

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成 19 年度～平成 21 年度

課題番号：19580223

研究課題名(和文) 有明海砂質干潟における重金属の蓄積がアサリ稚貝の殻形成と生残へ与える影響について

研究課題名(英文) Effect of heavy metal accumulation in sandy tidal flats of Ariake Bay on the shell forming and survival of juvenile short-neck clam.

研究代表者：

高橋 徹 (TAKAHASHI TOHRU)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：70369122

研究成果の概要(和文)：

有明海砂質干潟において、底質間隙水の Mn や Zn, Cu 等重金属の濃度に差が見られ、濃度が 20ppm に達する地点では稚貝の殻が脆弱になる事がわかっていた。そこで、本研究では、まず河川水の Mn 濃度を比較した結果、源流域から含まれる Mn が干潟に堆積し、河川による Mn 濃度の違いが干潟の底質間隙水濃度の違いに反映されている事が確認された。高濃度の Mn がアサリに生理的負荷を与え、その結果として殻形成に弊害が生じるとの仮定に基づき、幼貝を用いて曝露実験をおこない、アセチルコリンエステラーゼ、メタロチオネイン等の酵素活性の定量や、DIRECT TOF-MS 法による外套膜で分泌されるペプチドの網羅的比較等をおこなった。この中で、高濃度の現場と同一レベルの 20ppm の Mn に曝露された場合、現場の砂が存在する場合にはアセチルコリンエステラーゼ活性とカルボキシルエステラーゼ活性に有意な低下が認められ、高濃度マンガン曝露が幼殻形成期の稚貝にストレスを与えていることが示唆された。また、ヒト骨芽細胞 MC3T3-E1 に対して Mn を曝露したところ、細胞増殖が抑制される一方でオステオポンチンとオステオカルシン活性が向上した。脊椎動物ではあるが、骨・カルシウム代謝に Mn イオンが大きな影響を与える事が確認できた。最後に殻に対する Mn のダイレクトな影響を調べた結果、稚貝の死亡が多い干潟では殻自体に多くの Mn が含まれている事が判明し、この事が殻の脆弱性の原因である可能性も高くなった。今後、SEM/EDX を用いて殻の微細構造と Mn の存在様式を確認する予定である。以上のように、高濃度 Mn は着底直後の稚貝に生理的ストレスを与えながら殻形成を阻害し、殻にも直接取り込まれて殻の脆弱性を増していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

It has been known that shells of juvenile short-neck clam, *Ruditapes philippinarum*, become weak in some of the sandy tidal flat of Ariake Bay where the concentration of Mn in the pore water was higher than other tidal flat. In the present study, we confirmed that concentration of Mn in the pore water of each tidal flat reflects the original concentration of Mn in the river that flows in. Then, exposure experiment of Mn to the juvenile clams was carried out based on the assumption that juvenile clams had physiological impact by exposure of Mn resulting weakness of the shell. Several enzyme activities, acetylcholinesterase, metallothionein, etc. were measured, or comprehensive research of peptides in the mantle cells by Direct TOF-MS method. As a result, activities of acetylcholinesterase and carboxylesterase decreased significantly when exposed to high concentration of Mn (20ppm) with sand. It was suggested that the high concentration manganese exposure give the stress to the juvenile clam's shell formation. On the other hand, reproduction of human osteoblastic MC3T3-E1 cells was suppressed when exposed to Mn, while the activity of osteopontin and osteocalcin. We also examined direct effect of Mn to the shell, and Mn concentration in the shell of adult clams were higher in Arao tidal flat where mass mortality of juvenile clams had been recorded. Therefore, we should examine the second hypothesis that direct effect of Mn to the juvenile shell is concerned the weakness of shells and mass mortality just after the settlement. We are observing the microstructure of the shell and present state of Mn in the shell by using SEM/EDX. Consequently, high concentration Mn obstructed the shell

formation while giving a physiological stress to the juvenile clam, was taken directly into the shell, and thought that the vulnerability of the shell was increased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,400,000	420,000	1,820,000
20年度	600,000	180,000	780,000
21年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：アサリ、有明海、マンガン、干潟、稚貝

