

重金属暴露による淡水巻貝カワニナ (*Semisulcospira libertina*) の行動への影響

誌名	九州大学大学院農学研究院学芸雑誌
ISSN	13470159
著者	姜, 益俊 中村, あゆみ 諸石, 淳也 石橋, 宏一郎 福田, 信二 島崎, 洋平 大嶋, 雄治
巻/号	64巻2号
掲載ページ	p. 119-123
発行年月	2009年10月

重金属暴露による淡水巻貝カワニナ (*Semisulcospira libertina*) の 行動への影響

姜 益 俊*・中 村 あゆみ¹・諸 石 淳 也・石 橋 宏一郎²
福 田 信 二³・島 崎 洋 平²・大 嶋 雄 治²

九州大学農学研究院生物機能科学部門水圏バイオモニタリング学講座

(2009年6月30日受付, 2009年7月13日受理)

Effects of Heavy Metal Compounds on Behavior of Freshwater Snail (*Semisulcospira libertina*)

Ik Joon KANG*, Ayumi NAKAMURA¹, Junya MOROISHI, Koichiro ISHIBASHI²,
Shinji FUKUDA³, Yohei SHIMASAKI² and Yuji OSHIMA²

Aquatic Biomonitoring and Environmental Laboratory, Department of Bioscience and Biotechnology,
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

はじめに

近年, 急速な科学の発展や経済成長に伴い, 多数の化学物質が大量に使用され, その恩恵で農業, 工業や医薬等の分野が飛躍的に進歩してきた。しかし化学物質の中には, 人間の健康に被害を及ぼすだけでなく野生生物に悪影響を与えるものもあり, その影響が懸念されている。水圏環境においては, 有害化学物質の流出による河川や地下水等の汚染事故や慢性的な低濃度汚染が度々報告されている (Teal and Howarth, 1984)。特に産業廃棄物処理場等から浸出水に含まれた重金属が河川に流入し (Li *et al.*, 2001; Nicholson *et al.*, 2003), 上水原水の重金属汚染等による人間の健康や水生生物への影響が懸念されている (Dallinger *et al.*, 1987; Järup, 2003)。

産業廃棄物処理場の浸出水等が流入しやすい河川流域には淡水性貝類が生息しているが, その生態的な特性上移動性が低く, 生息場所をほとんど変えることが

できないため, 化学物質の汚染を長期的に受けやすい。貝類は重金属等の化学物質に暴露された場合, 閉殻行動により短時間は耐えることができるが, 低濃度の汚染下では化学物質が徐々に体内に蓄積され影響を受けると考えられる (Lauenstein *et al.*, 1993)。しかしながら, 巻貝類に対する化学物質の急性毒性や慢性毒性を調べた研究例は少ない (Cheung and Wong, 1999; Salánki *et al.*, 2003; 西内・吉田, 1972)。特に巻貝の行動に対する化学物質の影響評価はほとんど行われていないのが現状である。

最近, 化学物質が生物の行動に与える影響が注目されている。生物が亜急性レベルの化学物質に暴露されると, 摂餌行動, 天敵回避や繁殖行動に影響を及ぼし, 最終的に個体もしくは個体群の死 (生態学的死) につながる (Scott and Sloman, 2004)。よって化学物質の暴露による生物の行動影響の評価は重要である。貝類でも二枚貝を中心として重金属などの有害化学物質に対する影響を行動学的なパラメータで評価する研究

¹株式会社正興電機製作所バイオモニタリンググループ

²九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門水産生物環境学研究室

³九州大学熱帯農学研究センター

¹Biomonitoring Group, Seiko Electric Co., Ltd.

²Laboratory of Marine Environmental Science, Division of Marine Biological Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University

³Institute of Tropical Agriculture, Kyushu University

*Corresponding author (E-mail: kangnew@agr.kyushu-u.ac.jp)

が行われているが (Jou and Liao, 2006 ; Millington and Walker, 1983 ; Slooff *et al.*, 1983), 巻貝での知見はほとんどない。

今回の研究に用いた淡水性巻貝であるカワニナ (*Semisulcospira libertina*) は日本を含む東アジアの河川や用水路などに広く生息しており, 日本の水環境を代表する生物である。二枚貝に比べて運動性が高いため, 行動の観察が容易である。よって本研究では, 本種を用いて重金属が巻貝の行動に及ぼす影響を調べた。

