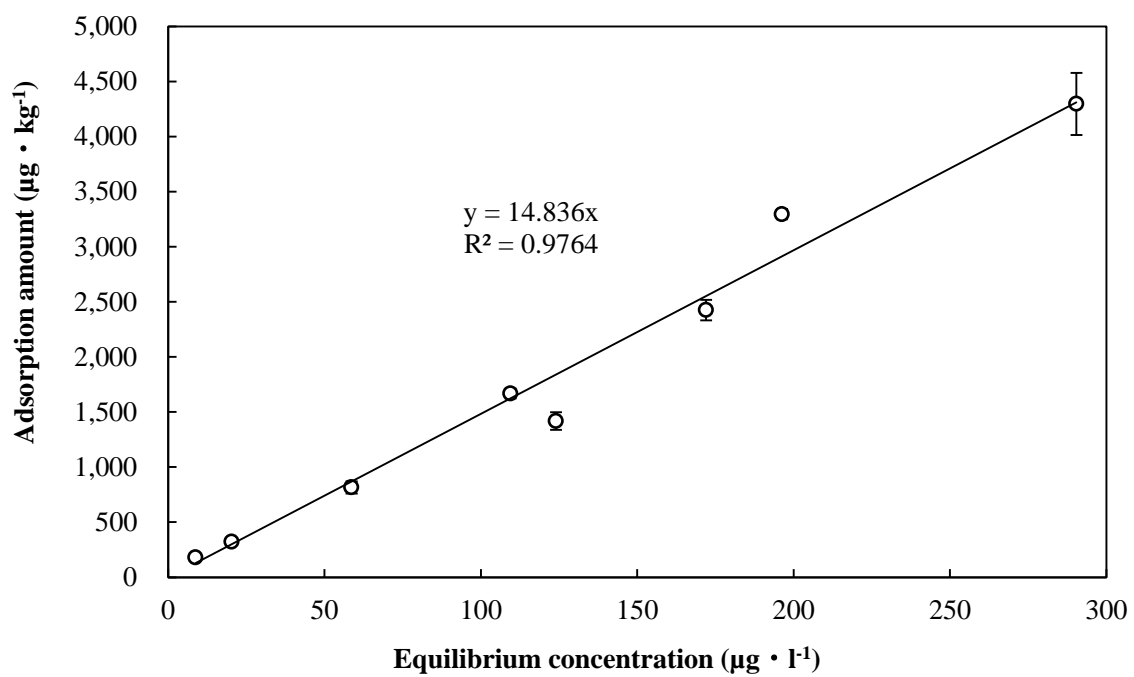


図 2-5. 黒ボク土による MC-LR 吸着等温線図

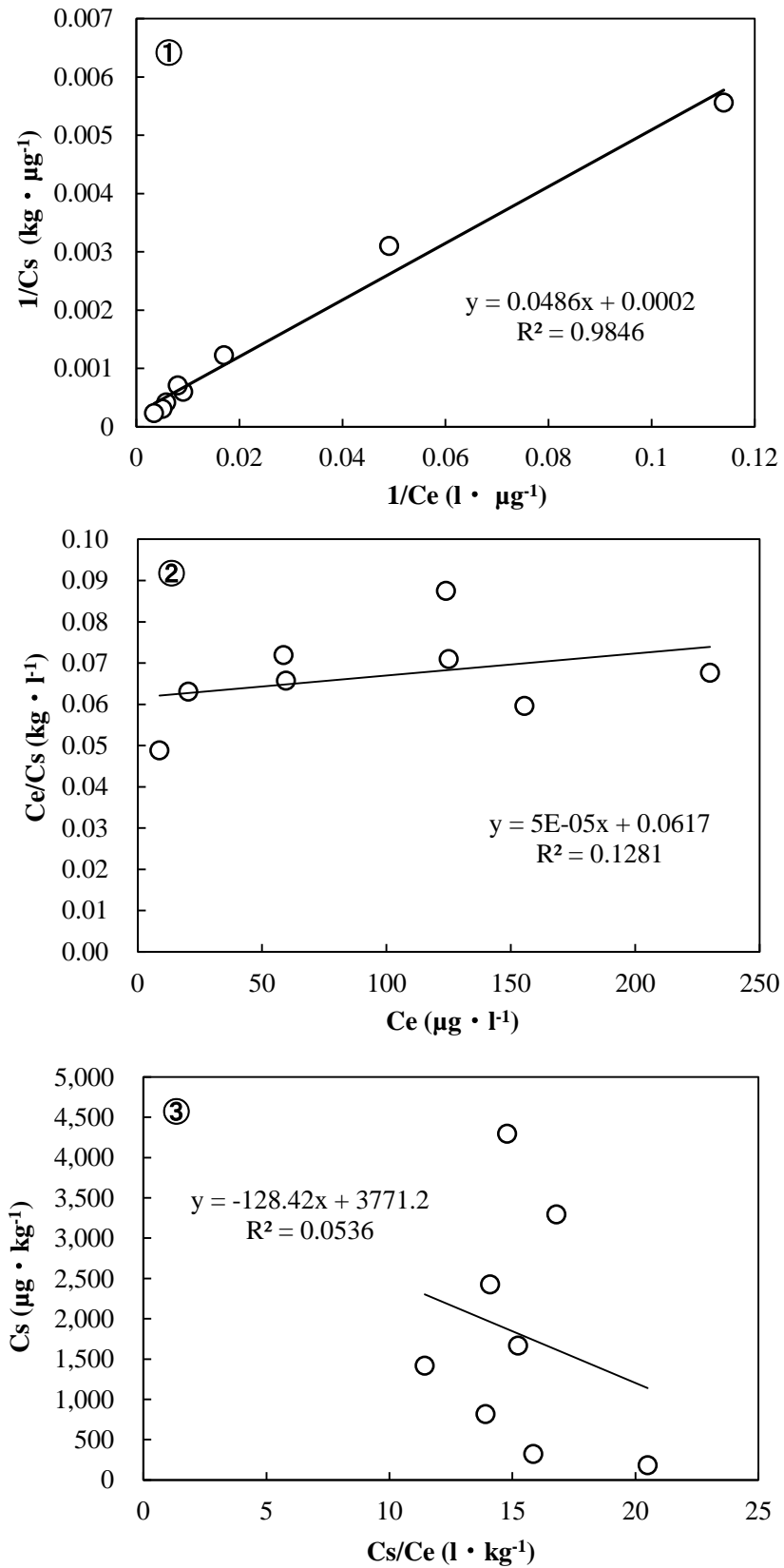


図 2-6. 黒ボク土の MC-LR 吸着等温データに対する各線形化 Langmuir 式の適用

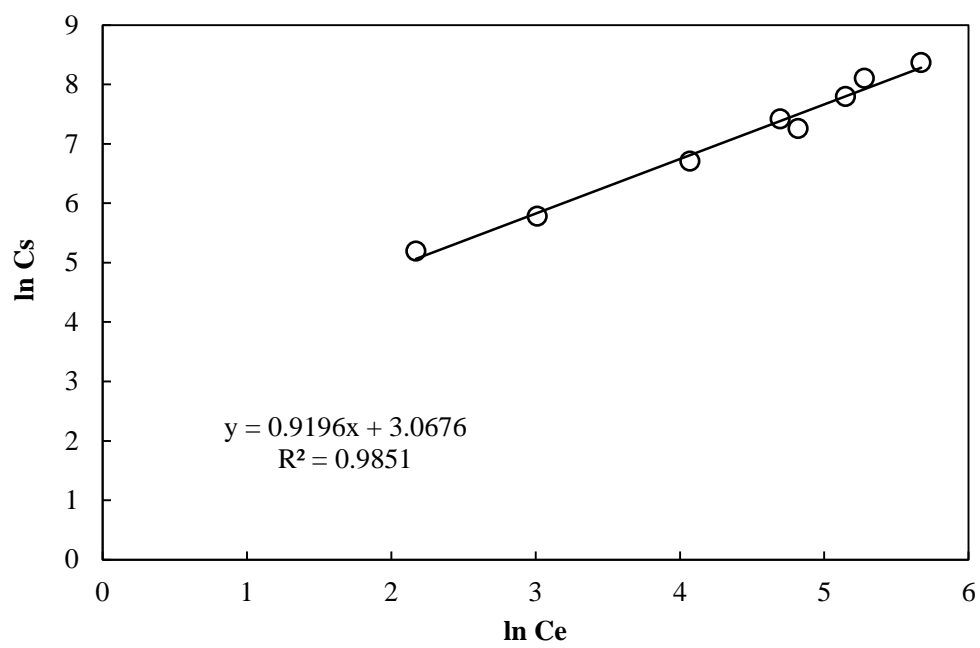


図 2-7. 線形化 Freundlich 式の適用結果

第3章 黒ボク土・赤玉土による MC-LR 吸着特性に与える灌漑水源 pH 影響 および滅菌操作の有無による MC 吸着特性比較

3-1 はじめに

MC-LR は図 1-4 に示したように Adda と呼ばれる部位を持つ環状ペプチドであり、Adda 部は疎水性が高いという特性を有していることは先に述べた通りである。しかしながら、de Maagd et al. (1999) は MC-LR のオクタノール・水分配比 (D_{ow}) が pH 上昇に伴い減少すると報告している (図 3-1 A)。Liang et al. (2011) もまた、MC-RR および-LR の D_{ow} と pH の関係を報告している (図 3-1 B)。両グラフ間で多少の差異は認められるが、pH の上昇に伴い MC-LR の D_{ow} が減少する点では一致している。 D_{ow} は Log P と同様の意味を持ち、すなわち MC-LR の疎水性・親水性割合を示すものであるが、pH 等により値の変動する場合は D_{ow} が用いられる。富栄養化で異常増殖したアオコは昼間に光合成を活発に行うが、一般的な藻類と異なり重炭酸イオン HCO_3^- をよく取り込むため、水中での二酸化炭素の平衡が $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$ から $H^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons 2H^+ + CO_3^{2-}$ に移行することで水中 pH の上昇を引き起こす (渡辺ら編, 1994)。そのため、pH 上昇により MC-LR の疎水性割合が減少し、それに伴い有機物への MC-LR 吸着量が減少する恐れがある。Liu et al. (2008) は河川水中の浮遊性粒子による MC-LR 吸着能を検討した際、pH 3 の条件と比較して pH 7 以上では吸着能が大きく減少したと報告している。更に、親水性 MC-LR は周辺環境の pH が 2.1 以上になると負電荷を有する可能性が指摘されている (de Maagd et al., 1999; Lawton et al., 2003)。一方、土壌の粘土鉱物は金属イオンの同型置換、結晶の壊れ目、腐植のカルボキシル基等により永久電荷として負電荷を有している (山根, 1969)。即ち、灌漑用水の pH によって負電荷を有する親水性 MC-LR (MC-LR⁻) の割合が増減し、場合によっては土壌の永久電荷である負電荷と反発し合い、吸着能が著しく阻害される恐れがある。土壌吸着能の低下は間隙水中の MC-LR 濃度の上昇を引き起こし、それは作物根の受ける MC 曝露濃度も急激に上昇する可能性がある。故に、MC の土壌吸着作用に与える pH 影響の解明が急務である。

更に、MC は種類によって物理化学的特性の大きく異なることが明らかとなっている。溶液中で解離した親水性 MC の有する正味電荷について、中性付近の pH において MC-LR は -1、MC-RR は 0 と予測されている (Lawton et al., 2003)。従って、 D_{ow} も MC 種間で大きく異なることが予想できる。正味電荷は粘土鉱物との静電的相互作用、 D_{ow} は有機態炭素による疎水結合力を左右する重要な要因であるから、土壌による MC 吸着作用は土壌種および MC 種によって異なる可能性が大いにある。この点に関して、MC の土壌内挙動を吸着現象に的を絞って考えれば、荷電特性および D_{ow} の 2 要因から評価が可能であると考えられる。

本章では上記の点を踏まえ、有機物豊富な黒ボク土および粘土鉱物豊富な赤玉土による吸着特性の解析を通して、MC-LR の土壌吸着に及ぼす pH の影響を検討した。また、非滅菌土壌による各 MC 種の吸着特性の検討から、両者の比較を通して滅菌操作による影響の解析を同時に行い、MC の農作物曝露に対して土壌の果たす機能と役割の解明を行った。

3-2 実験方法

3-2-1 黒ボク土・赤玉土による MC-LR 吸着作用に及ぼす pH 影響特性

供試土壌として、前章と同様の黒ボク土(株式会社牧野)および赤玉土(株式会社牧野、栃木県鹿沼市産の赤土を玉状に成形したもの)を用いた。赤玉土は不純物を目視で取り除いたのちに、乳鉢で塊を潰して粉末状にしたものを使用した。前章の通り、一般的な日本の農地は黒土であることが多い(羽鳥, 1975; 加藤, 1976)。火山堆積物である赤土層は黒土層よりも下層に位置することが多く、関東ローム層はその典型である。故に赤玉土は粘土鉱物を多く含み、黒ボク土は有機物を含む土壌である。赤土成分の多い土壌は水はけの良さ等からバレイショ栽培等に活用されており、形の良い高品質のものが収穫されるといわれている(竹内ら, 1990)。よって、ここで得られた成果は実際の現場に還元可能であるといえる。実験方法、分析における前処理および HPLC による分析方法は前章と同様に行った。即ち、121°C、20 分のオートクレーブ滅菌を行った土壌と MC-LR 溶液をフラスコで恒温振盪し、平衡濃度を HPLC で測定し、吸着量を算出した。MC-LR 添加濃度については 100、250、500 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ を基本の設定濃度とした。添加溶液の pH 調整は塩酸および水酸化ナトリウム溶液を用いて行い、条件は pH 3.5、5.5、7.5、9.5 とした。ただし、黒ボク土は前章の実験データを利用したため、pH 5.5 ではなく 5.4 である。また、実際の灌漑用水源で pH が 3.5 まで低くなる可能性はほぼ無いといえるが、吸着特性の pH 依存性を推定する際に極端な条件を含めてグラフ化することで、外挿による誤った考察を防ぐことが可能である。よって極端な条件である pH 3.5 の動態を評価した。全濃度系列を 3 連で行ったため、繰り返し数は 3 である。

吸着特性および吸着能は前章と同様に吸着等温線を用いて解析した。用いた式も前章と同様に、Henry 式、Langmuir 式および Freundlich 式とした。また、各式の線形化も前章と同様に行ったものを用いた。

3-2-2 非滅菌条件における各種 MC 混合溶液に対する黒ボク土・赤玉土の MC 吸着特性

MC-LR 以外の MC 種を用意するため、独立行政法人 国立環境研究所 微生物系統保存施設より分譲された *M. aeruginosa* NIES-102 (旧名: *M. viridis* NIES-102) 株を MA 培地にて培養し、藻体から MC を抽出、C18 (ODS) カラムおよび Silica カラムを用いた固相抽出法により、添加 MC 溶液を準備した。

供試土壌としては前節 3-2-1 と同様に黒ボク土および赤玉土を用いた。その後の実験方法も同様であるが、各土壌はオートクレーブ滅菌を行わずに用いた。実験終了後の抽出方法、HPLC による分析方法も前節と同様である。ただし、本章における MC の分析対象は MC-RR、MC-YR、MC-LR の 3 種とし、これらの合計値を MC 濃度とした。

3-3 実験結果

3-3-1 滅菌黒ボク土・赤玉土の有する MC-LR 吸着率

異なる初期添加濃度および初期 pH における滅菌黒ボク土、赤玉土の MC-LR 吸着率を、各々図 3-2A および 3-2B に示した。図 3-2 より、添加 MC-LR の多くが黒ボク土および赤

玉土に吸着されることが明らかとなった。特に赤玉土は添加量の 87 %以上を吸着可能であった。黒ボク土では低初期濃度かつ pH 3.5 において吸着率が 56.7 %と低い値を示したが、それ以外では添加量の約 70 %以上を吸着可能であった。実際の灌漑用水源において pH が 3.5 以下まで低下することはほぼ無いといえるため、この吸着率の低下は無視できるものである。本研究結果から、黒ボク土および赤玉土が中心的な土壌においては添加 MC-LR の 70 %以上が土壌に吸着されることで、土壌間隙水中の MC-LR 濃度は大きく低減し、作物に対する曝露濃度も極めて低くなると考えられた。また、様々な淡水域における MC 分解菌の存在（朴, 2014）および Chen et al. (2006) の報告において中国の実土壌における MC-LR 分解の半減期が 6.0~17.1 日であったことを考慮すれば、灌漑用水由来もしくは土着の MC 分解菌によって、土壌に吸着された MC 類が分解され、農地から除去されると判断できる。

3-3-2 滅菌黒ボク土・赤玉土による MC-LR 吸着特性評価のための吸着等温式の適合性検討

滅菌黒ボク土・赤玉土の有する MC-LR 吸着特性を検証するため、吸着等温式を用いて解析を行った。異なる pH 条件における両土壌の MC-LR 吸着特性について適用可能な吸着等温式を検討したところ、両土壌共に全ての pH 条件下で比例式の Henry 式が良く適合することが明らかとなった（図 3-3、 $R^2 > 0.95$ ）

理論式である Langmuir 式の全てに試験結果に対する適用は、前章と同様に難しいものであった。表 3-1 は滅菌黒ボク土の MC-LR 吸着結果に対して 3 つの線形化 Langmuir 式を適応した際の飽和吸着量 (C_{max})、平衡定数 (K) および決定係数 (R^2) を初期 pH ごとにまとめたものであるが、低初期 pH の結果ほど直線性が見られない結果となった。特に初期 pH 3.5 の行を見てみると C_{max} 、 K が共に負の値を示していたことから、このデータには Langmuir 式の適用が不可能であったことが分かる。一方、初期 pH の上昇に伴い線形化式間の C_{max} 、 K も値が近づいていき、初期 pH 9.5 に至っては線形化式に依らず同様の値が得られた。これは、初期 pH 9.5 のデータは Langmuir 式の適用が可能であったことを意味する。その際には C_{max} は $4,598 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 K は $0.0050 \text{ l} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ と推定された（実際の吸着等温線のグラフは付録の図 S-1~S-3 を参照）。

滅菌赤玉土による MC-LR 吸着結果に対して、黒ボク土と同様に Langmuir 式の適用を検討した。表 3-2 は得られた C_{max} 、 K および R^2 を初期 pH ごとにまとめたものであるが、黒ボク土とは逆に初期 pH 3.5 において高い直線性が確認され、線形化式に依らず同様の C_{max} 、 K の値が得られており、Langmuir 式の適用が可能であったことが分かった。その際の C_{max} は $17,992 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 K は $0.0042 \text{ l} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ と推定された（実際の吸着等温線のグラフは付録の図 S-4~S-7 を参照）。

更に、両滅菌土壌による MC-LR 吸着結果に対して実験式である Freundlich 式の適用を試みた。表 6-3 は得られた Freundlich 式の各定数および R^2 を初期 pH ごとまとめたものであるが、全実験条件で高い直線性が得られており、Freundlich 式が吸着等温式として適用可能であることを意味している。また、実際の農地における土壌の MC-LR 吸着量を推定する際には、これらの値を用いることで実土壌中の間隙中 MC-LR 濃度から土壌粒子による

MC-LR 吸着量を推定可能であるといえる（実際の吸着等温線のグラフは付録の図 S-8 を参照）。

以上をまとめると、Langmuir 式は全初期 pH 条件には適用できず、従って得られたパラメータの pH 依存性の解析には不適切であった。また Freundlich 式は高い適合性を示していたが、実験式であること、各パラメータが飽和吸着量、吸着質親和性等の様々な部土科学的要素を複合したものであること、 K_F の単位中の指数が a に依存して変化するため統一されないこと等から、Freundlich 式を用いた各パラメータの pH 依存性を科学的に説明することが極めて困難であった。よって、以降では Henry 式を用い、その吸着定数 K_H と pH の関係に焦点を当てて解析を行った。

3-3-3 滅菌黒ボク土・赤玉土の MC-LR 吸着における Henry 吸着定数に及ぼす pH 影響

Henry 吸着定数 K_H と pH の関係を解析するために、図 3-3 から得られた各土壌の K_H と初期 pH の関係を図 3-4 にまとめた。その結果、滅菌黒ボク土に対して滅菌赤玉土の K_H は非常に高いこと、滅菌黒ボク土の K_H は初期 pH 3.5 を除き影響を受けないこと、対して、滅菌赤玉土の K_H は初期 pH 3.5→5.5 で減少、5.5→7.5 では横這いとなり、7.5→9.5 で再度減少することが明らかとなった。これは、添加溶液 pH が 9.5 の様に高い場合は赤玉土による MC-LR 吸着が阻害されることを意味する。また、両滅菌土壌共に K_H が横ばいとなる pH 領域が存在しており、そこでは pH 影響が緩和されたと考えられた。そこで、振盪実験終了時の上澄み水の pH を測定したところ、pH および MC-LR 濃度に依らず、上澄水中の pH はいずれも 5~6 の間に変化していた（図 3-5）。別途、オートクレーブ土壌の pH (H_2O) を測定したところ、黒ボク土と赤玉土でそれぞれ 5.7、5.4 であった。これらの結果は、黒ボク土と赤玉土が吸着特性試験の実施中において、pH 緩衝作用によって pH を変化させたことを意味するものである。

3-3-4 非滅菌黒ボク土・赤玉土による MC 吸着特性からの比較解析

非滅菌条件における土壌の種類の違いによる MC 吸着特性比較試験のために、*M. aeruginosa* NIES-102 株より抽出して用意した添加溶液は MC-RR (42%)、MC-YR (13%)、MC-LR (45%) の全てを含有しており、MC-RR および MC-LR が多くを占めているものであった。MC 添加濃度の実測値は各々 MC-RR 158.2 ± 6.3 、MC-YR 47.4 ± 11.4 、MC-LR $167.6 \pm 10.6 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ であり、従って MC 濃度は $373.1 \pm 19.8 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ であった。*M. aeruginosa* の生産する MC には様々な物が存在するが、アジアを中心に広く検出される MC は MC-RR、MC-YR、MC-LR の 3 種であるといわれている。本研究における *M. aeruginosa* NIES-102 による MC-RR、MC-YR、MC-LR の生産割合は 3.3 : 1 : 3.5 であったが、Yasuno et al. (1998) の過去の報告と比較すると、多少 MC-RR の生産量が少なかったが、取り立てて大きな差異は認められなかった。

各土壌による MC-RR、MC-YR、MC-LR の吸着量を図 3-6 に示した。図より、MC-RR の吸着量に土壌間の差は認められなかった。一方、MC-YR および MC-LR では赤玉土の方が黒ボク土より高い吸着量を示すような結果が得られた。しかしながら、実験に用いた MC

添加溶液の初期濃度を実際に比較したところ、各実験系列で多少の差が認められた。例として、図 3-7 に MC-YR の初期実測濃度と吸着量のばらつきを示した。このように、黒ボク土実験系と赤玉土実験系の間に初期濃度のばらつきが存在していた。また、土壌種により吸着機構が異なるため、当然ながら平衡濃度に差が存在する。従って図 3-6 の各 MC 種における吸着量に対して単純な t 検定から有意差を求めることは適切ではないと判断した。よって、全 MC 吸着率から両者の比較を行った。表 3-4 は各土壌の MC-RR、-YR、-LR 吸着量および吸着率を示したものであるが、全 MC (RR + YR + LR) において、t 検定により黒ボク土と赤玉土の間に 5 %水準で有意差が認められた。これまでに得られた成果を踏まえると、赤玉土は黒ボク土よりも高い MC 吸着能を有する可能性は十分にあるといえる。また、表 3-4 において全 MC 吸着率が 90 %を超える高い値を示したことから、両土壌共に高い MC 吸着能を有することが明らかとなった。

次に、各土壌による各 MC 種の吸着力を比較した。図 3-8 は各土壌における MC-RR、-YR、-LR 吸着率をまとめたものであるが、黒ボク土において MC-RR、MC-YR、MC-LR の順で吸着率が減少しているように見える。また、赤玉土では MC-LR 吸着率が他に比べて低いように見える。そこで、R を用いて Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った結果、図 3-8 に示したように、黒ボク土ではすべての MC 種において、赤玉土では MC-LR において 5 %水準で有意差が認められた。よって、黒ボク土では MC-RR を、赤玉土では MC-RR および-YR をより吸着し易かったことが明らかとなった。

3-4 考察

3-4-1 各土壌による MC-LR 吸着機構および pH 緩衝作用の影響

疎水結合を引き起こす有機態炭素を有するであろう黒ボク土に対して、粘土鉱物を多く含む赤玉土の方が高い MC-LR 吸着能を示したことから、赤玉土の有する粘土鉱物は MC-LR 吸着に寄与することが分かった。実際に、両土壌の有する全有機態炭素量 (TOC) を固体試料用 TOC 分析装置 (TOC-V_{CSH}, 固体試料燃焼装置 SSM-5000A 接続, 島津製作所) により分析したところ、黒ボク土は 85.54 mg-TOC・g-Soil⁻¹、赤玉土は 14.77 mg-TOC・g-Soil⁻¹ と、両者の間には 5.8 倍ほどの差が見られた。特に赤玉土の方が TOC 含有量は低いにもかかわらず高い MC-LR 吸着能を示したことから、黒ボク土と赤玉土では吸着機構が決定的に異なることは明らかである。先述の通り粘土鉱物は一般的に負電荷を有すること、親水性 MC-LR は負電荷と有すると推測されていることから (de Maagd et al., 1999; Lawton et al., 2003)、赤玉土においては粘土鉱物と親水性 MC-LR (MC-LR⁻) が反発し合い吸着力は低下すると予想されたが、実際はそうではなかった。その理由として考えられたのが周辺 pH に依存して変化する変異電荷の存在である (佐藤, 2001)。赤玉土は風化火山灰層から採取されており、複数の研究者によりアロフェン、イモゴライト、フェリハイドライト、石英、長石、カオリン鉱物等の粘土鉱物が検出されている (木次, 1989; 浅岡および青野, 2006; 黒川および香村, 2016)。中でもアロフェン、イモゴライト、フェリハイドライト等は変異電荷を有するといわれている (軽部ら, 1998; 福土および佐藤, 2003; 福土および鈴木, 2004)。黒川および香村 (2016) は赤玉土の陰イオン交換容量 (Anion Exchange Capacity, AEC)

を測定しており、pHによって変動するが AEC を有することを明らかとしている(図 3-9)。よって上記の変異電荷を有する粘土鉱物が帯ていた正電荷が MC-LR⁻を吸着した可能性は高い。Morris et al. (2000) は変異電荷を有するカオリナイトを含む海岸沿いの底泥が MC-LR を吸着したと報告しており、本実験の赤玉土における吸着作用においても同様に、変異電荷が大きく寄与したことを裏付けられるといえる。

図 3-10 は de Maagd et al. (1999) の報告を基に、MC-LR 存在形態と pH との関係を示したものである。MC-LR の存在形態は疎水性 MC-LR と親水性 MC-LR (MC-LR⁻) としたが、pH 5~5.5 付近を境にして低 pH 側では疎水性の割合が、高 pH 側では親水性の割合が高くなる(図 3-10)。従って、pH 3.5 の場合を除き、赤玉土の K_H が黒ボク土より高かった理由としては、疎水性 MC-LR の割合が親水性のものより少なく、従って疎水結合され得る量自体が少なかったためであると考えられる。