1. 研究開始当初の背景

熊本県のアサリは1978年の現在の全国生産量の1.5倍以上に相当する65,000トンであったが、2000年の漁獲量は2,000トンにまで落ち込んでいる。一方、堤らは県内の数カ所でアサリの現存量、生残、定着等について精密な調査を継続し、熊本県砂質干潟におけるアサリ減少の主要因は成貝の死亡や食害による減少ではなく、正常な定着が行われた直後の死亡によることを明らかにした。一方、沖合の砂を覆砂した場合、定着直後の発育は正常に進行し、2-3年間は過去の豊かな干潟が再現される事から各漁協で覆砂事業が進行している。我々は覆砂によって改善された原因を探るため、様々な底質の物理化学的性質を比較検討してきた。その結果、底質のマンガン濃度とアサリ生息密度の間に明白な負の相関関係が認められた。さらに我々は平成16-18年度にかけて次のことを明らかにしてきた。

2004年度から2005年にかけて、荒尾前浜干潟では非覆砂域（マンガン2000-3000mg/kg）においても2000gWW/m²に達するアサリ個体群が形成された事を確認した。これは堤らによって示されてきた底質のマンガン濃度とアサリ生息密度の関係に合致しない結果であった。そこで凍結保存されていた2000年の大量死発生時の底質と2004年の荒尾干潟の底質について重金属の形態分離法を用いて交換吸着形態（海水で溶存可能）のマンガン含有量を測定したところ、2000年の大量死が起きたときが最も高く、ついで2004年の非覆砂造成域、覆砂造成域の順に減少した。特に、2000年の交換吸着形態のマンガンを間隙水の量から推定される間隙水に溶出可能なマンガニオン濃度が60mg/L以上になることがわかった。マンガンの溶出は底質の酸化還元環境に強く左右されることから、2000年のように泥分TOCが高く夏のバクテリア活性の高いときに非常に高濃度

で溶出する、すなわち、底質が還元的になるときにかなり高濃度にマンガニオンが溶出し、アサリの生理に影響、死亡へとつながるのではないかと考えられた。一方、高濃度二酸化マンガンのみを添加しても稚貝の死亡が起こらないが、現場の泥と二酸化マンガンを添加した場合に死亡率が増大することが室内実験で確認された。さらに、底質中マンガン濃度が高い干潟の稚貝、あるいは上記実験によって死亡率が増大した実験群の稚貝では、殻の強度が弱くなっている事が確認された。

これらの調査と実験によって、マンガン濃度が高くTOCも高い条件の下で稚貝死亡率が増大し、死亡しない場合でも殻が脆弱になることが確認された。

2. 研究の目的

有明海のMnを筆頭とする重金属濃度が高い干潟における着底後の稚貝死亡要因の特定が本研究の目的である。そのため、死亡要因あるいは死亡に結びつく重大要因としての殻の脆弱性に着目し、脆弱化が起こるプロセスとメカニズムの解明をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 河川水中のMn濃度の定量

干潟によって底質間隙水中の重金属濃度に差があった。その原因が流入する河川水中の重金属濃度によることを確認するため、最も濃度が高いMnに着目し、河川水間の濃度を比較した。筑後川、菊池川、緑川の上流・中流・下流域に各定点を定め、4回の採水をおこなった。試水は凍結乾燥による濃縮と酸分解をおこなったのち、DR-2400 (HACH社)を用い、1-(2-Pyridylazo)-2-Naphthol PAN Method (Goto *et al.*, 1977)によりMnの定量をおこなった。

(2) Mn 曝露による生理的影響実験

稚貝を用いた曝露実験を計画していたが、研究期間中に必要十分な稚貝の安定的に確保する事が困難であったため、幼貝・成貝を用いた実験に切り替えた。Mn 濃度(0, 2, 5, 20 ppm)に加え、現場の砂、焼き砂を加えた系列を用意し、48 時間の曝露をおこなった。実験終了後、血リンパ液と組織抽出液それぞれについて、タンパク定量、メタロチオネイン活性、アセチルコリンエステラーゼ活性を測定した。また、殻形成に関わる外套膜領域の組織に対してダイレクト TOF-MS 法による特異的ペプチドの網羅的探索(安田 & 安田, 2004)を実施した。

