

Gymnodinium nagasakiense の赤潮発生機構と 発生予知に関する生理生態学的研究

山 口 峰 生

Physiological Ecology of the Red Tide Flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae) — Mechanism of the Red Tide Occurrence and its Prediction —

Mineo YAMAGUCHI

During the summer of 1965, a huge bloom of the dinoflagellate *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi, named *Gymnodinium* type-'65 at the time, occurred in Omura Bay in Kyushu, the western part of Japan, and caused mass mortality of cultured and feral fish. Since then, *G. nagasakiense* red tide has frequently occurred in the coastal waters of western Japan. The present study was done to establish the biological background for the elucidation of the mechanism of *Gymnodinium* red tide and its prediction. The major factors involved in the red tide outbreaks were examined by a field survey, the growth responses of the organisms to physico-chemical factors in culture were observed, and the cell cycle of the organism was determined to develop a technique for estimating the species-specific in situ growth rate.

The chromosome number of *G. nagasakiense* was examined for clonal cultures from different origins; i.e., Suo-Nada, Hiroshima Bay, Uranouchi-Inlet and Gokasho-Bay. *G. nagasakiense* had rod-shaped chromosomes that measured about 10~20 μm long and 1.5~2 μm wide. There was no significant difference in chromosome counts for the cultures from different waters. The chromosome number of *G. nagasakiense* was 113 ± 5 (mean \pm SD, $n=105$). This indicated that the chromosome number in this species was stable and should be valuable for the taxonomy of the organism.

Distribution of the vegetative cells and environmental factors concerning the red tide outbreaks was investigated in Suo-Nada, western Seto Inland Sea from 1985 to 1987. Important factors causing the huge bloom of *G. nagasakiense* were the marked decrease of the salinity of the surface layer by heavy rainfall, increase of vertical stability caused by a development of halocline and formation of large scale anoxic bottom water. Frequent observation of the sea water from Uranouchi-Inlet, Kochi Prefecture, confirmed that vegetative cells of *G. nagasakiense* occurred throughout the year.

The effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of this organism were examined using axenic cultures to evaluate the relative importance of these factors on the dynamics of natural populations. *G. nagasakiense* grew at a low irradiance of $10 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ and more and the growth was saturated at $110 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. The growth response to light allowed them to dominate in the low light conditions such as subsurface layer and bad weather in the rainy season. The growth of the flagellate was examined in 25 different combinations of temperature (10 to

30°C) and salinity (10 to 30 ‰) under saturated irradiance. Growth occurred at temperatures from 10 to 30 °C and at salinities from 15 to 30 ‰. The highest growth rate was observed in the combination of 25°C and 25 ‰, respectively. The tolerable salinity range of growth was relatively wide at an optimum temperature and was reduced to a much narrower range at a sub-optimum temperature. These findings indicate that *G. nagasakiense* is an eurythermal and euryhaline organism. These physiological characteristics presumably allow them to endure the winter as motile cells, which in turn act as the seed population for initiating the red tide in the following summer.

G. nagasakiense could utilize both inorganic and organic nutrients (nitrate, ammonium and urea as N sources and orthophosphate and glycerophosphate as P sources). Minimum cell quotas (Q) for nitrogen and phosphorus of the organism were 3.7~4.0 pmol cell⁻¹ and 0.23~0.35 pmol cell⁻¹, respectively. On the basis of these values and in situ nutrient (DIN and PO₄-P) concentrations the growth potentials of natural sea water were evaluated. The growth potentials of the seawater from Suo-Nada and Uranouchi Inlet ranged from 100 to 8300 cells ml⁻¹. Therefore *G. nagasakiense* red tide may occur at the ordinary level of nutrients in a natural environment. The relationship between nutrient concentrations and growth rate followed Monod's equation. The half saturation constant for growth (K_s value) was 0.58~0.78 μM for nitrogen and 0.14~0.15 μM for phosphorus. These values were smaller than those of other dinoflagellates reported previously. This indicates that *G. nagasakiense* requires a very low concentration of nutrients for their growth, which is a characteristic allowing it to grow more abundantly than its competitors in the natural environment.

The diel pattern of cell division of *G. nagasakiense* was examined in a laboratory experiment under various light and temperature conditions on light:dark (L:D) cycles (L=05:00 to 19:00 h). *G. nagasakiense* exhibited a distinct phased cell division on the L:D cycles, with the maximum frequency of 2 nuclei stage at 22:00 h and that of paired cells at 04:00 to 06:00 h. Cell division generally occurred at the end of the dark period and its pattern was independent of light intensity and temperature. On the basis of these observations, the applicability of the frequency of dividing cells (FDC) technique for estimating growth rate of *G. nagasakiense* was examined. The duration of cell division (T_d), a parameter necessary for the calculation of growth rate, was determined for two different cell division stages; i.e., 2 nuclei and paired cells. Calculated T_d value from the frequency of paired cells was 1.09±0.16 h and stable for the population grown under different light intensities. On the other hand, the T_d estimated from the frequency of 2 nuclei varied markedly. The growth rate estimated by the FDC technique using T_d from paired cells correlated significantly with those calculated from the increase in cell number. The T_d value was affected by temperature. However, a statistically significant log-linear relationship was obtained between T_d and temperature. Using the relationship, T_d at the desired temperature could be obtained.

To determine the phased cell division and to estimate in situ growth rate of *G. nagasakiense* by the FDC technique, field sampling was conducted in Suo-Nada and Hiroshima Bay. Natural populations of *G. nagasakiense* showed distinct phased cell division as in the laboratory conditions with the maximum frequencies around midnight. Using the FDC of the natural population and T_d values calculated from in situ temperatures, the growth rates were estimated to be 0.12~0.14 divisions day⁻¹ for Suo-Nada and 0.27~0.52 divisions day⁻¹ for Hiroshima Bay populations, respectively.

To improve the FDC technique, DNA synthesis and the cell cycle in *G. nagasakiense* were investigated by determining the relative DNA contents of individual cells using an epifluorescence microscopy-based microfluorometry system. The nuclei were stained with the DNA-specific fluorochrome 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Nuclear DNA contents, cell size distribution, cell density, and frequency of paired cells were determined every 2 h for 24 h using cells grown on a 12h L:D cycle. DNA synthesis and cell division were tightly phased to a particular period of the L:D cycle. DNA synthesis (S phase) occurred from 10:00 to 22:00 h and was followed by cytokinesis. The presence of such a distinct S phase strongly suggests that *G. nagasakiense* has a typical eukaryotic cell cycle, which makes it possible to estimate the species-specific in situ growth rate based on the diel pattern of DNA synthesis.

To examine the effect of temperature on the cell cycle, *G. nagasakiense* cells were cultured at 5 different temperature conditions (10~30°C) and the DNA content was determined using micro-fluorometry. Patterns of the change in percentages of G₁ phase cell showed a sine curve at the temperature of more than 20°C. From the time interval of the peaks of the curve, the generation time of the species was estimated to be 24 h. These patterns become obscure at low temperatures. Based on the percentages of the cell cycle phase (G₁, S, G₂+M) durations of cell cycle phases at various temperatures were calculated. It was concluded that all phases of the cell cycle were affected by temperature and were increased with decreasing temperature. Low temperature caused an increase in cell size. Cells with 4C DNA were observed at 10°C. This indicated that diploidy occurred at a low temperature. The natural population of *G. nagasakiense* was also found to grow under the same cell cycle progression as in the laboratory conditions. These findings suggest that the method for species-specific growth rate using the diel DNA synthesis cycle is applicable to the natural populations.

The present study revealed that *G. nagasakiense* could grow under a very wide range of environmental factors (light, temperature, salinity and nutrients). Based on these growth characteristics the biological phase of *G. nagasakiense* red tide and the factors affecting red tide development were summarized as follows. First, the seed population of the red tide was thought to overwintered vegetative cells. They grew gradually and their number increased with increasing water temperature. The population grew at nearly the maximum growth rate (1.0 division day⁻¹) into red tide under the favorable conditions where low salinity and supply of nutrients by heavy rainfall in the rainy season, decrease of competitors by low irradiance, increase of temperature and irradiance after the rainy season, increase of vertical stability and decrease of grazing pressure. Physical and biological accumulation might increase the cell density in the red tide. After the red tide, the vegetative cells overwinter and play an important role in initiating the red tide of the following summer.

On the basis of these biological characteristics of *G. nagasakiense* several plans for the prediction of the red tide are proposed. First, simulation using an ecological model is appropriate for long term predictions. Biological parameters for the relationship between growth rates and environmental factors obtained in the present study are useful for this purpose. Second, monitoring in situ growth rate of the organism by the newly developed FDC technique or cell cycle analysis might be a useful indicator for the short term prediction of the red tide.

Key words: *Gymnodinium nagasakiense*, Red tide, Chromosome number, Growth physiology, Growth rate, Cell cycle.

目 次

第I章 序 論	254
第II章 染色体数による <i>Gymnodinium nagasakiense</i> の分類学的検討	258
第III章 現場海域における <i>Gymnodinium nagasakiense</i> の出現特性	266
第1節 夏季の周防灘における赤潮発生と環境要因	266
第2節 浦ノ内湾における出現の季節変化	284
第IV章 <i>Gymnodinium nagasakiense</i> の増殖に及ぼす物理・化学的要因	288
第1節 <i>G. nagasakiense</i> の増殖に及ぼす光強度, 水温及び塩分の影響	289
第2節 競合赤潮ラフィド藻 <i>Chattonella</i> spp. の増殖生理	297
第3節 珪藻類の増殖生理	307
第4節 <i>G. nagasakiense</i> の増殖に及ぼす栄養塩 (窒素, リン) の影響	316

第V章 <i>Gymnodinium nagasakiense</i> の増殖速度の測定	331
第1節 培養条件下における増殖速度測定法の検討	332
第2節 現場海域における同調分裂と増殖速度	341
第VI章 <i>Gymnodinium nagasakiense</i> の細胞周期	346
第1節 核DNA量測定法の確立	347
第2節 培養条件下における細胞周期	354
第3節 細胞周期に及ぼす温度の影響	360
第4節 現場個体群の細胞周期	370
第VII章 総 括	375
摘 要	379
謝 辞	382
文 献	382

第I章 序 論

わが国の水産物の消費は国民食生活の健康志向、グルメ志向などによる需要に支えられ、近年順調に推移している。しかし、水産物の供給面で見ると、1977年に始まる200海里時代への突入以降、国際漁業規制の強化や漁業資源水準の悪化により、遠洋及び沖合い漁業の生産量は減少している。したがって、将来にわたる水産物の安定供給及び漁業経営の安定のためには、資源管理型漁業や栽培漁業の推進等により、沿岸漁業の維持・振興を図る必要がある。

このような背景の中で海面養殖業は増加傾向にあり、1989年におけるその生産量は127万トン、金額では5,700億円に上っている（農林水産省統計情報部 1990）。これは総漁業生産量の11%、金額では21%に相当するものである。ところが、その生産の場となる沿岸海域においては、産業・生活排水の流入に伴う水質環境の悪化及び富栄養化が進行し、赤潮や貧酸素水塊及び油濁による漁業被害が後を絶たない。このため、沿岸水産資源の保護、水産物の安全性の確保等の観点からも、漁場の環境保全がますます重要な課題となっている。

赤潮は漁業被害をもたらす原因の中で最も重大なものである。赤潮現象は水域中で主として植物プランクトンが大増殖し、そのために水の着色が起こる現象である。歴史的に見ると赤潮自体は古くから知られている現象であるが、1960年代後半からその発生件数の増加、構成種の多様化及び分布の広域化が見られ、さらに沿岸域における水産増・養殖業に深刻な被害を与え始めたことから、産業的・社会的にも非常に注目されるようになった。

わが国における赤潮原因生物のうち、多大な漁業被害をもたらしている有害種の代表的なものとして、*Chattonella* 属と *Gymnodinium nagasakiense* *が挙げられる。瀬戸内海域における

* 本種の種名に関して *Gymnodinium nagasakiense* は *G. mikimotoi* の同種異名であり、前者は後者の新参シノニムとする報告がなされた（高山・松岡，1991：日本プランクトン学会報 38，53-70.）。

G. nagasakiense の赤潮は1957年11月の山口県徳山湾における発生が最初のものである (池田他 1987)。しかし本種が重大な有害赤潮生物として認識されるようになったのは、1965年の長崎県大村湾における大規模な赤潮とそれによる漁業被害が契機となっていることは間違いない (飯塚・入江 1966, TAKAYAMA and ADACHI 1984)。1972年以降に瀬戸内海及びその周辺海域 (熊野灘と土佐湾を含む) で発生した漁業被害を伴う赤潮の発生件数と、その中で占める *G. nagasakiense* 赤潮による被害件数を Fig. 1-1 に示した (水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1973-1990)。ここ10年間の被害件数は1970年代に比べてやや減少しているが、依然として毎年10件程度の漁業被害が続出している。その内 *G. nagasakiense* による漁業被害は年平均5件程度であるが、近年その割合が増大する傾向がうかがえる。瀬戸内海域とその周辺海域における本種による主な被害事例を Table 1-1 にまとめた (水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1973-1990)。とりわけ1984年の熊野灘及び1985年の周防灘における赤潮が顕著で、漁業被害はそれぞれ43億円及び10億円に上っている (水産庁他 1986, 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1986)。瀬戸内海以外では九州沿岸域での被害が多く、1989年には八代海で2億6,000万円に及ぶ被害が報告されている (水産庁九州漁業調整事務所 1990)。浜名湖でも1990年の赤潮でカキ養殖に重大な被害が及んでいる (静岡県水産試験場浜名湖分場 私信)。一方、韓国 (CHO 1981, LEE and KWAK 1986) や香港 (WONG 1989) など近隣諸国でも被害例が報告されており、*G. nagasakiense* 赤潮は国内だけの問題に留まらない。このように *G. nagasakiense* は *Chattonella* 属と並んで極めて有害な赤潮生物であると言える。

G. nagasakiense は渦鞭毛藻綱 (Dinophyceae) ギムノディニウム目 (Gymnodiniales) ギムノディニウム科 (Gymnodiniaceae) に属する単細胞性の藻類である。本種の細胞長は18~37

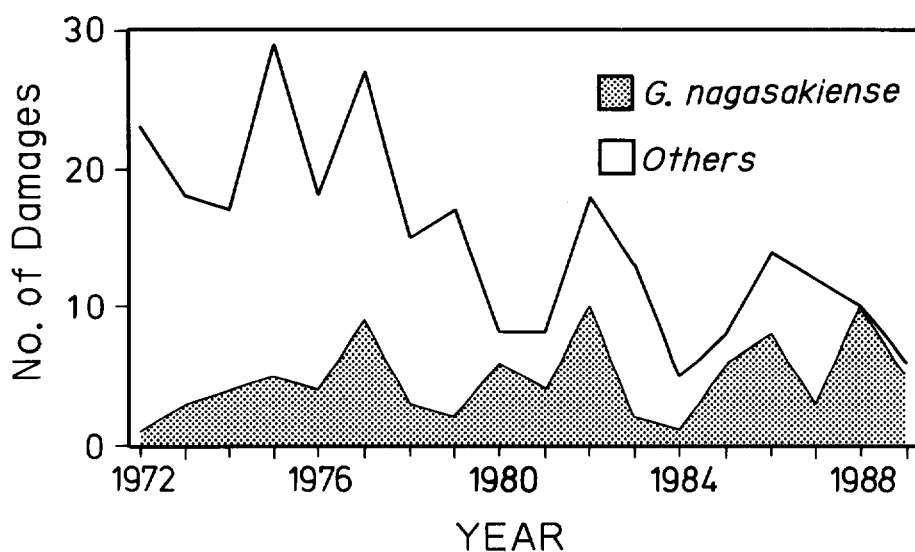


Fig.1-1. Yearly trends in red tide outbreaks accompanied by damage to fisheries in the Seto Inland Sea and the adjacent sea from 1972 to 1989. Dotted area indicates the number of fishery damages resulting from red tide by *G. nagasakiense*.

Table 1-1. Incidence of red tide outbreaks of *G. nagasakiense* and related damages to fishery in the Seto Inland Sea and adjacent sea from 1972 to 1989.

Year	Month	Locality	Fish damaged	Amount of loss (1,000yen)
1972	May	Kii Suido	Yellowtail	9,500
1973	Sep.	Harima Nada	Clam	1,000
1974	Aug.	Hiuchi Nada		17,000
1976	Sep.	Bungo Suido	Yellowtail, Abalone	17,475
1977	July	Kii Suido	Pearl oyster	163,050
	Aug.	Hiroshima Bay	Black porgy	180,160
1979	Aug.	Aki Nada, Harima Nada Suo Nada, Bungo Suido	Yellowtail, Clam, Red sea bream	796,584
1980	July	Kumano Nada	Yellowtail, Abalone	366,821
	Aug.	Suo Nada, Bungo Suido	Mullet, Yellowtail	23,499
1981	June	Bungo Suido	Abalone	173
	July	Bungo Suido	Yellowtail	71,512
1982	July	Suo Nada, Iyo Nada	Octopus, Egg cockle, Abalone	60,394
	Aug.	Iyo Nada, Bisan Seto Hiuchi Nada	Puffer, Yellowtail	238,221
1983	Aug.	Bungo Suido, Tosa Bay	Yellowtail, Red sea bream	26,020
1984	July	Kumano Nada	Red sea bream, Pearl oyster	4,361,609
1985	July	Suo Nada, Iyo Nada Bungo Suido	Clam, Red sea bream, Yellowtail Prawn	954,333
1986	July	Suo Nada, Iyo Nada Bungo Suido	Yellowtail, Prawn, Flatfish	158,791
	Aug.	Iyo Nada, Aki Nada Bungo Suido	Yellowtail	9,142
	Sep.	Suo Nada	Bastard halibut	174
1987	June	Kii Suido	Yellowtail	19,800
	Aug.	Bungo Suido	Horse mackerel	2,500
1988	July	Kii Suido	Yellowtail	1,900
	Aug.	Kii Suido, Tosa Bay	Yellowtail, Mackerel, Pike eel Amberjack, Top shell	20,723
1989	July	Tosa Bay	Yellowtail	6,600
	Aug.	Iyo Nada	Flatfish	4,463
Total				7,511,444

μm , 細胞幅は14~35 μm で、背腹に偏平である (Fig. 1-2)。これらの形態的特徴に関しては TAKAYAMA and ADACHI (1984) に詳述されている。本種についても他の赤潮生物同様その分類に混乱があった。本種は当初 *Gymnodinium* sp., *Gymnodinium* sp.1, *Gymnodinium* sp. ('65年型種), *G. nagasaki* などと仮称されていたが, TAKAYAMA and ADACHI (1984) によって *G. nagasakiense* と新種記載された。しかし現在 *G. mikimotoi* (尾田 1935) との異同が検討されている。

前述のように *G. nagasakiense* は漁業に大きな被害をもたらす有害な赤潮生物であるため、その赤潮の発生機構及びそれに対する対策のための調査・研究の必要性が早くから指摘されていた。*G. nagasakiense* に関するこれまでの研究報告を概説すると、以下のように整理できる。まず最も報告が多いのは現場調査に基づく赤潮発生と被害事例及び発生環境に関する報告であ

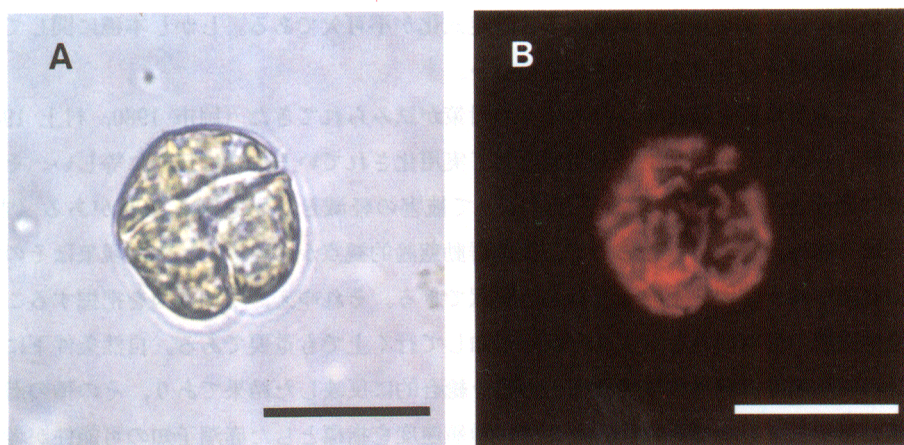


Fig.1-2. Light(A) and epifluorescence(B) micrographs of *G. nagasakiense*.
Scale bars=30 μ m.