黒ボク土の K_H が初期 pH の影響を受けなかった原因は土壤の pH 緩衝作用によるものであったと判断されたが、一方で同様に pH 緩衝作用が働いたにもかかわらず、赤玉土では初期 pH 7.5→9.5 にかけて K_H が減少していた。これは pH の上昇に従い赤玉土の AEC が減少するため(図 3-9)、初期 pH の上昇に伴い赤玉土の正電荷量が減少したことで MC-LR⁻ を十分に吸着できなかったことが理由のように一見思われる。しかしながら振盪終了時、つまりは平衡状態における上澄み水中の pH は緩衝作用により初期 pH に関わらず一定範囲に収束していたことから(図 3-5)、AEC の減少という理由で本結果を説明することは困難である。その他に考えられる要因としては、土壤の pH 緩衝作用が引き起こす負電荷量の増加が考えられる。土壤の pH 緩衝作用は以下の様な仕組みに依るといわれている(山内ら, 1985; 牧野, 1998; 朝倉ら, 1999)。

①土粒子表面に存在する陽イオンによる OH⁻イオンの中和

②粘土鉱物の-Si および-Al 構造端部による OH⁻イオンの中和



③腐食の構造端部による OH⁻イオンの中和



特に②の OH⁻イオンの中和は粘土鉱物の有する負電荷量を必然的に増加させるため、土壤のアルカリ緩衝量の増加は赤玉土の負電荷量を増加させる。加えて、赤玉土では変異電荷部分が MC-LR⁻の主要な吸着部位と考えられるが、MC-LR はホウ素やフッ素、重金属等と異なり分子量約 1,000 の環状ヘプタペプチドであるため、pH 緩衝作用によって生じた負電荷と MC-LR⁻との隣接距離は非常に近くなることが十分に考えられ、その反発を強く受けた可能性がある。特に、負電荷同士が隣接した際の反発は不可避と考えられる。振盪実験終了時の pH は初期 pH に依らなかったが、添加された OH⁻イオン量は明確に異なるため、生じた負電荷量も異なるはずである。それにより MC-LR⁻との間で反発が起こり、吸着能

が減少したと考えられる。黒ボク土における pH 緩衝作用は粘土鉱物以外に上述③の腐植成分も含まれるため、黒ボク土の MC-LR 吸着作用が有機態炭素成分による疎水結合を主とするものと考えれば、腐食や粘土鉱物上の負電荷が影響を及ぼさなかった結果も理解できる。同時に、以上の結果から現実的な pH 範囲において MC-LR の存在形態および正電荷量の各々に与える土壌 pH 緩衝作用の範囲としては、赤玉土では初期 pH 5.5 ~ 7.5、黒ボク土では初期 pH 5.5 以上の範囲であることが分かった。

初期 pH 3.5 において黒ボク土の K_H は最高値を示したが、これは疎水性 MC-LR の割合が高かったためと考えられる。また、赤玉土に関しても同様に pH 3.5 で K_H が最も高い値を示していた。Wu et al. (2011) は変異電荷を有するカオリナイトの MC-LR 吸着について、pH 2.5 の場合は pH 7.2 以上と比較して非常に高い吸着能を有することを明らかとしており、本研究においても矛盾しない結果が得られたといえる。Wu et al. (2011) は低 pH 条件で吸着能が上昇した理由について、粘土鉱物の正電荷量が増加したためと報告している。しかしながら、pH 2.5 ~ 3.5 といった範囲では親水性 MC-LR⁻よりも疎水性の方が割合として多いため（図 3-10）、粘土鉱物の正電荷量が多くとも MC-LR⁻が少ないのだから MC-LR 吸着量は減るはずである。従って pH 2.5 ~ 3.5 のような低条件下においては、粘土鉱物による MC-LR 吸着は電荷量だけでなく、より複雑な相互作用を含めた吸着機構が働いている可能性が高い。

3-4-2 非滅菌条件における各土壌による MC 種吸着特性

前節までは、土壌はいずれもオートクレーブ処理を行い、対象とした MC 種は MC-LR のみであった。MC は種によって化学的組成が非常に大きく異なるため、土壌の AEC による吸着能や疎水結合力は MC 種ごとに大きく異なる。また、オートクレーブは高温高圧で行われるため、どうしても土壌の物理化学的特性を変化させる恐れがある。これに対して実際に非滅菌土壌を用いて試験したところ、黒ボク土では MC-RR の吸着率が最も高かったが、これは MC-RR の正味電荷が 0 であったためと考えられる。図 3-11 に、予測されている MC-RR、-YR および-LR の電荷を有する部位をまとめた。但し、MC-YR に関しては既往報告が無いため、MC-LR との構造比較から求めた。図 3-11 から明らかなように、MC-RR の正味電荷は 0、-YR および-LR は -1 と考えられる。これらの値は pH によって変動するはずであるが、図 3-11 に示したものは pH が中性付近の場合を想定している。この図より、MC-RR は電荷の影響が他の MC に比べて低いため、黒ボク土による疎水結合を受けやすかったと考えられる。また、先述の通り赤玉土は陰イオンを吸着可能であるため、MC-YR および-LR を吸着可能であったといえる。しかしながら、赤玉土は正味電荷 0 の MC-RR に対しても高い吸着率を示していた。これは、MC-RR の電荷の偏りが原因と考えられる。図 3-11 から明らかなように、MC-RR は環状部の上半分は負電荷に、下半分は正電荷に偏っている。そのため、この偏りが赤玉土による吸着率に影響を及ぼした可能性がある。特に環状部の下半分が正電荷に偏っていれば、土壌に存在する永久電荷である負電荷によっても吸着可能であるため、黒ボク土・赤玉土の両土壌で MC-RR 吸着率が高かった理由としても十分に考えられる。MC-YR と-LR の間の吸着率の差については、MC-YR の初期濃

度が $47.4 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ であったのに対して、MC-LR では $167.6 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ と、初期濃度に著しい差が存在したことが影響した可能性が挙げられる。

オートクレーブの有無にかかわらず、黒ボク土、赤玉土共に MC-RR、-YR、-LR の 3 種全てを吸着可能あり、吸着率は全 MC 濃度で其々 90 %、95 % と非常に高い結果が得られたが、MC-LR 吸着量のみに着目すると、滅菌・非滅菌に関わらず近い吸着率が示された。このことは、各土壌の MC 吸着部位はオートクレーブの影響を受けにくいという事を意味する。同時に、非滅菌土壌による吸着実験においても、MC-LR の微生物分解は起きていなかったと考えられる。つまり、ここに分解菌等が共存すれば農地土壌が MC の作物曝露に対して強力な緩衝作用、防御機構を有するといえる。しかしながら、神蔵ら (2014) の実験結果においては、 $1,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ という非常に高濃度の MC-LR 曝露において、空芯菜が可食部を含めて作物体に MC-LR を蓄積していた。つまり、作物種によっては、その吸水力の強さ等も相まって、土壌の吸着作用だけでは防ぎきれない可能性がある。また、空芯菜は湖沼水質浄化等に用いられる生態工学技法において重要な作物であるため、MC の吸収蓄積特性を求めることは重要である。更に、水稻栽培のように多量の灌漑用水が利用されるような場合は、必然的に MC の暴露量が増加してしまう恐れがある。そこで、次章以降は国産水稻および空芯菜の有する MC 吸収能の検討を行った。

3-5 まとめ

本実験より黒ボク土および赤玉土は添加量の 70 % 以上、赤玉土では 87 % 以上の MC-LR を吸着でき、黒ボク土では初期 pH 3.5 を除き pH 影響を受けず、一方で赤玉土は初期 pH 9.5 において吸着力の減少することが分かった。両土壌共に初期 pH の影響を受けない範囲が存在し、それは土壌の有する pH 緩衝作用に依ることが明らかとなった。また、赤玉土で初期 pH 9.5 において吸着力の低下した理由として、粘土鉱物の持つ負電荷量が増え、MC-LR⁻ と反発し合うことで吸着量も減少したと考えられた。それ故、灌漑用水源の pH が 9.5 を超える場合は粘土鉱物による MC-LR 土壌吸着能が減少する恐れのあることが明らかとなった。また、非滅菌条件では黒ボク土、赤玉土共に MC-RR、-YR、-LR の 3 種全てを吸着可能あり、吸着率は全 MC 濃度で其々 90 %、95 % と非常に高い結果が得られた。よって、分解菌等が共存することで、農地土壌は MC の物曝露に対して強力な緩衝帯と成り得ることが分かった (図 3-11)。

表 3-1. Langmuir 式から推定した各初期 pH における黒ボク土の MC-LR 吸着に関する
 諸パラメータ（飽和吸着量（Cmax）、平衡定数（K）、決定係数（R²））

Initial pH	①			②			③		
	Cmax	K	R ²	Cmax	K	R ²	Cmax	K	R ²
3.5	-5.08×10^2	-1.17×10^{-2}	0.98	-1.10×10^3	-6.90×10^{-3}	0.60	-9.11×10^2	-8.00×10^{-3}	0.75
5.4	5.00×10^3	4.10×10^{-3}	0.98	2.00×10^4	8.00×10^{-4}	0.13	3.77×10^3	7.80×10^{-3}	0.05
7.5	5.34×10^3	4.30×10^{-3}	0.99	8.81×10^3	2.30×10^{-3}	0.76	6.29×10^3	3.60×10^{-3}	0.69
9.5	4.34×10^3	5.40×10^{-3}	1.00	4.79×10^3	4.70×10^{-3}	0.99	4.66×10^3	4.90×10^{-3}	0.98

表 3-2. Langmuir 式から推定した各初期 pH における赤玉土の MC-LR 吸着に関する
 諸パラメータ（飽和吸着量（Cmax）、平衡定数（K）、決定係数（R²））

Initial pH	①			②			③		
	Cmax	K	R ²	Cmax	K	R ²	Cmax	K	R ²
3.5	2.00×10^4	3.80×10^{-3}	1.00	1.67×10^4	4.50×10^{-3}	1.00	1.73×10^4	4.40×10^{-3}	1.00
5.5	5.00×10^3	1.45×10^{-2}	0.99	5.00×10^3	1.35×10^{-2}	0.32	2.55×10^3	4.02×10^{-2}	0.15
7.5	3.33×10^3	3.06×10^{-2}	0.99	5.00×10^3	1.83×10^{-2}	0.77	3.61×10^3	2.87×10^{-2}	0.72
9.5	5.00×10^3	1.12×10^{-3}	0.99	1.00×10^4	5.10×10^{-3}	0.87	6.28×10^3	8.60×10^{-3}	0.80

表 3-3. Freundlich 式から推定した各初期 pH における赤玉土・黒ボク土の MC-LR 吸着に関する諸パラメータ (K_F 、 a 、決定係数 (R^2))

Initial pH	黒ボク土			赤玉土		
	K_F	a	R^2	K_F	a	R^2
3.5	2.04	0.66	0.98	81.2	1.06	1.00
5.4~5.5	21.5	1.09	0.99	86.2	1.18	0.96
7.5	35.2	1.20	1.00	142	1.37	0.99
9.5	41.0	1.27	1.00	77.2	1.23	1.00

表 3-4. 各土壌による MC-RR、-YR、-LR 吸着量と吸着率

	黒ボク土		赤玉土	
	吸着量 ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	吸着率 (%)	吸着量 ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	吸着率 (%)
MC-RR	690.1 \pm 19.7	97.6 \pm 0.1	695.5 \pm 48.6	97.0 \pm 2.3
MC-YR	159.4 \pm 25.9	93.9 \pm 0.7	253.4 \pm 10.4	98.7 \pm 0.9
MC-LR	633.8 \pm 22.9	82.5 \pm 0.8	679.7 \pm 63.3	91.8 \pm 0.3
MCs	1470.0 \pm 26.1	90.1 \pm 0.3	1629.0 \pm 121.0	95.0 \pm 1.2

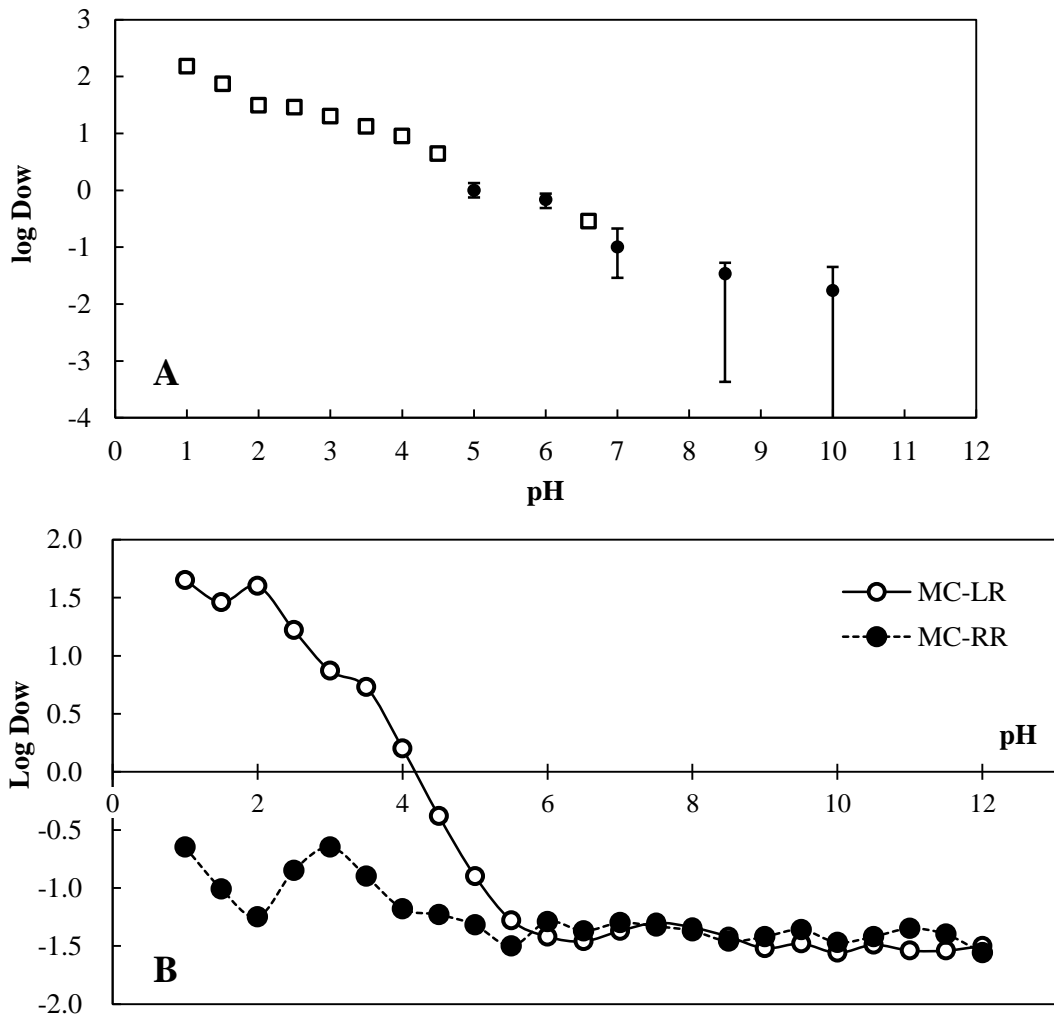


図 3-1. MC-LR のオクタノール・水分配比 (Dow) に対する pH 影響
 (A-de Maagd et al., 1999, B-Liang et al., 2011, 一部改変)

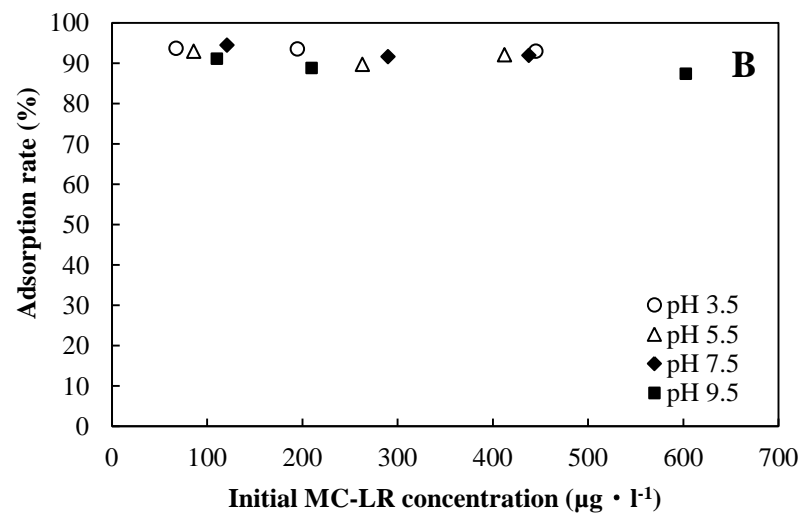
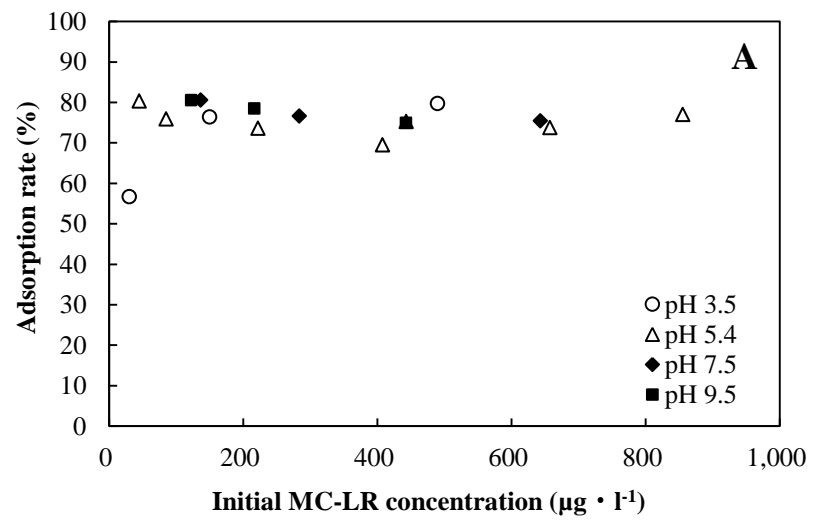