材料と方法

2006年6月, 福岡県猪瀬川の支流よりカワニナ100個体 (殻長 31.6 ± 1.3 mm, 殻径 13.3 ± 0.7 mm ; 平均 \pm 標準偏差) を採集し, 60Lのガラス水槽 (60 \times 30 \times 36cm) 2個にカワニナを50個体ずつ入れ, 実験室内にて6ヶ月間飼育した。照明は12時間:12時間 (明:暗) の周期で行い, 魚類用の人工餌料 (メダカのエサ, 株式会社キョーリン, 日本) を1日1回適量与えた。水槽の水温は 20 ± 1 °Cに維持し, 溶存酸素は 7.0 ± 0.4

mg/Lであった。

試験物質の硫酸銅 (II) (CuSO_4 ; 純度98%以上) および塩化カドミウム (CdCl_2 ; 純度98%以上) は和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) より購入した。100mg/Lの濃度に調整した試験原液は, 脱塩素水道水により希釈して設定濃度の試験液を準備した。硫酸銅 (II) の暴露濃度は0, 0.1, 1および10mg/Lに設定し, 塩化カドミウムは0, 0.01, 0.1, 1および10mg/Lに設定した。

暴露試験は1.5L (10 \times 10 \times 15cm) のガラス製の試験水槽を用いて止水で行った。処理区あたり, 約1.2Lの試験液が入ったガラス水槽2個にカワニナ8個体を4個体ずつ分けて入れ, 4日間暴露し, カワニナの行動と生残を観察した。なお試験液は1日に1回全量交換した。照明は12時間:12時間の明暗周期で行い, 水槽の水温は 20 ± 1 °Cで維持し, 溶存酸素は 7.0 ± 0.4 mg/Lであった。

暴露したカワニナの行動は5つに分類した (Fig. 1)。水槽の壁面や底を滑らかに動く状態 (M), 水槽

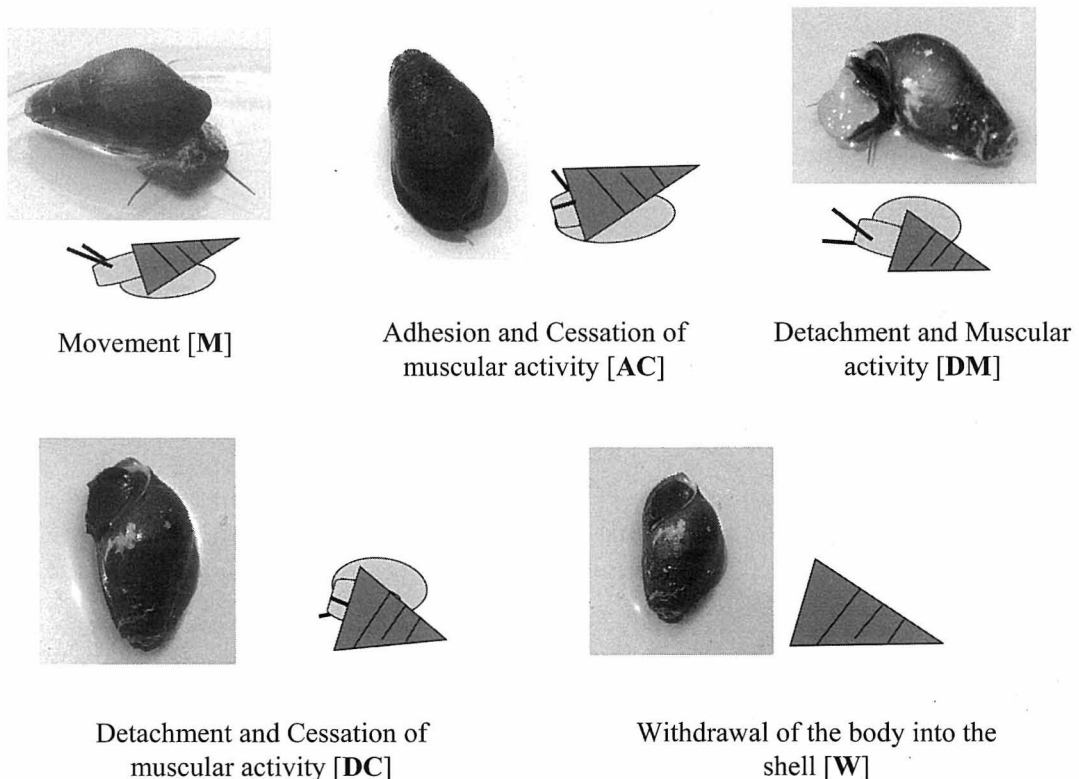


Fig. 1. Five behaviors of snail observed during the exposure test.