る(飯塚・入江 1966, 入江・浜島 1966, 森・入江 1966, 塩川・入江 1966, 飯塚・入江 1969a, 飯塚・入江 1969b, 飯塚 1972, 田中他 1979, CHO 1981, 吉松他 1985, LEE and KWAK 1986, 竹内他 1986, 池田他 1987, 中田・飯塚 1987, 寺田 1987, 寺田他 1987, 松野他 1988, WONG 1989, HONJO *et al.* 1990, 保坂 1990, 板倉他 1990)。つぎに形態と分類に関するもので、安達(1972), 野呂他(1981), 高山(1981), TAKAYAMA and ADACHI(1984), TAYLOR(1985), 高山(1986), SAKO *et al.*(1989), NAGASAKI *et al.*(1991)などの研究がある。さらに MATSUOKA *et al.*(1989)は本種の地理的分布についてまとめており、毒性に関しては安部・平山(1979)が、海水の生物検定(AGP)に関しては平山他(1972)及び平山・川端(1982)が、また統計的手法による赤潮予察に関しては大内・高山(1984)の研究がある。

赤潮の発生機構を解明して行く上で、赤潮構成種の生理特性を明らかにすることは重要な課題の一つである。本種に関する生理学的研究は以下のようにまとめられる。HIRAYAMA and NUMAGUCHI(1972)は底泥抽出液が本種の増殖を促進することを認めた。沼口・平山(1972)は増殖に好適なpHと塩分を調べ、ついで飯塚・中島(1975)によって本種が硫化物耐性を有することが示された。杉山他(1979)は本種が優占する赤潮海水について光-光合成曲線を求めている。栄養生理に関しては、魚類の肉ミンチやふん抽出液(西村 1982), また微量元素であるセレン(IISHIMARU *et al.* 1989)が本種の増殖を促進するといった報告が見られる。また、HIRAYAMA *et al.*(1989)は本種のアルカリフォスファターゼ活性を認めている。しかし、本種は *Chattonella* 属や *Heterosigma akashiwo* などに比べて培養が容易でないことなどから、上記の研究のほとんどは有菌株によるものであり、無菌株を用いた本種に関する系統的な生理学的研究は少なく、解明されていない部分が多く残されているのが現状である。

赤潮の発生過程には多くの物理・化学的環境要素が複雑に関係している。したがって、その発生機構を解明するためには、赤潮原因藻の生理とそれら環境因子との相互関係を定量的に把握することが必要である。特に生態系モデルを構築しシミュレーションによって赤潮予知を行

うような場合には、増殖速度と環境因子との定式化が不可欠である。しかし本種に関してはそのような定量的研究はこれまでなされていない。

赤潮による漁業被害を防止するため種々の対策が試みられてきた（岡市 1980, 村上 1980, 代田 1980）。しかし、赤潮発生後の対策として実用化されているものは皆無に等しい。そのため、赤潮の発生を事前に予知することによって被害の軽減と防止を図る必要がある（吉田 1980, 安楽 1985a, 1985b）。ところで、個体群動態論的観点からすると、赤潮現象はその構成種の増加要因が減少要因を上回った結果と解釈できる。それゆえ、増加要因を把握することは赤潮の発生機構の解明のみならず、それを予知して行く上でも重要である。自然条件下における個体群の増殖速度は種々の環境要因の影響を総合的に反映した結果であり、その種の潜在的な増殖能力を示しているであろう。そこで、増殖速度を指標とした赤潮予知の可能性が考えられる。増殖速度が赤潮の予知指標となり得るとい根拠としては、赤潮発生の10日前から *G. nagasakiense* が $1.0 \text{ division day}^{-1}$ の高い増殖速度を有していたという大村湾での観測結果（飯塚 1987）が挙げられる。この値は室内で得られた本種の最大増殖速度（飯塚・峯 1983）に相当するものである。このように現場個体群における増殖速度の把握は赤潮予知技術の開発のために有望であり、その簡便な測定法の確立が早急に望まれる。

以上述べてきた背景から、本研究では *G. nagasakiense* 赤潮の発生機構の解明と赤潮予知のための生物学的情報の強化を図ることを主な目的とした。本論文は全7章から構成されている。本章の序論に続いて、第II章では *G. nagasakiense* の分類学的な問題点と研究史を総括し、形態分類を補強するための分類基準として染色体数の有効性を検討した。第III章においては、周防灘及び浦ノ内湾における現場調査に基づき、大規模赤潮発生年の海況条件の特徴及び栄養細胞の年間の出現状況と環境条件との関係を調べた。第IV章では培養実験によって水温、塩分、光強度及び栄養塩に対する本種の増殖生理を明らかにすると共に、比較のため *C. antiqua*, *C. marina* 及び代表的な珪藻類4種の増殖生理を明らかにした。第V章では生物学的な赤潮の予知指標として細胞分裂指数による新しい増殖速度測定法の開発を行い、現場個体群への応用を検討した。第VI章では増殖速度測定法の基礎となる細胞周期を明らかにし、それに及ぼす環境要因の影響を調べた。第VII章では以上の成果を総括し、生物学的諸特性から見た *G. nagasakiense* 赤潮の発生機構について論じた。

第II章 染色体数による *Gymnodinium nagasakiense* の分類学的検討

赤潮を形成する微細藻類は一般に単細胞性で形態的にも単純であるため、分類の基準となるような特徴に乏しい。さらに固定が困難な場合や、それが可能であっても固定に伴う形態変化が著しいなど、形態に基づく分類基準には不確定な要素が多い。

赤潮を構成する生物群のうち発生件数及び漁業被害の多いものは主として渦鞭毛藻とラフィド藻である。これら両生物群に属する生物種については分類学的検討が繰り返され、属名及び

種名の改変等が盛んに行われてきており、様々な混乱の原因となっている (TAYLOR 1985)。本研究の対象種である *Gymnodinium nagasakiense* もその例外ではなく、分類学的な問題は解消していない。そこで本論に入る前に、*G. nagasakiense* に関する分類学的研究の総括を行うとともに、その問題点を整理する。なお本章では随所に *Gyrodinium* 属の記述を行う必要があり、*Gymnodinium* 属との混乱を避けるために属名の省略形にはそれぞれ *G.* (= *Gymnodinium*) 及び *Gyr.* (= *Gyrodinium*) を用いる。

ギムノディニウム目 (*Gymnodiniales*) に属する渦鞭毛藻は殻板や鎧板を欠くため無殻類と呼ばれる。科 (*Gymnodiniaceae*) の分類はほとんど外部形態に基づいており、内部構造に基づく基準はワルノヴィア科 (*Warnowiaceae*) におけるレンズ眼 (*Ocellus*) やアクチニスクス科 (*Actiniscaceae*) における骨片など特殊なものに限られている。属 (*Gymnodinium*) の分類基準としては横溝 (*cingulum*) の特徴が最も重要であり、その発達程度 (細胞を何周するか)、存在部位、そして溝の始端と末端の段差 (*displacement*) などによって分類されている (福代 1987a)。しかし細胞自体が弱いため長時間にわたる詳細な観察や固定は困難であり、このことが形態分類の不確実性の原因の一つとなっている。

G. nagasakiense についても他の赤潮生物同様その種名が何度か改変され、現在も種名に関する論議が行われている。ここで本種の種名の変遷をたどってみたい。1965年の夏季に大村湾で発生した赤潮に関する研究報告の中で、本種は「*Gymnodinium* のある種、*G. ochraceum* の記述に大体一致するが三重大学安達六郎氏によって別種と認定された」と記述された (飯塚・入江 1966)。その後、飯塚・入江 (1969a) によって *Gymnodinium* sp. (65年型種) と仮称されるようになった。一方、安達 (1972) は写真資料に基づき、1957年11月の山口県徳山湾 (前川 1961) 及び1965年の大村湾における赤潮形成種を *Gymnodinium* sp. 1 と呼んだ。また1975年には *G. nagasaki* と記述した報告も見られた (飯塚・中島 1975)。高山 (1981) は、走査電子顕微鏡を用いて *Gymnodinium* sp. ('65年型種) の詳細な形態観察を行い、上錐体における縦溝や上錐溝 (*apical groove*) の形態が本種の重要な標徴であることを初めて明らかにした。その後1984年になってようやく *G. nagasakiense* として新種記載が行われ (TAKAYAMA and ADACHI 1984)、現在に至っている。

現在 *G. nagasakiense* との異同が論議されている種に *G. mikimotoi* がある。本種は尾田 (1935) によって1934年冬に五ヶ所湾で発生した赤潮の原因藻としてその形態が記載されるとともに、三宅・小南によって新種記載の予定であるとされた。しかし、その後も両氏による記載はなされなかった。TAKAYAMA and ADACHI (1984) は *G. mikimotoi* は形態が五角形をしていること、燐光を放つという点で *G. nagasakiense* とは異なり、別種であるとした。ところが TAYLOR (1985) は細胞の大きさが同じであること、背腹に扁平であること、分散する葉緑体を有すること、横溝の段差が同じであること、核の形態と位置が同じであることなどから、TAKAYAMA and ADACHI (1984) による別種説に異論を唱えた。さらに MATSUOKA *et al.* (1989) も *G. nagasakiense* にはかなり形態変異があること、そして冬季でも赤潮を形成するといった生態的特徴等から、*G. nagasakiense* は *G. mikimotoi* MIYAKE et KOMINAMI ex

ODA (尾田 1935, 高野 1971) と同種である可能性を指摘している。

G. nagasakiense と形態的に類似する渦鞭毛藻に *Gyr. aureolum* がある。本種は北ヨーロッパや北米沿岸域にかけて、また南半球でもブラジル沿岸域で赤潮を引き起こし、漁業被害を及ぼしている (PARTENSKY and SOURNIA 1986, MAHONEY *et al.* 1990)。本種は HULBURT (1957) によって米国マサチューセッツで初めて記載された種である。その後 *G. nagasakiense* と時を同じくするかのように1966年にノルウェー沿岸域で大規模な赤潮を形成した (BRAARUD and HEIMDAL 1970)。TANGEN (1977) は *Gyr. aureolum* の形態は HULBURT (1957) の原記載と一致するものの形態変異がかなり大きいこと、さらに本種が *G. nagasakiense* と形態的に酷似すると報告した。それに対して TAKAYAMA and ADACHI (1984) は *Gyr. aureolum* の核の形態と位置が *G. nagasakiense* とは異なることから、これら2種は別種であるとした。しかし TAYLOR (1985) は *G. mikimotoi* と *Gyr. aureolum* 及び *G. nagasakiense* が形態的には区別できないと述べている。一方、PARTENSKY and SOURNIA (1986) は、ヨーロッパに出現する *Gyr. aureolum* の分類が複雑で混乱しているとして *Gyr. cf. aureolum* と呼ぶことを提案した。その後彼らは本種が *Gyr. aureolum* の原記載 (HULBURT 1957) よりも日本の *G. nagasakiense* に酷似すること、さらに *Gyr. aureolum* という種名が異なるいくつかの種に当てられている可能性を指摘し、近い将来これらの分類学的検討が行われることを前提に *Gyr. cf. aureolum* の代わりに *G. cf. nagasakiense* と呼ぶことを提唱している (PARTENSKY *et al.* 1988)。ただし *G. nagasakiense* が *G. cf. nagasakiense* よりも核DNAを40%多く有すること、さらに後者には“大型細胞”と“小型細胞”の2つの形態が存在することから、PARTENSKY *et al.* (1988) は *G. nagasakiense* と *G. cf. nagasakiense* が同一種であるとの見方に疑問を呈している。

Gyr. aureolum では、全カロチノイドのうち71%が19'-hexanoyloxyfucoxanthinで占められるといった色素組成の特徴がある (TANGEN and BJÖRNLAND 1981)。この特殊なカロチノイドは *G. nagasakiense* にも存在するとされている (PARTENSKY *et al.* 1988)。しかし鈴木・石丸 (1988) は *G. nagasakiense* の和歌山株及び周防灘株における fucoxanthin は 19'-hexanoyloxyfucoxanthin と異なっており、さらに fucoxanthin, diatoxanthin, diadinoxanthin の存在割合が同程度であることから、これら2種は近縁とは言えずかけ離れた種であると指摘している。さらに最新の研究によれば、*G. nagasakiense* の共通抗原を認識するモノクローナル抗体がヨーロッパの *G. cf. nagasakiense* とは反応しないことが明らかにされた (NAGASAKI *et al.* 1991)。以上の結果を総合すると現状では *G. nagasakiense* と *G. cf. nagasakiense* とは異なる種と考えた方が良さそうである。

これまで述べてきたように、*G. nagasakiense* とそれに類似する渦鞭毛藻の分類は複雑で混乱している。現時点では *G. nagasakiense* と *G. mikimotoi* は同種である可能性が高いが、それらとヨーロッパの *G. cf. nagasakiense* は別の種であるようである。*G. nagasakiense* と *G. mikimotoi* との問題を解決するためには、*G. mikimotoi* のタイプ産地である五ヶ所湾における両種の精査が必要となろう。また *G. mikimotoi* の場合とは異なり、*G. nagasakiense* と *G. cf.*

nagasakiense にはいくつかの培養株も保存されている。したがって、以上のような *G. nagasakiense* をめぐる分類学的な混乱を解決するためには、形態的な指標のみならず、細胞学的、生化学的、遺伝学的あるいは生態的な特性をも調べる必要がある (DODGE 1963a, SHYAM and SARMA 1978, SAKO *et al.* 1989)。細胞学的な分類基準の一つに染色体数が挙げられる (DODGE 1963a)。現生の渦鞭毛藻には約4,000種が知られているが、その中で染色体数が明らかにされているのはわずかに50種程度である (SPECTOR 1984)。その原因には渦鞭毛藻の染色体数が極めて多いこと、さらに計数方法が確立されていない点が挙げられよう (SIGEE 1986)。そこで本章では、*G. nagasakiense* の染色体計数法を確立し、それによって染色体数の計数を行い、分類基準としての有効性を検討した。

材料及び方法

1. 供試株と培養条件

染色体計数に用いた *G. nagasakiense* は、Fig. 2-1に示す周防灘 (分離年月: 1985年7月)、広島湾 (同: 1988年8月)、高知県浦ノ内湾 (同: 1989年7月) 及び三重県五ヶ所湾 (1989年8月) から分離したクローン株である。なおこれらの分離株のうち浦ノ内湾株及び五ヶ所湾株についてはそれぞれ高知県水産試験場及び南勢町種苗生産施設より南西海区水産研究所に送付された海水中から分離しクローン化したものである。また広島湾株は南西海区水産研究所赤潮環境部の板倉 茂技官から分譲されたものである。これらの株の培養は培地に改変 SWM-3培地 (CHEN *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987) を用い、温度は22°C、光強度は120 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明暗周期は14hL:10hD の条件で行った。

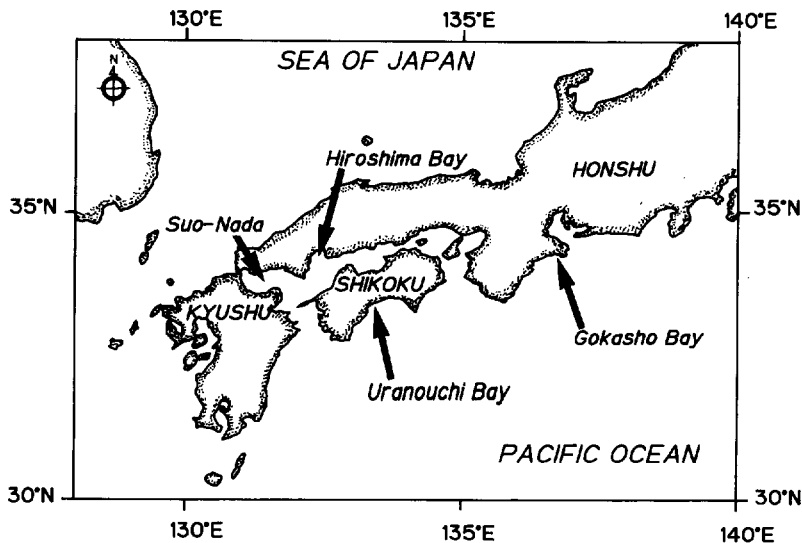


Fig.2-1. Locations of sampling site of *G. nagasakiense* for chromosome counting.

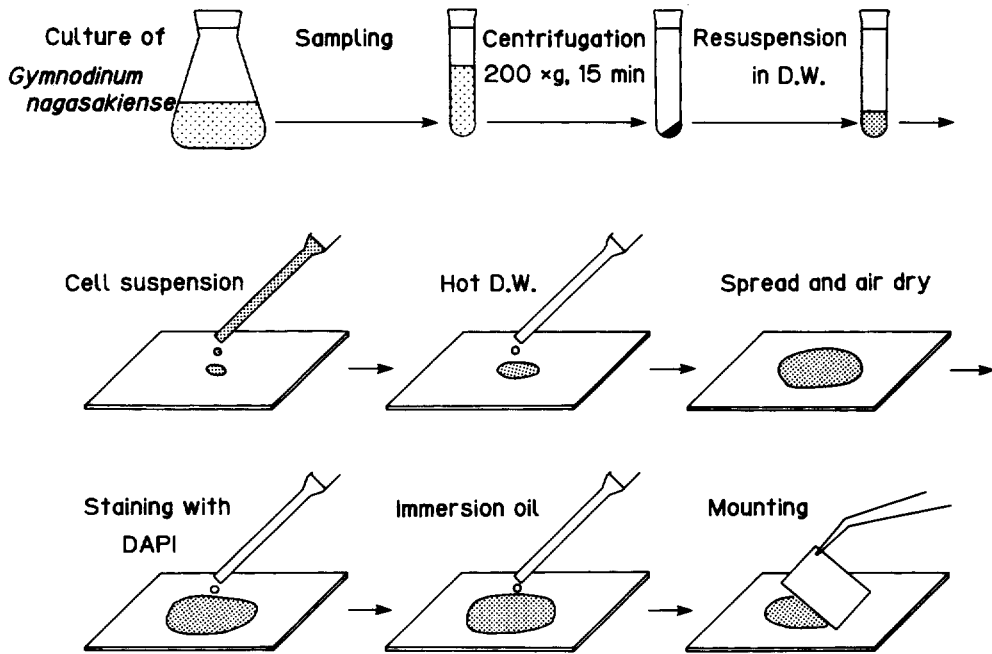


Fig.2-2. Illustration of chromosome spreading technique for *G. nagasakiense*.