図 3-2. 添加 MC-LR 量に対する各土壌の吸着率
A-黒ボク土, B-赤玉土

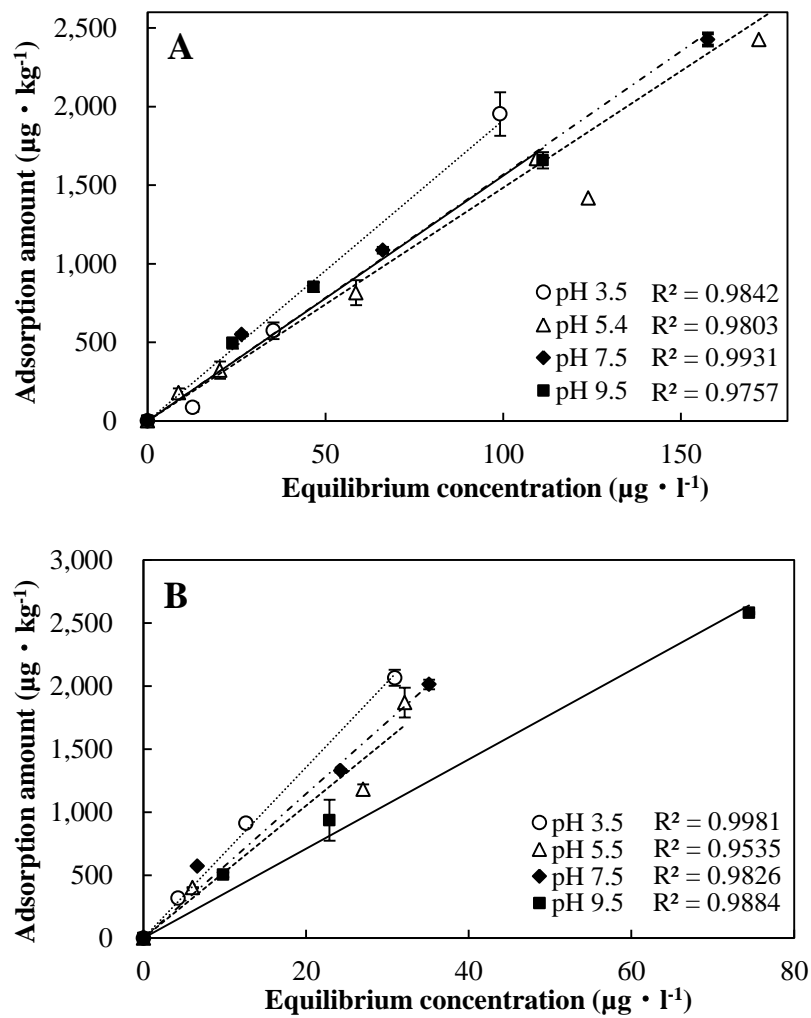


図 3-3. 異なる初期 pH 条件下における各土壌の MC-LR 吸着等温線および決定係数
A-黒ボク土, B-赤玉土

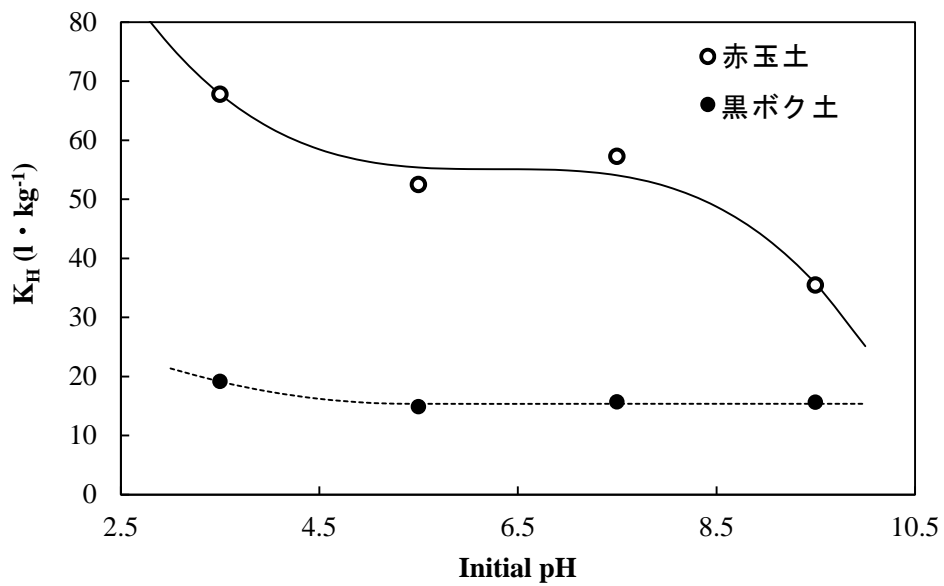


図 3-4. 異なる初期 pH が黒ボク土および赤玉土の Henry 吸着定数 K_H に与える影響

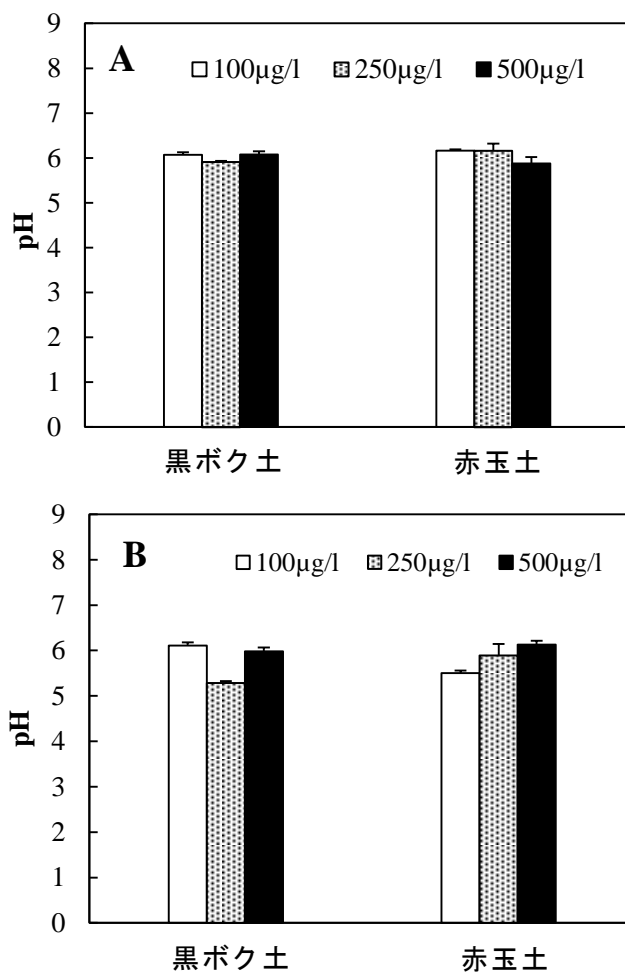


図 3-5. 各土壌を用いた吸着試験終了時の上澄水中の pH
 A-初期 pH 3.5 の場合, B-初期 pH 9.5 の場合

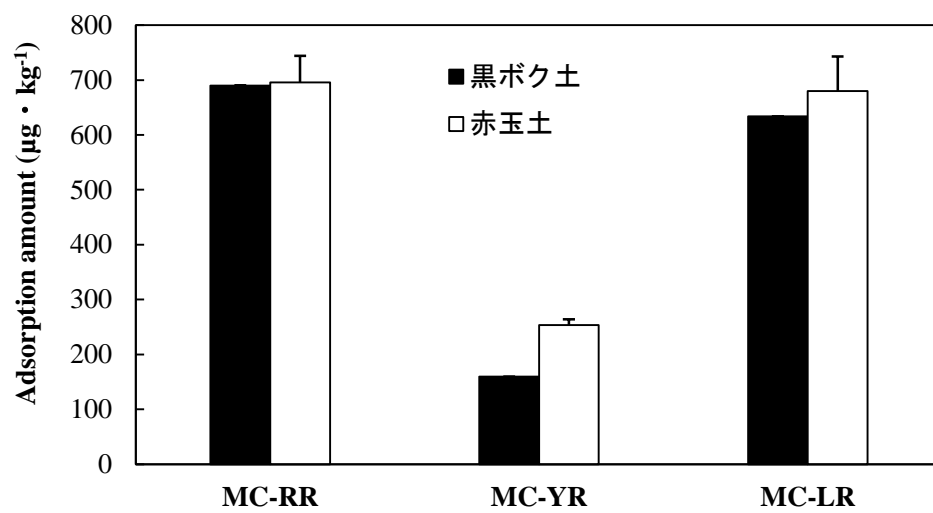


図 3-6. 黒ボク土および赤玉土による MC-RR、-YR、-LR 吸着量

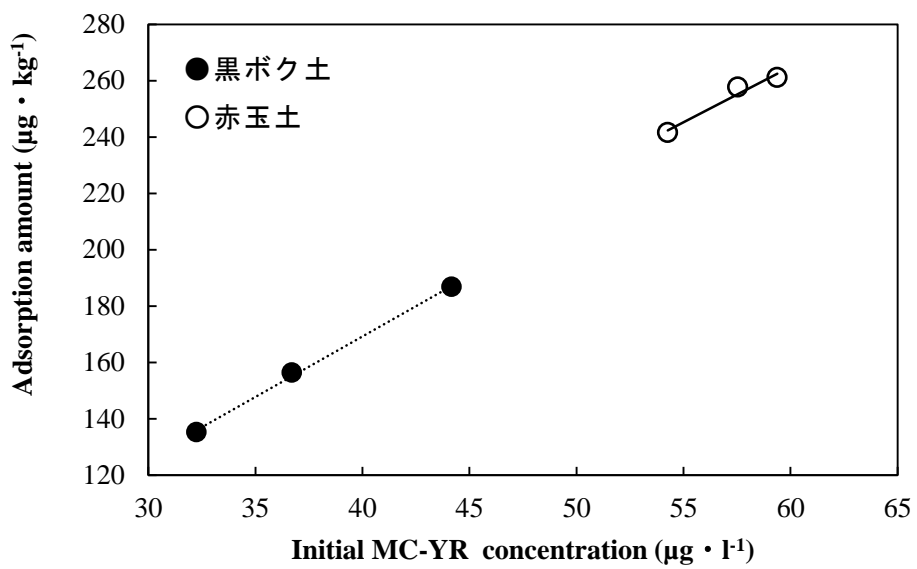


図 3-7. MC-YR における初期実測濃度と吸着量のばらつきに関する土壌間比較

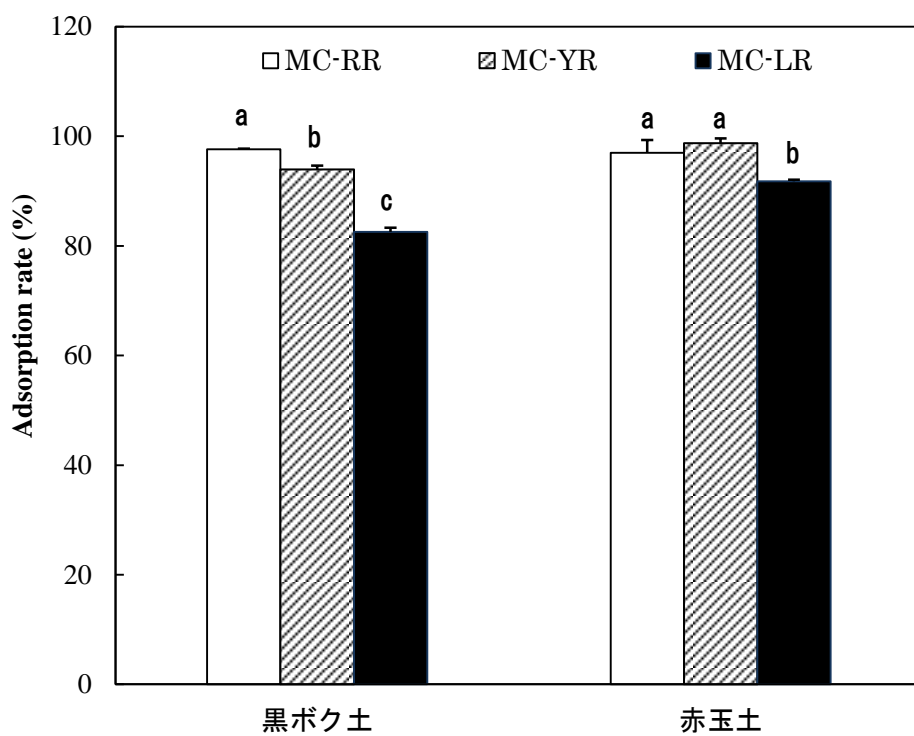


図 3-8. 各土壌の MC-RR、-YR、-LR 吸着率

a、b、c はそれぞれ Tukey-Kramer による多重比較検定によって 5%水準で有意差が認められた分類群を示す。

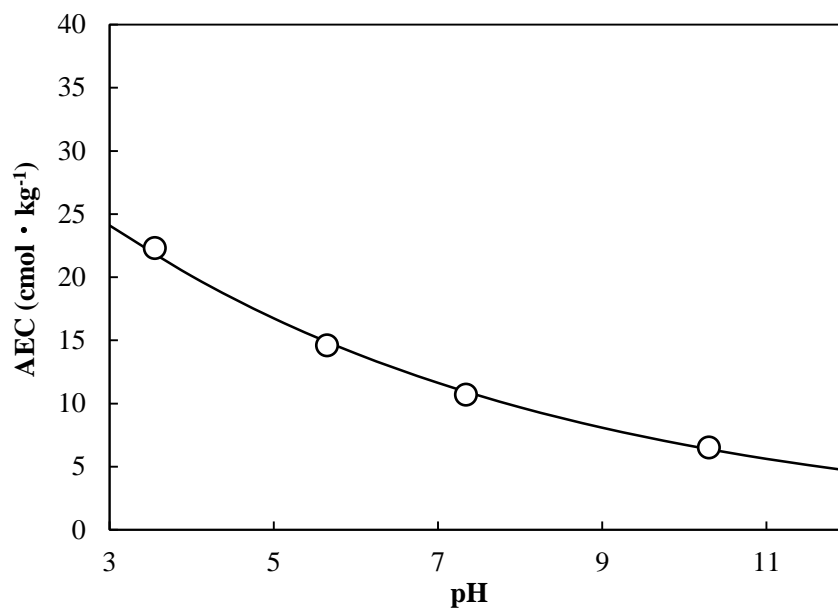


図 3-9. 赤玉土の有する陰イオン吸着容量の pH 依存性（黒川および香村, 2016, 一部改変）

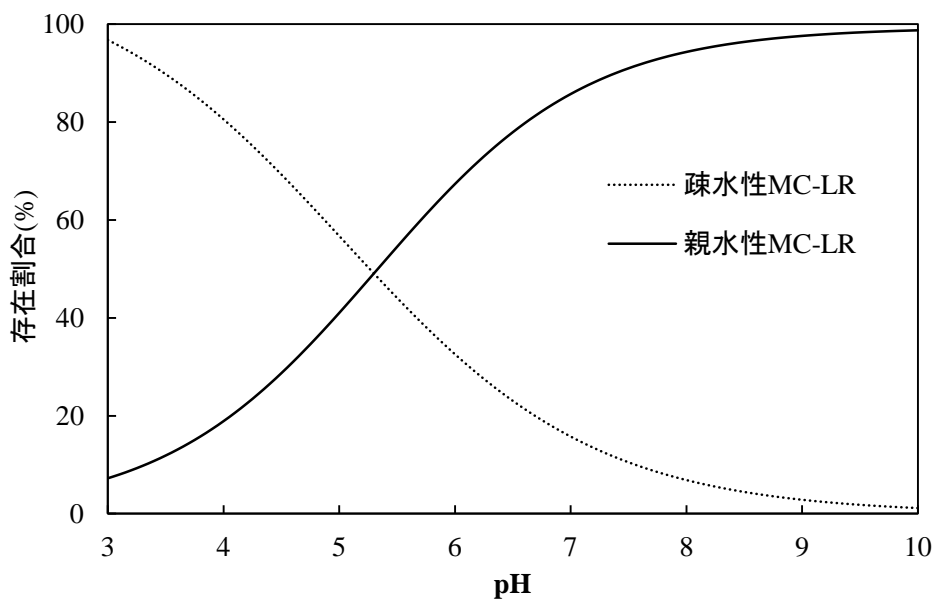


図 3-10. pH による MC-LR 形態別存在割合の定性的挙動

(de Maagd et al., 1999 より作成)

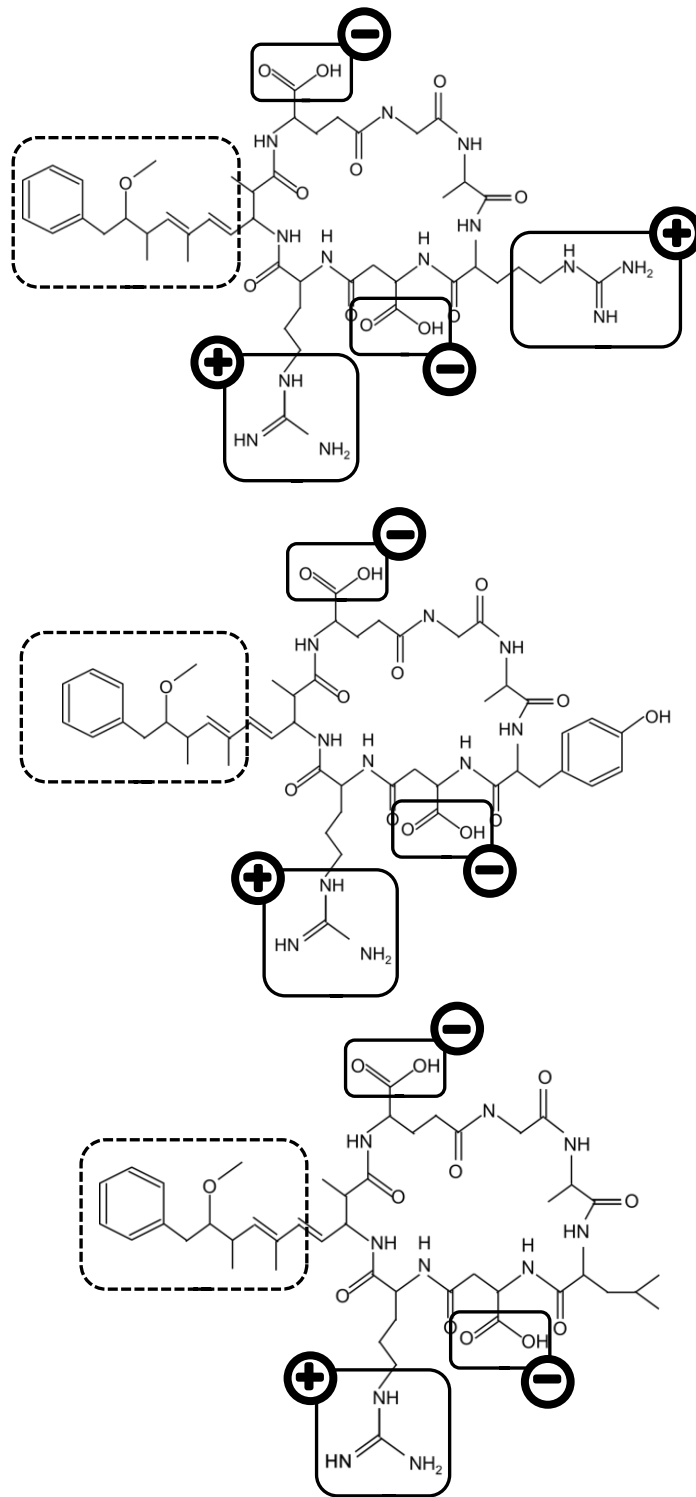


図 3-11. MC-RR、-YR および-LR 予想される荷電部位の比較

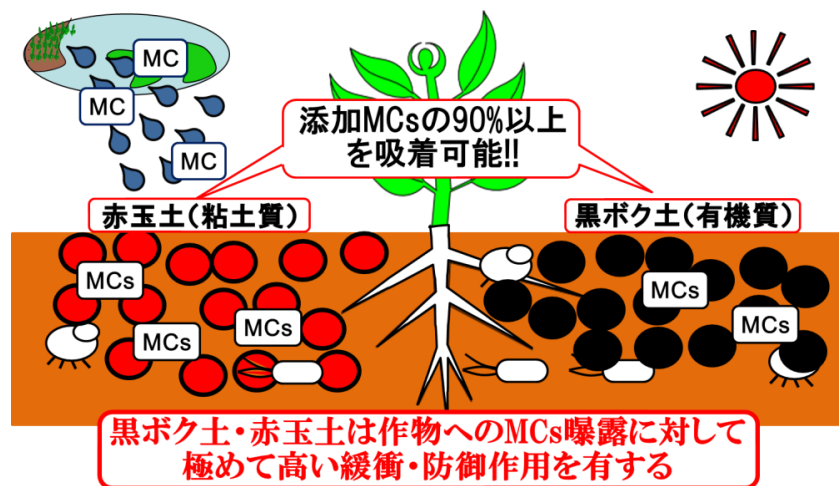


図 3-12. 本研究成果における黒ボク土・赤玉土の MC 吸着特性

第4章 イネおよび空芯菜の初期生育における MC 吸収蓄積特性

4-1 はじめに

イネ (*Oryza sativa*) は日本を含めアジアで広く栽培され、食されている作物である。イネの栽培法は、一般的には育苗開始、水田の代掻き、田植え、中干し、間断灌漑、落水および収穫の順で行われる。この工程の中で、中干しとは有効分げつ期の後期に一時的に水田の水を全て排水し、土壌表面がひび割れた状態にすることである。中干しを行う事で、生育を抑え、過剰な分げつを抑える効果があるといわれている。過剰分げつは中身の無い穂の増加につながるため、非常に重要な工程である。また、還元状態の水田遡上深部に酸素を供給することで、ガス抜きや有害物質の除去が可能になるといわれている。更に、根に直接酸素が届くため、根腐れの防止につながる。中干し後は間断かんがいを行い、水の有る状態と無い状態を繰り返す (高品質コシヒカリの栽培ごよみ, JA 全農 茨城県本部より)。稲作農家はよく、田植えの後に毎日の朝晩、田の様子を見に行くという話を聞くが、おそらく中干しおよびその後の間断かんがいのための水管理のために出かけているものであろう。このように、イネ栽培には大量の灌漑用水が必要である。さらに、間断かんがい期 (茨城県では6月下旬以降) は灌漑のサイクルも早まると考えられるため、水源でアオコが発生した場合、低濃度であっても水田への添加量自体が多くなる可能性がある。

ここで、作物根断面の一般的な構造を確認しておく。植物細胞は細胞膜の周りを細胞壁が取り囲んでおり、それは主にセルロース分子の集合体によって構成されているが、これは根の細胞でも同様である。細胞壁は微細な繊維で成り立っているため微小な空隙が存在しており、水分や溶け込んだ養分はこの細胞壁間隙部分を通り、根の中心へ移動する。また、それらは細胞質内にも取り込まれるが、その後は細胞質同士をつなぐ原形質連絡を通じて吸収される経路も存在する (図 4-1, Taiz and Zeiger, 2010)。しかし、図 4-1 に示すように、根には葉や茎にはないカスパリー線と呼ばれる一重の細胞領域が、維管束を取り囲むように存在している。ここで、細胞壁間隙を通過してきた水分や物質は一度ブロックされ、カスパリー線に位置する細胞内を一度経由し、維管束系へ流れていく。これは養分も例外ではない。そのため、植物が養分を吸収し利用するためには根のカスパリー線細胞内を一度は通過させる必要がある。その際の細胞膜透過の機構は複数存在しており、無機イオンや低分子化合物の細胞膜透過は脂質二重膜中の拡散とチャネルタンパク質、運搬体タンパク質を主として行われている (Taiz and Zeiger, 2010)。故に MC が植物によって吸収されるためには、このカスパリー線内細胞の細胞膜を透過しなければならないが、分子量が約 1,000 であることから、単純に考えれば細胞膜は透過できないように思われる。しかしながら、表 1-6 に示したように、様々な作物種において MC 吸収能が確認もしくは示唆されていることから、何らかの機構によってカスパリー線を横断していることが考えられる。

実栽培作物の中で、Chen et al. (2012) は中国太湖北岸沿いの水田で栽培された米から MC-LR が検出されたと報告している。この報告の中での MC-LR 蓄積量は最大で $3.19 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ であったが、TDI (耐容一日摂取量) を用いた安全性評価が行われていなかったため、成人男性の体重を 60 kg と仮定して比較を行ったところ、安全であると評価できた。同様

に中国産のイネが MC を吸収し得るという報告は Chen et al. (2004) や Liang et al. (2016) によってもなされているが、分析方法が全て ELISA 法であるため、MC-LR 以外の物質も検出している可能性がある。これらの点について、日本産イネでは朴らが国産イネ（品種不明）に対する MC 曝露試験を行っているが、生長阻害のみが報告されており、吸収蓄積特性には一切触れられていない。

これまでに報告されたイネの論文には、分析方法以外にも栄養素の未添加、乾燥防止のための MC 溶液の繰り返し添加、物質収支解析が行われていない、無菌状態でない等の問題がある。栄養素の未添加はイネ本来の健全な成長を損なうものであり、MC 溶液の繰り返し添加は曝露濃度の急激な上昇を引き起こす。物質収支解析は実験の分析精度の検証に必要不可欠であり、環境水を扱う研究室では淡水由来の MC 分解菌の混入に細心の注意を払う必要がある。こういった問題点を解決し、かつ国産イネによる MC 吸収蓄積特性を解明するため、本章では一般的に用いられる無菌栽培法を応用してイネにおける曝露濃度に対する MC-LR の作物体内蓄積特性を、作物根の内皮細胞膜透過から明らかにすることで、食の安全性評価を行う際の重要な知見を得ることを目的として実験を行った。

加えて、生態工学技法における空芯菜を使ったフロート式水耕栽培による手法は広く研究されている。しかしながら、その際に用いた空芯菜から MC が検出されたという報告がある (Song et al., 2009)。また、神蔵ら (2014) も高濃度で暴露した場合は、土壌栽培であっても蓄積が認められる結果を報告している。よって、空芯菜の MC-LR 吸収特性を定量的に解析した。

4-2 実験方法

4-2-1 無菌作物栽培法

供試作物としては日本産のジャポニカイネ (*O. sativa* cv. Koshihikari) を用い、二瓶 (2012) の方法を一部改良して行った。組織培養用プラントボックスにガラスビーズ (粒径 2.500 ~ 3.500 mm) を 150 g 充填して 121°C、20 分でオートクレーブ滅菌し、あらかじめオートクレーブ滅菌しておいた添加用 MC-LR 溶液を 40 ml 添加してビーズ間空隙を満たしたものを栽培容器として用いた。プラントボックスには上部に穴をあけ、サンバイオフィルター (現在生産終了) を張り付けることで細菌等を通さずに通気ができるようにした。イネは種子から籾を除去した後に、大澤および久保 (2003) を参考に、70 % エタノールに 1 分浸漬後に滅菌水で 3 回洗浄し、その後、2 ~ 5 倍希釈の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 15 分浸漬して滅菌水で 3 回洗浄する作業を 2 回行い、寒天上で 2 日かけて無菌的に発芽させた。この段階でできるだけ生長のそろっているものを選び、それを上記プラントボックス内のビーズ担体上に 9 個体設置し、照度 10,000 Lux で 26 ~ 28°C、栽培期間は Kurki-Helasmo et al. (1998) の試験方法を参考に 7 日間とした。栽培用 MC 溶液には栄養塩として表 4-1 に示すような木村氏 B 液 (馬場および高橋, 1960) を用い、設定 MC-LR 濃度を 0 (対照系)、100、500、1,000 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ となるように濃度調節し、pH を 5.0 ~ 5.5 に調整して用いた。その際の MC-LR 実測濃度は 0.0、72.4、374.3、768.8 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ であった。また、ガラスビーズからの回収率を検討するために、設定 MC-LR 濃度を 100 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ とした、イネ無植栽系列も

用意した。試験は各 3 連とし、播種、移植作業は全てクリーンベンチ内で行った。

空芯菜（エンサイ、タキイ種苗株式会社）における実験方法はイネとほぼ同様だが、ガラスビーズを 150 g とし、栽培用 MC 溶液は 65 ml 添加した。また、発芽種子はプラントボックス内のビーズ担体上に 9 個体設置し、試験期間は 14 日間とした。栽培用 MC 溶液には栄養塩として 2 倍希釈したホーグランド養液 (Taiz and Zeiger, 2010) を用いた。また、設定 MC-LR 濃度は 0 (対照系)、100、500、1,000、5,000 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ とした。

4-2-2 植物体からの MC-LR 抽出および分析法

実験終了後、イネを取り出して根の表面を 100 %メタノールと超純水でよく洗浄した後に、葉と根に分けて湿重量を計測し、 -80°C で冷凍保存した試料を凍結乾燥機 (EYELC FREEZER YD-1、株式会社東京理化学器械) で乾燥させた。乾重量を測定後、試料を粉砕して抽出液 (メタノール : 酢酸 : 超純水 = 20 : 5 : 75) を 40 ml 添加し、超音波処理 (3 min、60 W、20 kHz) の後に十分に攪拌、振盪し、遠心分離 (3,200 G、20 min) 後の上澄みを濾過するという工程を 3 回繰り返し、回収した上澄み液を作物抽出液とした。水耕液に関しては、イネを取り除いた後にろ過器を用いてガラスビーズを除いたろ液の体積を測定したものを水耕残液とした。その後、ガラスビーズ表面およびプラントボックス内部をメタノールおよび超純水でよく洗い、その洗浄液とイネ根洗浄液をろ過し、回収した溶液を水耕洗浄液とした。作物抽出液および水耕残液、水耕洗浄液はこれまでと同様に ODS カートリッジ、Silica カートリッジで処理を行い試験管に溶出し、空気を吹き付けながら 60°C で湯煎してメタノールを揮発させた後に、HPLC によって MC-LR 濃度を測定した。

4-2-3 残存栄養塩濃度の分析方法

イネの系列の関しては、実験終了後に回収した栽培溶液中のアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、リン酸態窒素、全窒素および全リン濃度を以下の手法により分析した。手法は主に日本下水道協会発行の下水試験方法 (2012) に記載された方法である。

- ・アンモニア態窒素 (インドフェノール青吸光光度法 : JIS K 0102 42.2 に準拠)
- ・亜硝酸態窒素 (N- (1-ナフチル) エチレンジアミン吸光光度法 : JIS K 0102 43.1.1 に準拠)
- ・硝酸態窒素 (ブルシン吸光光度法 : 下水試験方法に準拠)
- ・全窒素 (銅・カドミウム還元法 : JIS K 0102 45.1 に準拠)
- ・リン酸態リン (モリブデン青吸光光度法 : JIS K 0102 46.1.1 に準拠)
- ・全リン (ペルオキシ二硫酸カリウムによる分解法 : JIS K 0102 46.3.1 に準拠)

全窒素および全リンについては、試料にペルオキシ二硫酸カリウムのアルカリ性溶液を加え、オートクレーブを用いて 121°C にて 110 分間加熱処理を行った後に、硝酸イオンを銅・カドミウムカラムによって還元して亜硝酸イオンとし、N- (1-ナフチル) エチレンジアミン吸光光度法によって定量し、全窒素の濃度を求めた。一方で、生成したリン酸イオン態リンを測定し、試料中の全リンとした。

アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、リン酸イオン態リンの測定に関しては、

いずれも溶存態であるため、夾雑物を濾過によって取り除いてから測定を行った。また、全窒素、全リンに関しては夾雑物も含めてペルオキシ二硫酸カリウム溶液を加えて加熱分解処理をしたものを濾過後、測定に用いた。濾過に用いたフィルターは、ADVANTEC 製のガラス繊維濾紙 GS-25 を用いた。なお、本研究では上記の窒素・リンの水質測定はビーエルテック製 QuAAtro 2-HR による連続流れ分析 (CFA: Continuous Flow Analysis, JIS K 0170) を用いて行った。

4-2-4 統計解析

本研究でいくつかの統計解析手法を用いているが、主に Microsoft Office Excel のアドインとフリーソフトの R を基礎としたユーザーインターフェースである EZR を用いて行った。

4-3 実験結果

4-3-1 成長量解析

MC-LR 曝露によるイネの生長量への影響について、各濃度における葉および根の乾重量を図 4-2 に示した。各値をそれぞれ比較した結果、曝露濃度の上昇に伴う生長量の減少は見られなかった。分散分析 (ANOVA) の結果からも有意差が認められなかったため、イネに対して、MC-LR は本研究で用いた初期濃度において急激な生長阻害を引き起こさないことが示された。

図 4-3 に空芯菜における葉および根の湿重量と乾燥重量についてまとめた。ANOVA および多重比較検定として Dunnet 法を用いた結果、葉(地上部)において、初期濃度 $5,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ のみで有意差 ($p < 0.05$) が認められた。また、根においては湿重量のみ、初期濃度 $5,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ のみで有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

4-3-2 イネにおける栄養塩残存性

イネ実験終了時の栽培溶液中の濃度について、図 4-4 にまとめた。イネの生長量において有意差が認められなかったが、全窒素、リン酸、全リン濃度が、曝露濃度の上昇に従い有意に上昇していた。また、全リンのほとんどがリン酸であった。図 4-5 は全窒素、リン酸、全リン濃度と曝露濃度との相関を取ったものであるが、非常に高い相関が得られた。つまり、曝露濃度の上昇に従い栽培溶液中の全窒素、リン酸、全リン濃度が上昇したという事である。表 4-4 は全窒素および全リン濃度の初期値をまとめたものであるが、MC-LR 溶液の添加は濃度上昇を引き起こしていない。従って、初期濃度には差が無かったといえる。全窒素については、硝酸およびアンモニア濃度に対照系と有意差が認められなかった。従って、イネの根より何らかの窒素化合物が分泌されたものと考えられる。リン酸については、MC-LR の曝露によって吸収阻害が起きた可能性が示された。これらの知見はこれまでまったく報告されておらず、従って新規的知見である

添加用 MC-LR は *M. aeruginosa* の大量培養から抽出したものであるため、多少の夾雑物を含んでいる。そのため、MC 以外の藍藻類産生化合物が上記の現象を引き起こした可能

性は否定できない。しかしながら、藍藻類生産化合物中に窒素化合物の分泌促進ならびにリン酸吸収阻害を引き起こすような物質が含まれていることは確かである。

4-3-3 MC-LR 物質収支解析

図 4-6 に MC-LR のスタンダードサンプルおよびイネの根からの抽出サンプルのクロマトグラムを示した。コントロールとして MC-LR を添加しなかったイネのサンプルのクロマトグラムからピークが検出されなかったため、イネ抽出サンプルにおけるピークは MC-LR であると判断された。実験終了後のイネ無植栽プラントボックスにおけるビーズおよびボックスからの MC-LR 回収量を添加量と比較したところ、回収率は平均 94.7 % であった。これを考慮したイネ実験系各部からの MC-LR 回収量について表 4-2 に示した。物質収支解析から、イネにおいて系全体からの MC-LR 回収率は全系列において 90 % 以上であり、そのほとんどが水耕溶液内に残存していた。イネ作物体への蓄積量は根、葉ともに添加量の 1 % 未満であり、葉に関しては設定濃度 $100 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加系で 0.7 % であったが、500、1,000 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加系ではともに 0.1 % と非常に低い値を示した。よって、イネの初期生育においては葉への MC-LR 吸収蓄積量は非常に少ないことが示された。

表 4-3 には空芯菜における MC-LR の物質収支をまとめた。作物体への蓄積量は 1 % 未満であった。溶液への残存率は、初期設定濃度 $1,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下では 78.8 % 以上であったが、5,000 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ では平均 65 % と減少していた。また、それに伴い回収率も 59.4 % ~ 98.3 % と大きく変動した。つまり、4.6 ~ 40.6 % の MC-LR が実験系内から消失したことが明らかとなった。

4-3-4 MC-LR 蓄積特性

イネ実験における、実験開始時と終了時における MC-LR 濃度の実測値を比較したグラフを図 4-7 に示した。両者の間で t 検定を行った結果、設定濃度 $500 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加系で有意差 ($p < 0.05$) が認められたが、終了時の濃度は水耕残液と水耕洗浄液から回収された MC-LR 量を水耕残液体積で除したものであるため、ガラスビーズ表面から回収しきれなかった分の水分による体積減少によって、実際よりも濃度が少し高く算出された可能性がある。その点を考慮すると、両者の値に極端な差は認められないものといえる。よって、本研究において栽培溶液内における MC-LR 濃度はほぼ変化せず、一定の曝露濃度が維持されたいたものと判断した。イネ実験終了時の葉および根における乾重量当たりの MC-LR 蓄積量を図 4-8 に示した。葉、根ともに添加濃度の上昇につれて、ある一定値を上回らない傾向が見られた。そこで、図 4-8 の各グラフに対して Michaelis-Mentens 式を適用し、最大蓄積量を算出した。その結果、葉は $0.179 \mu\text{g} \cdot \text{g-D.W.}^{-1}$ 、根においては $2.79 \mu\text{g} \cdot \text{g-D.W.}^{-1}$ と算出された。本実験結果は、作物体への MC-LR 蓄積量に上限があり、かつ、本実験で用いた品種であるコシヒカリの初期生育における蓄積量の上限が上記のような値になることを示すものである。また、得られた蓄積量の上限値に関して、葉と根で大きな差が見られたことから、葉に対して根はより多くの MC-LR を保持可能であることが明らかとなった。しかしながら、表 4-2 から明らかのように、葉への蓄積量は検出限界値の $0.01 \mu\text{g}$ であ