(3) 二枚貝の細胞培養は技術的に確立しておらず、我々も試みたが失敗した。そのため、骨・カルシウム代謝への Mn の影響をみる手始めとして、ヒト造骨細胞 **MC3T3-E** に対し Mn 曝露をおこない、増殖への影響とリアルタイム RT-PCR による骨基質タンパク質オステオポンチンとオステオカルシンの mRNA 発現を測定した。

(4) 地域個体群毎のアサリ殻中 Mn 濃度定量

アサリ殻を酸分解し、中和したのち HACH, DR-2400 で Mn 濃度を定量した。殻断面の SEM による形態比較と、EDX による Mn 原子の存在様式を実施中であるが、SEM 電子銃の不調により中断している。

4. 研究成果

(1) 干潟の Mn の起源

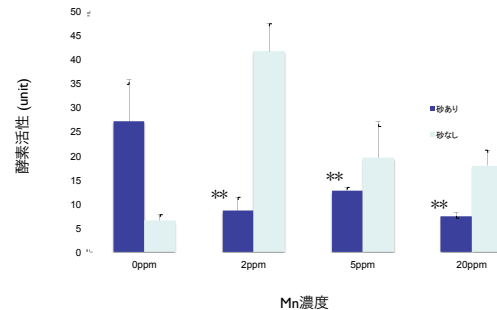
干潟によって底質間隙水中の Mn 濃度に差がある(Zn など、Mn 以外の重金属も比例している)のは、干潟に流入している河川水の濃度差が反映されている事が確認された。この河川水の有機物等が干潮域で凝集沈殿する際に金属類も同時に沈殿したが、高度成長期以降は川砂採取によって砂の堆積が激減したために間隙水中の Mn 濃度が上昇したと考えられる。

(2) 曝露実験による生理的影響の確認

0, 2, 5, 20 ppm の濃度勾配による曝露実験の結果、現場の砂を加えない場合、アセチルコリンエステラーゼ、カルボキシルエステラーゼ共に低濃度曝露で一旦活性が上昇し、その後は濃度の低下が認められたが、いずれもコントロール(0 ppm)が最も低い値を示した。また、現場の砂を加えた場合にはいずれの酵素活性にも有意な低下が認められた。

砂が存在する時に低濃度曝露で酵素活性の上昇が認められる理由は現時点で明らかではないが、砂の存在が酵素活性に大きく影響している事は確実にあり、より詳細なメカニ

ズム解明のヒントとなると思われる。現場と同様に砂が存在する場合には両酵素共に活性が低下した。どちらも加水分解に関わる酵素であり、特にアセチルコリンエステラーゼ活性の低下は神経毒に該当するため、Mn 濃度が高い底質環境ではアサリ稚貝が大きなストレスを受けている事が確実である。殻形成に対する直接的影響は明確ではないものの、着底直後の一大イベントである幼殻形成に問題が生じることは当然であろう。メタロチオネイン活性については、再現性のある結果が得られなかった。