2. 染色体計数標本の作成

計数用標本の作成手順を Fig. 2-2 に示す。対数増殖期にある *G. nagasakiense* の培養から培養液 5 ml を採取し、10 ml の丸底遠心管に入れ室温で遠心分離 (200 × g, 15 分) 後、上澄みを捨てた。次に細胞質を膨潤させて展開し易くするため、次のような低張処理を行った。すなわち、細胞ペレットに蒸留水 1 ml を加え、その状態で 15 分程度室温に放置した。処理後の細胞懸濁液の数滴を、あらかじめ 50℃ に熱したホットプレート上に並べた無蛍光スライドガラス上に滴下し、さらにその上から 50℃ に温めた蒸留水数滴を加えて展開した。水分が蒸発した時点でスライドガラスをホットプレートから取り上げて冷却した。それに Tris 緩衝液 (HAMADA and FUJITA 1983) に溶解した蛍光染料 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 溶液 (0.5 μg ml⁻¹) を滴下して染色し、その上から無蛍光エマルジョンオイルを 1 滴落としてカバーガラスで封入した。染色体標本の観察は落射蛍光顕微鏡 (UV 励起) によって行い、染色体が良く展開した標本について写真を撮影し、撮影像に基づいて染色体数の計数を行った。

結果及び考察

上述の方法で観察された *G. nagasakiense* 周防灘株の細胞核及び染色体の蛍光顕微鏡写真を Fig. 2-3A, B に示す。*G. nagasakiense* の核は若干展開しているためやや大きく、長さ約

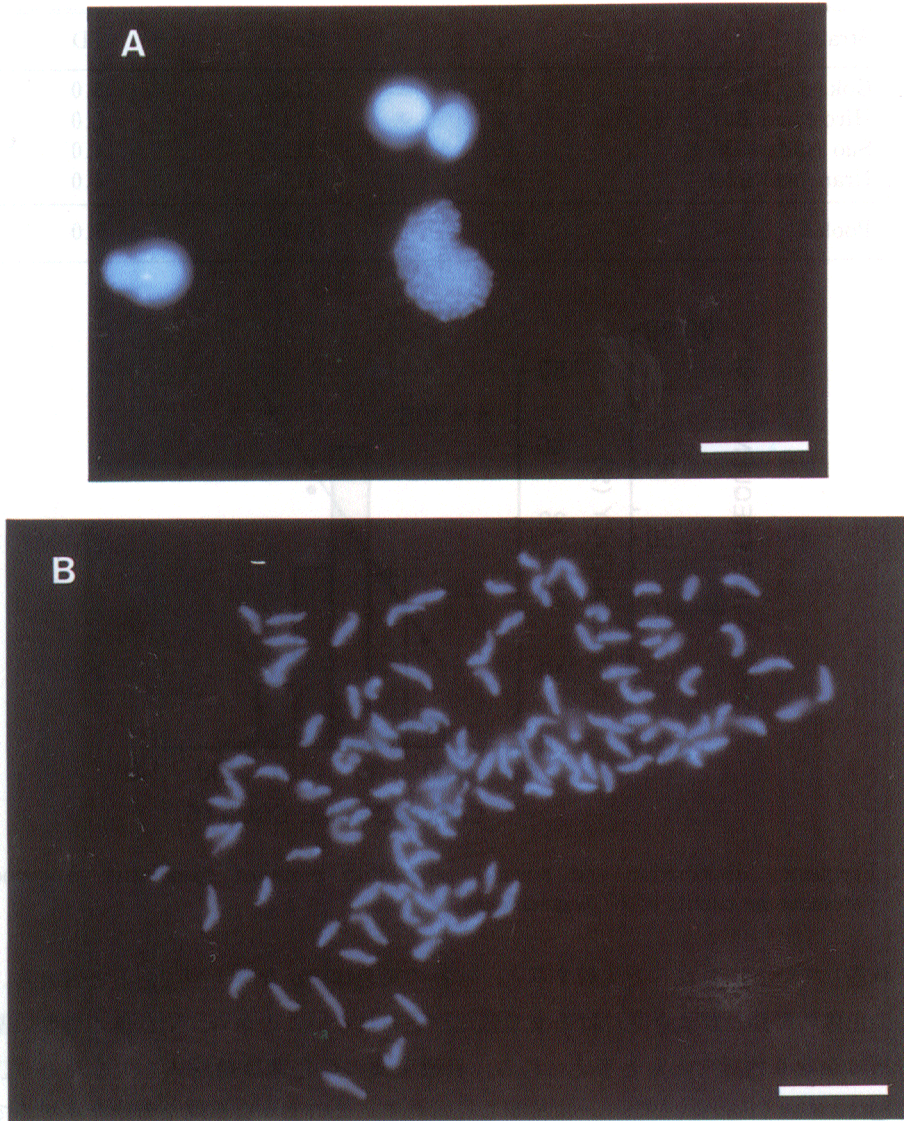
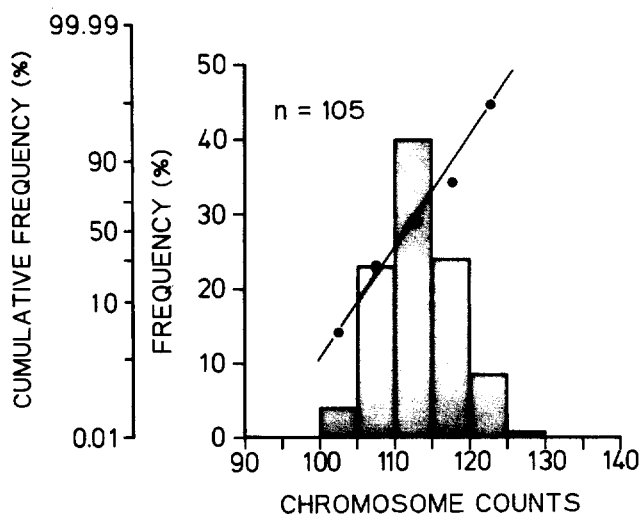


Fig.2-3. Epifluorescence micrographs of *G. nagasakiense* nucleus (A) and chromosomes (B). The nucleus and chromosomes were stained with DAPI. Scale bars=30 μ m

30 μ m, 幅20 μ mの腎臓型を呈し, 内部に粒状あるいはヒモ状に凝集した染色体が複雑に絡みあっている様子が観察された (Fig. 2-3A)。これは渦鞭毛藻に典型的な核の特徴とされている (TANGEN and BJÖRN LAND 1981)。一方, 染色体は長さ10~20 μ m, 幅1.5~2 μ mの紐状あるいは螺旋状の形態を示した (Fig. 2-3B)。DODGE (1963b) によれば, 渦鞭毛藻の染色体の大きさにはかなり変動幅がある。大型のものでは *Prorocentrum* の染色体は長さ10~15 μ m, 径1 μ mの棒状であり, また小型のものでは *Massartia rotundata* の径0.5 μ mの球形があるとされている。SHYAM and SARMA (1978) も淡水産の渦鞭毛藻の染色体の長さが0.75~10 μ mの範囲にわ

Table 2-1. Chromosome counts of various strains of *G. nagasakiense*.

Strain	n	Mean	SD
Gokasho Bay	18	114	5.0
Hiroshima Bay	12	114	5.0
Suo Nada (G303)	35	111	4.0
Uranouchi Inlet	40	113	4.0
Pooled	105	113	5.0

Fig.2-4. Frequency distribution and normal probability plots of cumulative frequency of chromosome counts of *G. nagasakiense*.

たと報告している。これらと比較すると、本種の染色体はかなり大型であると言える。また個々の染色体の形態及び大きさにはあまり変化が見られないことから、染色体の形態に基づく核型分析はかなり困難であると考えられる。渦鞭毛藻の染色体は動原体を欠くため (DODGE 1963b, SHYAM and SARMA 1978) 一次狭窄も見られず、このような単純な形態を示すのであろう。

他の標本ではFig. 2-3Bに示したものより細長い形態の染色体が観察された。他の渦鞭毛藻 *Gyr. cohnii* (= *Cryptothecodinium cohnii*) や *Gyr. aureolum* では、分裂の初期には静止期に比べて染色体がより細長くなると報告されている (KUBAI and RIS 1969, TANGEN and BJÖRNLAND 1981)。したがって、本種の場合もこのような長い染色体の出現は分裂に伴う変化であると考えられる。

異なる4海域から得られた *G. nagasakiense* クローン株の染色体計数結果をTable 2-1にまとめた。本種の染色体数は平均111~113であり、周防灘株でやや少ない傾向が見られた。また標準偏差は4~5であった。このような計数値のばらつきの要因としては、染色体同士の重なり合いやガラス面からの脱落及び計数誤差といった方法上の問題と、細胞分裂時の染色分体の

不分離や断片化 (SHYAM and SARMA 1978) といった生物的な要因が考えられる。

計数値の分布特性を調べるため、全計数値に基づいた頻度分布及び累積度数の正規確率紙上へのプロットをFig. 2-4に示す。染色体計数値の頻度分布は一つのモードを有し、左右に対称な分布パターンを示した。また累積度数のプロットも明らかに1本の直線に乗ることから、得られた計数値は同一の正規母集団から得られたものと見なすことができる。さらに分散分析によって平均値の差を検定した結果 (Table 2-2)、各水準における平均値は等しいとした帰無仮説は5%有意水準で棄却されなかった (F-検定, $df=3,101$, $p>0.05$)。以上の統計検定結果は *G. nagasakiense* の染色体数に株間による差がないことを示している。したがって全計数値に基づき、*G. nagasakiense* の染色体数は 113 ± 5 ($n=105$) と結論できる。

Peridinium 属や *Ptychodiscus brevis* (= *G. brevis*) では培養年数に伴い染色体数が増加する現象 (倍数化: polyploidy) が報告されている (LOPER *et al.* 1980, HOLT and PFIESTER 1982)。しかし *G. nagasakiense* の場合、最も培養年数が長い周防灘株で分離後5年を経過しているが、このような染色体数の増加は見られなかった。渦鞭毛藻の種分化機構の一つに倍数化を挙げている報告もあることから (LOEBLICH *et al.* 1981)、本種の倍数化の存在についてはさらに検討する必要がある。

SPECTOR (1984) は渦鞭毛藻の染色体計数値を取りまとめている。その結果によれば、渦鞭毛藻の染色体数は最小4 (*Syndinium borgerti*) から325 (*Endodinium chattoni*) と非常に広い範囲にわたっている。しかしながら大多数の渦鞭毛藻の染色体数は150以内である。その中で *G. nagasakiense* の113という値は比較的数が多い部類に入る。*G. nagasakiense* と形態的に類似している *P. brevis* では 121 ± 3 (LOPER *et al.* 1980)、*G. cf. nagasakiense* では 117 ± 3 (PARTENSKY *et al.* 1988) という値が報告されている。これらの値と *G. nagasakiense* で得られた結果との差を検討するため、平均値の差の検定を行った。その結果、*G. nagasakiense* と *G. cf. nagasakiense* との間には有意な差は認められなかったが (t-検定, $df=106$, $p>0.05$)、*P. brevis* との間には有意な差が見られた (t-検定, $df=128$, $p<0.01$)。すなわち *G. nagasakiense* の染色体数は *P. brevis* のそれとは明らかに異なるが、ヨーロッパの *G. cf. nagasakiense* の染色体数と差があると言えないことになる。したがって、もしこの2種 (*G. nagasakiense* と *G. cf. nagasakiense*) が別種であるならば、これらは共通の祖先を有し、地理的な隔離によって別々の種へと分化したことが推測される。

Table 2-2. Analysis of variance table of difference in chromosome counts of *G. nagasakiense*.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean square	F
Strain	3	126.5	42.2	1.96 ns
Error	101	2173.0	21.5	
Total	104	2299.5		

以上のように *G. nagasakiense* の染色体数には海域差が見られず、また培養年月が経過しても安定であることから、形態分類を補強するための客観的な分類基準として有効であると考えられる。

第Ⅲ章 現場海域における *Gymnodinium nagasakiense* の出現特性

赤潮発生機構を解明するための最も基本的なアプローチは、海況・気象条件等の環境因子の変動と赤潮発生との因果関係を明らかにすることである。このためには赤潮発生期に現場調査を行い、物理・化学的環境要因と赤潮生物の動態を把握することが重要である。ところで、これまでの現場調査は赤潮発生時の環境特性を明らかにすることに重点が置かれていたため、赤潮発生の盛期である夏季に集中する傾向があった。そのため年間を通じた調査はほとんど行われておらず、夏季以外における赤潮生物の生態については不明の点が多く残されている。しかし、赤潮のシードポピュレーションとしてシスト等の休眠細胞の重要性が指摘されるに至り (WALL 1971, 1975, SAKO *et al.* 1984, IMAI and ITOH 1987)、赤潮発生期以外の赤潮生物の生態を明らかにすることの重要性が認識されるようになった。

以上のような観点から、本節では現場海域における *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮の発生と環境因子との関係及び本種の年間の生活様式を明らかにするため、現場調査を行った結果について述べる。まず第1節では、瀬戸内海西部に位置する周防灘の夏季調査に基づき本種の赤潮発生と環境因子との関係を調べ、大規模赤潮に至る海況的特徴を抽出した。第2節では、高知県浦ノ内湾において一年間にわたり高頻度の調査を行い、*G. nagasakiense* 栄養細胞の出現と環境因子及び珪藻類の出現との関係について述べた。

第1節 夏季の周防灘における赤潮発生と環境要因

周防灘は瀬戸内海西部に位置し、総面積は3,100 km²、平均深度は23.7mで、内海では伊予灘、播磨灘に次いで第3位の規模をもつ灘である(村上 1976)。周防灘は東部は伊予灘を経て豊後水道に、また西部は関門海峡を経て響灘に通じている。

周防灘ではこれまで *G. nagasakiense* とラフィド藻である *Chattonella* spp. による赤潮が発生し、漁業に被害が及んでいる。このうち *Chattonella* 赤潮についてはその生活史が明らかにされ (IMAI and ITOH 1987)、発生機構に関する検討がなされている (今井他 1986)。しかし、*G. nagasakiense* の生態に関しては不明の点が多く、その発生機構も解明されていない。

周防灘における *G. nagasakiense* 赤潮は灘北東部に位置する徳山湾で1957年にすでにその発生が報告されている(前川 1961)。それ以降、1962, 1964, 1965, 1967~69, 1971, 1976~80, 1982及び1984年にその赤潮発生が記録されている(池田他 1983, 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1985)。このように周防灘では *G. nagasakiense* 赤潮が頻度高く発生していることから、初

夏から盛夏にかけて現場水域での栄養細胞の分布並びに出現状態を調べ、それらと環境因子との関係を把握することは、赤潮の発生機構を知る上で重要な手がかりとなろう。

以上の背景から、本節では周防灘全域を対象水域に設定し、1985年から1987年の夏季にかけて調査を行った結果について述べる。この3年間の調査を通して *G. nagasakiense* の大規模赤潮年から赤潮非発生年にわたる極めて特徴的な年変化を観測することができた。そこで、それらの年の環境条件の差異を比較することによって大規模赤潮発生条件の抽出を試みた。

調査方法

1. 全域調査

現場調査は1985年から1987年の3年間にわたり、6月下旬、7月中旬、8月上旬及び8月下旬（1987年調査では行わず）の計4回周防灘に設けた29定点（Fig. 3-1）で、南西海区水産研究所調査船「しらふじ丸」によって実施した。各定点の0 m、5 m及び10 mあるいは海底上1 m（B-1m）層よりバンドーン採水器で採水し、生海水、あるいは10 μ m プランクトンネットで50倍に濃縮した試水を採水日当日に船上にて検鏡を済ませ、*G. nagasakiense* の細胞数を計数した。水温と塩分は鶴見精機製 STD、溶存酸素は DO メーター（YSI Model 58）を用いて、0、2、5、10 m層、そして10 m以深では10 m間隔で B-1m 層まで測定した。

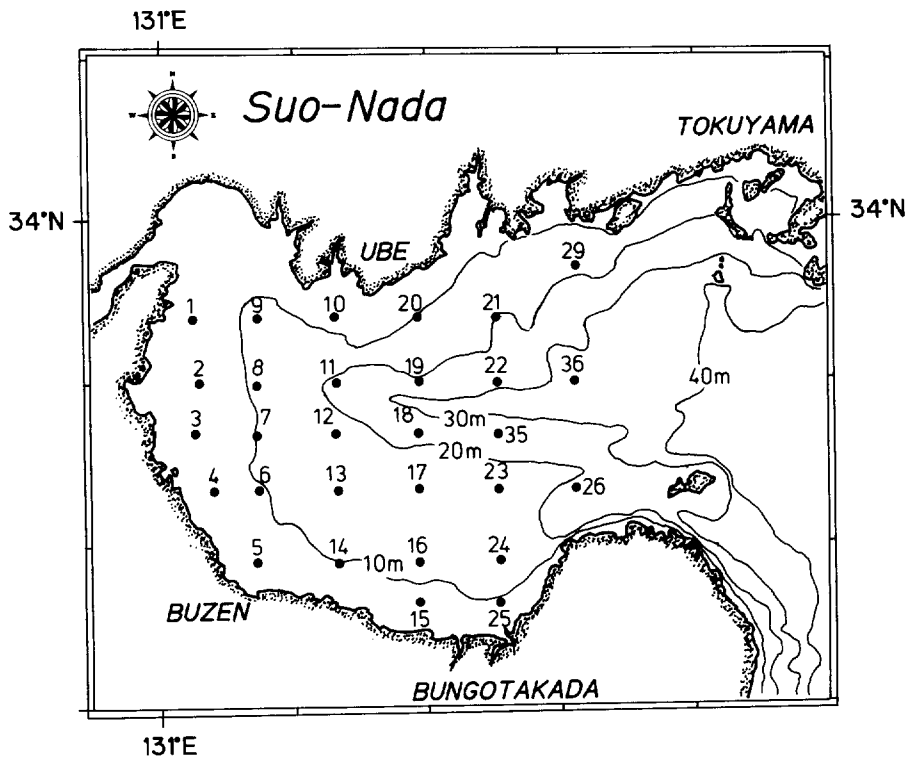


Fig.3-1. Location of the sampling stations in Suo Nada, western Seto Inland Sea.