るため、定量性は低いといえる。この点は今後、安定同位体等の利用によってより定量性の高い値を得る必要があるといえる。

空芯菜における作物体への MC-LR 蓄積特性に関して図 4-9 にまとめた。図より、空芯菜では $1,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上においても比例関係が認められた。しかし、添加濃度 $5,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ のクウシンサイの葉への蓄積量データはばらつきが非常に大きいものであった。そこでこのデータ群について統計処理の Dixon 法を用いて外れ値検定をした結果、一つのデータが高蓄積量の外れ値であることが分かった。この外れ値を除外した場合、蓄積量と添加濃度の関係は緩やかな曲線を描きながら頭打ちとなる傾向にあったが、この外れ値が何に起因するのかが不明であったため、除外すべきではないと判断した。その理由として、MC-LR を極端に吸収しやすい個体が存在する可能性を否定できないためである。また、表 4-3 より明らかなように、同じ MC-LR 曝露濃度でも蓄積量に差が認められ、特に低濃度曝露では蓄積の見られた系と見られない系が存在していた。これは分析法の検出の限界によるものであり、イネの場合と同様に安定同位体等の利用によって回避可能であるといえる。また、食の安全に関する健康リスクを検討する以上、予防原則の立場に立って解析を進めるべきであるため、以下のリスク解析においては各実験系列の値を平均せずにそのまま用いて解析した。これらの点については、今後、より詳細な研究が必要と考えられる。

4-3-5 空芯菜におけるリスク評価

空芯菜の可食部から MC-LR が検出されたため、食品利用した際の安全性評価を行った。評価方法は以下の式に従った。

$$\text{Hazard Quotient (HQ)} = \frac{\text{EHE}}{\text{TDI}}$$

$$\text{TDI (耐容 1 日摂取量)} = 0.04 \mu\text{g} \cdot \text{kg-human}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$$

$$\Rightarrow 2.4 \mu\text{g-MC} \cdot \text{day}^{-1} \quad (\text{成人男性の体重を } 60\text{kg} \text{ と仮定})$$

$$\text{EHE (人への予測暴露量)}$$

$$= \text{作物内 MCs 蓄積濃度 } (\mu\text{g} \cdot \text{g-W.W.}^{-1})$$

$$\times \text{推定消費量 } (\text{g} \cdot \text{human}^{-1} \cdot \text{day}^{-1})$$

つまり、 $\text{TDI} > \text{EHE}$ なら $\text{HQ} < 1$ でリスク無し、逆ならリスク有りという事である。空芯菜の消費量について、推定消費量には厚生労働省 (2012) が推奨する野菜摂取推奨量 $350 \text{g} \cdot \text{day}^{-1}$ を用いた。つまり、一日に必要な野菜摂取量を全て空芯菜に換算した事になる。図 4-10A はその結果をプロットしたものであるが、蓄積量にばらつきがあったため、それらを考慮していくつかの近似直線を作成した。広い曝露範囲で HQ が 1 を超えていたため、原点付近を拡大したものが図 4-10B である。回帰式は、①各曝露濃度条件において最も蓄積量の多かった値のみを用いたもの、②平均値を用いたもの、③最も値の小さいもののみを用いたものを作成した。これら 3 つの回帰式それぞれのリスク発生下限濃度は 75.2 (①) ~ 175 (②) ~ $1,000$ (③) $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ と非常に広い幅を持っている。この結果を基に、

予防原則の観点から空芯菜は曝露（初期）濃度が $75.2 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下において $\text{HQ} < 1$ 、すなわちリスクなしと判断された。

4-4 考察

4-4-1 物質収支解析の重要性

栽培溶液中の MC-LR 濃度の測定は非常に重要である。これまでの報告ではこの点が無視されており、そのため実際の曝露濃度等が不明瞭であった。本研究ではガラスビーズを担体として用いたことで、実験終了後も栽培溶液を容易に回収可能であった。

イネ実験における物質収支解析の結果、栽培溶液、根および葉からの MC-LR 回収率は 83.8 ~ 99.1 % であり、0.8 ~ 16.2 % が実験系内から消失していた。実験は無菌環境下で行ったため、分解菌のコンタミネーションによる消失は考えにくい。この点について、固相抽出法を用いた、根および葉の凍結乾燥粉末からの MC-LR 回収率を別途検討したところ、それぞれ 95 %、106 % であった。これらの事実を考慮すると、物質収支解析で明らかとなった MC-LR の消失要因として、イネによる解毒機構が考えられた。動物細胞におけるグルタチオン抱合作用は MC の解毒機構の 1 つであることが明らかとなっているが (Campos and Vasconcelos, 2010)、Pflugmacher et al. (1998; 1999) によると、いくつかの沈水植物種はグルタチオン抱合作用による MC の解毒作用を有しているようである。グルタチオン抱合体は親水性が非常に増すため、本研究の固相抽出で用いた C18 (ODS) カラムでは回収できなかった可能性が高い。しかしながら、実験系内からの MC-LR 消失量は小さく、また大部分が栽培溶液中に残存していた点は非常に重要である。なぜなら、イネ（コシヒカリ）の MC-LR 吸収能が低いことを意味するからである。

一方、空芯菜では最大で 40.6 % の添加 MC-LR の消失が認められた。この原因として考えられるのはイネと同様にグルタチオン抱合である。よって、グルタチオン抱合された MC-LR のその後の行方が重要となってくる。臼井 (2003) はイネ等の植物による農薬のグルタチオン代謝作用について検討しており、そのような知見を基に、図 4-11 の様な経路図を作成した。グルタチオン抱合された物質は、動物細胞であれば細胞外へ排出される。しかし、植物ではそれ以外に液胞にも隔離、貯留され得ることが明らかとなってきている。仮にグルタチオン抱合された MC-LR が液胞中に隔離された場合、未だ植物細胞内に留まることとなる。これが根において起こるのであれば、食の安全性リスクの面からみれば問題ないといえる。しかしながら、これが葉において起きていた場合、本実験で用いた固相抽出法では回収しきれず、従って蓄積量を過小評価してしまう可能性があるため、今後、詳細な検討が必要である。

4-4-2 イネの生長阻害に関する過去の報告との比較

MC の主な毒性は PP 1 および 2A の阻害作用である (Honkanen et al., 1990; MacKintosh et al., 1990)。これは植物も例外ではないと考えられている (Stubbs et al., 2001)。本研究では微量の MC-LR が根および葉から検出されたにもかかわらず、生長阻害は見られなかった。Maejima et al. (2014) は品種不明の日本産イネの半数影響濃度 (Half maximal (50 %) effective

concentration, EC50) を $900 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ と報告し、それは Chen et al. (2004) による中国産イネ *O. sativa* cv. Liang-you-pei-9 (LYP9) と似た値であったと論じている。これらの報告は本研究結果と異なっているが、その原因として、①作物の健全な成長のための栄養素の有無、②水分の蒸発および MC 溶液の繰り返し添加による曝露濃度の上昇、の 2 つが考えられる。栄養素の有無は確実にイネの生理学的状態に影響を与えうるものであるし、曝露濃度の上昇は生長阻害を著しいものとする。本研究では栄養塩を添加し、かつ実験開始時と実験終了時の曝露濃度に大きな差は認められなかったことから、上記の問題は回避できたものと判断できる (図 4-7)。一方、Liang et al. (2016) は、中国産イネ *O. sativa* cv. Huai-dao 8 (HD8) は栄養塩を与えた状態で $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上で生長が阻害されたと報告している。Liang et al. (2016) の報告はイネが穂ばらみ期に入っていたため、イネの成長段階によって影響の受けやすさが異なる可能性があるが、品種が異なるため、品種間差も考慮した検討が必要であるといえる。

4-4-3 イネの MC-LR 曝露による栄養塩吸収阻害および窒素化合物の分泌

イネの組織重量において生長阻害は見られなかったにもかかわらず、MC-LR 曝露濃度の上昇に伴い栽培溶液中の全窒素およびリン酸濃度は上昇していた。また、全窒素構成要素は根から分泌された何らかの窒素化合物である可能性が示唆された。実際、植物根は様々な物質を根から分泌しており、その中にはモミラクトン A、B (Badri and Vivanco, 2009) も含まれており、Chung et al. (2007) によるとモミラクトンは *M. aeruginosa* の成長に影響を与えるようである。それ故、MC-LR が根からの分泌を活性化させた可能性がある。一方、リン酸吸収阻害について、Freitas et al. (2015) は $1 \sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ の MC-LR を 5 日間曝露させたレタス (*Lactuca sativa*) の葉のリン濃度を分析しており、 $1 \sim 10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲では生長阻害が見られなかったにもかかわらず、対照系と比較して 5 %水準で有意に減少したと報告している。この現象は植物の有する贅沢吸収作用によると考えられる (Epstein, 1972)。植物は、栄養素によっては成長に必要な量以上に過剰に吸収することがあるため、リン酸吸収が阻害されたとしても、それが過剰吸収分の範囲において阻害されたのであれば、生長阻害は受けないと予想される。事実、Azevedo et al. (2014) はイネ品種の一つであるアルバトロス種のタンパク質発現が低濃度の MC-LR 曝露 ($13\text{-}78 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) で変化したことが、組織重量に差は見られなかったと報告している。加えて、MC は様々な植物に対して酸化ストレス源に成り得ると報告されている (Gehring et al., 2003; Chen et al., 2004; Yin et al., 2005; Pflugmacher et al., 2007; Chen et al., 2010; Jiang et al., 2011)。本研究で用いた MC 溶液は MC-LR 以外にも *M. aeruginosa* の代謝物が微量ながら含まれているため、これら窒素化合物の分泌およびリン酸吸収阻害が MC-LR を原因として引き起こされると断言できないが、既往の報告を考慮し、MC-LR は日本産イネ (コシヒカリ) に対して、外観には影響が現れなくとも、生理学的な側面で影響を与えうるものと判断した。

4-4-4 イネ・空芯菜の MC-LR 吸収蓄積特性解析

恐らく、植物が MC を吸収可能であると最初に報告したのは Kurki-Helasma et al. (1998)

の論文と思われる。中国産イネを含め、いくつかの作物で蓄積特性が検討されてきたにもかかわらず、日本産イネに対しての報告はこれまでなかった。よって、本報告が日本産イネ *O. sativa* cv. Koshihikari の MC-LR 吸収蓄積特性に関する最初の報告になる。植物細胞壁は網目構造を取っており、その空隙サイズは 5 ~ 10 nm と言われている (Wyman, 2013)。Zhang et al. (2011) は MC-LR の大きさについて、3 次元構造から最長部分を 2.94 nm と解析しており、故に MC-LR は細胞壁内に侵入、蓄積することができるといえる。実験初期と終了時の曝露濃度に大きな差が見られなかったことから (図 4-2)、MC-LR は水分子のと共に細胞壁内に入り込んだと考えられる。しかしながら、図 4-8 において根への蓄積量が曲線を描いていたことから、単純拡散だけでなく、根の細胞内にも取り込まれたことが予想される。一方で、葉 (地上部) への MC-LR 蓄積量は根と比較して非常に低かった (図 4-8)。一般的に、イネは根において、地上部への化学物質輸送に対して二重の障壁を備えており、図 4-1 で示した内皮だけではなく根表面領域を構成する外皮においてもカスパリー線形成する (Enstone et al., 2003)。それ故、根細胞壁内の MC-LR 移動はこれらのカスパリー線によって遮断され、細胞膜内に取り込まれたもののみが木部にたどり着くことができる (図 4-12)。加えて、曝露濃度が上昇しているにもかかわらず葉への蓄積量が一定であったことから、この細胞膜通過における速度が非常に遅いものであったことが読み取れる。一方、曝露濃度 $72.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ においては葉にのみ MC-LR の蓄積が確認されたが、これは希釈効果 (Dilution effect) によるものと考えられる (Larcher, 2003)。つまり、根の成長速度に対して、根への MC-LR 蓄積量が少なく、よって乾燥重量当たりの蓄積量が“希釈”されたため、検出限界値を下回ったと考えられる。これは同時に、MC-LR の膜輸送に関わる輸送システムの親和性が非常に高いことを意味する。これら膜横断に関わる速度および親和性を定量的に検討するために、葉への蓄積量を根間重量で割り、曝露濃度とのグラフを作成、その後に Michaelis-Menten 式を適用して V_{max} および K_{m} をそれぞれ推定した。その結果、 V_{max} は $0.0013 \text{ nmol}\cdot\text{g-root (D.W.)}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 K_{m} は 28.7 nM と算出された。これらの値は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いたアンモニアやジペプチド吸収に関する既往報告のものよりも非常に低いものであった (Wang et al., 1993; Song et al., 1996; 2000)。よって、*O. sativa* cv. Koshihikari の MC-LR 膜輸送に関わる輸送システムは、栄養塩等の他の物質の場合と比較して非常に親和性が高いものであることが明らかとなった。

空芯菜についても地上部より根の方が高い MC-LR 蓄積能が示されたが、これも根におけるカスパリー線が MC の維管束への侵入を抑制したためと考えられる。栽培期間が異なるため単純に比較はできないが、イネと比べて空芯菜は高い MC-LR 吸収蓄積能を有することが示唆された。イネと空芯菜ではカスパリー線構造の異なることが予想されるが、吸収機構自体が異なる可能性もある。いずれにしても、空芯菜が高い MC 吸収能を有している可能性は否定できず、従って MC-LR 濃度が $75.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ を超えるような水圏への空芯菜を用いたフロート式水耕栽培装置の様な生態工学技法の導入は、食の安全性に関するリスクを増加させる危険性がある。カナダ保健省 (2012) は親水域の水質ガイドラインとして全 MC 濃度で $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下という値を定めているが、その値と比較しても $75.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ と

いう濃度は一般的に高い値である。しかしながら、それを越える濃度は現実に観測されているため、富栄養化対策としての空芯菜の利用には細心の注意が必要である。対して、神蔵ら（2014）の報告を思い起こせば、空芯菜を土壌栽培した際にリスクが認められたのは添加濃度 $1,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ の系列のみであった。つまり、水耕栽培等の直接 MC が根に触れるような栽培環境では空芯菜の MC 吸収蓄積リスクは高まるが、日本においては土壌栽培であれば添加 MC の多くが土壌に吸着され、微生物分解も起こるためにそのリスクは格段に低下させることができるといえる。

上記のように、イネ（コシヒカリ）および空芯菜による地上部への MC-LR 吸収蓄積特性をクロマトグラフィーによって確かめることができた。つまり、MC-LR は根のカスパー一線を突破して維管束内に侵入可能であるといえる。その際の細胞膜透過機構としては、エンドサイトーシスもしくはペプチドトランスポーターの存在が考えられる。エンドサイトーシスの例として、イネにおけるヘモグロビンの吸収が挙げられる。西澤ら（1977）はヘモグロビンを用いてイネを栽培した際、ヘモグロビンを窒素源としてイネが生長可能であり、それがエンドサイトーシスによるものであることを確認している（図 4-13、西澤, 1992）。エンドサイトーシスとは細胞外にある高分子化合物を細胞膜ごと細胞内に取り込む機構であり、かつては植物に存在しないと考えられてきた。しかし、上記の実験結果および幾つかの植物細胞生物学的知見からも存在が示唆され、現在ではその存在が確認されており、起因となる遺伝子も発見されている（Paungfoo-Lonhienne et al., 2008; 藤本および上田, 2014）。更に、植物ホルモンの一つであるオーキシンの極性輸送について、エンドサイトーシスが重要な働きをしていることが示され（Paciorek, 2005）、植物細胞の世界でもその重要性が認識されてきている。他方、作物はジペプチド～ペンタペプチドの吸収に関与するトランスポーターを有していることが明らかとなってきた（表 4-5, Tegeder and Rentsch, 2010）。従って、これらのペプチドトランスポーターの中に MC の細胞内取り込みに関与する者が存在する可能性は十分にある。久保（2006）は大豆粕の分解物中に含まれるある種のペプチドが根毛形成を促進させると報告しており、作物はペプチド等も含めた様々な物質と相互関連しながら成長していると考えられる。MC の作物細胞内取り込み機構は全く明らかになっていないが、本研究で得られた成果や既往の研究を総合し、遺伝子の既知配列の相互比較等のバイオインフォマティクス、分子生物学的手法を用いることで解明できる可能性がある。それは植物生理学に新たな知見を与えるものであり、今後の展開が期待される。

4-4-5 イネにおける品種間差比較

表 4-6 はイネにおける MC の蓄積特性に関して、本研究および既往研究をまとめたものである。Chen et al. (2004) の報告において、*O. sativa* cv. LYP9（インディカ米）実生の MC 蓄積量は、 $3,000 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ の曝露において $5.40 \text{ ng-MC-LR equiv.} \cdot \text{g (F.W.)}^{-1}$ と、*O. sativa* cv. Koshihikari および *O. sativa* cv. HD8（Liang et al., 2016）と比較して低い値であった。しかし、前述を通り *O. sativa* cv. LYP9 の実験にはかの問題を抱えており（栄養塩無添加、MC 溶液の繰り返し散布、非殺菌および ELISA による分析等）、単純に比較することは困難で

ある。更に、Liang et al. (2016) は作物体への MC 蓄積量の単位を統一していない（要旨、本文、グラフの単位が全て異なる）。それ故、品種間比較が非常に困難なものとなった。しかしながら、傾向としては *O. sativa* cv. LYP9 の MC 吸収蓄積能は、*O. sativa* cv. Koshihikari および HD8 よりも低いとものであった。*O. sativa* cv. LYP9 の親品種はインディカ米であり、*O. sativa* cv. Koshihikari および HD8 ではジャポニカ米である。従って、インディカ米はジャポニカ米に比べて MC 吸収蓄積能が低い可能性がある。また、*O. sativa* cv. LYP9 は収量の高いハイブリット米と呼ばれるもので、栄養塩吸収能等が他の品種と大きく異なる可能性もある。このような品種間差は、分子生物学的側面からの MC 吸収に関わる機構の解明に大きな寄与をしようるものであり、今後、詳細な検討が必要である。

4-5 まとめ

日本産イネの *O. sativa* cv. Koshihikari 実生は MC-LR を吸収し、地上部へ蓄積可能であることが明らかとなった。また、添加量のうち 87~92% が吸収されずに溶液部に残存することが分かった。これは根構造内における MC-LR 移動が外皮および内皮のカスパー線によって制限されたためといえる。加えて、膜輸送機構は、他の物質の輸送機構と比較して高親和性かつ取り込み速度は非常に遅いことが分かった。一方、生長阻害が見られなくとも、リン酸吸収は阻害され、かつ窒素化合物の分泌が活性化されていた。故に、MC-LR はイネの生理学的システムを攪乱する可能性が示唆された。また、既往報告との比較から、ジャポニカ米はインディカ米よりも MC を多く吸収する可能性が示唆された。蓄積能に差はあれど、ジャポニカ米であれインディカ米であれ、MC を蓄積可能であるといえる。イネ栽培は多くの灌漑用水を必要とするため、食の安全性に関するリスクを下げるためにも、水源の水質およびアオコの発生状況には可能な限り注意を払うべきである。

空芯菜においては曝露濃度が $75.2 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下でリスクなしと判断されたが、実環境中でこれほどの濃度が検出されることは、現在の日本においてはほとんどない。また、神蔵ら (2014) の試験結果において高濃度曝露系においてのみ空芯菜に MC が蓄積されていたことを考慮すれば、日本の土壌の有する緩衝作用により、国内においては現状、作物栽培への藍藻類産生毒 MC の与える影響は無視できるものと判断された。

表 4-1. 木村氏 B 液組成

Components	Amount
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	48.2 mg
$\text{K}_2 \text{SO}_4$	15.9 mg
MgSO_4	65.9 mg
KNO_3	18.5 mg
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	59.9 mg
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	24.8 mg
Fe-citrate	2~5 mg
Distilled water	1 L

(出典：馬場および高橋, 1960)

表 4-2. イネにおける MC-LR 回収量および回収率

Setting concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Series	Initial Amount (μg)	Recovered amount (μg)			Recovery rate (%)
			Culture solution	Root	Leaf	
0	-	-	-	-	-	-
	1	2.89	2.53	N.D.	0.01	87.8
100	2	2.92	2.63	N.D.	0.01	90.3
	3	2.88	2.84	N.D.	0.01	99.1
	1	14.58	12.90	0.04	0.02	88.9
500	2	15.04	13.14	0.04	0.01	87.7
	3	15.30	13.17	0.04	0.01	86.4
	1	30.99	26.95	0.06	0.01	87.2
1,000	2	31.09	25.99	0.06	0.01	83.8
	3	30.17	27.24	0.07	0.01	90.6

N.D. : 検出限界値未満

表 4-3. 空芯菜における MC-LR 回収量および回収率

Setting concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Series	Initial amount (μg)	Recovered amount (μg)			Recovery rate (%)
			Culture solution	Root	Leaf	
0	-	-	-	-	-	-
	1	5.58	4.72	N.D.	0.03	85.3
100	2	5.62	5.12	0.01	N.D.	92.5
	3	5.82	4.55	0.03	N.D.	78.8
	1	26.27	24.51	0.02	N.D.	93.4
500	2	22.39	21.99	0.02	N.D.	98.3
	3	23.00	21.75	0.06	0.05	95.0
	1	48.95	39.38	0.03	0.01	80.5
1,000	2	49.60	37.57	0.08	0.02	75.9
	3	46.61	43.47	0.10	0.06	93.6
	1	286.87	197.77	0.58	0.04	69.2
5,000	2	265.19	157.24	0.32	0.07	59.4
	3	296.57	197.96	0.42	0.49	67.1

N.D. : 検出限界値未満

表 4-4. 初期栄養塩濃度の検証結果

Setting MC-LR ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	T-N ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	T-P ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
0	28.20 ± 0.02	6.90 ± 0.00
100	28.75 ± 0.46	7.70 ± 0.37
500	28.65 ± 0.07	6.95 ± 0.32
1,000	29.20 ± 0.14	7.20 ± 0.00

表 4-5. 現在までに明らかとなっているペプチドトランスポーター

トランスポーター	学名	作物種
ペプチドトランスポーター (PTR)		
<i>AtPTR1-5</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ
<i>HaPTR4</i>	<i>Hakea actites</i>	ハケア
<i>HvPTR1</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	オオムギ
<i>NaPTR1</i>	<i>Nepenthes alata</i>	ウツボカズラ
<i>VfPTR1</i>	<i>Vicia faba</i>	ソラマメ
<i>BnNRT1-2</i>	<i>Brassica napus</i>	セイヨウアブラナ
オリゴペプチドトランスポーター (OPT)		
<i>AtOPT1-9</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ
<i>OsGT1</i>	<i>Oryza sativa</i>	イネ
<i>BjOPT6</i>	<i>Brassica juncea</i>	カラシナ

PTR…di、tripeptide およびヒスチジン、硝酸塩の細胞膜内輸送に関与
 OPT…tetra、penta peptide およびグルタチオンの細胞膜内輸送に関与

(出典 : Tegeder and Rentsch, 2010)

表 4-6. 各イネ栽培品種 (*O. sativa* cultivar.) の MC 吸収量比較

Cultivar	MC variant	Parts	MCs exposure concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)					Unit	Reference
			374	600	769	1,000	3,000		
Liang-You-Pei 9 (LYP9, Indica)	-RR (62) -YR (35) -LR (3)	Aerial	-	5.12	-	-	5.40	ng-MC-LR \cdot equiv. \cdot g-F.W. $^{-1}$	Chen et al., 2004
Koshihikari (Japonica)	-LR	Aerial	172	-	175	-	-	ng-MC-LR \cdot g-D.W. $^{-1}$	This study
Huai-Dao 8 (HD8, Japonica)	—	Leaf	-	-	-	<i>c.a.</i> 130	241	*	Liang et al., 2016
		Stem	-	-	-	<i>c.a.</i> 35	32.5		

* Liang et al. (2016) においては、同様の値にもかかわらず、グラフでは $\mu\text{g-MCs}\cdot\text{g-F.W.}^{-1}$ 、本文では $\mu\text{g-MCs}\cdot\text{kg-F.W.}^{-1}$ 、要旨部分では $\mu\text{g-MCs}\cdot\text{kg-D.W.}^{-1}$ と単位が統一されていない。

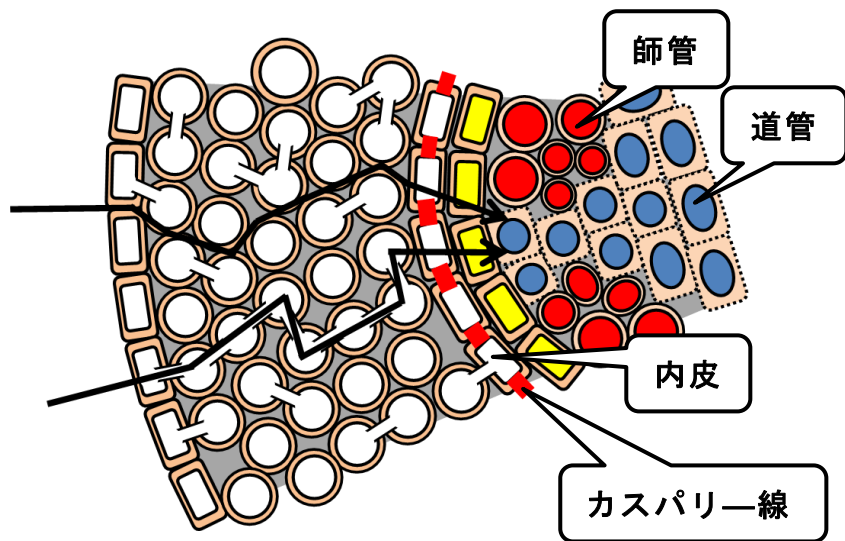


図 4-1. 作物根中の物質移動経路（出典：Taiz and Zeiger, 2010）

2つの黒矢印は水および各種物質の移動経路を示しており、細胞壁間隙もしくは細胞に取り込まれた後に細胞間の原形質連絡を介して運ばれる。しかしながら、内皮の部分にカスパリー線が形成され細胞壁内を介した維管束への物質移動が阻害されるため、必ずカスパリー線内の細胞を通過しなければ木部に至ることができない。