の壁面や底に付着しているが、停止した状態 (AC)、水槽の壁面や底に付着せず、足や触手を動かしている状態 (DM)、水槽の壁面や底に付着せず、足や触手を引き込めて蓋をほとんど閉めている状態 (DC)、そして完全に蓋を閉じて動かない状態 (W) に分けて、暴露終了時にこれらの行動を示しているカワニナの個体数を記録した。死亡判定は Watton and Hwakes (1984) の手法に従い、触覚の部分ピンセットで突き、反応がなく、また W 行動を示している場合は脱塩素水道水に入れ、10分間観察して反応の無いものを死亡と判定した。なお、統計処理のため、活動がある行動 M、AC および DM の頻度をまとめ (活動状態, A)、また活動が停止した状態である DC および W 行動の頻度をまとめた (停止状態, S)。対照区と処理区との間においてこれらの2つの行動パターンの頻度の統計学的有意差 ($p < 0.05$) を Fisher の正確確率検定により解析した。また、暴露濃度と W 行動の頻度との間における相関性を Spearman の順位相関検定を用いて調べた。統計処理は SPSS 11.0J (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いて行った。

結果と考察

4日間の硫酸銅 (II) 暴露によってカワニナの行動は影響を受けた (Fig. 2)。対照区のカワニナは、6個体が M 行動を示し、2個体のみが W 行動を示した。いずれの暴露区においても死亡は観察されなかったが、最低濃度の0.1mg/L 区では全個体が W 行動を示し、1 mg/L 区においては8個対中7個体が W 行動を示し、1個体が M 行動を示した。さらに10mg/L 区では5個体が W 行動を示し、3個体が DC 行動を示した。なお、カワニナの行動を活動状態と停止状態の2つに分けた A および S の頻度について対照区と比較した結果、0.1、1 および10mg/L 区において対照区との間で有意な変化が見られた ($p < 0.05$)。

塩化カドミウムを4日間暴露した結果、1 および10 mg/L 区において行動への影響が観察された (Fig. 3)。硫酸銅 (II) 暴露試験の結果と同じく、全濃度区において死亡は確認されなかったが、0.01mg/L において6個体が M 行動を示し、2個体が AC 行動を示した。また、0.1mg/L 区では8個体中5個体が M 行動を示し、2個体が AC 行動を示した。残りの1個体のみが W 行動を示した。一方、1 mg/L 区においては、M 行動は1個体のみで観察され、2個体が AC 行動、4個体が W 行動、1個体が DC 行動を示した。さらに最高濃度の10mg/L 区において8個体すべてのカワニナ

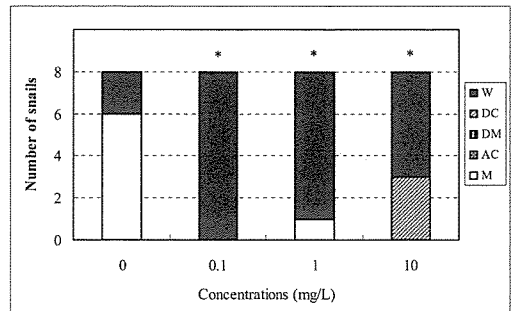


Fig. 2. Behavior of snail exposed to CuSO₄ (0, 0.1, 1 or 10mg/L) for 4 days. * $p < 0.05$ compared with control.

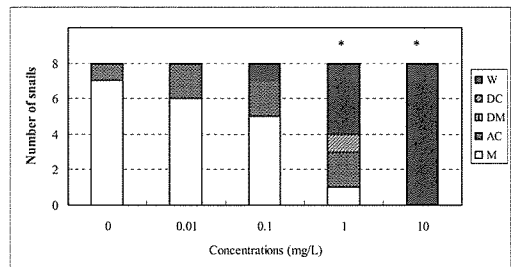


Fig. 3. Behavior of snail exposed to CdCl₂ (0, 0.01, 0.1, 1 or 10mg/L) for 4 days. * $p < 0.05$ compared with control.

が W 行動を示した。また、DM 行動は硫酸銅 (II) や塩化カドミウムのいずれの試験区においても観察されなかった。A および S について対照区と比較した結果、1 および10mg/L 区において対照区との間で有意差が検出された ($p < 0.05$)。

本研究の結果、4日間の硫酸銅 (II) および塩化カドミウム暴露がカワニナの行動に影響を及ぼすことがわかった。M および AC 行動は対照区や塩化カドミウム0.01および0.1mg/L 区において多く観察されたが、その他の暴露区では DC や W といった筋肉の動きが抑制され、蓋を閉じる行動が引き起こされた。Watton and Hawkes (1984) は、銅をコモチカワツボ (*Potamopyrgus jenkinsi*) に96時間暴露し、行動における96時間の半数影響濃度を0.072mg/L と報告しており、本実験で硫酸銅 (II) 0.1mg/L に暴露したカワニナがすべて W 行動を示した結果とほぼ一致している。