2. 昼夜連続観測

G. nagasakiense の鉛直移動を調べるため、1985年7月17～18日に福岡県豊前市宇島港において24時間の連続観測を実施した。17日の09:00より1～4時間ごとに定点（水深8m）の0, 3, 6及びB-1m層より採水を行い、検鏡によって*G. nagasakiense*の細胞数を計数した。

結果及び考察

1. 1985年全域調査

(1) *G. nagasakiense* の分布

各調査時の各層（0, 5, 10mあるいはB-1m層）における*G. nagasakiense*細胞密度の水平分布をFig. 3-2に示す。6月下旬には栄養細胞は灘の東半分分布し、高密度域（ >5 cells m^{-3} ）は各層とも東部の灘入口付近に見られた。7月中旬になると細胞密度の増大及び分布範囲の拡大が顕著であった。すなわち、灘全域にわたって細胞密度は 10^2 cells m^{-3} 以上となり、特に灘中央部と南西部では 10^3 cells m^{-3} を越える高い細胞密度に達し、灘全域にわたる大規模赤潮の様相を呈した。8月上旬になると細胞密度は著しく低下し、灘中央部と西部沿岸域で0.5 cells m^{-3} 以下の分布が見られたに過ぎなかった。したがって、この時点で赤潮は消滅状態であったと言える。8月下旬になると、灘中央部及び東部の一部で再び1 cell m^{-3} を越える海域が見られた。以上のように1985年は灘全域に及ぶ赤潮が発生し、大規模発生年であったと言える。

(2) 水温、塩分及び溶存酸素

表層（0m層）における水温、塩分及び底層（B-1m）における溶存酸素飽和度の水平分布をFig. 3-3に、また東西方向（St.3,7,12,18,35）と南北方向（St.15,16,17,18,19,20）における水温と塩分の鉛直断面をFig. 3-4及びFig. 3-5にそれぞれ示す。

6月下旬の表面水温は21～23℃にあり、灘南部で高かった。7月中旬になるとかなり上昇し22～27℃となった。高水温域は灘中央部から南西部にかけて見られ、前述の*G. nagasakiense*の高密度分布域とほぼ一致していた。8月上旬に入ると灘全体で28～30℃となり、中央部で低く、南西部沿岸域で高い傾向を示した。8月下旬になると、灘南部と東部で比較的低い（ <27 ℃）海域が見られ始めた（Fig. 3-3）。

水温の鉛直分布によれば、6月下旬の水温は底層で16℃、表層で21℃であり、10m付近に弱い水温躍層が見られた。7月中旬には底層で17℃、表層で26℃となり、躍層は浅く5～10m層に存在した。また、灘北部では表面付近まで底層水の上昇が見られた。8月上旬になると水温は底層で20℃、表層で29℃と全体的に上昇し、著しい水温躍層が10m付近に見られた。8月下旬になるとさらに水温の上昇が進み、27℃の等温線が15m深付近にまで達した。しかし躍層は弱まる兆しがうかがえた（Fig. 3-4）。

表面塩分の水平分布によれば（Fig. 3-3）、6月下旬には灘西部を除く広い範囲で塩分は30%以下であった。7月上旬になると低塩分化がさらに進み、灘全域で30%以下、中央部から南部では27%以下に達した。8月上旬になると塩分は回復し、灘全域で30%台となった。さらに8月下旬になると31～32%にまで回復した。塩分の鉛直分布によれば6月下旬には灘南部表層で

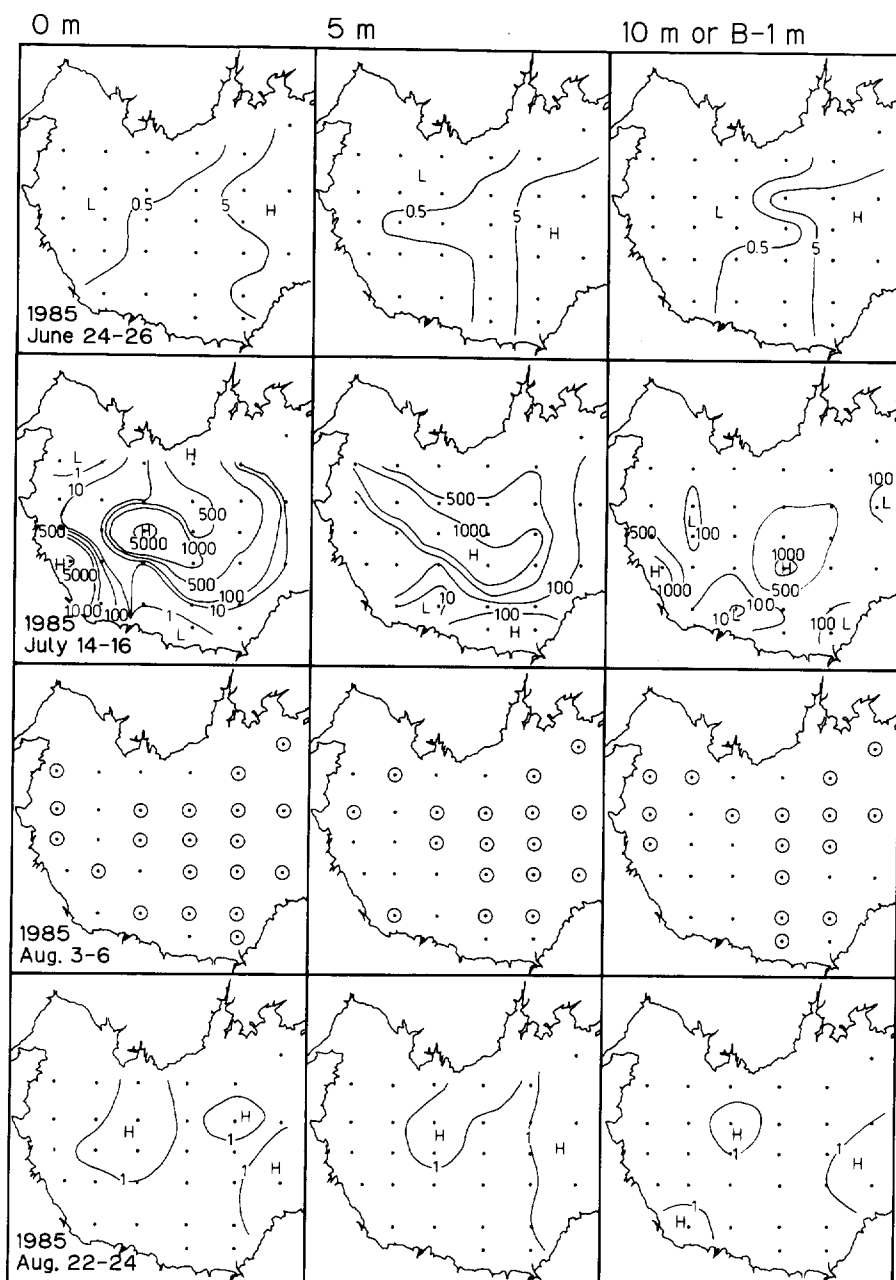


Fig.3-2. Horizontal distributions of vegetative cells of *G. nagasakiense* at 0 m, 5 m, and 10 m or B-1m depth during the summer in 1985. Numerals show the cell number (cells ml⁻¹). Circled dots in Aug. 3-6 indicate the station where vegetative cells were detected (less than 0.5 cells ml⁻¹).

若干低下していたものの、ほぼ30~33%であった。しかし、7月中旬になると著しい塩分低下が見られた。すなわち、表面から10 m層にかけて30%以下となり、10 m付近に強固な密度躍層が形成されていた。8月以降になると塩分の回復によって明瞭な鉛直分布パターンは見られなくなった (Fig. 3-5)。

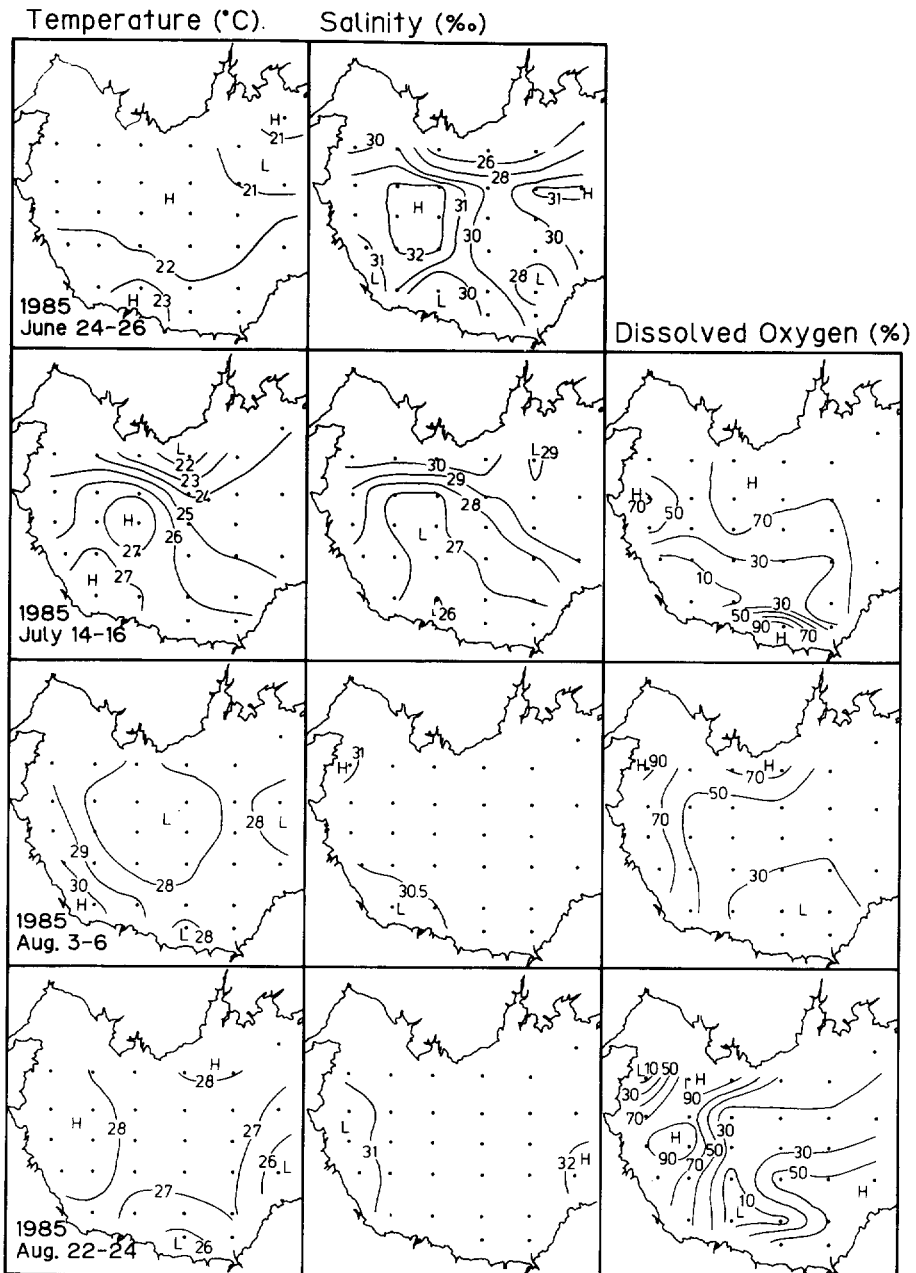


Fig.3-3. Temperature and salinity at the surface and dissolved oxygen at the bottom during the summer in 1985.

底層における溶存酸素飽和度を見ると (Fig. 3-3), 7月中旬には瀬南西部に30%以下の海域が見られ, 沿岸部では10%以下と著しく低下していた。特に飽和度の低い定点では採水時に硫化水素臭が認められた。8月上旬には中部から東部にかけて50%以下の海域が広がっており, 南部では30%を下回っていた。この傾向は8月下旬にも見られ, 瀬南部から東部にかけて飽和度は30%以下であった。

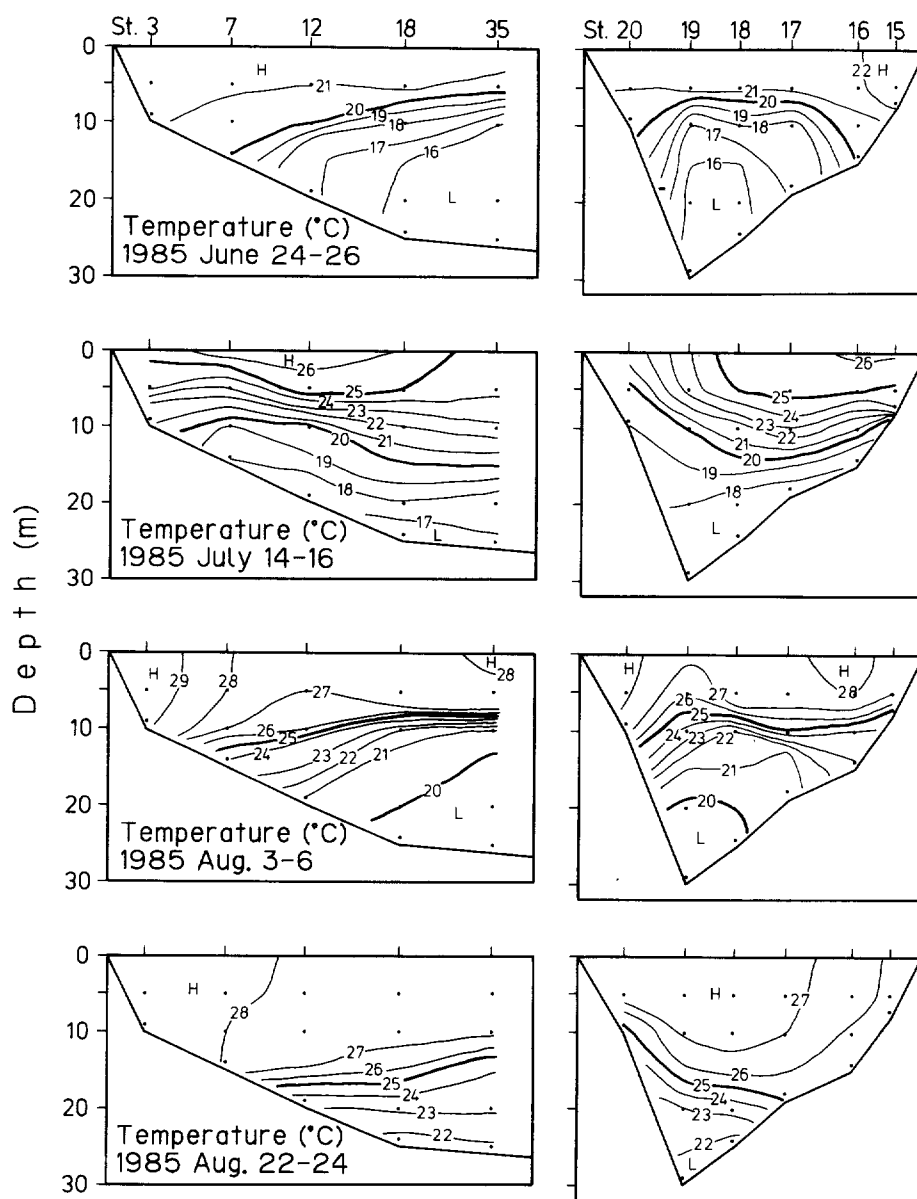


Fig.3-4. Vertical distributions of temperature along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1985.

2. 1986年全域調査

(1) *G. nagasakiense* の分布

G. nagasakiense 細胞密度の水平分布を Fig. 3-6に示す。6月下旬には灘北東部及び南部に 1 cell ml^{-1} 以上の密度で分布し、表層での分布範囲が最も広がった。7月中旬になるとほとんどの定点に分布が拡大していた。特に5m層での分布密度が高く、西部から南部沿岸域及び東部

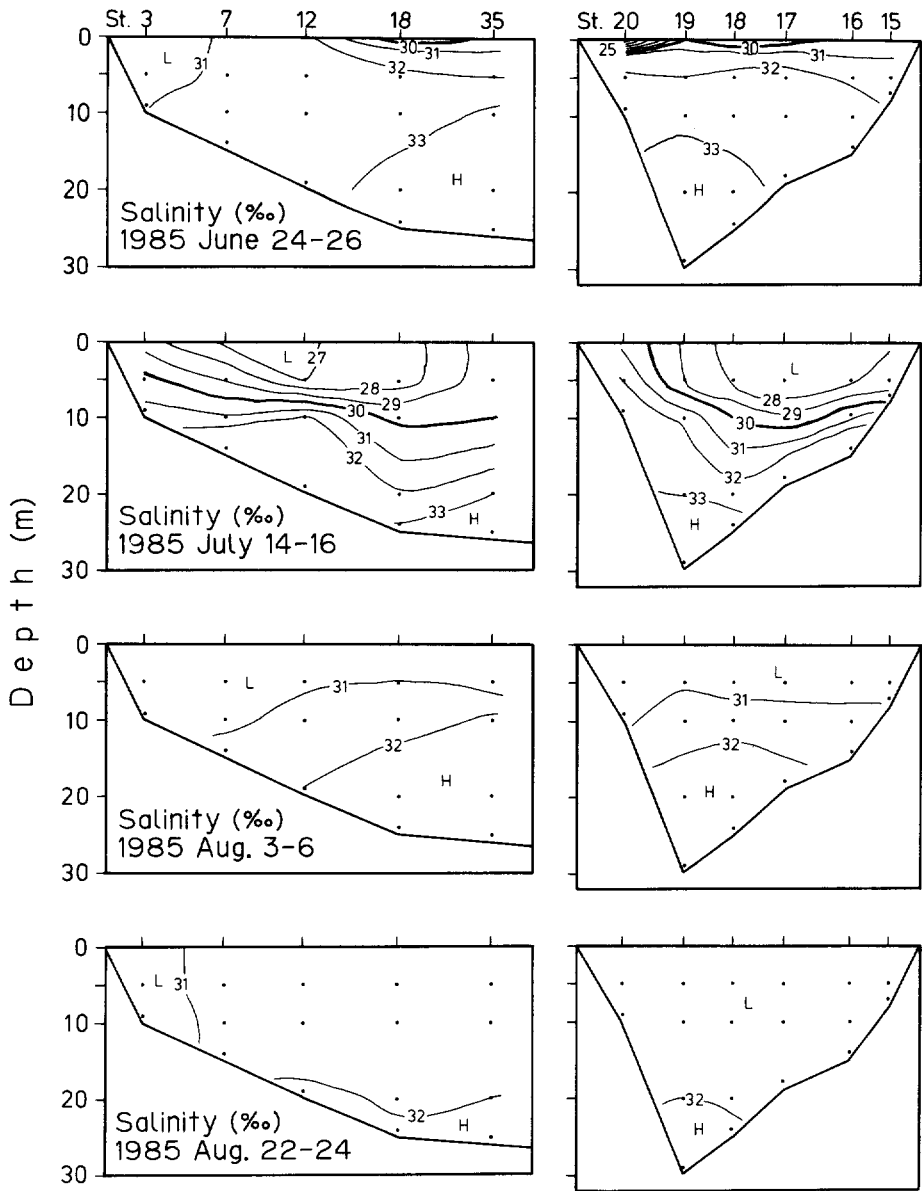


Fig.3-5. Vertical distributions of salinity along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1985.