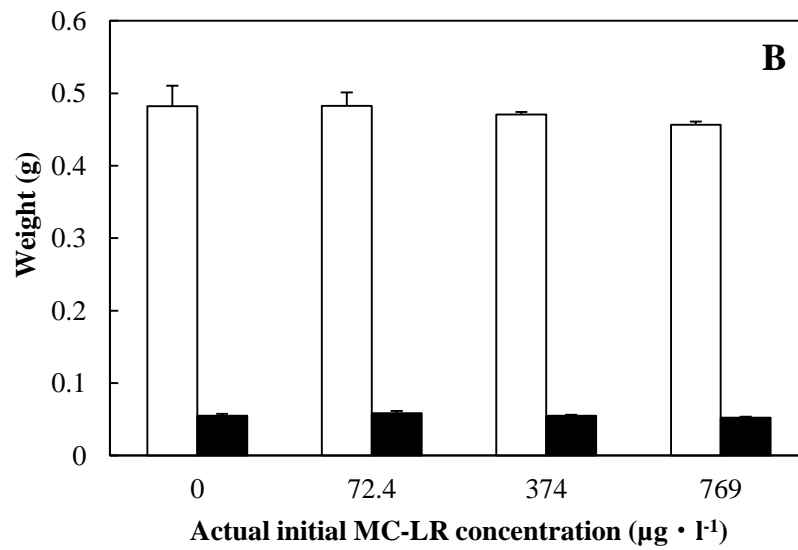
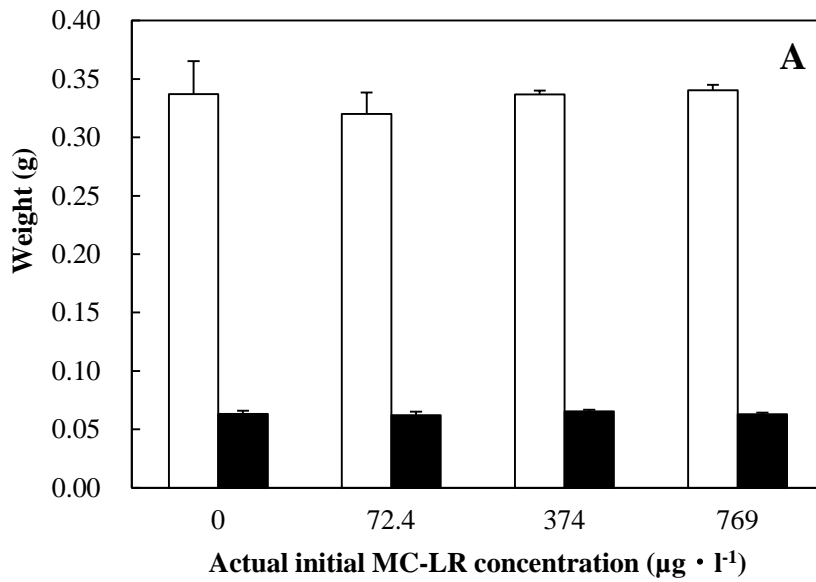


図 4-2. イネの葉 (A) および根 (B) の重量比較

□-湿重量, ■-乾燥重量

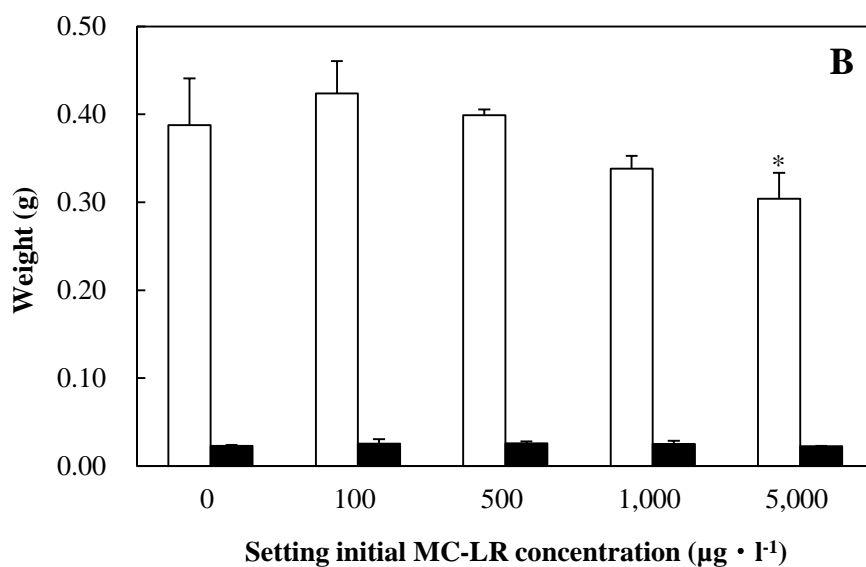
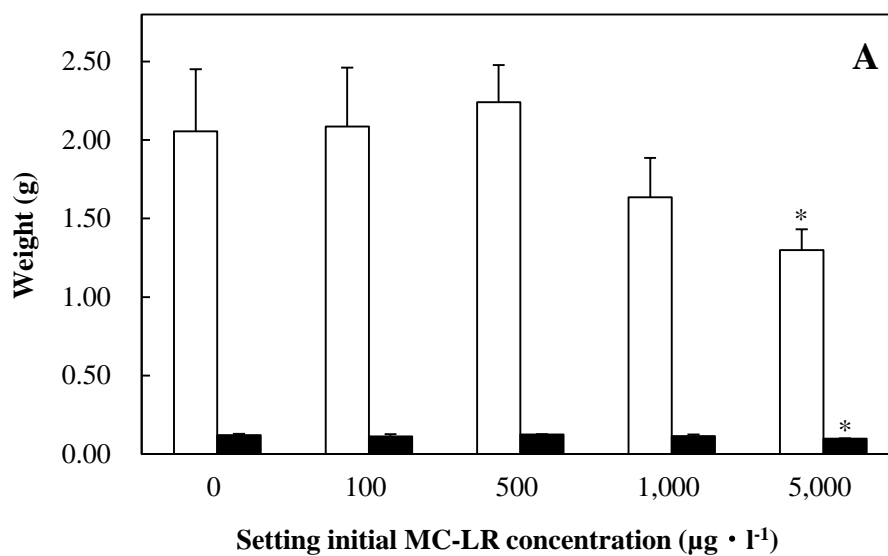


図 4-3. 空芯菜の葉 (A) および根 (B) の重量比較
□-湿重量, ■-乾燥重量, *は対照系との間で 5%水準の有意差 (Dunnett 法) が認められた群を示す。

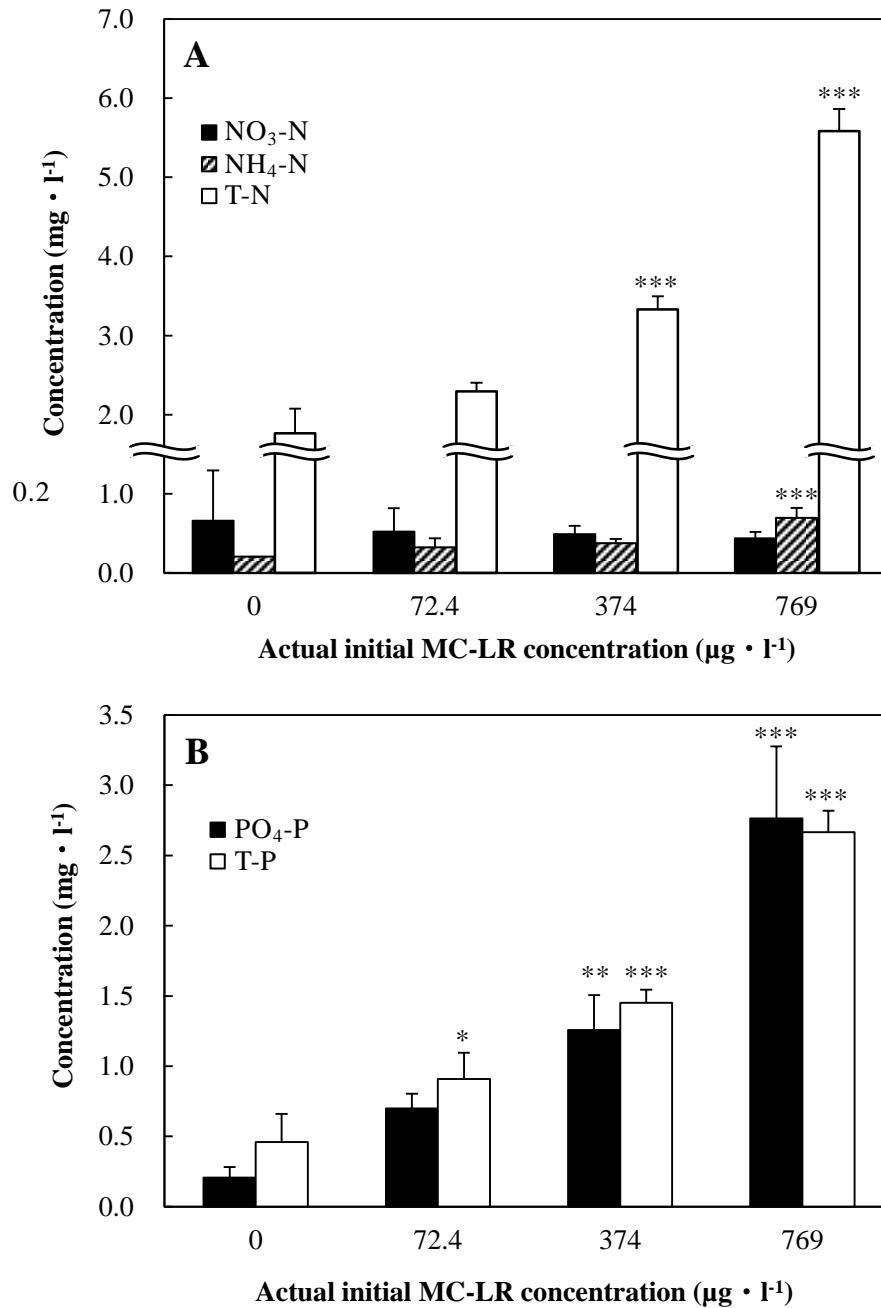


図 4-4. イネにおける実験終了時の硝酸、アンモニア、全窒素 (A)、リン酸および全リン (B) の残存栽培溶液内濃度の比較
 有意差の検討は Dunnett の方法を用い、対照系に対して
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ を示す。

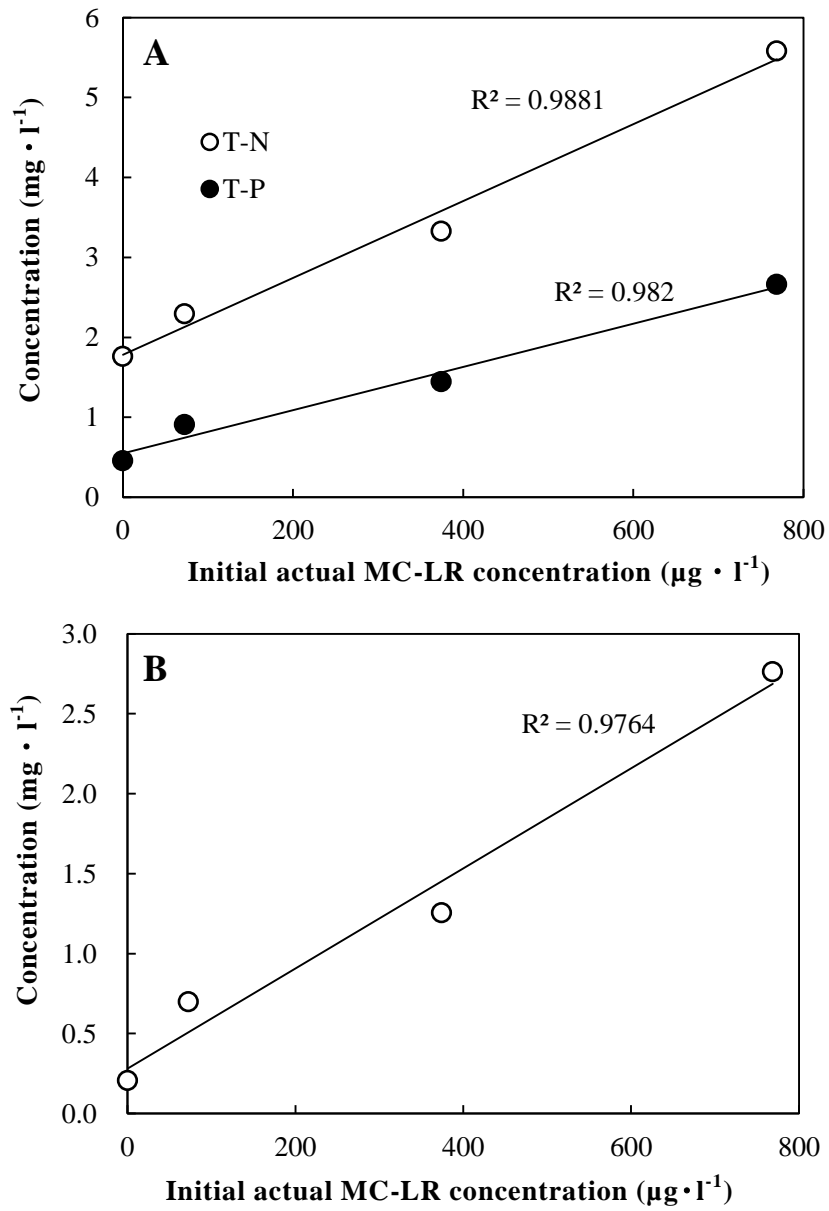


図 4-5. イネの実験終了時における全窒素、全リン (A) およびリン酸 (B) の栽培溶液内残存濃度と曝露 MC-LR 濃度との比較

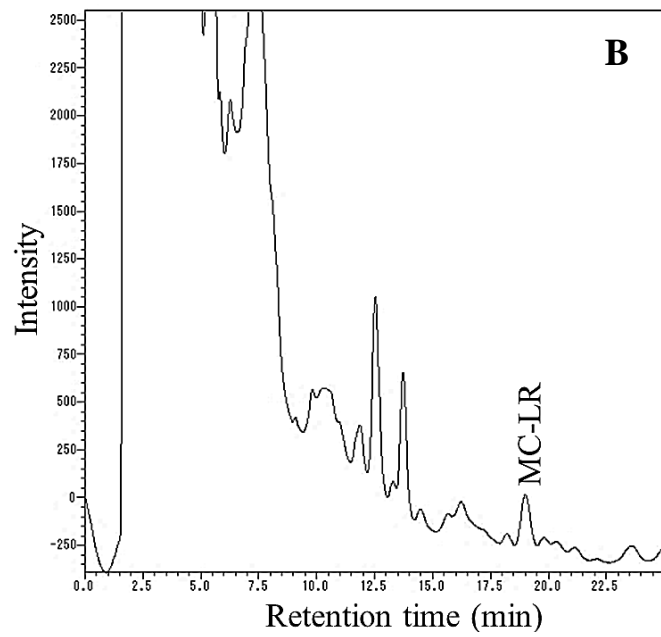
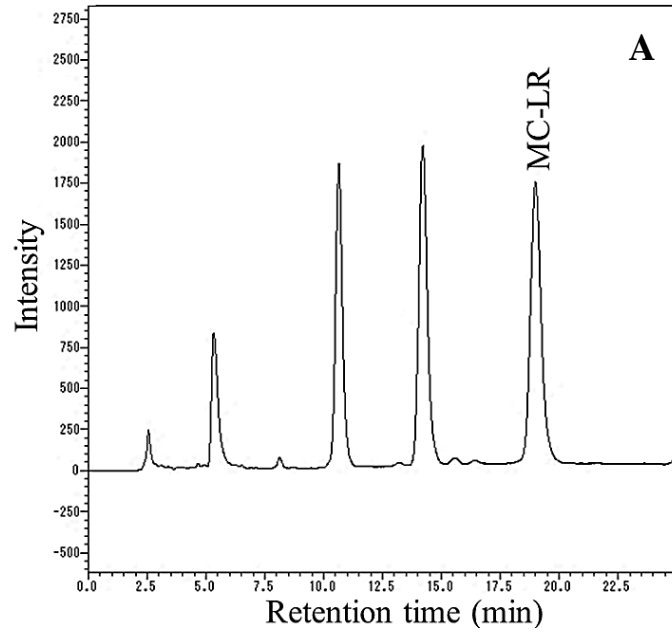


図 4-6. イネにおけるスタンダード試料 (A) と実試料中 (B) の MC-LR の HPLC クロマトグラム

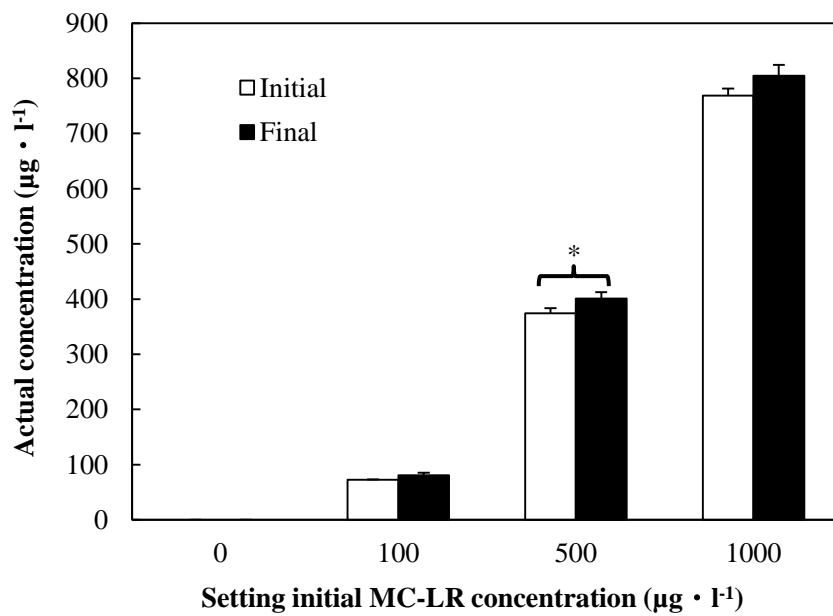


図 4-7. イネにおける MC-LR の初期および実験終了の実測濃度
 *は 5%水準で有意差が認められたことを示す。

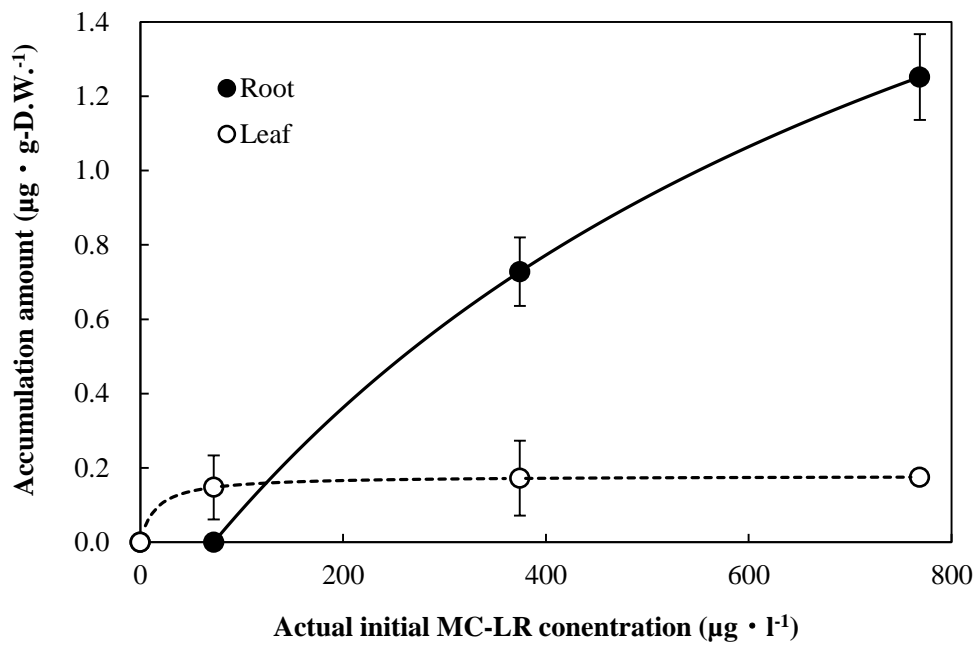


図 4-8. イネの葉および根における MC-LR 蓄積特性

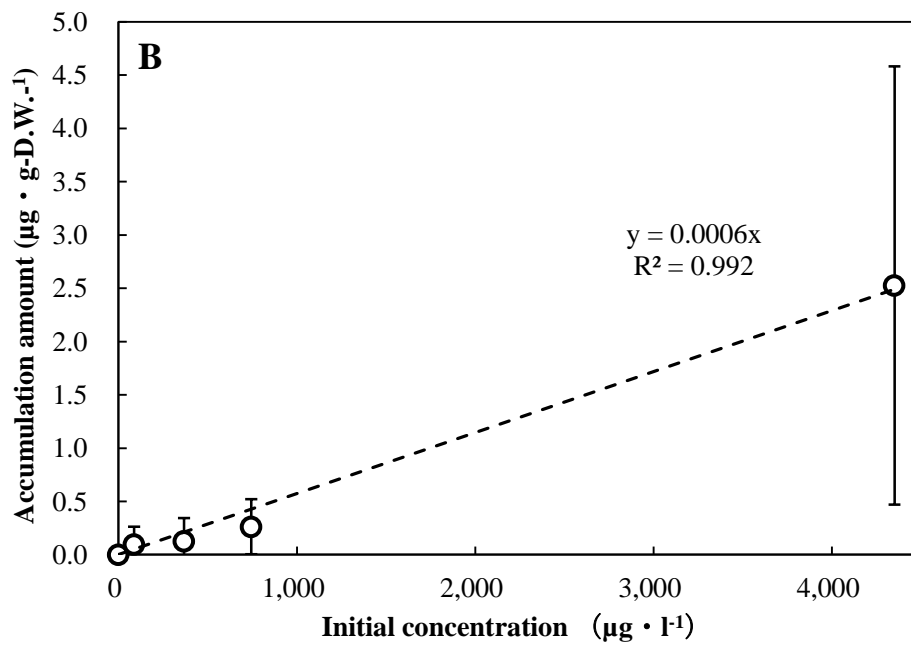
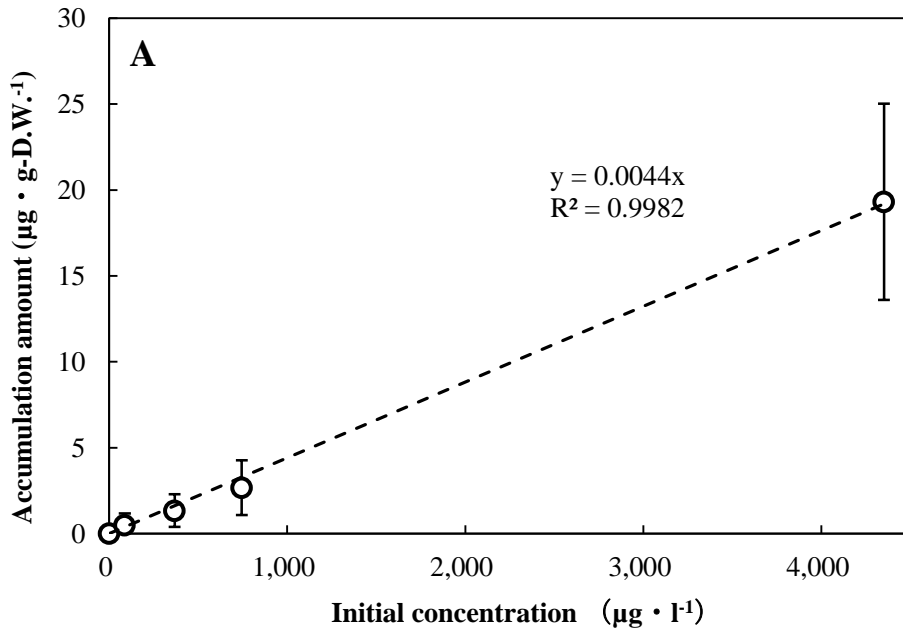