硫酸銅 (II) と塩化カドミウムの暴露によって行動への影響が見られたが、感受性に差があった。硫酸銅 (II) 0.1から10mg/L までのすべての濃度区で行動

響が観察されたが、塩化カドミウムの暴露では1および10mg/L区のみで影響が見られ、硫酸銅(II)が塩化カドミウムより強い毒性をもつことが推定された。このような傾向は先行研究においても報告されている。Cheung *et al.* (2002) は、海産巻貝アラムシロ (*Nassarius festivus*) における銅およびカドミウムの96時間半数致死濃度 (LC₅₀) が、それぞれ0.36および1.52mg/Lであったと報告している。また、Okamoto *et al.* (1999) はメダカ (*Oryzias latipes*) では、塩化銅の48時間 LC₅₀ は1,100 μg/Lであり、塩化カドミウムの48時間 LC₅₀ が22,000 μg/Lであったと報告した。よって、カワニナの行動に対しても銅がカドミウムより強い毒性を有すると考えられた。

塩化カドミウムの0.1mg/L以上の暴露区(0.1, 1, 10mg/L)においてそれぞれ1個体、4個体、8個体がW行動を示し、W行動の頻度は濃度依存的に増加した ($r^2 = 0.985$, $p < 0.05$)。しかし硫酸銅暴露ではW行動の頻度は最低濃度区の0.1mg/L区において8個体と最も多く、1mg/Lや10mg/L区では7個体と5個体であり、濃度依存性はなかった ($r^2 = 0.2$)。銅の1および10mg/L区で、0.1mg/L区に比べてW行動を示す個体が少なくなった原因として銅の毒性により筋肉の弛緩が起こり、蓋を閉じることができなくなった可能性が考えられた。今後さらに低濃度の硫酸銅暴露によるカワニナの行動への影響を調べ、暴露濃度との相関性を解明する必要がある。

硫酸銅(II)と塩化カドミウムの暴露により、カワニナの行動に影響を及ぼすことが明らかとなった。しかし、カワニナに対する銅およびカドミウムの毒性機構は明らかでない。金属の中には生物にとって生理的に欠かせないものも多く、体内におけるその濃度が欠乏や過剰な場合、毒性が現れる。銅はフリーラジカルなど活性酸素を生成し、タンパク質を変性させることが知られている。また、カドミウムは体内に取り込まれると、カドミウム-メタロチオネインの形で蓄積され、様々な臓器に影響を及ぼすとされている。これらが原因となりカワニナの行動異常が引き起こされたと考えられた。

日本の環境中における水質基準値は、銅が1mg/L以下であり、カドミウムが0.01mg/L以下である(厚生労働省, 2009)。本研究の結果、硫酸銅(II)のカワニナに対する影響は0.1mg/Lから検出されたため、水質基準値を下回る濃度でカワニナが暴露された場合でも、行動への影響が懸念される。さらに、日本国内では徳島県の河川において銅が2.5mg/L以上の濃度

で検出された例が報告されている (Shinomura *et al.*, 2005)。これらの濃度は本研究でカワニナの行動に影響が見られた硫酸銅の最低濃度(0.1mg/L)をはるかに上回っており、カワニナの行動異常が引き起こされ、水圏環境中のカワニナの個体数減少に繋がる可能性があると考えられる。一方、カワニナの行動を指標とすれば、銅などの重金属汚染をより早く検出できると考えられる。しかし、カドミウム暴露によるカワニナ行動への最小影響濃度(LOEC)は1mg/Lであったため、カドミウムの環境基準値が守られている水域におけるカワニナの行動への影響は考えにくい。

今後、カワニナを有害化学物質に長期間暴露し、その行動パターンの変化をさらに詳しく調べることで、カワニナの行動を指標に用いた生物モニタリングが可能になると考えられる。