で $10^3 \text{ cells ml}^{-1}$ を越え、局所的には $10^2 \text{ cells ml}^{-1}$ 以上に達する所も見られた。8月上旬になるとさらに細胞密度が増大し、表層と5m層では灘南東部と北部で、また底層では中央部を除く全域で $10^2 \text{ cells ml}^{-1}$ を越えていた。さらに表層では国東半島の北部で $10^3 \text{ cells ml}^{-1}$ 以上に達する細胞密度が見られた。このように1986年は細胞密度が高くなったのは8月上旬で、1985年に比べて2週間程度遅れていた。8月下旬になると細胞密度はかなり低下し、西部沿岸域に局所

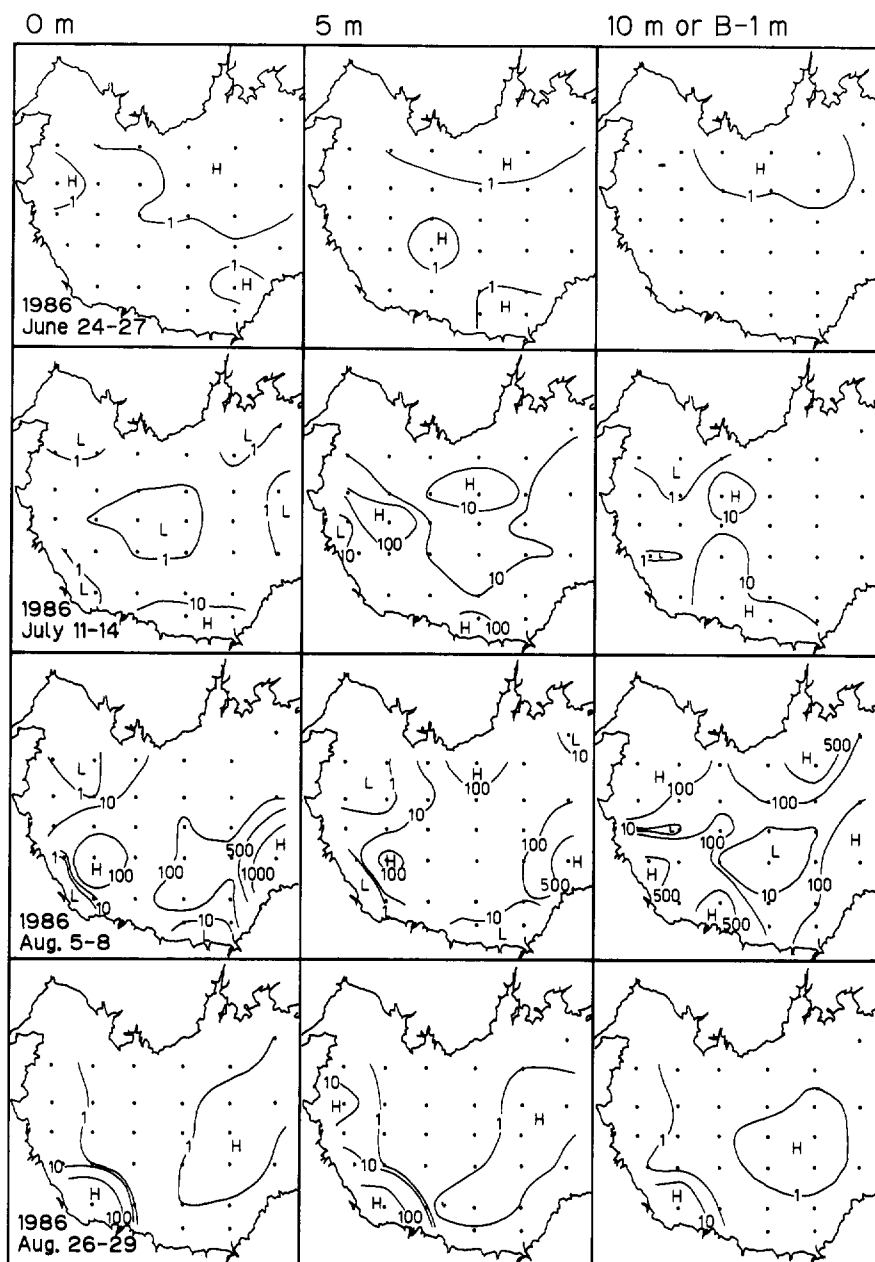


Fig.3-6. Horizontal distributions of vegetative cells of *G. nagasakiense* at 0 m, 5 m, and 10 m or B-1m depth during the summer in 1986. Numerals show the cell number (cells m^{-3}).

的に 10^2 cells m^{-3} を越える分布が見られるのみとなった。以上のように、1986年は1985年ほど大規模な赤潮発生には至らなかったものの、中規模程度の赤潮発生年であったと言える。

(2) 水温、塩分及び溶存酸素

水温、塩分及び溶存酸素の水平分布をFig. 3-7に示す。6月下旬の表面水温は $21\sim 24^{\circ}C$ で、

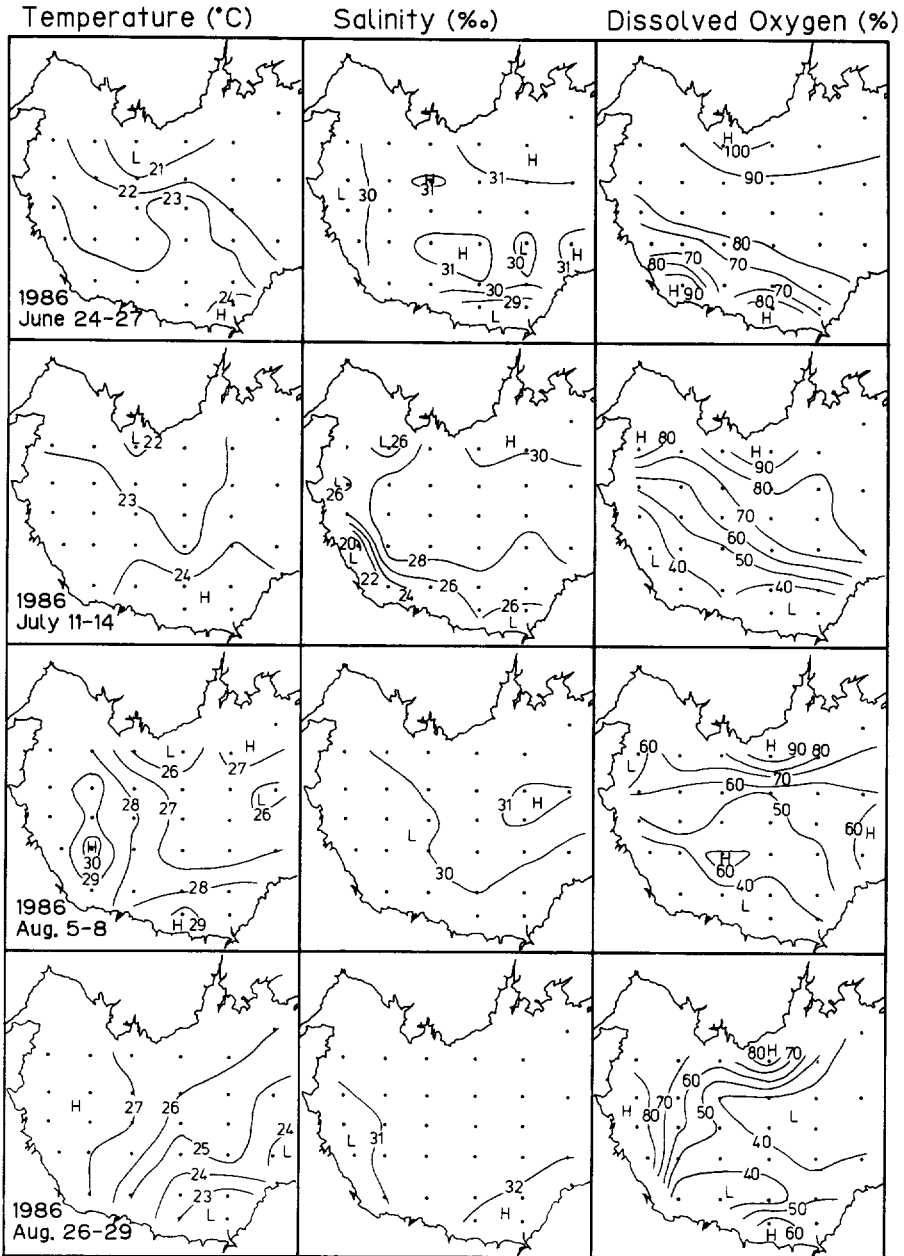


Fig.3-7. Temperature and salinity at the surface and dissolved oxygen at the bottom during the summer in 1986.

灘南部で高かった。7月中旬における水温もほぼ同範囲にあったが、南部でやや高い傾向が見られた。8月上旬になると水温はかなり上昇し26~30℃となった。高水温域は灘南部と西部沿岸域に分布していた。8月下旬に入ると水温は低下し、高水温域は灘西部のみに限られた。

東西方向及び南北方向における水温の鉛直断面をFig. 3-8に示す。6月下旬には16~23℃であり、10 m付近に弱い躍層が見られた。水温は灘西部及び南部に行くほど高い傾向がうかがえ

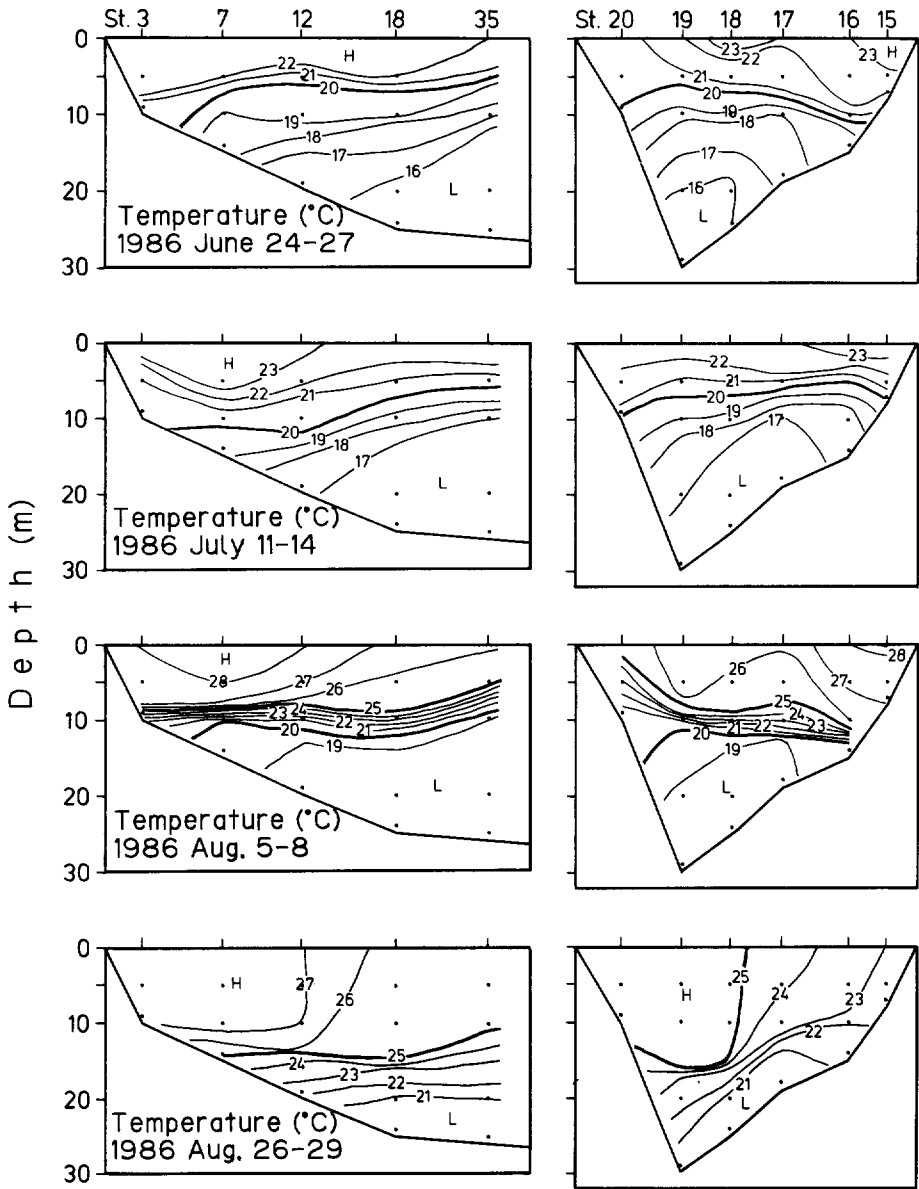


Fig.3-8. Vertical distributions of temperature along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1986.

た。7月上旬においても6月調査と同様の鉛直分布を示した。8月上旬になると10 m層に著しい水温躍層が発達し、その上下では10℃に及ぶ水温較差があった。8月下旬になると表層水の昇温がさらに進み、弱い躍層が15 m層付近に存在した。また灘南部に低温水の上昇が見られた。

表層塩分の水平分布によると (Fig. 3-7), 6月下旬には灘西部及び南部の沿岸域で30%以

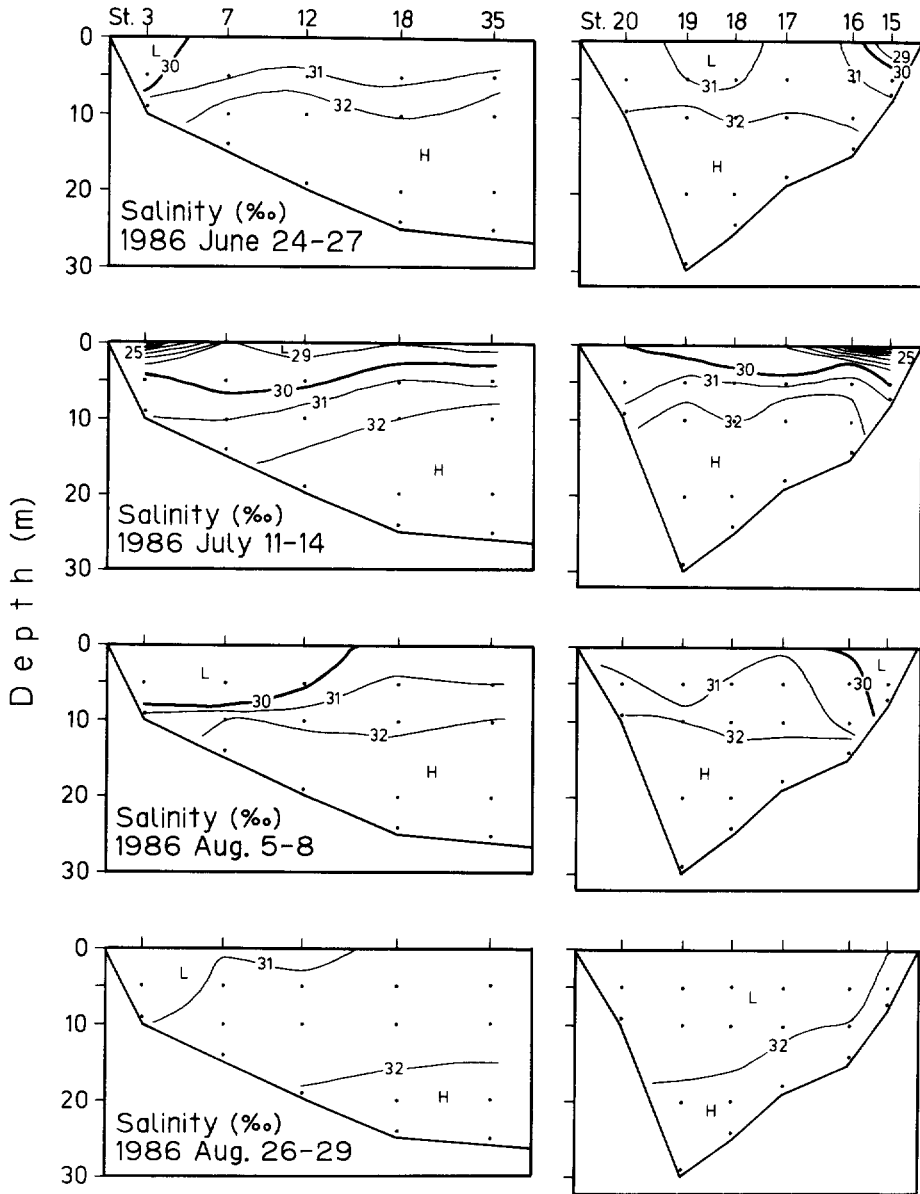


Fig.3-9. Vertical distributions of salinity along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1986.

下の海域が見られたが、その他では30~31‰であった。しかし、7月中旬になると塩分低下が起こり、灘全域で30‰以下となった。特に灘西部から南部にかけての沿岸域における塩分低下が著しく、20‰を下回る海域も見られた。8月上旬になると塩分低下の回復が見られたが、灘西部から南部では依然として30‰以下であった。8月下旬になると完全に塩分低下は解消され、灘全域で31~32‰となった。

塩分の鉛直断面を Fig. 3-9に示す。6月下旬には灘西部及び南部の表層付近で若干の塩分

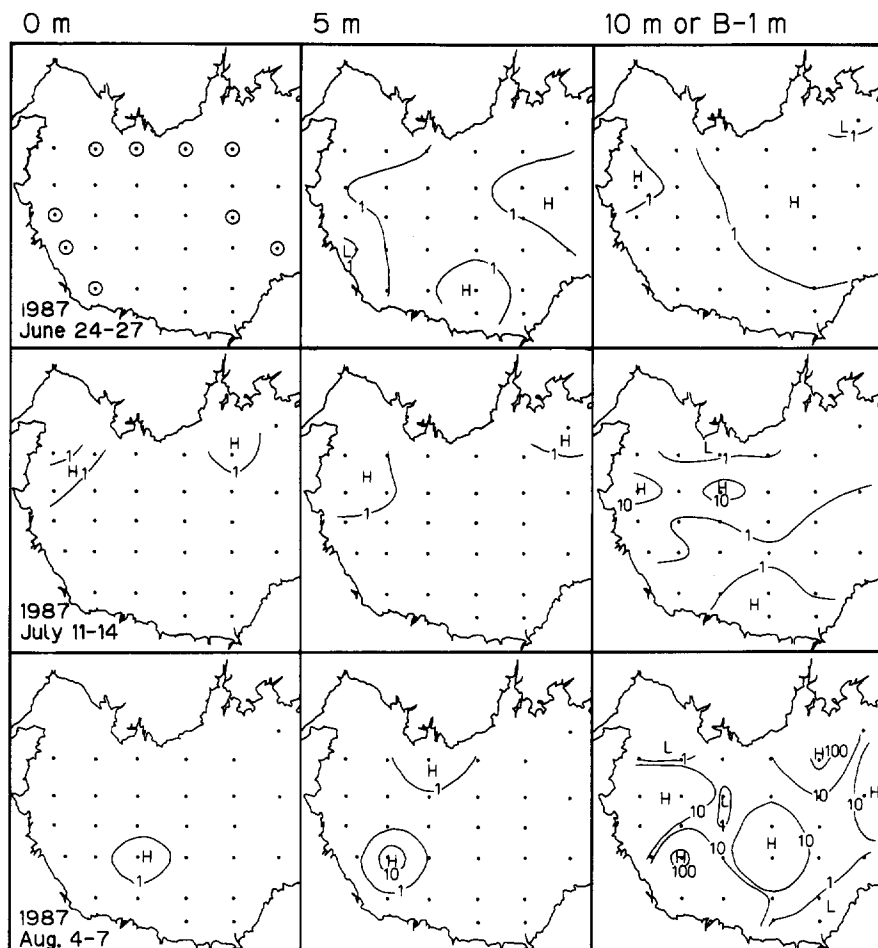


Fig.3-10. Horizontal distributions of vegetative cells of *G. nagasakiense* at 0 m, 5 m, and 10 m or B-1m depth during the summer in 1987. Numerals show the cell number (cells ml^{-1}). Circled dots at 0 m in June 24-27 indicate the station where vegetative cells were detected (less than 0.5 cells ml^{-1}).