図 4-9. 空芯菜の MC-LR 吸収蓄積特性
A-根試料, B-葉試料

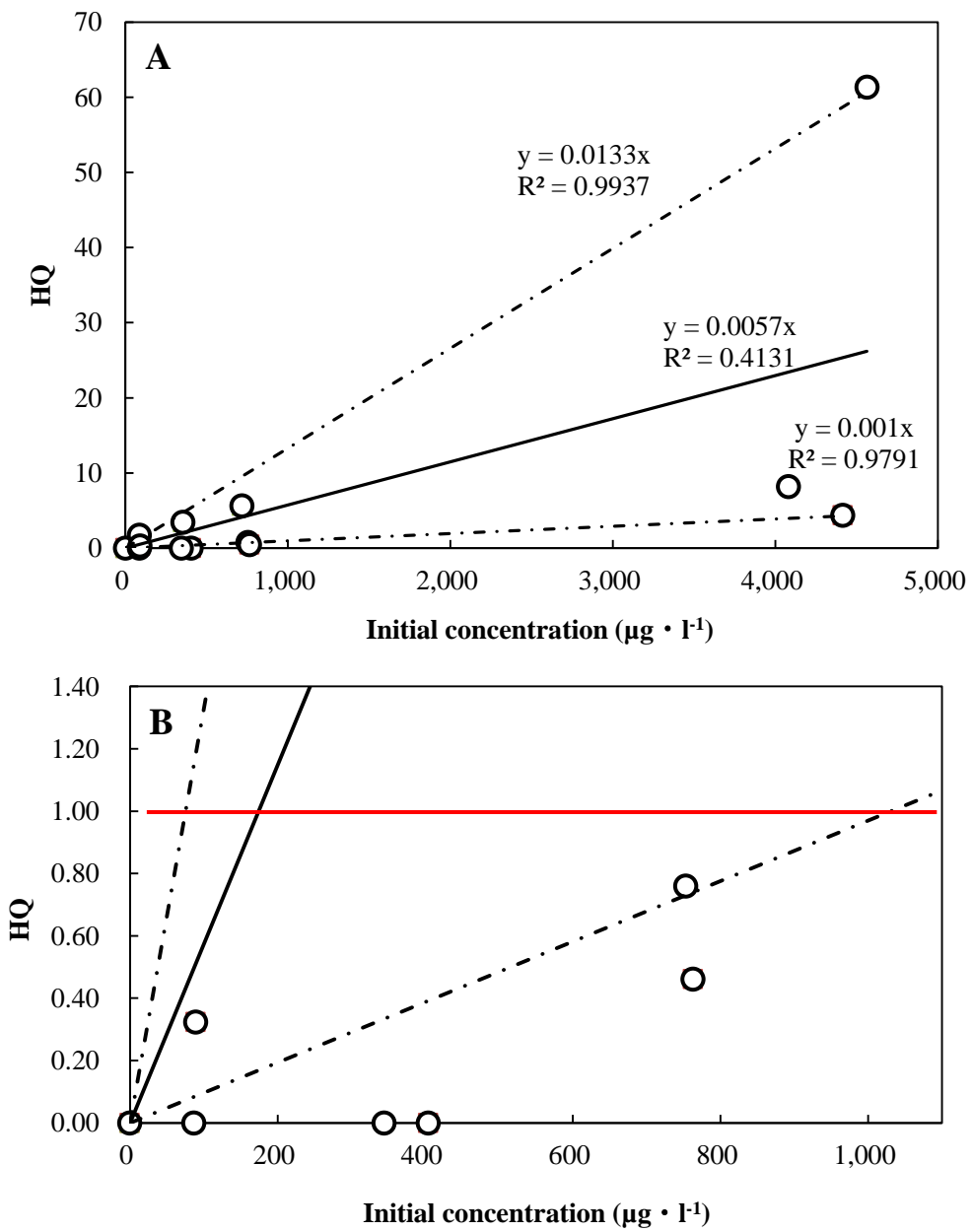


図 4-10. 曝露初期濃度に対する HQ
A-全体図, B-原点拡大図

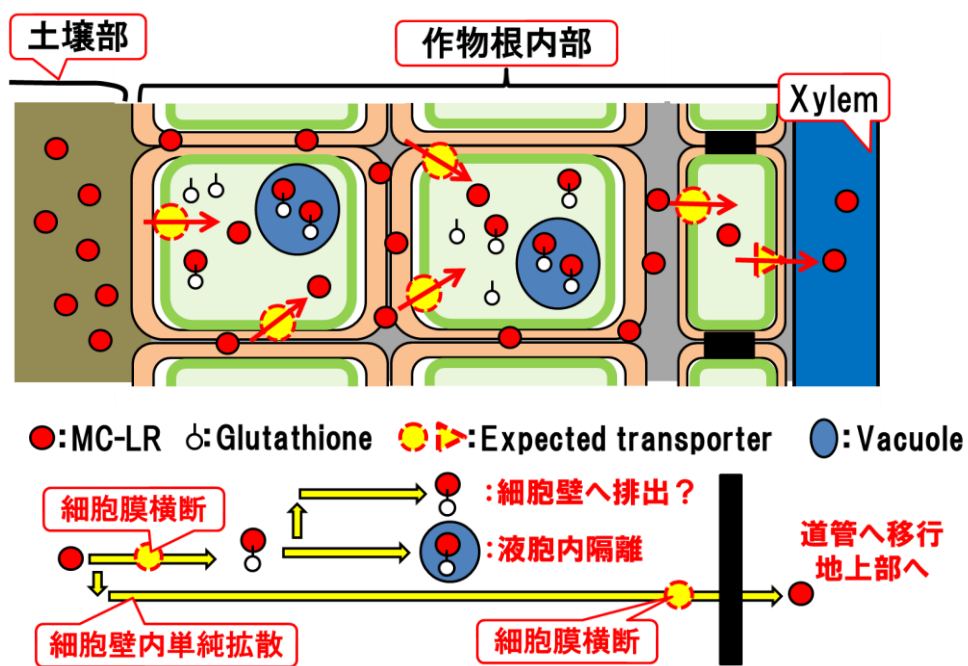


図 4-11. 予想されるクウシンサイの根内における MC-LR 移動経路

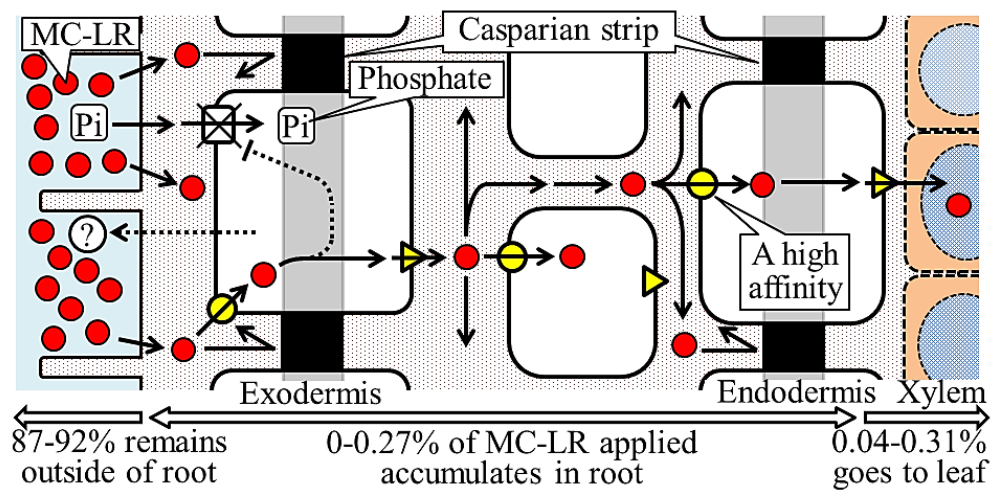


図 4-12. イネにおける MC-LR 吸収経路

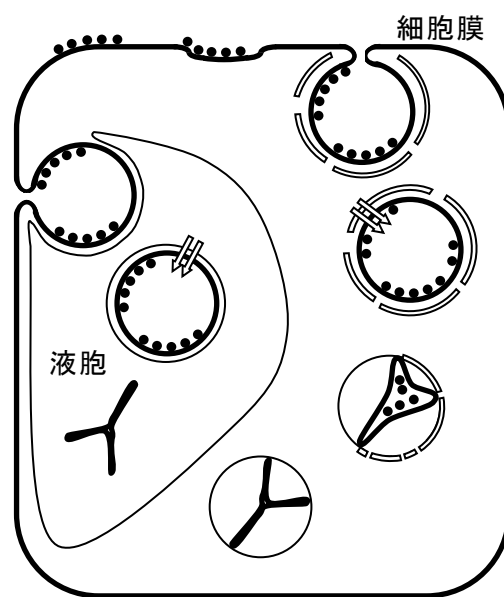


図 4-13. イネ冠根細胞におけるエンドサイトーシスによるヘモグロビン吸収の模式図
 ⇔-酵素、●-ヘモグロビンを示す（出典：西澤ら, 1992）。

第5章 農業用水源管理方策の検討

5-1 本研究で得られた成果

本研究において明らかとなった点は以下の通りである。また、図 5-1 は重要部をまとめたものである。

1. 黒ボク土および赤玉土は MC-RR、-YR、-LR を吸着可能であり、吸着率は全 MC 濃度で其々 90 %、95 % と非常に高い値であった。
2. 黒ボク土および赤玉土共に MC-LR 吸着特性は Henry 式に従った。
3. 黒ボク土の K_H (Henry 式の吸着定数) は、初期 pH 3.5 を除き pH 影響を受けないことが明らかとなった。
4. 赤玉土の K_H は初期 pH 3.5 で最も高く、pH 5.5 ~ 7.5 ではほぼ一定、pH 9.5 において減少することが分かった。よって灌漑用水源でアオコの異常増殖が確認された場合、水源の pH が 9.5 を超えるような条件下では粘土鉱物による MC-LR 土壌吸着能の減少する恐れがある。
5. 両土壌共に pH 緩衝作用が働き、 K_H の変動を抑えることが分かった。
6. 日本産イネの *Oryza sativa* cv. Koshihikari 実生は MC-LR を吸収し、地上部へ蓄積可能であることが明らかとなった。
7. *O. sativa* cv. Koshihikari への添加 MC-LR 量のうち 87 ~ 92 % が吸収されず、溶液中に残存することが分かった。
8. *O. sativa* cv. Koshihikari の MC-LR 膜輸送機構は高親和性かつ低速であることが分かった。
9. *O. sativa* cv. Koshihikari においては生長阻害が見られなくとも、リン酸吸収阻害および窒素化合物の分泌が起きることが分かった。
10. 空芯菜への MC-LR 曝露においては、曝露濃度が $75.3 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下で食の安全性に関してリスクなしと判断された。
11. 上記濃度は高濃度であるため、日本国内では土壌による緩衝作用も相まって、作物への MC 曝露によるリスクは無いものと判断された。

5-2 水源監視項目への追加の提案

本研究において、日本国内では MC の曝露による農作物の健康リスクは無いものと判断された。その根拠として、土壌の高い MC 吸着性が挙げられる。しかしながら、近年は地球温暖化も相まって、アオコ発生 of 北限が上昇し得る状況である。従って、現状では問題が無くとも、今後問題が発生しうる可能性がある。本研究成果の一つに、赤玉土の吸着力は添加溶液 pH 9.5 において減少するというものがある。農林省公害研究会が昭和 45 年に水稲を対象とした農業用水質基準 (農林水産省, 1970) として、pH 6.0~7.5 の範囲を挙げている。また、土壌の高アルカリ化は、施肥条件によってはアンモニアガスの発生による生育障害を引き起こす場合がある (橋田, 1968)。よって、作物へのアオコ産生毒 MC 曝露による健康リスクの低減化および高品質作物の収穫のためにも、灌漑用水源におけるアオ

コノ発生状況の確認、MCの定期的な計測、pHの観測および管理等が必要不可欠であるといえる。特に、長崎県「いさはや新池」流域では、食料自給率向上のモデル地域として、干拓地における農業がおこなわれている。霞ヶ浦用水地区と同様に、淡水域を灌漑用水源として利用している地域においては、pH、栄養塩濃度およびMC濃度等を含めたモニタリングを強化し、健康リスクが発生しないよう未然に防止することが重要といえる。

上記の手法は大規模な灌漑用水地区において行われるべきものである。MCの分析は極微量分析となるため、小規模の営農地ではコスト面で継続的モニタリングは難しい。簡易な分析法といわれるのが **Glutathione** 付加法である（彼谷, 2002）。他にも分子生物学的手法を用いた有毒アオコの検出法も存在するが、やはりイニシャルコストの面から導入は容易ではない。より簡便な方法は、アオコの発生状況を生物顕微鏡（子供向けのもので十分）で直接観察することである。顕微鏡観察ではMC濃度は一切わからないが、基本的にアオコの発生がMC汚染の原因でもあるので、十分に目安と成り得る。カナダ保健省（2012）は親水域におけるアオコ発生量に関して、水質ガイドライン基準値として $100,000 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以下と定めているが、この例からも分かるように、アオコ藻体量は実際に指標として用いられているため、灌漑用水源に対しても同様の手法が利用できる。顕微鏡でなくとも目視でアオコが出ているかどうかを確認するだけでよい。農林水産省（2012）は『農業用貯水施設におけるアオコ対応参考図書』をホームページ上で公開しているが、それに記載されている『見た目アオコ指標レベル』に従えばだれでも行う事ができる。また、pHの測定はポータブルpHメーター等を用いずとも、簡易なpH試験紙で十分測定可能である。よって、目視もしくは顕微鏡観察によるアオコ発生状況の確認、pH試験紙等によるpHの測定の2つを灌漑用水源に対して行う事で、藍藻毒問題に関する状況把握に資する情報を得られるといえる。特に顕微鏡観察は重要である。なぜならば、アオコが発生していても、第一章で述べたいさはや新池の例のように、アオコが発生したとしても、それが *Microcystis* 属と全く違うということも十分に起こりうるためである。

5-3 バイオ・エコエンジニアリングによる安全な灌漑用水の確保

藍藻類産生毒MCが灌漑用水源で発生しないよう、発生源対策として水源の富栄養化対策を行う事が不可欠である。そのためにはバイオ・エコエンジニアリングによる対策が重要かつ急務であるといえる。バイオ・エコエンジニアリングとは、浄化槽や下水処理といったバイオエンジニアリングと生態工学といったエコエンジニアリングを、その繋がりを断つことなくベストミックスというものである（稲森編, 2008）。図5-2は地方における灌漑用水源周辺へのバイオ・エコエンジニアリングの適用例であるが、家庭排水由来の栄養塩は、処理水質として $\text{BOD } 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、全窒素濃度 $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、全リン濃度 $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ を担保した高度処理型によって水源への流入濃度を下げ、そこで発生した余剰汚泥や家畜糞尿等はメタン発酵によってエネルギーを回収、発生する残渣や消化液は農地還元することで、灌漑用水源への栄養塩流入を食い止めることができる。また、アシ、マコモおよびガマといった抽水植物による緩衝帯および水耕栽培用フロートを設置すれば、栄養塩を除去できるだけでなく、それを売ることによって商売が可能になる。このように、物質循環、エネルギ

一循環および経済的側面の全てに配慮し、最適な環境改善および地域経済循環を成り立たせることで、持続可能性を担保出来るようになる。実際には地域性に合わせ、最適な手法を組み合わせることが重要となる。また、図 5-2 ではメタン発酵残渣や消化液を農地還元することが一つのキーポイントとなっているが、これは有機農法の普及を意味する。特に、化成肥料の投入により各種イオンの存在量が多くなった場合、MC の吸着能に少なからず影響を及ぼす恐れがある。灌漑用水を介した MC 曝露によるリスク上昇を防止する観点からも、慣行農法から有機農法への農法の転換が推奨されてよい。有機農業は生産性の面で慣行農法に劣るという側面がある。よって、如何にして有機農法で収量を上げるかがカギとなる。しかしながら、資源の循環利用による環境保全という点からも、有機農法は重要である（武田, 2012）。未来を見据え、不断の努力を継続して行い続ける必要がある。

5-4 灌漑用水源で MC が発生してしまった際の対処法

日本国内の黒ボク土の分布状況については農研機構の日本土壌インベントリーというサイト (<http://soil-inventory.dc.affrc.go.jp/index.php>) から確認でき、国内の畑の約 47% が黒ボク土であるとされている。本研究結果から、これらの黒ボク土および赤土は非常に高い MC 吸着能を有することが明らかとなった。国内の灌漑用水源において、仮に数百 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ のような高濃度の MC が発生してしまった場合、本研究結果および神蔵ら（2014, 2015）の報告を基に考察すれば、スプレー灌漑ではなく土壌表面への散水を行うことで対処可能であると考えられる。その際、可能な限り土壌との接触により添加 MC を吸着させる必要があるため、作物から多少離れた土壌表面への散水が望ましい。また、Codd et al. (1999) はアオコ藻体含有水をスプレー灌漑した際にサラダレタス表面に残存していたと報告している。スプレー灌漑はリーチングという葉からの栄養塩溶脱現象を引き起こすこともある（鈴木, 2003）。よって、アオコの発生が危惧されるような地域ではスプレー灌漑以外の灌漑方法が望まれる。

日本国外においてそのような状況が発生した場合は、土壌組成が日本と異なるために対処が難しくなると予想される。本研究で用いた土壌の MC 吸着要因としては有機態炭素量および陰イオン交換容量（AEC）が挙げられたことから、国外においてもこの 2 点を測定することで、土壌の MC 吸着能を推定できると考えられる。もし、砂質の様に有機態炭素も少なく、AEC も低いような土壌の場合は、MC 吸着能が低い可能性がある。その場合は、水源の利用を停止するか、もしくは対処療法的に次亜塩素酸処理または活性炭等の吸着剤投入を行う必要があるが、いずれも根本的な解決には至らない。よって、水源の水質保全が最重要であるといえる。有機態炭素量の測定は、本研究においては専用の機械を用いたが、過酸化水素水によって有機物を分解させ、その差分から有機物量を見積もることもできる。また、AEC はその性質上、公定法は存在しないが、塩化アンモニウムや塩化カリウム等を用いて、塩素イオンの吸着交換量からその大きさを推定することができる（土壌環境分析法編集委員会編, 1997）。塩素イオン濃度の測定は滴定法で行えるため、イオンクロマトグラフィの様な高額の機械がなくとも測定可能である。陰イオン吸着を行う土壌構成要素はアロフェン等の変異電荷を有する粘土鉱物であるが、粘土鉱物の定性的、定量的分

析は難しく、FT-IR や X 線回折像等の情報が必要であり、機材も高額になるため農業従事者にとっては実用的ではない。その点、AEC の測定は陰イオン吸着可能な粘土鉱物を直接定量せずとも、吸着力を推定可能という利点がある。

鈴木光剛先生の著書『畑作物の水質環境 (2003)』が発刊され、灌漑用水を含めた農業用水源の水質悪化が叫ばれてからおよそ 15 年が経過した現在、日本国内のみならず、水源の水質確保の重要は日に日に増している。喫緊の課題のみならず、中長期的な視点に立ち、バイオ・エコエコエンジニアリングの確実なる普及による持続可能な社会形成を確実に推進していくことが最も重要である。

5-5 今後の展望について

土壌として、神蔵ら (2014) が用いた黒ボク土および赤玉土を利用したが、世界的には様々な種類の土壌が存在する。それらの土壌においても、有機態炭素量と陰イオン交換容量 (AEC) の大きさが MC 吸着の主要因となることが予想される。しかしながら、分解菌の共存という点においては不明な点が多い。言い換えれば、土壌生態系に及ぼす MC 影響については未解明な点が多々ある。よって、土壌の物理構造および微生物群集構造の両側面から、土壌による MC 吸着・分解作用の検討を行うことで、農地土壌を中心とした微生物生態学における新知見を得られることが期待される。加えて、微生物活性を明らかにできれば、有機農法でいかに効率よく作物を栽培、収穫できるかという問題についても寄与し得る成果の取得が期待できる。作物についてもグルタチオン抱合がどれだけ作物吸収蓄積作用に関わってくるかはいまだ未知数であるし、MC 取り込みに関わる輸送機構も不明のままである。こういった点の解明は、植物生理学の未知の領域を開拓し得るだけの可能性を秘めており、リスク問題のみならず、学術分野においても大いに貢献できると期待される。

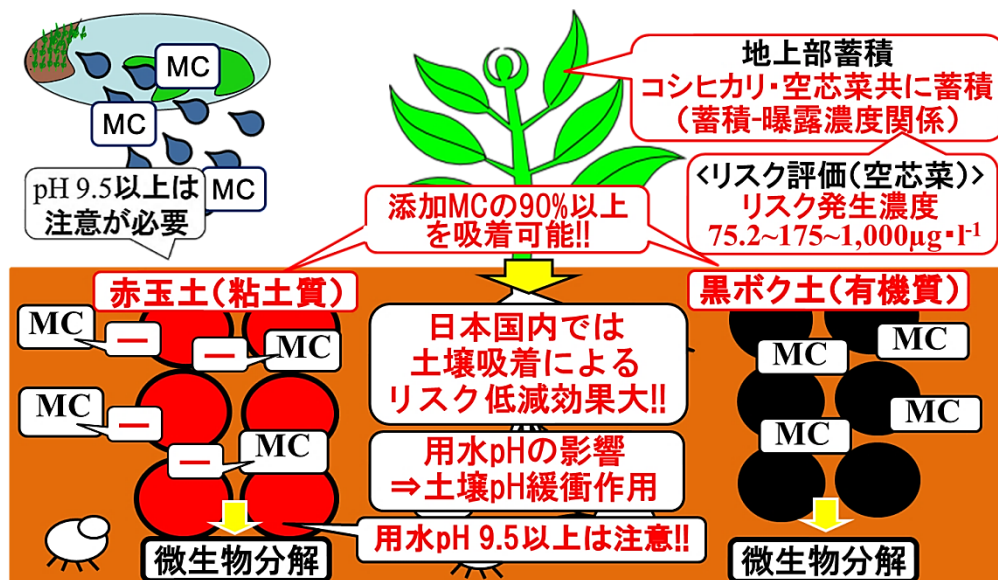


図 5-1. 本研究のまとめ

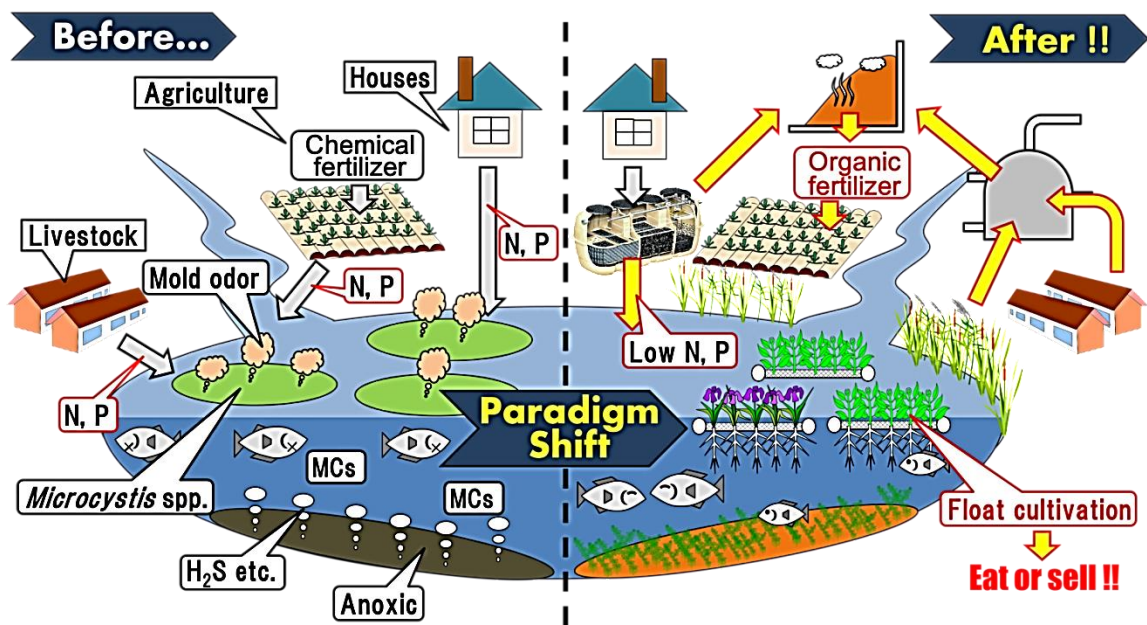


図 5-2. 郊外地域を対象とした発生源対策としてのバイオ・エコエンジニアリング適用例

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なる御指導を賜りました、筑波大学生命環境系、生物資源プロセス工学研究室 張振亜教授、雷中方准教授、清水和哉准教授 に衷心より感謝の意を表し、厚く御礼を申し上げます。学部時代から今日まで、懇切丁寧な御指導および御助言によりここまで導いて下さいました、国際科学振興財団 バイオ・エコ技術開発研究所 稲森悠平所長、稲森隆平副所長、埜千恵子氏に深く感謝申し上げます。

博士論文審査におきましては、審査委員会の張振亜教授、雷中方准教授、稲森悠平所長、ならびに筑波大学 水野谷剛准教授には、論文執筆から完成に至るまで多大なるご指導を賜りました。ここに深く御礼申し上げます。

研究を進める上で、国立環境研究所 徐開欽先生、千葉県立中央博物館 林紀男先生、琵琶湖環境科学国際センター 一瀬論先生、千葉県船橋市役所 西村浩先生には、お忙しいにもかかわらず、学部時代から今日まで様々なご指導を賜りましたことについても、厚くお礼申し上げます。

キャノン電子株式会社の神蔵雄生氏におかれましては、御卒業、就職後も様々な御助言および御指導をいただきました。ここに心より感謝申し上げます。

更に、植物生理学および土壌実験法に関して、筑波大学 山路恵子准教授には専門的立場より非常に多くの御助言をいただきました。心より感謝の意を表します。

学部時代から研究について様々なご相談に対応して下さいました賀数邦彦氏および卒業生の皆様、鹿目真理子様、伊藤裕子様に対し、深く感謝申し上げます。

また、筑波大学 生物資源プロセス工学研究室の諸氏には、終始貴重な御助言とご協力を賜りました。ここに深く感謝いたします。

最後に、健康に気遣い、学業に専念できるように援助、応援して下さいました両親に対して心より感謝申し上げます。

参考文献

- Abe, T., Lawson, T., Weyers, J., D., B., Codd, G., A., 1996, Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implication for current spray irrigation practice, *New Phytol.*, **133**, 651~658
- Azevedo, C., C., Azevedo, J., Osório, H., Vasconcelos, V., Campos, A., 2014, Early physiological and biological responses of rice seedlings to low concentration of microcystin-LR, *Ecotox.*, **23**, 107~121
- Badri, D.V., Vivanco, J.M., 2009, Regulation and function of root exudates, *Plant Cell Environ.*, **32**, 666~681
- Bibo, L., Yan, G., Bangding, X., Jiantong, L., Yongding, L., 2008, A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland, *J. Environ. Manage.*, **86**, 566~574
- Campos A., Vasconcelos, V., 2010, Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 268~287
- Chen, J., Song, L., Dai, J., Gan, N., Liu, Z., 2004, Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.), *Toxicon*, **43**, 393~400
- Chen, W., Song, L., Gan, N., Li, L., 2006, Sorption, degradation and mobility of microcystins in Chinese agriculture soils: Risk assessment for groundwater protection, *Environ. Pollut.*, **144**, 752~758
- Chen, J., Dai, J., Zhang, H., Wang, C., Zhou, G., Han, Z., Liu, Z., 2010, Bioaccumulation of microcystin and its oxidative stress in the apple (*Malus pumila*), *Ecotox.*, **19**, 796~803
- Chen, J., Han, F.X., Wang, F., Zhang, H., Shi, Z., 2012, Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*), *Ecotox. Environ. Safe.*, **76**, 193~199
- Chung, I. M., Ali, M., Ahmad, A., Chun, S. C., Kim, J. T., Sultana, S., Kim, J. S., Min, S. K., Seo, B. R., 2007, Steroidal constituents of rice (*Oryza sativa*) hulls with algicidal and herbicidal activity against blue-green algae and duckweed, *Phytochem. Anal.*, **18**, 133~145
- Codd G., A., Metcalf, J., S., Beattie, K., A., 1999, Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria, *Toxicon*, **37**, 1181~1185
- Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N., 2014, Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops, *Chemosphere*, **96**, 1~15
- Corbel, S., Mougin, C., Néliu, S., Delarue, G., Bouaïcha, N., 2016, Evaluation of the transfer and the accumulation of microcystins in tomato (*Solanum lycopersicum* cultivar MicroTom) tissues using a cyanobacterial extract containing microcystins and the radiolabeled microcystin-LR (¹⁴C-MC-LR), *Sci. Total Environ.*, **541**, 1052~1058
- Cordeiro-Araújo, M., K., Chia, M., A., Arruda-Neto, J., D., T., Tornisielo, V., L., Vilca, F., Z.,

- Bittencourt-Oliveira, M., D., C., 2016, Microcystin-LR bioaccumulation and depuration kinetics in lettuce and arugula: Human health risk assessment, *Sci. Total Environ.*, **566-567**, 1379~1386
- de Maagd, P. G.-J., Hendriks, A. J., Seinen, W., Sijm, D. T. H. M., 1999, pH-dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR, *Wat. Res.*, **33**, 677~680
- El Ghazali, I., Saqrane, S., Saker, M., Youness, O., Oudra, B., Vasconcelos, V., Del Campo, F., F., 2011, Caractérisation biochimique et moléculaire d'efflorescences à cyanobactéries toxiques dans le réservoir Lalla Takerkoust (Maroc), *Revue des sciences de l'eau J. Water Sc.*, **24**, 117~128
- El Herry, S., Fathalli, A., Rejeb, A., J.-B., Bouaïcha, N., 2008, Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* spp. and *Oscillatoria tenuis* in the Lebna Dam, Tunisia, *Water Res.*, **42**, 1263~1273
- Enstone, D.E., Peterson, C.A., Ma, F., 2003, Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment, *J. Plant Growth Regul.*, **21**, 335~351
- Epstein, E., 1972, Mineral Nutrient of Plants: Principles and Perspectives, John Wiley and Sons, Inc., 62~71
- Freitas, M., Azevedo, J., Pinto, E., Neves, J., Campos, A., Vasconcelos, V., 2015, Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants, *Ecotox. Environ. Safe.*, **116**, 59~67
- Gehringer, M.M., Kwada, V., Coates, N., Downing, T.G., 2003, The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR, *Toxicon*, **41**, 871~876
- Guo L., 2007, Doing battle with the green monster of Taihu lake, *Science*, **317**, 1166
- Gurbuz, F., Metcalf, J.S., Karahan, A.G., Codd, G.A., 2009, Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey, *Sci. Total Environ.*, **407**, 4038~4046
- Gutiérrez-Praena, D., Campos, A., Azevedo, J., Neves, J., Freitas, M., Guzmán-Guillén, R., Cameán, A., M., Renaut, J., Vasconcelos, V., 2014, Exposure of *Lycopersicon esculentum* to microcystin-LR: effects in the leaf proteome and toxin translocation from water to leaves and fruits, *Toxins*, **6**, 1837~1854
- Health Canada, 2002, Guidelines for Canadian drinking water quality supporting documentation: Cyanobacterial Toxins-Microcystin-LR, Canada, 1~22
- Honkanen, R.E., Zwiller, J., Moore, R.E., Daily, S.L., Khatra, B.S., Dukelow, M., Boynton, A.T., 1990, Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases, *J. Biol. Chem.*, **265**, 19401~19404
- Inamori, Y., Jin, X., Park, J.-D., Xu, K., 2008, Guideline on the Management for Establishment of Eco-sound Watershed Environment of Lakes and Marshes, The Industrial Water Institute Co., Ltd., 22~123
- Isobe, T., Okuhata, H., Miyasaka, H., Jeon, B.-S., Park, H.-D., 2014, Detoxification of