文 献

- Cheung, S. G. and L. S. Wong 1999 Effects of copper on activity and feeding in the subtidal prosobranch *Babylonia lutosa* (Lamarck) (Gastropoda: Buccinidae). *Mar. Poll. Bull.*, 39: 106-111
- Cheung, S. G., K. K. Tai, C. K. Leung and Y. M. Siu 2002 Effects of heavy metals on the survival and feeding behaviour of the sandy shore scavenging gastropod *Nassarius festivus* (Powys). *Mar. Poll. Bull.*, 45: 107-113
- Dallinger, R., F. Prosi, H. Segner and H. Back 1987 Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. *Oecologia*, 73: 91-98
- Järup, L. 2003 Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68: 167-182
- Jou, L.-J. and C.-M. Liao 2006 A dynamic artificial clam (*Corbicula fluminea*) allows parsimony on-line measurement of waterborne metals. *Environ. Poll.*, 144: 172-183
- 厚生労働省 「水道水質基準について」 <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/kijunchi.html>, 2009.6.30
- Lauenstein, G. G., A. Y. Cantillo and S. S. Dolvin 1993 Sampling and analytical methods of the NOAA National Status and Trends Program National Benthic Surveillance and Mussel Watch Project. Vol.1 Program overview and summary of methods. Technical Memorandum 71, NOAA Office of Ocean Resources Conservation and Assessment, Silver Spring, MD.
- Li X., C. Poon and P. S. Liu 2001 Heavy metal

- contamination of urban soils and street dusts in Hong Kong. *Applied Geochemistry*, 16: 1361-1368
- Millington, P. J. and K. F. Walker 1983 Australian freshwater mussel *Velesunio ambiguous* (Philippi) as a biological monitor for zinc, iron and manganese. *Australian J. Mar. Freshw. Res.*, 34: 873-892
- Nicholson, F. A., S. R. Smith, B. J. Alloway, C. C. Smith and B. J. Chambers 2003 An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Sci. Total Environ.*, 311: 205-219
- 西内康浩・吉田孝二 1972 各種農薬の淡水産マキガイ類におよぼす影響。農薬検査所報告, 12: 86-92
- Okamoto, O. K., L. Shao, J. W. Hastings, P. Colepicolo 1999 Acute and chronic effects of toxic metals on viability, encystment and bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123: 75-83
- Real, M., I. Munoz, H. Guasch, E. Navarro and S. Sabater 2003 The effect of copper exposure on a simple aquatic food chain. *Aquat. Toxicol.*, 63: 283-291
- Salánki, J., A. Farkas, T. Kamardina and K. S. Rózsa 2003 Molluscs in biological monitoring of water quality. *Toxicol Lett.*, 140-141: 403-410
- Scott, G. R. and K. A. Sloman 2004 The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.*, 68: 369-392
- Shinomura, Y., K. Anazawa and M. Sato 2005 The relationship between the river environment and the habitat of firefly in Misato, Tokushima Prefecture, West Japan. *Papers on Environmental Information Science*, 19: 297-302
- Slooff, W., D. de Zwart and J. M. Marquenie 1983 Detection Limits of a Biological Monitoring System for Chemical Water Pollution Based on Mussel Activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 30: 400-405
- Teal, J. M. and R. W. Howarth 1984 Oil spill studies: A review of ecological effects. *Environmental Management*, 8: 27-43
- Watton, A. J. and H. A. Hawkes 1984 The Acute Toxicity of Ammonia and Copper to the Gastropod *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith). *Environ. Poll. (Series A)*, 36: 17-29

Summary

We elucidated the behavioral changes of freshwater snail (*Semisulcospira libertina*) exposed to heavy metals for biological monitoring of water quality. Freshwater snails were exposed to copper sulfate (CuSO_4 ; 0, 0.1, 1 or 10mg/L), or cadmium chloride (CdCl_2 ; 0, 0.01, 0.1, 1 or 10mg/L) for 4 days. The behavior of snails were observed at the end of exposure test and classified with five behaviors (movement, M; adhesion and cessation of muscular activity, AC; detachment and muscular activity, DM; detachment and cessation of muscular activity, DC; withdrawal of the body into the shell, W).

As a result, exposure of CuSO_4 and CdCl_2 induced significant change of behaviors in snails, respectively ($p < 0.05$). In the 0.1 CuSO_4 -mg/L treatment group, all snails showed W behavior after the exposure. And 7 out of 8 snails showed W behavior in the 1mg/L group. Additionally, in the 10mg/L group, W and DC behavior were observed from 5 and 3 snails, respectively. However, no death was observed in all CuSO_4 treatments, and 6 out of 8 snails in the control showed M behavior. In CdCl_2 exposure, M behavior was observed in the 0.01mg/L group, and 5 out of 8 snails showed M behavior in the 0.1mg/L treatment. On the other hand, M behavior was observed from only 1 out of 8 snails, in the 1 mg/L treatment, and 4 out of 8 snails showed W behavior. In addition, all test organism showed W behavior in the 10mg/L group. However, the death was not observed in all CdCl_2 treatments. Additionally, we compared the observed effect concentration determined from this study with the recorded concentrations of Cu and Cd in the environment. And we concluded that the behavior of freshwater snails could be affected by high recorded Cu concentration.