低下が見られたものの、表層から底層まで31~32%であった。7月中旬になると表層から5m層にかけて塩分が低下したが、29%以下となったのはごく表層に限られた。そのため顕著な密度躍層は発達しなかった。8月上旬になると、灘西部の10m以浅及び南部沿岸域で30%以下の海域が見られたものの、その他の海域では31~32%であり、低塩分は解消されつつあった。8月下旬には全域で31~32%台となり、低塩分は完全に解消した。

底層における溶存酸素飽和度の分布をみると (Fig. 3-7), 6月下旬には全域で飽和度は70%以上であり、北部及び南部の沿岸域で高かった。7月中旬には灘西部から南部にかけて40%を下回る海域が見られたものの、北部ではかなり高く、1985年のような顕著な酸素飽和度の低下は見られなかった。8月上旬もほぼ7月調査時と同様の傾向が見られ、灘南部域では40%以下と低く、灘北部で高かった。8月下旬になると灘中央部から東部にかけての灘深部で飽和度は40%以下となったが、それ以外の沿岸部では比較的高かった。

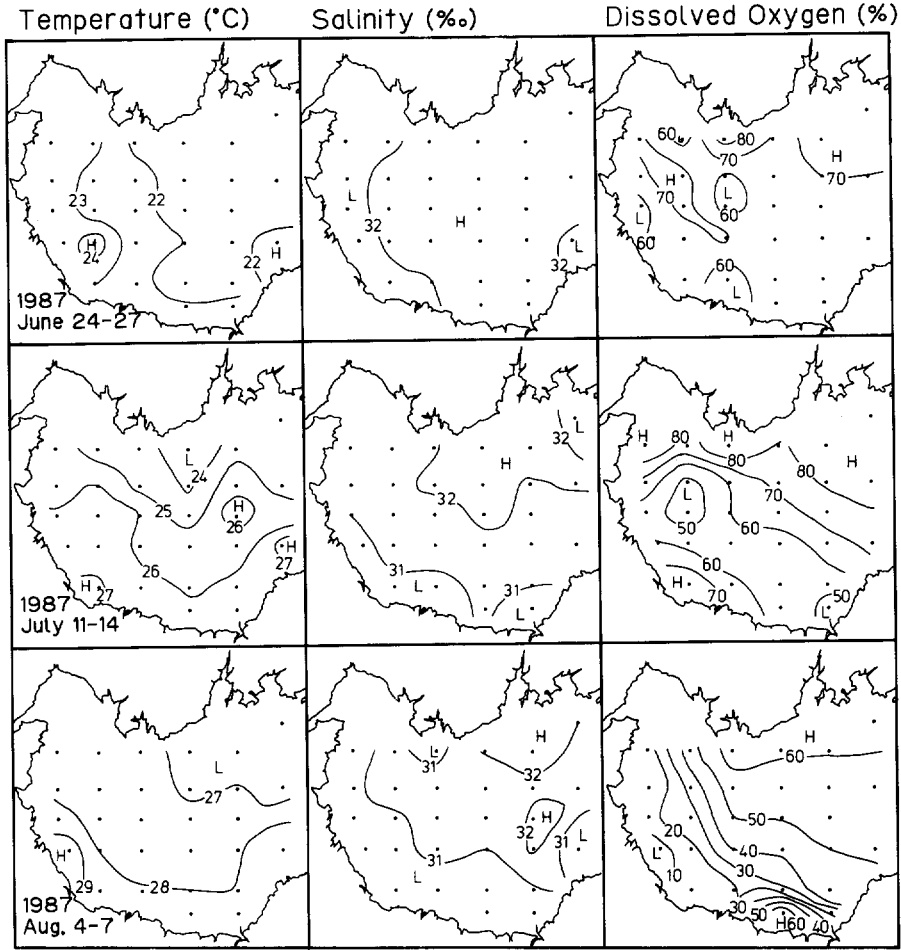


Fig.3-11. Temperature and salinity at the surface and dissolved oxygen at the bottom during the summer in 1987.

3. 1987年全域調査

(1) *G. nagasakiense* の分布

G. nagasakiense の水平分布を Fig. 3-10に示す。6月下旬の表層では灘北部、南西部及び東部の一部で1 cell ml^{-1} 程度存在した。5m以深でも同様の傾向が見られたが、底層ほど分布範囲が広い傾向が見られた。1987年は7月中旬になっても細胞密度の増加が見られず、5m以浅では灘西部及び北東部の狭い範囲で1 cell ml^{-1} 以上となったに過ぎなかった。しかし、10m (B-1m)層では灘西部から北東部にかけて帯状に1 cell ml^{-1} を越える海域が見られ、一部の定点では10 cells ml^{-1} を上回る所もあった。8月上旬になると、5m層以浅では依然として分布が局所的であり、数定点でのみ細胞が確認されるに留まった。しかし、10m (B-1m)層ではほぼ全域で1 cell ml^{-1} を越えており、灘西部から南部、中央部及び北東部で10 cells ml^{-1} を越える密度で存在した。1987年の特徴として、過去2年間に比べ *G. nagasakiense* の増殖時期が遅かったこと、表層での増殖が見られなかったこと、細胞密度が低かったことが挙げられる。以上の

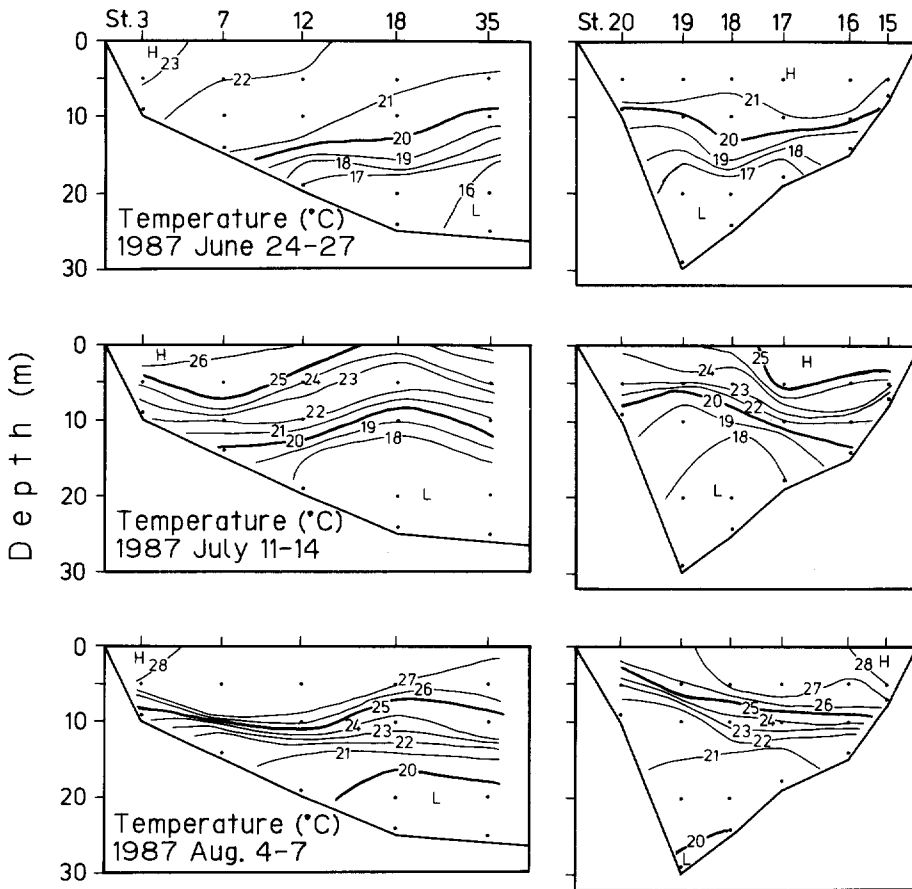


Fig.3-12. Vertical distributions of temperature along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1987.

ことから1987年は赤潮非発生年であったと言える。

(2) 水温、塩分及び溶存酸素

表層水温の水平分布をFig. 3-11に示す。6月下旬における水温は22~24℃で灘西部で高かった。7月中旬になると24~27℃となり、灘西部から南部沿岸域で高かった。8月上旬では27~29℃となり、やはり灘西部から南部で高い傾向が見られた。

水温の鉛直断面をFig. 3-12に示す。6月下旬の水温は16~23℃で、15 m付近に弱い躍層が見られた。7月中旬になると18~26℃となり、水温躍層は10 m以浅に上昇した。8月上旬では10 m付近に著しい躍層が発達し、それ以浅では27℃と全体的に水温の上昇が見られた。

表層塩分の水平分布を見ると (Fig. 3-11), 6月下旬では32‰台で過去2年に比べ高めに推移した。7月中旬になってもこの高塩分傾向は変わらず、灘南西部から南部沿岸域で若干の低塩分域 (<31‰) が見られたのみであった。8月上旬になってもこの傾向は持続した。ただし、灘西部から南部にかけて低塩分域がやや広りを見せていた。

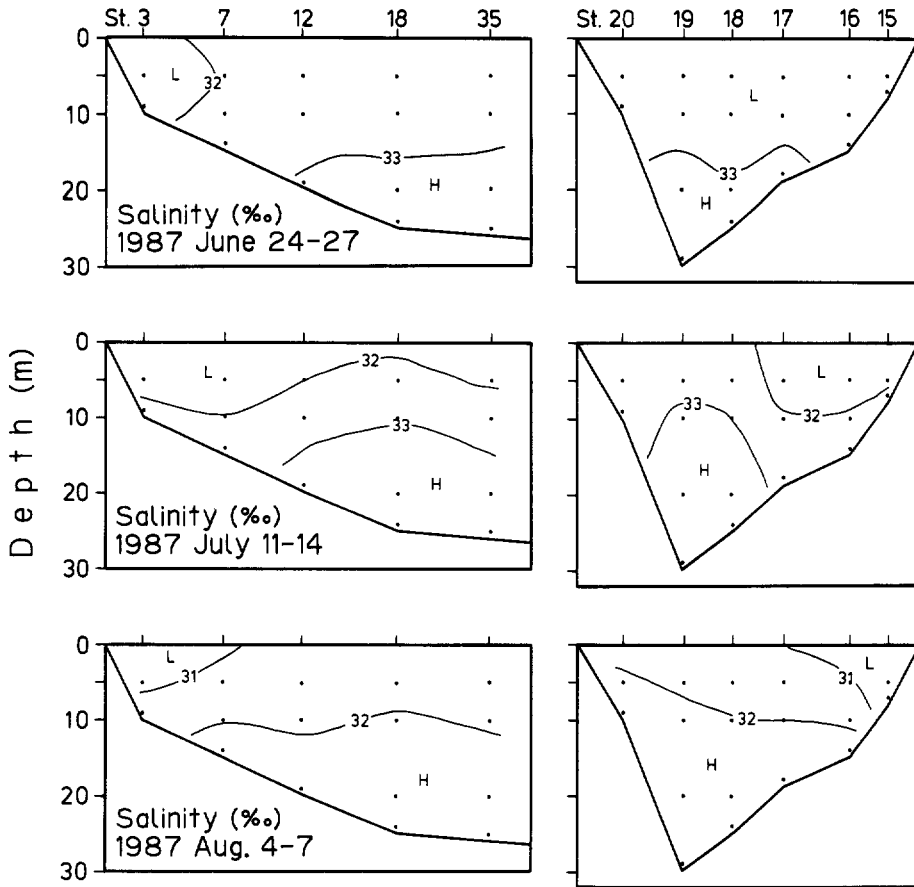


Fig.3-13. Vertical distributions of salinity along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1987.

塩分の鉛直分布 (Fig. 3-13) によれば、1987年は各調査を通して高塩分で推移し、密度躍層は全く見られず、鉛直的に一様な分布を示した。

溶存酸素飽和度の水平分布を見ると (Fig. 3-11)、6月下旬には灘全域で60%以上であった。7月中旬になっても飽和度の低下は見られず、ほぼ全域で50%以上であった。しかし、8月上旬になると灘西部から南西部沿岸にかけて飽和度30%以下の海域が見られ始めた。1987年の特徴として底層の貧酸素化の時期が8月上旬で過去2年よりも遅かったことが挙げられる。

4. 連続観測結果

宇島港における *G. nagasakiense* の鉛直分布の経時変化を Fig. 3-14に示す。鉛直分布の中心は7月17日の10:00から12:00にかけては6 m層あるいは底層 (B-1m) であったが、15:00以降には3 m層に上昇した。日没後には分布の中心は再び6 m層あるいは底層となり、特に04:00にはほとんどすべての細胞が底層に分布した。日の出以降分布の中心は次第に表層付近へ移動する傾向が見られ、18日の09:00には3 m層に最も多く分布した。以上の結果から、本種が昼夜

この3年間で最も異なった環境因子としては塩分が挙げられる。すなわち、1985年及び1986年には6月下旬から塩分の低下 (<30%) が見られ始め、7月中旬には表層塩分は全域で30%以下となった。また、この低塩分化は鉛直的にも進行し、1985年には10 m層まで、そして1986年には5 m層まで30%以下の塩分となった。さらに1985年には著しい密度躍層が発達していた。各年における降水量の資料を取りまとめた結果によれば、1985年の降水量は6月21日頃より増加し、その後10日間で約400 mmに達した(伊藤他 1986)。また1986年の6月下旬における降水量は平年値以下であったが、7月上・中旬では平年より多く、特に中旬には平年の2倍以上(350 mm)の降雨が記録されている(伊藤他 1987)。したがって、このような多量の降雨が灘全域に及ぶ低塩分化の原因となったことは間違いない。しかし、1987年には6月下旬にほとんど降雨が無く、7月中旬に200 mm程度の降水量が記録されたものの(板倉他 1988)、大規模な低塩分化には至らなかった(Fig. 3-11)。一方、日照時間を見ると、1985年には7月上旬より著しく増加したことが報告されている(伊藤他 1986)。また、1986年にも7月下旬から8月上旬にかけて晴天の日が多かったようである(伊藤他 1987)。これらのことから、周防灘における *G. nagasakiense* の大規模赤潮発生年の特徴としては、6~7月中旬にかけてのいわゆる梅雨期に多量の降雨があり、それによって著しい密度躍層が発達し、さらにそれがかなり長期間持続するといった海況条件が挙げられる。

著しい密度躍層が形成されると水塊の鉛直安定度が増大し、表層水と底層水との混合が悪くなる。さらに多量の降雨によって陸上から流入した有機物が沈降・分解することによって、底層に貧酸素水塊が形成される。実際に、1985年には灘南部全域にわたって著しい溶存酸素飽和度の低下が見られている(Fig. 3-3)。このような溶存酸素の低下は海底泥からの各種栄養塩及び増殖促進物質の溶出を引き起こすことが知られている(HIRAYAMA and NUMAGUCHI 1972, 本城 1979)。ちなみにこの3年間の栄養塩(DIN及び $PO_4\text{-P}$)の平年値に対する偏差を伊藤他(1990)に基づき Tabel 3-1に示した。Tabel 3-1 から明らかのように、1985年及び1986年の6、7月には平年値をはるかに上回る栄養塩が存在していたことが判る。これらの栄養塩は降雨に伴う陸上からの補給に加えて、前述のように貧酸素化に伴う底層からの溶出もかなり寄与しているものと思われる。このように、1985年と1986年の赤潮は飯塚・入江(1969b)が大村湾で述べているような「降水性赤潮」と「無酸素化関連赤潮」の両側面を備えているようである。すなわち、周防灘の場合には降雨と貧酸素水塊の形成及びその規模の拡大とが関連しており、それらが赤潮の発生に影響を及ぼしているものと推察される。伊藤他(1990)は、過去12年間の資料を整理し、周防灘において発生した *G. nagasakiense* 赤潮は、1978年の一例を除き、常に平年値を大きく上回る集中的な降雨の後で発生することを認めている。

今井(1990)は周防灘のこの3年間における *Chattonella* の出現の年変化を調べている。それによれば、1985年及び1986年には濃縮によって辛うじてその栄養細胞が検出できる程度であったのに対して、1987年には7月中旬から8月上旬にかけて 10^2 cells ml^{-1} 以上の増殖が見られている。このような出現パターンは *G. nagasakiense* の場合とは全く逆であり、両種が増殖生理的に異なることを示唆するものである。彼は *Chattonella* の出現を左右する環境因子として日

Table 3-1. Summary of DIN and PO₄-P concentrations (comparison with average year) at surface and bottom waters in Suo Nada from 1985 to 1987. Numerals indicate μ M. Symbols + and \pm show more than and same as average year, respectively. (after ITOH *et al.* 1990)

			1985	1986	1987
June	Surface	DIN	+ 6.0	+ 5.0	\pm
		PO ₄ -P	+ 1.0	+ 0.1	\pm
	Bottom	DIN	+ 4.0	+ 2.0	\pm
		PO ₄ -P	+ 0.5	+ 0.3	\pm
July	Surface	DIN	\pm	+12.0	\pm
		PO ₄ -P	+ 0.1	+ 0.8	\pm
	Bottom	DIN	+10.0	+ 3.0	+10.0
		PO ₄ -P	+ 0.3	\pm	+ 0.2
Aug.	Surface	DIN	\pm	\pm	\pm
		PO ₄ -P	\pm	\pm	\pm
	Bottom	DIN	\pm	\pm	\pm
		PO ₄ -P	\pm	\pm	\pm

照時間が重要であると考察している。

以上の結果をまとめると、周防灘における *G. nagasakiense* の大規模赤潮発生は次のような過程を経て引き起こされたものと考えられる。まずシードポピュレーションとしては6月下旬にすでに灘全域に分布していた *G. nagasakiense* の栄養細胞が挙げられる。その後水温の上昇につれて本種の増殖に好適な水温条件が整えられて行く。梅雨期（6月から7月中旬）における多量の降雨は陸上からの栄養塩の供給を行うとともに、灘全域に及ぶ低塩分化をもたらす。加えて梅雨後の日射量の増加によって表面水温が上昇し、著しい密度躍層を発達させる。このような水塊の鉛直安定度の増加は渦鞭毛藻の増殖に有効となることが知られている (POLLINGHER and ZEMEL 1981)。また底層の貧酸素化によって海底泥からの栄養物質の溶出が促進されることで、栄養環境的にも本種の増殖に好適な環境が形成される。さらに低塩分そのものも本種の増殖に有効であることも考えられる。このような環境下で、*G. nagasakiense* は昼間は光合成に適度な光条件を求めて表・中層に集まり、夜間は栄養塩が豊富な底層に移動するといった鉛直移動を行いながら個体群密度を増大させる。多量の降雨はその裏返しとして日照時間の減少をもたらし、他の植物プランクトンの増殖には不適な環境となり、競合種の排除に役立つであろう。1985年と1986年における *Chattonella* の出現密度の低下はこのことを示唆している (今井 1990)。以上のような過程を経て *G. nagasakiense* の赤潮が形成されていったものと考えられる。

第2節 浦ノ内湾における出現の季節変化

浦ノ内湾は土佐湾のほぼ中央に位置し、東西方向に横たわる半島によって外海から隔たれた深い入江であり、行程はほぼ12 kmである。本湾は沈降性峡湾であるため、湾内には多くの枝湾が発達している。湾口には大きな砂州が発達しており、水深は最深部で17~19 mである。また流入河川がないため、水質の激変は梅雨時、豪雨時にみられる(大野他 1971)。面積は約10 km²である(高知県水産試験場 1979)。

浦ノ内湾では大正時代から真珠養殖が行われていたが、1966年の水揚げピーク以降減少し、現在ではほとんど行われていない。これに代わって1967年以降大規模なハマチ養殖が行われるようになったが(西島 1985)、閉鎖水域であるため赤潮の発生、水質の悪化及び魚病の蔓延等をきたしている(高知県水産試験場 1979)。特に *G. nagasakiense* 赤潮は高知県が水産庁の赤潮情報交換事業に参加した1978年以降では、1978, 1980, 1981, 1982, 1988, 1989年に発生しており、そのほとんどでハマチ等への漁業被害を引き起こしている(水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1979~1990)。

本湾は前述のようにかなり閉鎖性が強く、また流入河川の影響がほとんど無いなど周年にわたって植物プランクトンの出現を調査するのに非常に適した内湾と言える。本節では同湾を対

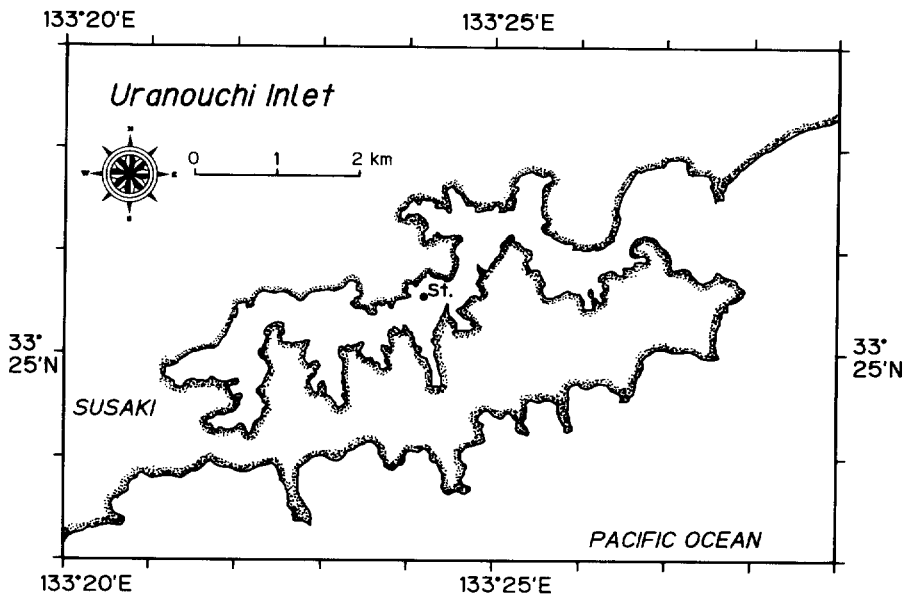


Fig.3-15. Location of the sampling station in Uranouchi Inlet, Kochi Prefecture.