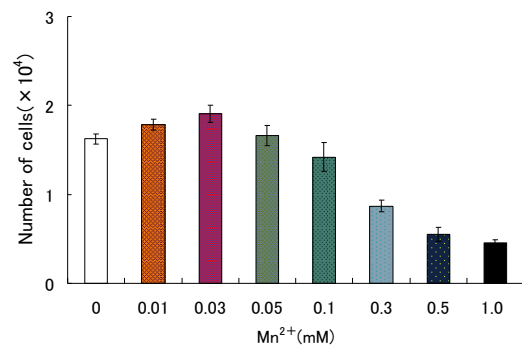


アセチルコリンエステラーゼ活性

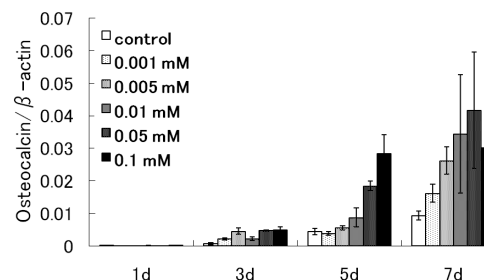
(3) 造骨細胞 MC3T3-E1 への Mn 曝露

曝露後一日の細胞数。

低濃度ではポジティブ、高濃度でネガティブ効果が現れた(下図)。



その一方で、骨タンパクオステオポンチン/オステオカルシンの遺伝子発現は増大した(下図は曝露後のオステオカルシンの遺伝子発現)



(4) アサリへの Mn 元素蓄積

覆砂を実施しないと稚貝の斃死が起こり、底質間隙水の Mn 濃度が高い荒尾干潟、緑川河口干潟のアサリと Mn 濃度が低い菊池川河口干潟の(Tsukuda *et al.*, 2008)アサリ殻と体内の Mn 含有量を測定した結果、表のようになった。

殻の Mn 含量

産地	n	平均 Mn 含量 (mg/g)	SD	
荒尾	7	0.132	0.0067	
緑川	9	0.125	0.0040	
菊池川	5	0.084	0.0024	**, U-test

体内 Mn 含量

産地	n	平均 Mn 含量 (mg/g)	SD	
荒尾	7	0.165	0.0067	
緑川	9	0.125	0.0040	
菊池川	5	0.084	0.0024	**, U-test

殻については、Mn が Ca と置換している可能背もあり、SEM/ESX を用いて微細構造と Mn の存在様式を確認したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Masanori Tsukuda, Hitomi Yamaguchi, Tohru Takahashi & Hiroaki Tsutsumi 2008. Impact of high concentrations of manganese on the survival of short neck clam *Ruditapes philippinarum* juveniles in sandy tidal flat sediment in Ariake Bay, Kyushu, Japan. *Plankton Benthos Research* 3: 1-9.

Tsutsumi H (2008) Reduction of manganese dioxide in the sediment and its negative impact on the physiology of clams on two sandy tidal flats, Midori River Tidal Flat and Arao Tidal Flat, in Ariake Bay.

Plankton Benthos Research 3: 64-71.

Kyung-Il Park, Hiroaki Tsutsumi, Jae-Sang Hong and Kwang-Sik Choi 2008.

Pathology survey of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* occurring on sandy tidal flats along the coast of Ariake Bay, Kyushu, Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 212-219.

[学会発表] (計 3 件)

高橋 徹・野村雄二・園田喜子・佃 政則・堤 裕昭, マンガン濃度の高い環境におけるアサリ稚貝の殻の脆弱性. 2007年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、横浜市立大学(横浜市)、2007年9月。
田上貴文・小川 純一・井芹 寧・堤 裕昭, 熊本県八代市 金剛干拓地先の干潟における覆砂後の底質改善が、アサリ (*Ruditapes philippinarum*) の生息に与える効果. 2008年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、熊本県立大学(熊本市)、2008年9月。

Takafumi T, Tsutsumi H. Population dynamics of three dominant edible clams, *Ruditapes philippinarum*, *Meretrix lusoria* and *Macra veneriformis* on Midori River Tidal Flats in Kumamoto, Kyushu, Japan. Korean and Japan joint symposium on biology of tidal flat 2009, in Suncheon, Korea, 2009年6月。

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 徹 (TAKAHASHI TOHRU)

熊本保健科学大学・衛生技術学科・教授

研究者番号: 7 0 3 6 9 1 2 2

(2) 研究分担者

堤 裕昭 (HIROAKI TSUTSUMI)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号: 5 0 1 9 7 7 3 7

野村雄二 (NOMURA YUJI)

広島大学大学院・医歯薬総合研究科・助手

研究者番号: 8 0 2 1 0 3 7 0