- microcystin-LR in water by *Portulaca oleracea* cv., *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 330~332
- Jiang, J., Gu, X., Song, R., Wang, X., Yang, L., 2011, Microcystin-LR induced oxidative stress and ultrastructural alterations in mesophyll cells of submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* (Lour.) Hara, *J. Hazard. Mater.*, **190**, 188~196
- Jochimsen, E., M., Carmichael, W., W., An, J., S., Cardo, D., M., Cookson, S., T., Holmes, C., E., Antunes, M., B., de Melo Filho, D., A., Lyra, T., M., Barreto, V., S., Azevedo, S., M., Jarvis, W., R., 1998, Liver Failure and Death after Exposure to microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil, *N. Engl. J. Med.*, **338**, 873~878
- Järvenpää, S., Lundberg-Niinistö, C., Spoo, L., Sjövall, O., Tyystjärvi, E., Meriluoto, J., 2007, Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography–mass spectrometry, *Toxicon*, **49**, 865~874
- Kanzo, Y., Ruike, K., Inamori, R., Suzuki, R., Xu, K., Inamori, Y., 2013, Analysis of absorption and accumulation of blue-green algae toxin Microcystin in the *Komatsuna* cultivation, *J. Bioind. Sci.*, **2**, 12~16
- Kondo, R., Kagiya, G., Hiroishi, S., Watanabe, M., 2000, Genetic typing of a bloom-forming cyanobacterial genus *Microcystis* in Japan using 16S rRNA gene sequence analysis, *Plankton Biol. Ecol.*, **47**, 1~6
- Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J., S., Codd, G., A., Pflugmacher, S., 2003, Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **43**, 141~148
- Krienitz, L., Dadheech, P.K., Fastner, J., Kotut, K., 2013, The rise of potentially toxin producing cyanobacteria in Lake Naivasha, Great African Rift Valley, Kenya, *Harmful Algae*, **27**, 42~51
- Kurki-Helasma, K., Meriluoto, J., 1998, Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, *Toxicon*, **36**, 1921~1926
- Lambert, T. W., Holmes, C. F. B., Hrudey, S. E., 1996, Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment, *Wat. Res.*, **30**, 1411~1422
- Larcher, W., 2003, *Physiological Plant Ecology 4th - Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*, Springer-Verlag, 196~201
- Lawton, L. A., Robertson, P. K. J., Cornish, B. J. P. A., Marr, I. L., Jaspers, M., 2003, Processes influencing surface interaction and photocatalytic destruction of microcystins on titanium dioxide photocatalysts, *J. Catar.*, **213**, 109~113
- Lefebvre, B.R., 2013, The accumulation of the cyanobacterial toxin, microcystin, in cherry tomato (*Solanum lycopersicum*) and bush bean (*Phaseolus vulgaris*) plants, *UNH Cent. Freshwater Biol. Res.*, **15**, 1~11
- Lehman, P.W., Boyer, G., Satchwell, M., Waller, S., 2007, The influence of environmental conditions on the seasonal variation of *Microcystis* cell density and microcystins concentration in San Francisco Estuary, *Hydrobiologia*, **600**, 187~204
- Liang, G., Xie, P., Chen, J., Yu, T. 2011, Comparative studies on the pH dependence of D_{OW} of

- microcystin-RR and -LR using LC-MS, *The Sci. World Jour.*, **11**, 20~26
- Liang, C., Wang, W., Wang, Y., 2016, Effect of irrigation with microcystins-contaminated water on growth, yield and grain quality of rice (*Oryza sativa*), *Environ. Earth Sci.*, **75:505**, 1~10
- Liu, G., Qian, Y., Dai, S., Feng, N., 2008, Adsorption and microcystin LR and LW on suspended particulate matter (SPM) at different pH, *Wat. Air. Soil Pollut.*, **192**, 67~76
- Liu, Y., Chen, W., Li, D., Huang, Z., Shen, Y., Liu, Y., 2011, Cyanobacteria-/cyanotoxin-contaminations and eutrophication status before Wuxi drinking water crisis in lake Taihu, China, *J. Environ. Sci.*, **23**, 575~581
- MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A., 1990, Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants, *FEBS Lett.*, **264**, 187~192
- Machado, J., Campos, A., Vasconcelos, V., Freitas, M., 2017, Effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on plant-soil systems: A review of their relevance for agricultural plant quality and public health, *Environ. Res.*, **153**, 191~204
- Maejima, K., Muraoka, T., Park, H. D., 2014, Accumulation and inhibitory effects of microcystin on the growth of rice and broccoli, *KJEE*, **47**, 19~30
- Miller, M. J., Hutson, J., Fallowfield, H. J., 2005, The adsorption of cyanobacterial hepatoxins as a function of soil properties, *J. Wat. Health*, **3**, 339~347
- Miller, A., Russell, C., 2017, Food crops irrigated with cyanobacteria-contaminated water: an emerging public health issue in Canada, *Environ. Health Rev.*, **60**, 58~63
- MDH (Minnesota Department of Health, USA), Comparison of State Water Guidance and Federal Drinking Water Standards (<http://www.health.state.mn.us/divs/eh/risk/guidance/waterguidance.html>)
- Mohamed, Z.A., Al Shehri A.M., 2009, Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia, *J. Hazard. Mater.*, **172**, 310~315
- Morris, R., J., Williams, D., E., Luu, H., A., Holmes, C., F., B., Anderson, R., J., Calvert, S., E., 2000, The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles, *Toxicon*, **38**, 303~308
- Nasri, H., Herry, S., E., Bouacha, N., 2008, First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeira. Algeria, *Ecotox. Environ. Safe.* **71**, 535~544
- NHMRC (National Health and Medical Research Council), 2011, National Water Quality Management Strategy, Australian Drinking Water Guidelines 6 2011, Australia, 333~338
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W., W., Fujiki, H., 1992, Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR, *J. Cancer Res. Clinical Oncol.*, **118**, 420~424
- Nishizawa, T., Nishizawa, I., Asayama, M., Harada, K., Shirai, M., 2007, Diversity within the Microcystin Biosynthetic Gene Clusters among the Genus *Microcystis*, *Microbes Environ.*, **22**, 380~390

- NSF (National Science Foundation), 2013, Extreme Algae Blooms: the New Normal?, *NSF Press Release*, 13-057 (https://www.nsf.gov/news/news_summ.jsp?cntn_id=127400)
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu H., Matsumoto, S., Watanabe, M. M., 1998, 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of microcystis strains with and without phycoerythrin, *FEMS Microbiol. Lett.*, **164**, 119~124
- Paciorek, T., Zažimalová, E., Ruthardt, N., Petrášek, J., Stierhof, Y.-D., Kleine-Vehn, J., Morris, D., A., Emans, N., Jürgens, G., Geldner, N., Friml, J., 2005, Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells, *Nature*, **435**, 1251~1256
- Park, H., D., Iwami, C., Watanabe, M., F., Harada, K., I., Okino, T., Hayashi, H., 1998, Temporal variabilities of the concentration of intra-and extracellular microcystins and toxic microcystins species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan, *Environ. Toxicol.*, **13**, 61~72
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T., G., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R., I., Gamage, H., K., Carroll, B., J., Schenk, P., M., Schmidt, S., 2008, Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms, *PNAS*, **105**, 4524~4529
- Pendleton, P., Schumann, R., Wong, S. H., 2001, Microcystin-LR adsorption by activated carbon, *J. Colloid. Inter. Sci.*, **240**, 1~8
- Peuthert, A., Chakrabarti, S., Pflugmacher, S., 2007, Uptake of microcystins-LR and -LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation), *Environ. Toxicol.*, **22**, 436~442
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1998, Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification, *Biochim. Biophys. Acta*, **1425**, 527~533
- Pflugmacher, S., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1999, Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants, *Environ. Toxicol.*, **14**, 111~115
- Pflugmacher, S., Aulhorn, M., Grimm, B., 2007, Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants, *New Phytol.*, **175**, 482~489
- Romero-Oliva, C.S., Contardo-Jara, V., Block, T., Pflugmacher, S., 2014, Accumulation of microcystin congeners in different aquatic plants and crops - A case study from lake Amatitlán, Guatemala, *Ecotox. Environ. Safe.*, **102**, 121~128
- Sathishkumar, M., Pavagadhi, S., Vijayaraghavan, K., Balasubramanian, R., Ong, S. L., 2010, Experimental studies on removal of microcystin-LR by peat, *J. Hazard. Mat.*, **184**, 417~424
- Song, W., Steiner, H.-Y., Zhang, L., Naider, F., Stacey, G., Becker, J.M., 1996, Cloning of a second *Arabidopsis* peptide transport gene, *Plant Physiol.*, **110**, 171~178
- Song, W., Steiner, H.-Y., Zhang, L., Naider, F., Stacey, G., Becker, J.M., 2000, Corrections, *Plant Cell*, **12**, 2295
- Song, H.-L., Li, X.-N., Lu, X.-W., Inamori, Y., 2009, Investigation of microcystin removal from

- eutrophic surface water by aquatic vegetable bed, *Ecol. Eng.*, **35**, 1589~1598
- Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T., Meriluoto, J., 2003, Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1020**, 105~119
- Stubbs, M.D., Tran, H.T., Atwell, A.J., Smith, C.S., Olson, D., Moorhead, G.B.G., 2001, Purification and properties of *Arabidopsis thaliana* type 1 protein phosphatase (PP1), *Biochim. Biophys. Acta*, **1550**, 52~63
- Taiz, L., Zeiger, E., 2010, Plant Physiology (5th edition), Sinauer Associates, Inc., 85~160, 110~113
- Tegeder, M., Rentsch, D., 2010, Uptake and partitioning of amino acids and peptides, *Molecular Plant*, **3**, 997~1011
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M., F., Park, H.-D., Chen, G.-C., Chen, G., Yu, S.-Z., 1996, Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in haimen and fusui, endemic areas of primary liver cancer in china, by highly sensitive immunoassay, *Carcinogenesis*, **17**, 1317~1321
- Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., Glass, A.D.M., 1993, Ammonium uptake by rice roots, II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma, *Plant Physiol.*, **103**, 1259~1267
- Ward, C., J., Codd, G., A., 1999, Comparative toxicity of four microcystins of different hydrophobicities to the protozoan, *Tetrahymena pyriformis*, *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 874~882
- WHO, 2011, Guidelines for Drinking-water Quality FOURTH EDITION, WHO, 344~346
- Wood, S., A., Briggs, L., R., Sprosen, J., Ruck, J., G., Wear, R., G., Holland, P., T., Bloxham, M., 2006, Changes in concentrations of microcystins in rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu, *Environ. Toxicol.*, **21**, 205~222
- Wu, X., Xiao, B., Li, R., Wang, C., Huang, J., Wang, Z., 2011, Mechanisms and factors affecting sorption of microcystins onto natural sediments, *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 2641~2647
- Wyman, C.E., 2013, Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals, John Wiley and Sons, Ltd., 23~38
- Xie, L, Park, H.-D., 2007, Determination of microcystins in fish tissues using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction, *Aquaculture*, **271**, 530~536
- Yan, H., Gong, A., He, H., Zhou, J., Wei, Y., Lv, L., 2006, Adsorption of microcystins by carbon nanotubes, *Chemosphere*, **62**, 142~148
- Yasuno, M., Sugayama, Y., Kaya, K., Watanabe, M. M., 1998, Variations in the toxicity of *Microcystis* species to *Moina macrocopa*, *Phycol. Res.*, **46**, 31~36
- Yin, L., Huang, J., Huang, W., Li, D., Liu, Y., 2005, Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR, *Toxicon*, **46**, 859~864
- Zhang, H., Zhu, G., Jia, X., Ding, Y., Zhang, M., Gao, Q., Hu, C., Xu, S., 2011, Removal of

- microcystin-LR from drinking water using a bamboo-based charcoal adsorbent modified with chitosan, *J. Environ. Sci.*, **23**, 1983~1988
- E. P. オダム, 1991, 基礎生態学 (三島次郎訳), 培風館, 175~178
- JA 全農 茨城県本部, 高品質コシヒカリの栽培ごよみ, JA グループ
- 浅岡聡, 青野求, 2006, 赤玉土および各種無機系吸着剤混合赤玉土による海水の脱塩, 日本土壤肥料学雑誌, **77**, 33~39
- 朝倉宏, 肴倉宏史, 田中信壽, 松藤敏彦, 1999, 土壌によるアルカリ性溶液中和に関する研究, 衛生工学シンポジウム論文集, **7**, 70~75
- 浅野敏久, 李光美, 平井幸弘, 金料啓, 伊藤達也, 2011, 中国・太湖の富栄養化問題と 2007 年のアオコ大発生事件 (利水障害) 後の対応, *E-Journal GEO*, **5**, 138~153
- 安部郁夫, 2002, 吸着の化学, オレオサイエンス, **2**, 275~281
- 市村輝宜, 1979, 2.5B 淡水藻類, 2.5 培養液の種類と組成, 2 藻類の単離と培養法, 西澤一俊, 千原光雄編, 藻類研究法, 共立出版株式会社, 294~305
- 稲森悠平, 2002, 国際的水環境の修復-バイオ・エコエンジニアという技術- 循環型社会形成推進・廃棄物研究センター, 独立行政法人国立環境研究所 公開シンポジウム発表資料, 独立行政法人国立環境研究所
- 稲森悠平編, 2008, 最新環境浄化のための微生物学, 講談社サイエンティフィック, 1~13, 70~104
- 稲森隆平, 神蔵雄生, 類家翔, 稲森悠平, 2015, 有毒アオコ産生ミクロシチンの灌漑水域における水生動植物および農作物に及ぼす影響評価と保全対策, 稲森悠平, 猪岡尚志, 坂井拓夫監修, 応用細胞資源利用学 第 2 巻, 株式会社大学教育出版, 82~116
- 茨城県霞ヶ浦環境科学センター, 2016, 平成 28 年度 アオコ情報 No.10, 茨城県霞ヶ浦環境科学センター, 1~4
- 臼井健二, 2003, 植物における数種除草剤の解毒代謝酵素を中心とした生理生化学的研究, 雑草研究, **48**, 17~23
- 大澤勝次, 久保田旺編, 2003, 農学基礎セミナー 植物バイテクの実際, 社団法人農山漁村文化協会, 75~82
- 岡野邦宏, 鈴木英治, 太田栞, 宮田直幸, 谷幸則, 尾崎保夫, 2015, 秋田県八郎湖における藍藻毒ミクロシチンと有毒藍藻の季節的変動, 水環境学会誌, **38**, 23~30
- 加藤芳郎, 1976, 黒ボク土, アーバンクボタ, **13**, 12~13
- 霞ヶ浦用水土地改良区 (霞ヶ浦農業用水管理センター), 2007, 霞ヶ浦用水 (パンフレット), 霞ヶ浦用水建設推進協議会 (<http://www.kasumi-lid.or.jp/koho/jigyoupannful.pdf>)
- カナダ保健省, 2012, Guidelines for Canadian Recreational Water Quality Third Edition, Health Canada, 63~87
- 彼谷邦光, 2002, 講義 藍藻毒の分析, ぶんせき, **8**, 436~441
- 軽部重太郎, 杉本英夫, 藤平雅巳, 中石克也, 1998, アロフェンとイモゴライトの分散凝集と荷電特性, 農業土木学会論文集, **196**, 103~110
- 環境省, 2015, 湖沼水質保全計画の概要 (<http://www.env.go.jp/water/kosyou/keikaku/html/>)

gaiyo01.pdf)

- 神蔵雄生, 類家翔, 稲森隆平, 鈴木理恵, 徐開欽, 稲森悠平, 2014, 有毒藍藻類産生毒 Microcystin のコマツナ、キャベツ、クウシンサイ土壤栽培における生育影響および吸収・蓄積特性評価, 日本水処理生物学会誌, **50**, 15~22
- 木次恭一, 1989, 軟弱地盤改良技術と環境問題, セメント・コンクリート, **511**, 104~115
- 久保幹, 2006, アミノ酸より分子の大きいペプチドの吸収で根毛がワットとでる「有機肥料が化学肥料と何が違う」の謎に迫る, 現代農業, 社団法人農山漁村文化協会, **10**, 288~292
- 黒川諒悟, 香村一夫, 2016, 火山灰土壤の有するホウ素・フッ素吸着特性の検討, 第 27 回廃棄物資源循環学会研究発表会講演原稿, 453~454
- 厚生労働省, 2012, 厚生労働省告示第四百三十号, 国民の健康の増進の総合的な推進を図るための基本的な方針, 1~14
- 厚生労働省, 水質基準項目と基準値, 2015 年 4 月 1 日施行分 (<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/kijunchi.html>)
- 国立環境研究所 微生物系統保存施設ホームページ (<http://mcc.nies.go.jp/02medium.html#m11>)
- 小林裕子, 2000, 農薬の残留性と残効性, マテリアルライフ, **12**, 120~125
- 佐藤努, 2001, 粘土の特性と利用, 粘土科学, **41**, 26~33
- 佐野友春, 2012, 藍藻毒ミクロシスチン, 和光純薬時報, **80**, 2~3
- 滋賀県・京都府, 2012, 琵琶湖に係る湖沼水質保全計画 第 6 期, 滋賀県・京都府, 1~3
- 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター, 2016, 琵琶湖(湖心部)の水質概況速報(平成 28 年度(2016 年度)第 2 四半期), 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター(<http://www.pref.shiga.lg.jp/d/biwako-kankyo/lberi/01shiru/01-05suishitsu/files/h28suisitu2.pdf>)
- 鈴木光剛, 2003, 畑作物の水質環境-食の安全とおいしさを求めて, 社団法人 畑地農業振興会, 5~7, 59~75
- 須藤隆一編, 2004, 水環境保全のための生物学, 株式会社産業用水調査会, 197~199
- 竹内清文, 森田剛浩, 1990, 島原半島西部の農業地理学的考察 バレイショ栽培を中心として, 長崎大学教育学部社会科学論叢, **40**, 9~20
- 武田容枝, 2012, 野菜の品質は有機質肥料の施用で向上されるのか?, 福島県農業総合センター研究報告, **4**, 1~14
- 土壤環境分析法編集委員会編, 1997, 日本土壤肥料学会監修 土壤分析法, 博友社, 212~215
- 中村忠貴, 津田泰三, 一瀬諭, 若林徹哉, 原良平, 2004, 琵琶湖におけるアオコ藻体中のミクロシスチン分析結果, 試験研究報告 2004 年度, 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター, 107~113
- 中村剛也, 本間隆満, 宮原裕一, 花里孝幸, 朴虎東, 2010, 諏訪湖における藍藻の現存量・組成変化に及ぼす滞留時間の影響, 水環境学会誌, **33**, 123~129
- 南條吉之, 福田明彦, 矢木修身, 細井由彦, 1998, 汽水湖沼におけるアオコおよび赤潮発生の制御に関する基礎的研究, 水環境学会誌, **21**, 530~538

- 西沢直子, 森敏, 1977, 自己貧食による液胞形成 ヘモグロビンで育てた水稻冠根皮層細胞の場合, 日本土壌肥料学雑誌, **48**, 471~480
- 西澤直子, 1992, 栄養ストレスと植物根の超微細構造に関する研究, 日本土壌肥料学雑誌, **63**, 263~266
- 二瓶直登, 2010, 植物のアミノ酸吸収代謝に関する研究, 福島農業総合センター研究報告, **2**, 21~97
- 日本下水道協会, 2012, 下水試験方法 上巻, 公益社団法人 日本下水道協会, 292~337
- 農研機構, 日本土壌インベントリー (<http://soil-inventory.dc.affrc.go.jp/index.php>)
- 農村振興局農村環境課, 2012, 農業用貯水施設におけるアオコ対応参考図書, 気候変動に伴う農業用水の水質に関する適応策検討, 農林水産省, 1~75
- 農林水産省, 1970, 農業(水稻)用水質基準, (http://www.maff.go.jp/j/nousin/kankyo/kankyo_hozen/hozen_suisitu/suisitu_pdf/suisitu_kizyun.pdf)
- 朴虎東, 2009, 諏訪湖で起きたアオコの激減とラン藻類組成の変化, 水環境学会誌, **32**, 229~231
- 朴虎東, 2014, アオコにより生成する毒素に関する研究, 水環境学会誌, **37(A)**, 169~174
- 萩原富司, 矢木修身, 高村義親, 須藤隆一, 1984, 霞ヶ浦に発生する *Microcystis aeruginosa* の純粋分離, 水質汚濁研究, **7**, 437~442
- 橋田茂和, 1968, ハウス栽培のガス障害とその防止対策, 農業および園芸, **43**, 1855~1858
- 羽鳥謙三, 1975, 関東ローム層と関東平野, アーバンクボタ, **11**, 12~17
- 馬場赴, 高橋保夫, 1960, 第7章 水耕法及び砂耕法, 戸苺義次編, 作物試験法, 農業技術協会, 164
- 東照雄(分担), 2000, 土壌中のアオコの生態解明の検討, 霞ヶ浦用水地区畑地灌漑調査研究報告書(平成11年度), 畑地農業振興会, 85~95
- 福士圭介, 佐藤努, 2003, フェリハイドライト・シュベルトマナイトの生成と環境親和物質としての役割, 粘土科学, **42**, 148~153
- 福士圭介, 鈴木正哉, 2004, 天然産アロフェン表面酸/塩基特性の表面錯形成モデリングによる解析, 粘土科学, **43**, 180~185
- 藤本優, 上田貴志, 2014, 膜交通経路の多様性獲得機構から見た植物のポストゴルジ輸送網, 植物科学の最前線, **5A**, 3~20
- 牧野知之, 1998, 腐植とその機能, 農業土木学会誌, **66**, 82
- 水落元之, 2009, 第1章 太湖流域の水汚染問題の現状, 大塚健司編, 『中国の水汚染問題解決に向けた流域ガバナンスの構築—太湖流域におけるコミュニティ円卓会議の実験』調査研究報告書, アジア経済研究所, 1~21
- 森敏, 前忠彦, 米山忠克編, 2001, 植物栄養学, 文永堂出版, 52~57, 91~137
- 矢木修身, 須藤隆一, 1981, *Microcystis* の純粋分離, 国立公害研究所研究報告, **25**, 7~15
- 矢木修身編, 1986, アオコの増殖及び分解に関する研究, 国立公害研究所研究報告, **92**, 7~16
- 山根一郎, 1960, 土壌学の基礎と応用, 社団法人農山漁村文化協会, 49~52

- 山内豊聡, 岩田進午, 前田隆, 1985, 土の物理化学と土質工学への応用, 土と基礎, **33**, 79~87
- 吉永育生, 白谷栄作, 長谷部均, 馮延文, 人見忠良, 2004, 農業用調整池のクロロフィル a, COD_{MN} 及び栄養塩類濃度の季節変動特性, 水環境学会誌, **27**, 137~142
- 吉野昇編, 1999, 絵とき環境保全対策と技術 (改訂 2 版), 株式会社オーム社, 98~107
- 渡辺真利代, 原田健一, 藤木博太編, 1994, アオコ その出現と毒素, 東京大学出版会, 13~17, 183~227
- 渡邊眞之, 2007, 日本アオコ大図鑑, 株式会社誠文堂新光社, 44~107