象水域として一年間にわたり高頻度で調査を実施し、*G. nagasakiense* 及びその他植物プランクトンの出現生態を調査した結果について述べる。

調査方法

現場調査は1989年4月から1990年4月の一年間にわたり、浦ノ内湾中央部に設けた定点 (Fig. 3-15) で高知県水産試験場の協力のもとで実施された。調査間隔は春季から秋季にかけては毎週一回、冬季には隔週に一回とした。定点の0, 2, 5, 10, B-1m層より採水を行い、調査日に保温容器に梱包されて宅配便にて南西海区水産研究所に送付された。採水時に各層における水温と塩分の測定も実施した (サリノメーター, EIL社 Type MC-5)。調査日の翌日採水試料が水産研究所に到着した後、その各層ごとの生試水の各々 1 ml を数回検鏡し、*G. nagasakiense* 及び珪藻類の細胞数を計数した。生海水中で *G. nagasakiense* が検出できなかった場合には各層試水を混合し、ガラス繊維濾紙 (Whatman GF/C, ϕ 150 mm) によって常圧濃縮後 (濃縮率は約30~1,400倍) 検鏡を行った。

結果及び考察

浦ノ内湾における水温と塩分の季節変化をFig. 3-16に示す。まず同湾における水温は11.9~29.5°Cの範囲で推移した。季節的にみると、4月上旬から6月下旬にかけては水温は鉛直的に一様な分布を示したが、7月上旬から成層が発達し始め、表層ほど高温となった。表層と底層との水温較差は最大5°C程度であった。最高水温は8月上旬に見られた。その後、9月中旬になると成層が崩れ、鉛直的にほとんど一様な分布となり、混合期の開始が示唆された。10月から12月下旬にかけて水温は急激に低下し、1~2月に最低水温期を経た後、翌年3月頃から再び水温が上昇し始め、4月までその状態で推移した。一方、塩分の推移をみると4月は比較

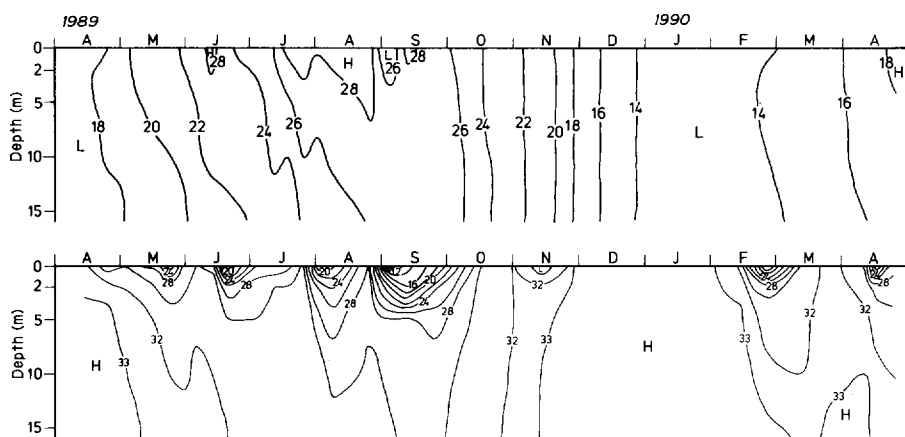


Fig.3-16. Seasonal changes in temperature (°C : upper panel) and salinity (‰ : lower panel) in Uranouchi Inlet during the period from Apr. 1989 to Apr., 1990.

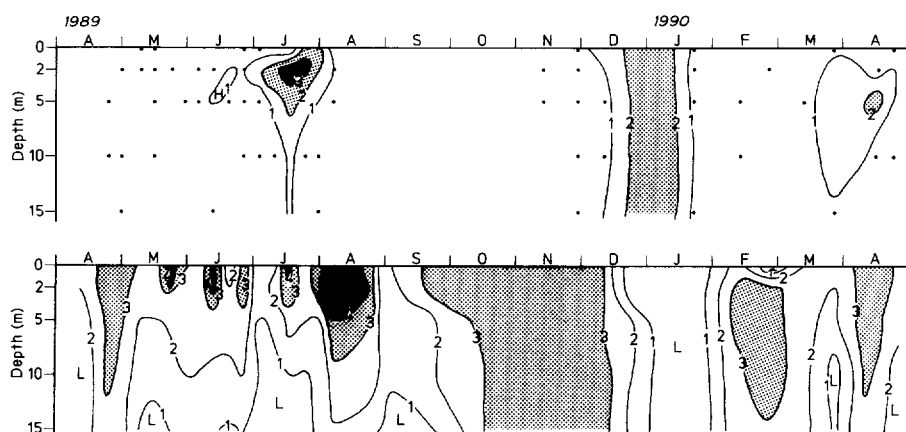


Fig.3-17. Seasonal changes in cell density of *G. nagasakiense* (upper panel) and diatoms (lower panel) in Uranouchi Inlet during the period from Apr. 1989 to Apr., 1990. Numerals in the contour indicate the log number of cells per milliliter. Dots in the upper panel indicate that the log number of *G. nagasakiense* cells are less than 1.0.

的高塩分であったが、5月から10月中旬にかけては2～5m層以浅で塩分の低下(<30%)がしばしば見られた。特に8、9月にはかなりの低塩分で推移し、鉛直的には塩分躍層が発達していた。一方、5m以深では周年にわたり塩分較差が小さく、低塩分は9月に、また高塩分は12月から1月にかけて認められた。10月中旬以降では鉛直混合によって塩分の分布は一様となり、この傾向は2月上旬まで続いた。その後、3月には表層で若干の塩分低下が見られたものの、比較的高塩分で推移した。以上の結果から、浦ノ内湾の水温・塩分環境は高水温期には低塩分、低水温期には高塩分といった内湾域に一般的に見られる傾向を示すことが判明した。

同湾における *G. nagasakiense* 及び珪藻類の細胞密度の季節変化を Fig. 3-17 に示す。調査期間を通して生海水中に栄養細胞が観察されなかったのは1989年8月24日から10月30日までの期間であった。また、濃縮試料によっても *G. nagasakiense* が観察されなかったのは1989年9月5日と25日の2回の調査のみ(濃縮率はそれぞれ1,250倍, 860倍)であった。しかしその前後の調査日には細胞が観察されていることから、これらの2回の際にも非常に低密度で存在していた可能性がある。したがって、浦ノ内湾では周年にわたって *G. nagasakiense* の栄養細胞が存在するものと考えられる。他海域においても冬季に本種の栄養細胞が観察されており(中田・飯塚 1987, 寺田他 1987, HONJO *et al.* 1990, 板倉他 1990, 保坂 1990), ある程度以上の水温が保証される海域では本種は栄養細胞で越冬するものと考えられる。浦ノ内湾の沖合い海域である土佐湾において *G. nagasakiense* の分布調査を行った結果によれば、ごく沿岸域を除いて栄養細胞は観察されていない(高知県水産試験場 1988)。したがって、同湾における *G. nagasakiense* 赤潮は湾内に存在する細胞を起源としているものと思われる。

遊泳細胞が比較的高密度($>10^2$ cells ml^{-1})となったのは、1989年7～8月, 同年12月中旬から1990年1月下旬及び1990年4月中旬の計3回であった。その際の水温・塩分条件は、それぞれ

れ23~29.2°Cと19~31.7% (7~8月), 12.3~14.3°Cと33.4~33.7% (12~1月), 15.3~17.4°Cと20.5~33.1% (4月)であった。最高出現密度は7月17日の2m層で観察された3,750 cells ml^{-1} であった。また鉛直分布の中心は、表面から海底まで一様であった12~1月の場合を除き、2~5m層にあった。HONJO *et al.* (1990)によれば、*G. nagasakiense*の鉛直分布はその細胞密度によって分布層が異なり、 10^3 cells ml^{-1} 以下では5~10m層に、それ以上の細胞密度では0~2m層に多く分布するとされている。また大村湾では分布の中心が10m層にあるとされており(飯塚・入江 1969b)、増殖段階及び海域によって分布層が異なる可能性がある。さらにこのような分布層はその時点における日射量によっても影響される可能性がある。実際に1985年の周防灘における大規模赤潮の際には *G. nagasakiense* の鉛直分布が天候によって変化し、晴天時には中層で、また曇天時には表層に分布することが観察された。したがって、このような鉛直分布を説明するためには光条件に対する本種の増殖応答を明らかにする必要がある。

珪藻類の出現の季節変化を見ると (Fig. 3-17)、4月の下旬に *Skeletonema costatum* 及び小型の *Nitzschia* sp. による 10^3 cells ml^{-1} を越える増殖が見られたが、それ以降8月の初めまでは表層における散発的な増殖に終始した。この期間の主たる構成種は小型の *Chaetoceros* spp. 及び *Nitzschia* spp. であった。また降雨による表層塩分の低下の後にそれらの増殖が見られる傾向があり、陸上からの栄養塩の補給にその増殖が依存していることがうかがえた。8月に入ると 10^4 cells ml^{-1} を越える増殖が見られたが、この際にも微細な *Chaetoceros* spp. が主体であった。その後一時的に細胞密度は減少したが、9月下旬から12月上旬にかけては表層から底層に及ぶかなり大規模な増殖が見られた。この期間の構成種は、前半は *Leptocylindrus* sp. 及び *Hemiaulus* sp. で、また後半は *Nitzschia* spp., *Chaetoceros* spp., *Asterionella japonica* が主体であった。この時期は混合期であり (Fig. 3-16)、温帯域に見られるいわゆる秋のブルームと考えられる。12月から2月中旬にかけては細胞密度はかなり減少したが、それ以降 *S. costatum* を主体とした増殖が2月後半と4月に観察された。珪藻類の増殖時期の水温をみると14~26°Cで (Fig. 3-16)、高水温期及び低水温期での出現は少なかった。

G. nagasakiense の出現の季節変化と珪藻類のそれとを比較すると、両者の出現には負の相関関係が見られた。すなわち、*G. nagasakiense* は珪藻類の細胞密度が低い場合に多く出現する傾向が見られた。このことは両者の間に何等かの競合関係が存在するか、あるいは両者が増殖生理的に異なった特性を有することを示唆するものである。

以上のように浦ノ内湾においては *G. nagasakiense* は周年存在し、夏季及び冬季の増殖はそれらの細胞に起因していることが示唆された。また、珪藻類との間に何等かの競合関係が存在することが示唆されたことから、培養実験によるその要因の解明が必要となろう。

第IV章 *Gymnodinium nagasakiense* の増殖に及ぼす物理・化学的要因

赤潮の発生機構を解明するための研究法には大きく分けて二つの取り組み方がある。その一つは、海況・気象条件などの環境因子の変動と赤潮発生との因果関係を明らかにしようとする環境面からの調査・研究であり、もう一方は赤潮原因生物の増殖生理や生態の解明といった生物学的方面からのアプローチである(岩崎 1973)。赤潮現象は様々な因子が複雑に絡み合って起こると考えられることから、環境面からの研究のみでは不十分であり、生物学的な面も含めた両側面からの研究が有機的に連携される必要がある。前章(第三章)では、現場調査に基づき *G. nagasakiense* の大規模赤潮発生年における海況の特徴を明らかにするとともに、*G. nagasakiense* と他種植物プランクトンとの間に種の交替現象が見られることを示した。このような現場調査は前者の環境面からの取り組み方と位置付けられる。しかし、生理学的な裏付けがなされなければ、現場海域で赤潮現象と環境因子との相関関係が得られたとしても、単なる現象の記載に終わってしまうであろう。したがって、現場調査から得られた環境因子と *G. nagasakiense* の相互関係に対して直接的な証拠を提供するために、実験的な解析が必要となる。

赤潮は海水が着色するほど微細藻類が増加する現象であることから、その原因生物が高密度に増殖することが必要条件であることは言うまでもない(岩崎 1973)。したがって、赤潮の発生機構を論ずる上で、その種の増殖最適条件を明らかにすることが第一に重要な課題となる。ところで、赤潮現象は微細藻類の大増殖のみならず、特定種による場の独占という生態学的な特徴を有する。Gause の競争排除則(Competitive exclusion principle)に従えば、類似した生理要求を持つ2種は同じ生息場で共存できない(HARRIS 1986)。このことは赤潮形成種と他種との間に何等かの生理特性の差異が存在することを意味する。したがって、赤潮形成種及びそれと競合関係にある他種植物プランクトンの生理特性を比較検討する必要がある。代表的な赤潮ラフィド藻である *Chattonella antiqua* や *Heterosigma akashiwo* については、その増殖特性がかなり明らかにされている(岩崎・佐々田 1969, 岩崎 1971, TOMAS 1978, 1979, 1980, WATANABE *et al.* 1982, NAKAMURA and WATANABE 1983a, b)。しかし第I章で述べたように *G. nagasakiense* に関する知見は非常に少ない。

自然条件下では赤潮原因藻も他の植物プランクトンと同様、光、水温、塩分、栄養塩、種間競合や捕食圧等、様々な環境因子の制約の下にある。そのような中で赤潮原因種が大増殖に至るためには、それらの制限因子からの解放が必要となる。したがって、赤潮の発生機構を知るためには、どのような環境因子が増殖の制限要因になっているのかを明らかにしておくことが重要である。ここで言う制限要因とは、Liebig の最小律で定義されるような因子の欠乏のみを指すのではなく、過剰な場合の影響もそれに含まれるべきである。例えば、高濃度のアンモニア態窒素によって藻類の増殖が阻害されるような場合(NAKAMURA and WATANABE 1983b)がそれに相当するであろう。このように制限要因はある範囲、すなわち耐性限界(生物が耐え

られる上限と下限), と解釈すべきであると考えられる。さらに, 環境因子間に相互関係があり, ある因子の変化に伴って別の因子に対する最適条件や耐性限界が変化する可能性があることに注意しておく必要がある。

以上の観点から, 本章では赤潮原因藻を分離して無菌培養によってその生理生態特性を定量的に明らかにし, 増殖生理の面から赤潮の発生に必要な条件を解明することを目的とした。まず第1節で光強度, 水温及び塩分が増殖速度に及ぼす影響を明らかにするとともに, それらの関係の定式化を行った。第2節と第3節では *G. nagasakiense* と出現の交替現象が見られた *Chattonella* spp. 及び珪藻類の増殖生理を調べ, *G. nagasakiense* との競合関係を比較検討することによって本種の生理・生態特性について論じた。第4節では形態別に栄養塩の利用能を調べ, その結果に基づき栄養塩制限下における増殖の動力学を解析した。これらの結果から増殖特性, すなわち増殖最適条件及び耐性限界, を明らかにすることによって, 赤潮の発生機構について考察した。

第1節 *G. nagasakiense* の増殖に及ぼす光強度, 水温及び塩分の影響

光は光合成を行う植物プランクトンにとって最も基本的な因子であるし, 水温は細胞内の物質及びエネルギー代謝に関わる各種の生化学反応を通じて増殖に影響を及ぼすであろう。また塩分は細胞内成分や浸透圧に対する作用を通じて影響を及ぼすことが考えられる。このように光, 水温及び塩分は植物プランクトンの増殖に影響を及ぼす物理的な環境因子の中でとりわけ重要な因子であると言える。また, これらの環境因子が植物プランクトンに対して相乗的あるいは干渉的に作用することが報告されている (TOMAS 1978, NORRIS and CHEW 1975)。

前章(第III章)では現場調査を通じて, 赤潮発生時における水温, 塩分等の海況の特徴, 栄養細胞出現の季節変化, 鉛直分布及び他種植物プランクトンとの相互関係等, *G. nagasakiense* の生態的特性が明らかにされた。本節ではこれらの結果を踏まえ, *G. nagasakiense* の培養株を用いてその増殖に及ぼす光強度, 水温及び塩分の影響を調べ, 増殖特性から見た本種の赤潮発生機構について考察する。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験に用いた *G. nagasakiense* は1985年に周防灘より分離し, マイクロピペット洗浄法(岩崎1967)により無菌化したクローン株(G303 AX-2株)である。継代培養及び実験には海水強化培地である改変 SWM-3(CHEN *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987)を用いた。無菌検査は SWM-3を基本とした ST10¹培地 (ISHIDA *et al.* 1986) による培養法及び DAPI 染色による細菌の直接観察法(今井 1984) によった。

2. 増殖速度に及ぼす光強度の影響

光強度100 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で前培養を行った *G. nagasakiense* を培地300 ml (塩分は31%) を分注

した500 ml容の三角フラスコ10本に接種した。培養温度は25°C, 光強度は $10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ から $190 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ までの10段階で培養を行った。光源は白色蛍光灯によった。また, 明暗周期は14hL:10hDとした。培養開始後15日間にわたり1日おきに細胞数を計数し, 片対数グラフにプロットした。その直線部分(対数増殖期)について最小自乗法により増殖速度(μ ; divisions day⁻¹)を計算した(GUILLARD 1979)。すなわち,

$$\mu = \frac{n \sum_{i=1}^n (t_i \ln C_i) - (\sum_{i=1}^n t_i) (\sum_{i=1}^n \ln C_i)}{[n \sum_{i=1}^n (t_i^2) - (\sum_{i=1}^n t_i)^2] \ln 2} \quad (1)$$