付録

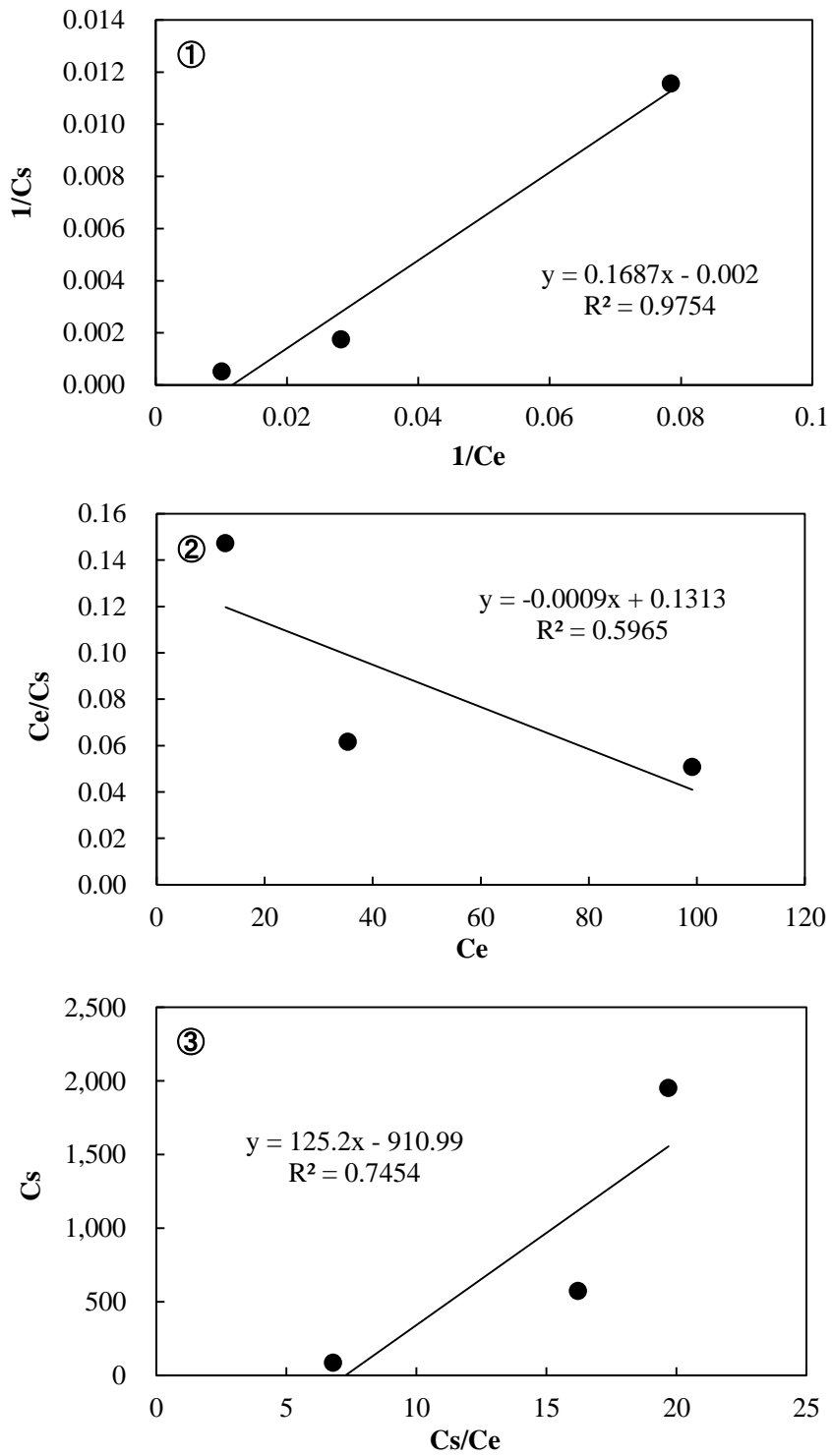


図 S-1. 初期 pH 3.5 における黒ボク土の MC-LR 吸着等温データに対する各線形化 Langmuir 式の適用結果

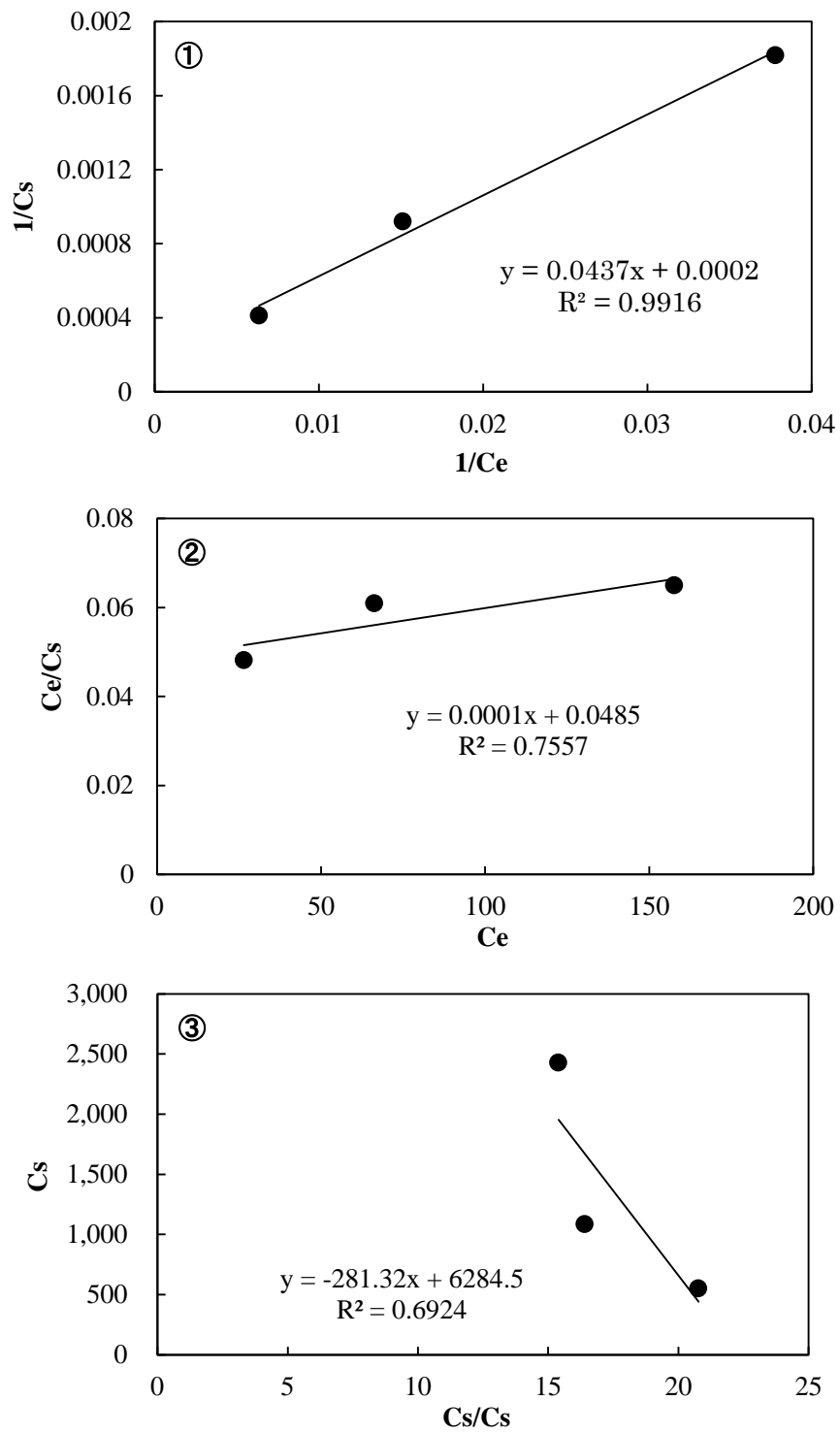


図 S-2. 初期 pH 7.5 における黒ボク土の MC-LR 吸着等温データに対する各線形化 Langmuir 式の適用結果

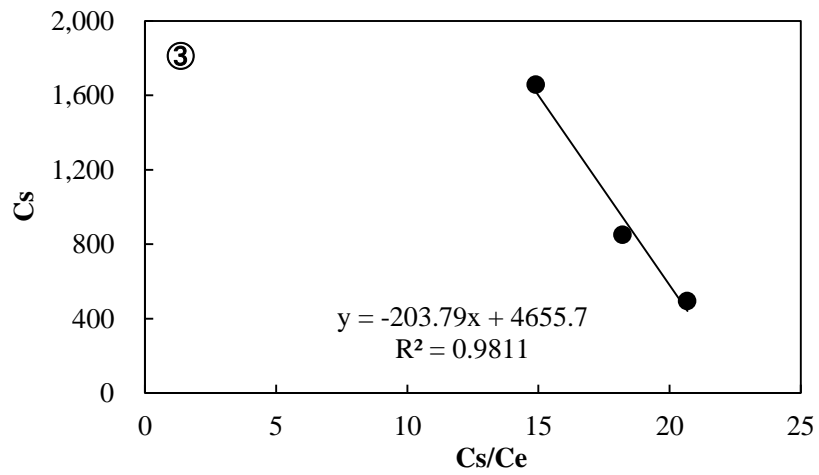
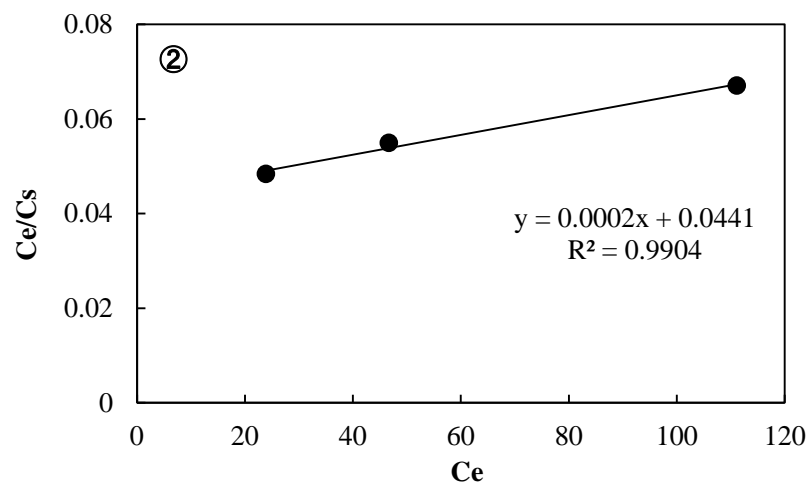
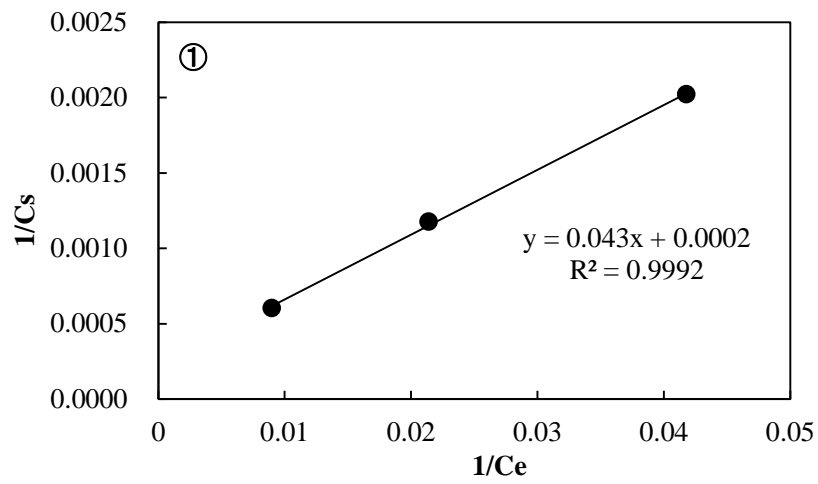


図 S-3. 初期 pH 9.5 における黒ボク土の MC-LR 吸着等温データに対する各線形化 Langmuir 式の適用結果

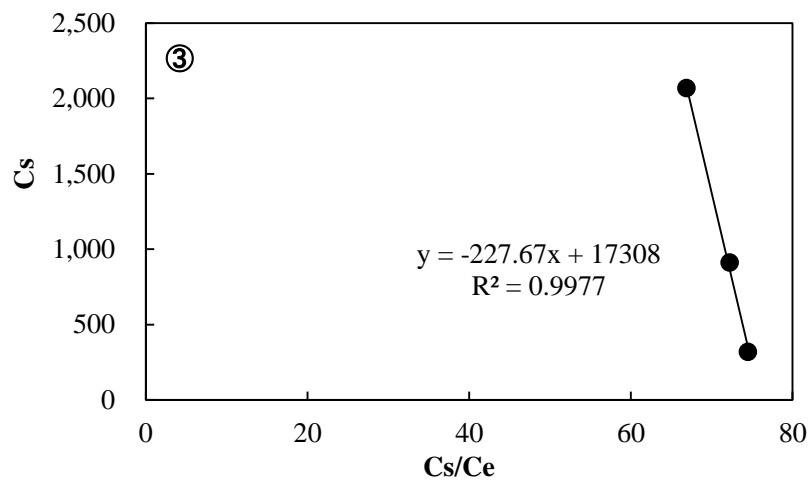
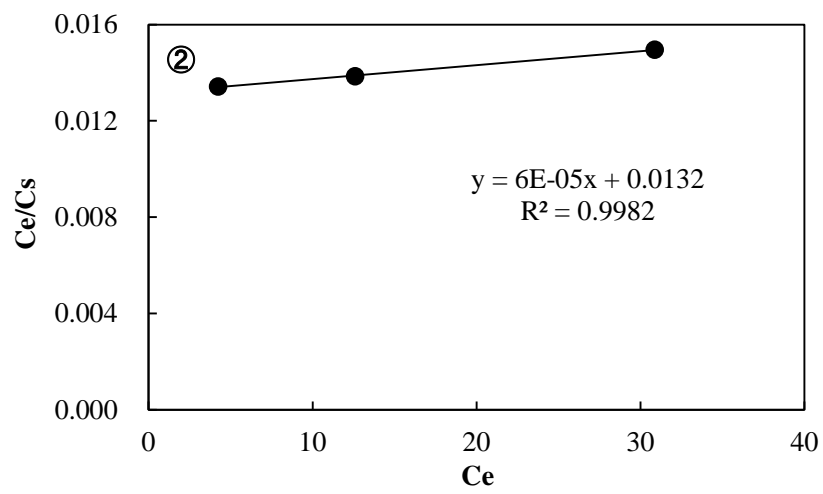
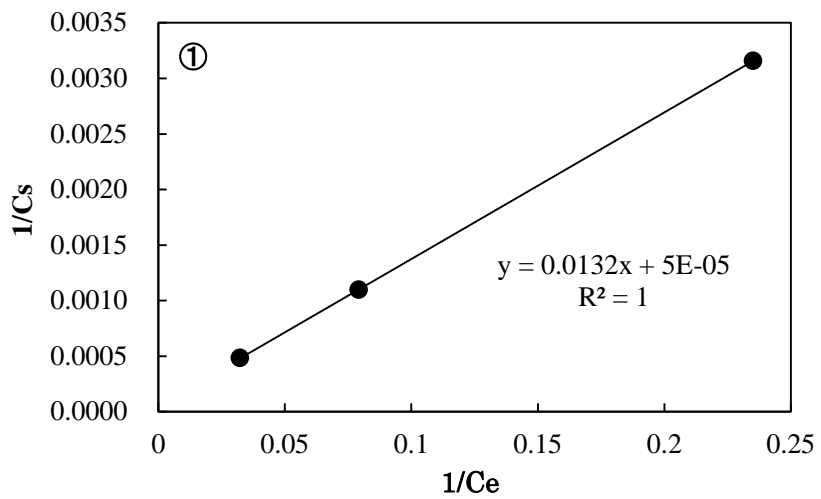


図 S-4. 初期 pH 3.5 における赤玉土の MC-LR 吸着等温データに対する各線形化 Langmuir 式の適用結果

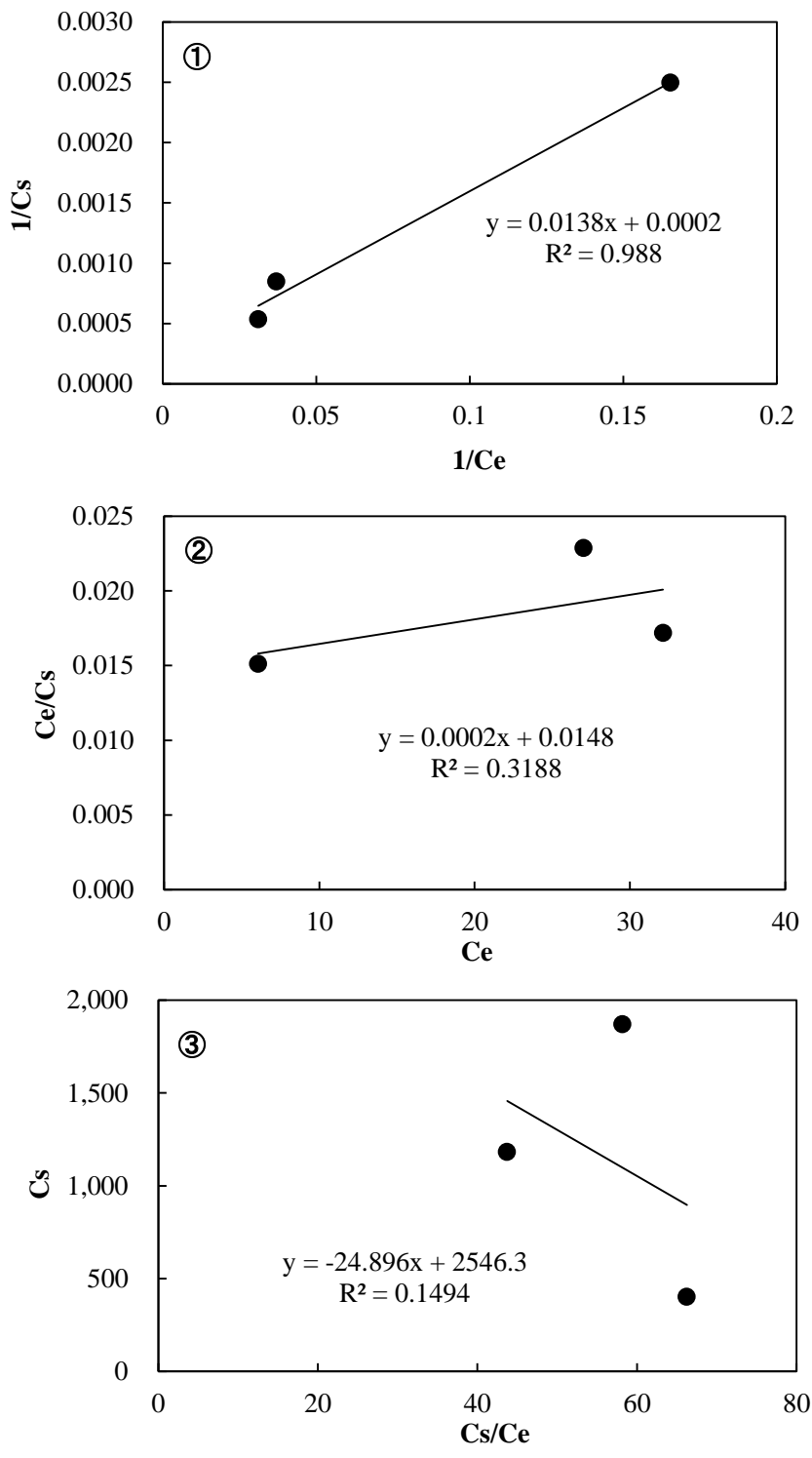


図 S-5. 初期 pH 5.5 における赤玉土の MC-LR 吸着等温データに対する各 Langmuir 式線形化法の適用結果

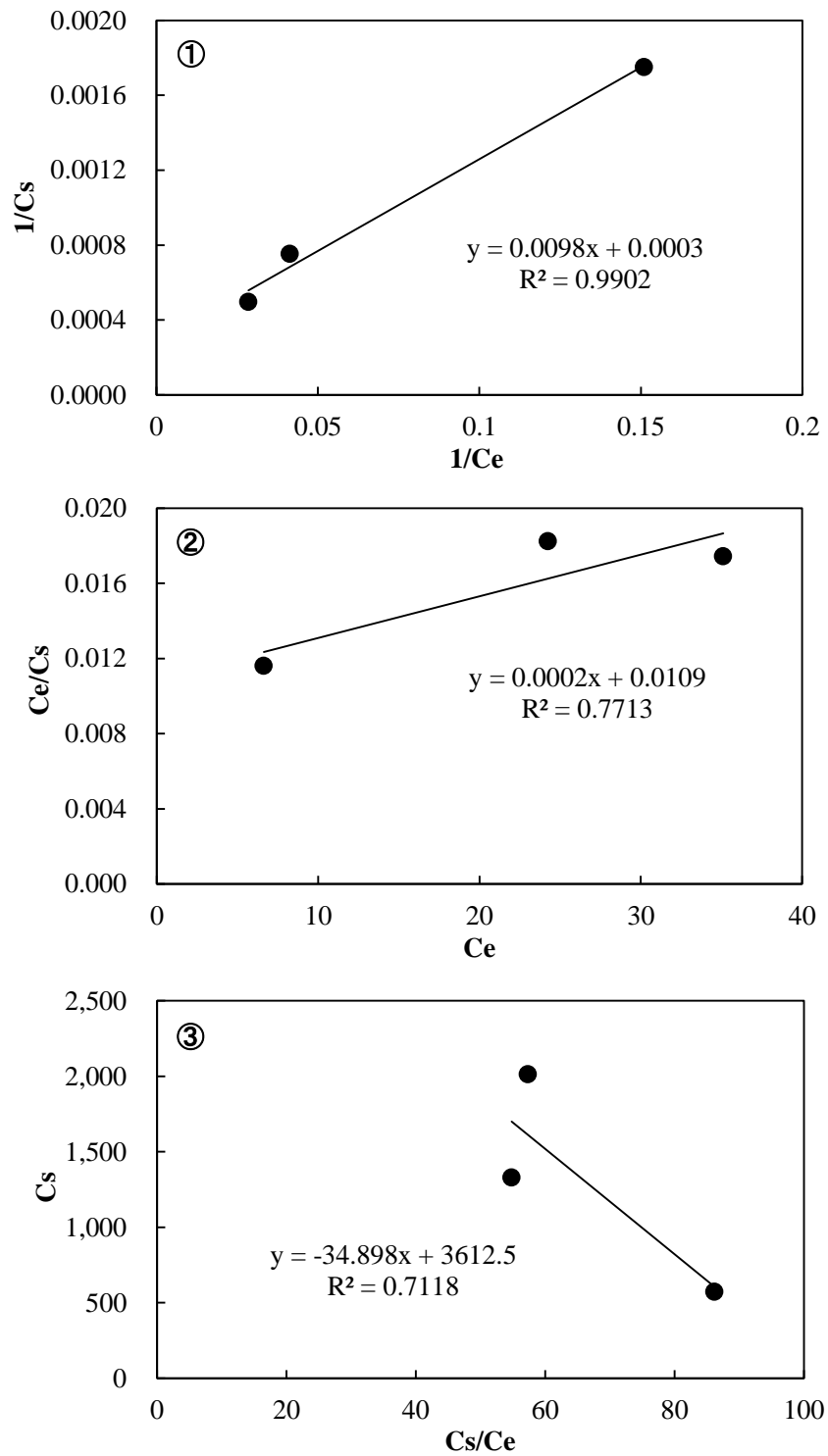


図 S-6. 初期 pH 7.5 における赤玉土の MC-LR 吸着等温データに対する各線形化 Langmuir 式の適用結果

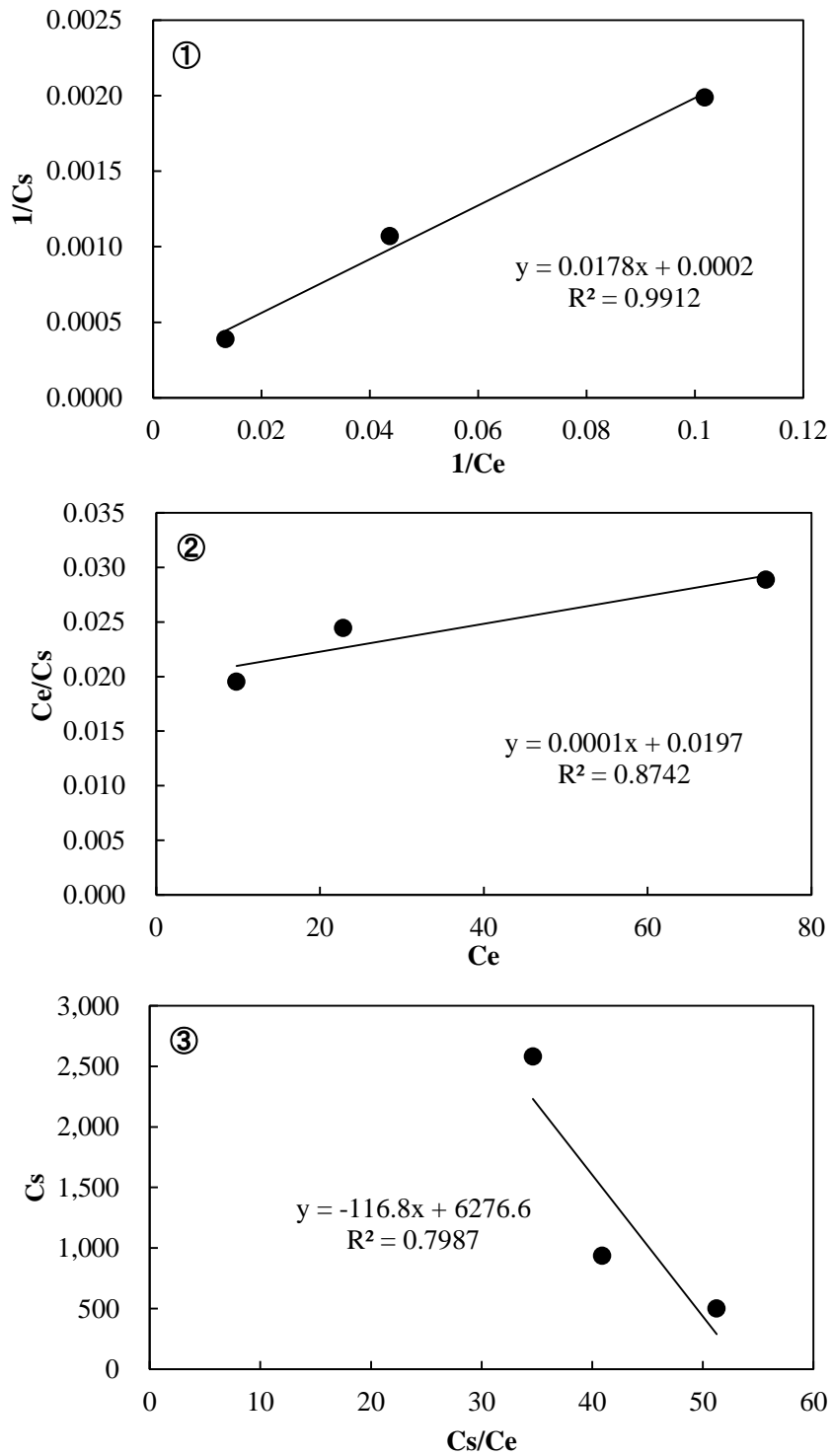


図 S-7. 初期 pH 9.5 における赤玉土の MC-LR 吸着等温データに対する各線形化 Langmuir 式の適用結果

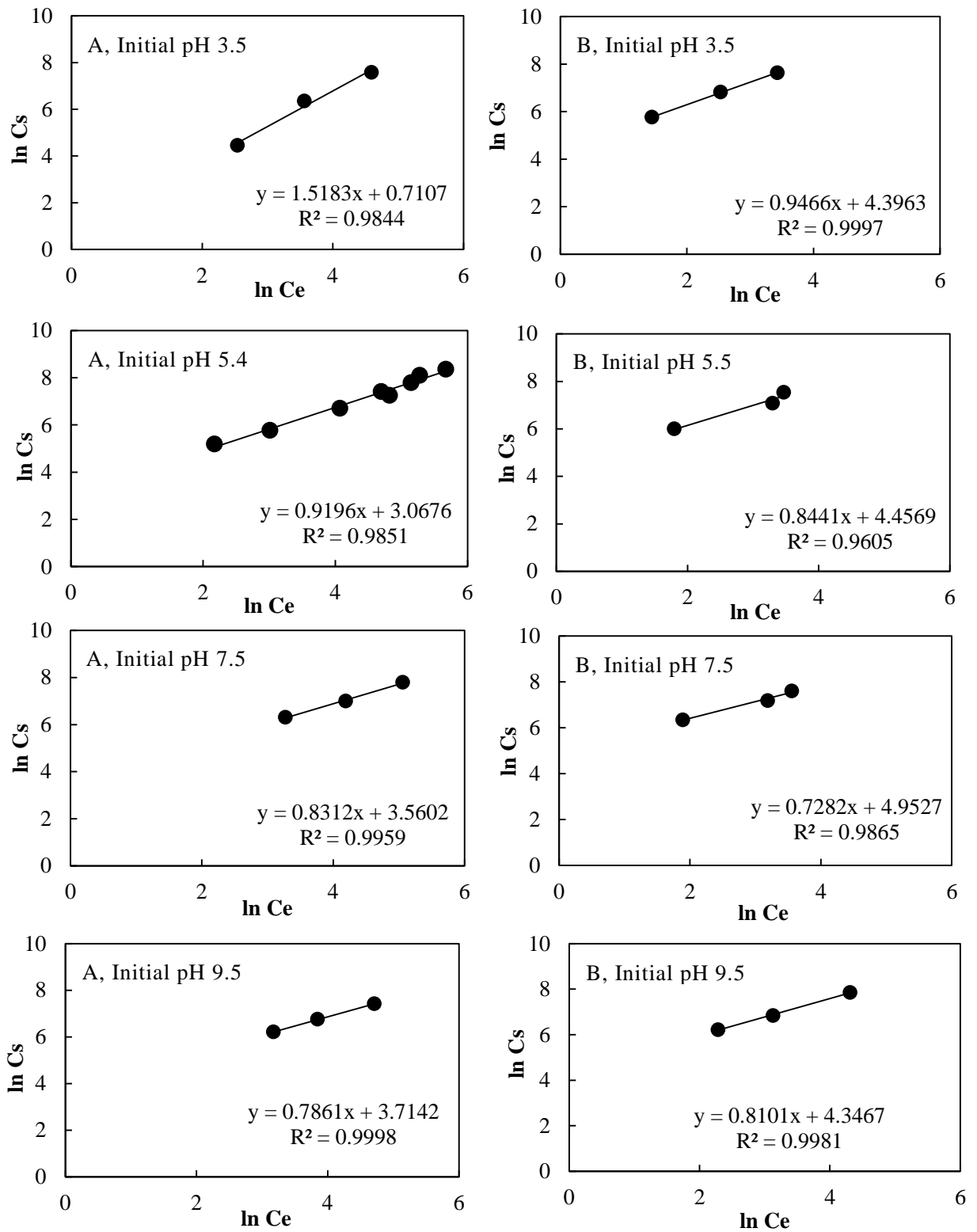


図 S-8. MC-LR 吸着等温データに対する Freundlich の適用結果
A-黒ボク土, B-赤玉土