ここで, t_i は培養日数(day), C_i は t_i 日における細胞数(cells ml⁻¹), n はサンプル数をそれぞれ示す。増殖速度と光強度の関係式には, (2)式で表せる直角双曲線モデル(LEDERMAN and TETT 1981)を改変したモデルを適用した。

$$\mu = \mu_m \frac{I - I_0}{(K_s - I_0) + (I - I_0)} \quad (2)$$

ここで, μ は増殖速度(divisions day⁻¹), I は光強度($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), I_0 は光強度のいき値, μ_m は最大増殖速度, K_s は $\mu_m/2$ を与える光強度をそれぞれ示す。そして(2)式への当てはめは, 次の関数 $f(\mu_m, I_0, K_s)$ を最小にするパラメータの値をシンプレックス法による逐次計算によって求めることにより行った。

$$f(\mu_m, I_0, K_s) = \sum_{i=1}^n [\mu_i - \mu_m (I_i - I_0) / (K_s + I_i - 2I_0)]^2$$

ここで μ_i は増殖速度, I_i は光強度の測定値である。

3. in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度の測定

細胞数の計数に代わるより迅速で簡便な生物量の測定法として, in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度測定法(BRAND *et al.* 1981)の検討を行った。培地3 literを入れた平底フラスコに *G. nagasakiense* を接種し, 温度22°C, 光強度 $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12hL:12hDの明暗周期で培養を行った。1日おきに培養の一部を取り出して細胞数及びin vivo クロロフィル蛍光の測定を行い, 培養日数の経過に伴う両者の変化を調べた。蛍光値は蛍光光度計(TURNER DESIGNS 社製 model 110)で, 細胞数は検鏡によってそれぞれ測定した。

4. 増殖に及ぼす水温と塩分の影響

水温と塩分の影響は2因子要因計画実験によって調べた。SWM-3 培地の塩分濃度は基本海水を超純水により希釈し, 10, 15, 20, 25, 30%の5段階に調整した。また培養温度は, 10, 15, 20, 25, 30°Cの5段階に設定した。培養実験はこれら水温と塩分のすべての組合せ, すなわち25通りについて実施した。保存株をこれらの実験条件に馴致させるため, 以下の継代培養

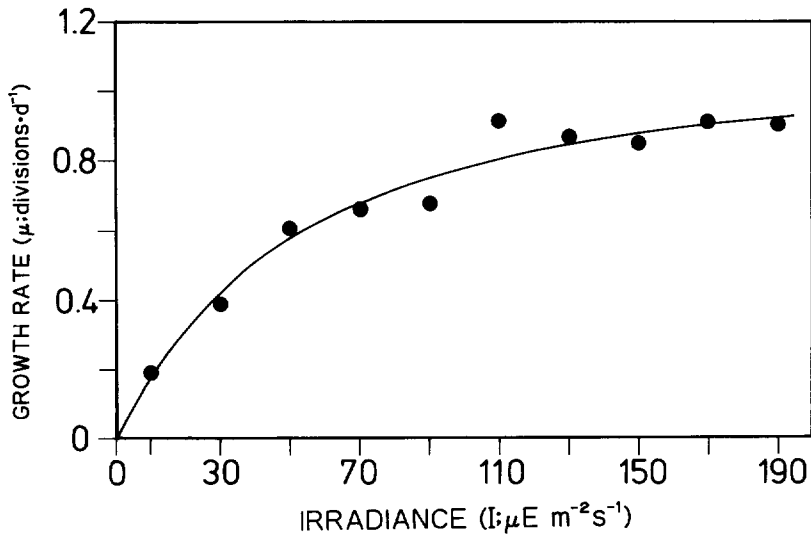


Fig.4-1. Effect of irradiance (I) on the growth rate of *G. nagasakiense* (μ).

を約三ヶ月間行った。まず温度については、保存株の培養温度である22°Cから少しずつ温度を上昇あるいは下降させながら実験温度条件に馴致させた。次に各温度で増殖した細胞を5段階の塩分濃度の培地に接種した。ただし10%については15%で増殖した細胞を接種した。以上の操作で増殖したものを前培養とした。本培養は培地4mlを分注したPPキャップ試験管(13×120mm)に前培養を1ml接種し(3本立て)、光強度120 μE m⁻²s⁻¹、明暗周期12hL:12hDで前培養と同じ温度で行った。接種細胞密度は、20°C以上の実験区については10~90 cells ml⁻¹(平均50 cells ml⁻¹)、15°C以下では80~150 cells ml⁻¹(平均100 cells ml⁻¹)であった。培養開始後1日おきに in vivo クロロフィル蛍光を蛍光光度計によって測定した。増殖速度は(1)式の細胞数に蛍光値を代入して計算した。また定常期の最大蛍光値を最大収量とした。

結 果

1. 増殖速度に及ぼす光強度の影響

G. nagasakiense の増殖速度と光強度の関係をFig. 4-1に示す。増殖速度は光強度とともに増加したが、110 μE m⁻²s⁻¹以上では約0.9 divisions day⁻¹で飽和した。また、実験した最低光強度10 μE m⁻²s⁻¹でも0.19 divisions day⁻¹の増殖速度が認められた。逐次計算によって得られた μ_m , K_s 及び I_0 はそれぞれ1.19 divisions day⁻¹, 53.2 μE m⁻²s⁻¹, 0.7 μE m⁻²s⁻¹であり、増殖速度と光強度の関係は次の式で表せることが明らかとなった。

$$\mu = \frac{1.19 (I - 0.7)}{51.8 + I}$$

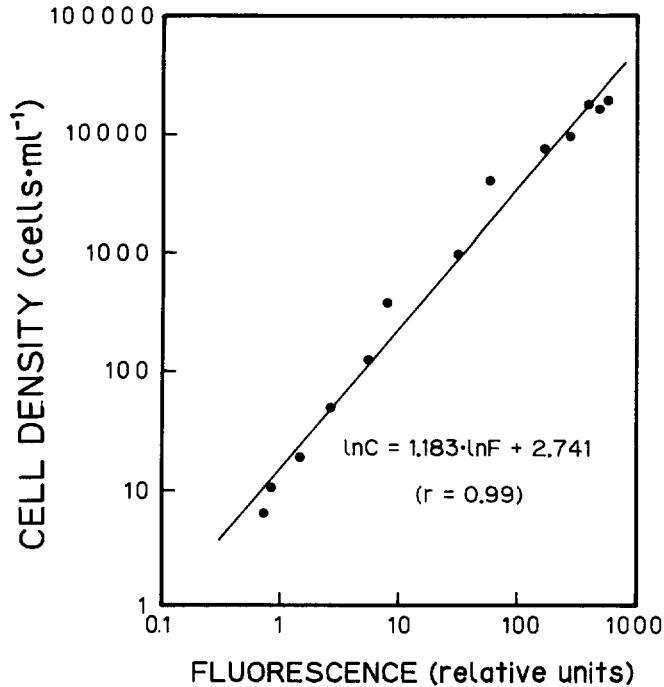


Fig.4-2. Relationship between cell density (C) and in vivo chlorophyll fluorescence (F) in *G. nagasakiense* cultures.

以上の結果に基づき、水温と塩分の影響を調べる実験は増殖速度が飽和する光強度 $110 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以上で実施した。

2. 増殖に及ぼす水温と塩分の影響

G. nagasakiense の増殖に伴う細胞密度 (C) と in vivo クロロフィル蛍光 (F) の変化を Fig. 4-2 に示す。両者の間には次式で示されるような高い相関関係が認められた。

$$\ln C = 1.183 \ln F + 2.741 \quad (r^2 = 0.980)$$

このことから、増殖速度の測定には細胞数の代わりに蛍光値が使用できることが判明した。

各水温及び塩分条件下で培養した *G. nagasakiense* の増殖曲線を Fig. 4-3 に示す。なお前培養において増殖が認められなかった実験区については本培養は行わず、増殖速度は 0 とした。まず水温が 30°C の場合は、塩分 15% と 10% での増殖は観察されなかった。塩分が 30% 及び 25% では誘導期もなく、 $15\sim 20$ 日まで指数関数的な増殖が見られた。次に水温が 25°C の場合は、 15% 以上の塩分でやはり指数関数的な増殖が見られ、増殖速度も大きかった。この場合も塩分 10% での増殖は認められなかった。水温が 20°C の場合は、 25°C に比べるとやや増殖速度は低下し、特に 15% では誘導期が長くなった。水温が 15°C の場合には、 20°C に比べていずれも誘導期が長く、また増殖速度も小さくなり、定常期に達するのに $40\sim 50$ 日要した。 10°C の場合は塩分 25% 以上でのみ増殖が観察された。いずれの温度でも 10% での増殖は見られなかった。

先の増殖曲線から増殖速度と最大収量を求め、その結果を水温と塩分の 2 因子要因計画 (繰

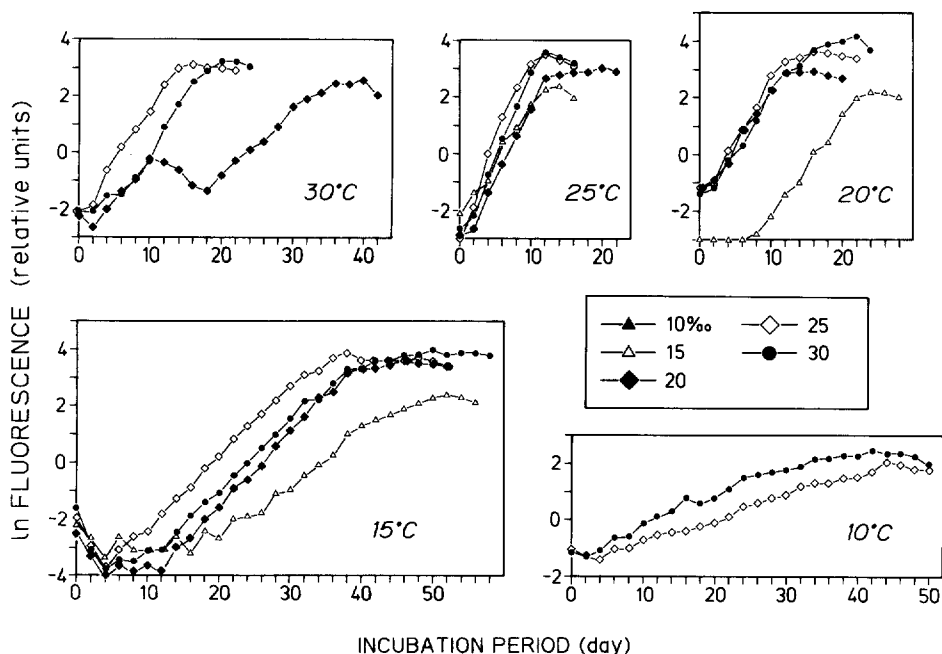


Fig.4-3. Growth curves of *G. nagasakiense* grown under various temperature and salinity combinations. Growth expressed as natural logarithm of in vivo chlorophyll fluorescence intensity averaged over three replicates.

Table 4-1. Summary of two-way analysis of variance of the growth rate and the maximum yield of *G. nagasakiense* as a function of temperature, salinity and their interaction.

Variables	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean square	F
Growth rate	Temperature	4	3.104	0.7761	1261.41***
	Salinity	4	3.043	0.7608	1236.69***
	Interaction	16	1.199	0.0749	121.79***
	Error	50	0.031	0.0006	
	Total	74	7.377		
Maximum yield	Temperature	4	7301.1	1825.3	33.69***
	Salinity	4	15630.0	3907.5	72.13***
	Interaction	16	4309.3	269.3	4.97***
	Error	50	2708.6	54.2	
	Total	74	29949.0		

*** Significant at the 1% level

り返しは完全無作為化)として解析した (Table 4-1)。増殖速度の場合も最大収量の場合も同様に、水温及び塩分の各々の主効果とそれらの交互作用が有意水準1%で有意であった。したがって、水温と塩分の2つの因子が相互に関連しながら *G. nagasakiense* の増殖に影響を及ぼしていることが明らかとなった。また平均平方でみると、増殖速度に及ぼす水温と塩分の効果はほぼ等しいことが判明した。しかし、最大収量に関しては塩分の効果の方が大きかった。

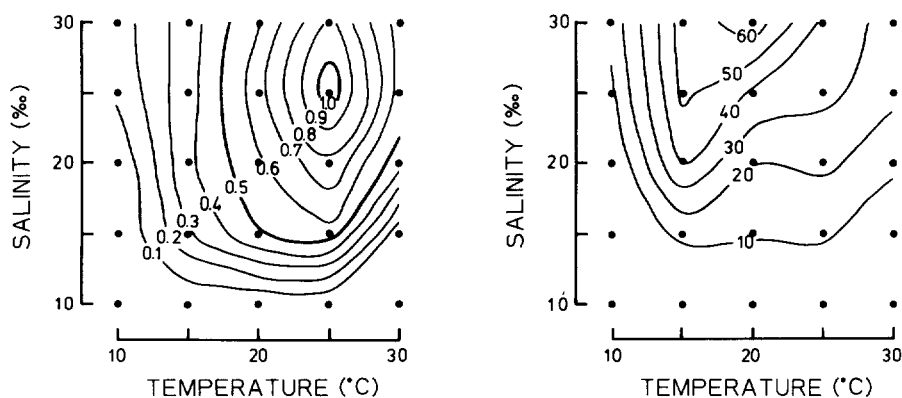


Fig.4-4. Contour plots of the growth rate (divisions day⁻¹) (left) and final cell yield ($\times 10$ relative fluorescence units) (right) of *G. nagasakiense* grown at various temperature and salinity combinations.

Fig. 4-4に水温と塩分の組合せに対する増殖速度及び最大収量の等値線を示す。最大増殖速度を与える水温と塩分の組合せは25°C, 25‰であった。また、温度が25°Cより上昇あるいは下降するにつれて、増殖可能な塩分範囲が狭まる傾向が見られた。一方、最大収量を与える条件は20°C, 30‰で、増殖速度の場合とは若干異なっていた。

考 察

ここでは本研究によって得られた水温、塩分及び光強度に対する増殖応答の結果に基づき、本種の増殖最適条件及び耐性限界について検討し、赤潮の発生機構について考察する。

本報告における室内実験で *G. nagasakiense* は $10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ という弱光下でも増殖が可能であり、その増殖速度は $110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で飽和することが判明した。また、 $190 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ までは強光阻害は認められなかった (Fig. 4-1)。NAKAMURA and WATANABE (1983a) によれば、わが国の代表的な有害赤潮藻である *C. antiqua* の増殖は 0.11 ly min^{-1} 以上でみられ、最大増殖速度を与える光強度は 0.04 ly min^{-1} とされている。これらの光強度は、波長を 550 nm とした場合、それぞれ $35 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、 $128 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ と換算される (有賀・横浜 1979)。したがって *G. nagasakiense* は *C. antiqua* に比べて弱光下での増殖に有利であると考えられる。ところで、大村湾では水深の2分の1に相当する中層が *G. nagasakiense* の最適環境層であると想定されており (飯塚 1972)、HONJO *et al.* (1990) も五ヶ所湾における本種の鉛直分布は $10^3 \text{ cells ml}^{-1}$ 以下の細胞密度の場合には $5 \sim 10 \text{ m}$ 深が中心であると報告している。第三章で述べたように浦ノ内湾においても *G. nagasakiense* の鉛直分布の中心は表層ではなく、 $2 \sim 5 \text{ m}$ の中層であった (Fig. 3-17)。渦鞭毛藻の増殖は水の攪乱によって阻害されることが室内実験 (WHITE 1976, DIXON and SYRETT 1988) や現場海域 (POLLINGER and ZEMEL 1981) で指摘されている。したがって、本種は弱光での増殖が可能であることにより気象・海象の急激な変化が小さい中層域で個体群の増大を可能にし、環境の激変による影響からの回避を行っているものと考えられ

る。このような鉛直分布特性は、鉛直移動と相俟って、移流拡散による個体群の生息場からの消失を防ぐ効果があることも報告されている (ANDERSON and STOLZENBACH 1985)。

G. nagasakiense は水温、塩分単独でみた場合、温度10~30°C、塩分15~30%の範囲で増殖可能であった。また増殖速度の最大値を与える水温と塩分の組合せは25°C、25%であった (Fig. 4-4)。この最適温度条件は、大村湾における *G. nagasakiense* 赤潮発生の最適水温が26~30°C であるという報告 (飯塚・入江 1966) とほぼ一致する。またIWASAKI (1979) は総説の中で、赤潮鞭毛藻の増殖最適水温をまとめている。それを参照すると、25°C以上に最適域 (増殖速度と最大収量の両方を含む) を有する種は少なく、また増殖可能な温度範囲が *G. nagasakiense* のように20°Cにわたる種はほとんどない。したがって、本種が25°Cという高い最適温度を有することは、夏季に他の藻類と共存しながら次第に生息場を独占できる重要な要因の一つであると考えられる。

五ヶ所湾においては13~21°Cで本種の冬季赤潮が発生しており (本城 1987)、また冬季の周防灘沿岸 (水温10°C以上) でも 10^3 cells m^{-3} を越える高い細胞密度が観察されている (寺田 他 1987)。これらの赤潮発生時及び冬季の現場観察と本実験結果から、本種は広温性種 (eurythermal species) であると判断される。

次に *G. nagasakiense* の低水温に対する耐性と越冬様式について考察する。本実験結果から *G. nagasakiense* は10°Cでも十分増殖可能であることが判った。この温度は瀬戸内海における冬季の最低水温 (約7°C付近) にほぼ近い (小村 1983)。また、冬季の現場海域で本種の遊泳細胞が確認されており (中田・飯塚 1987, 寺田他 1987)、五ヶ所湾でも冬季水温が12°C以上の場合には周年遊泳細胞が認められている (HONJO *et al.* 1990)。さらに *G. nagasakiense* については未だシストに関する報告がなく、板倉他 (1990) は瀬戸内海の様々な海域から採集した底泥をシスト発芽のために培養しても、*G. nagasakiense* の栄養細胞が出現しなかったと述べている。以上の結果は本種が遊泳細胞の形態で越冬し、それが翌年の赤潮のシードポピュレーションとなる可能性を強く示唆するものである。

G. nagasakiense の増殖速度の温度依存性を調べるため Fig. 4-5 にアレニウスプロットを示す。25°C以下のデータを用いて計算した Q_{10} は塩分15, 20, 25, 30%についてそれぞれ2.0, 2.0, 4.2, 3.3であった。25%以上の値は植物プランクトンの光合成速度で報告されている2.0~2.3 (REYNOLDS 1984) や藍藻の増殖速度の1.5~2.1 (FOY *et al.* 1976) に比べて1.5~2倍程度大きい。したがって、25%以上の好適塩分域では、*G. nagasakiense* の増殖速度は温度変化に極めて鋭敏に依存することが判る。

飯塚・入江 (1966) は蒸留水希釈海水の方が現場海水よりも培養成績が良いことから、本種が低塩分種であると推測した。培養実験でも大村湾から分離された株は塩素量で11~18.5%に好適領域を有していることが報告されている (沼口・平山 1972)。これは塩分に換算すると19.9~33.4%に相当する。さらに、1984年の熊野灘南部の赤潮時には 10^4 cells m^{-3} 以上の細胞密度は18.0~34.0%の範囲に見られている (水産庁他 1986)。したがって、本研究で得られた周防灘産株の結果も合わせて考えると、*G. nagasakiense* は広塩分性種 (euryhaline species)

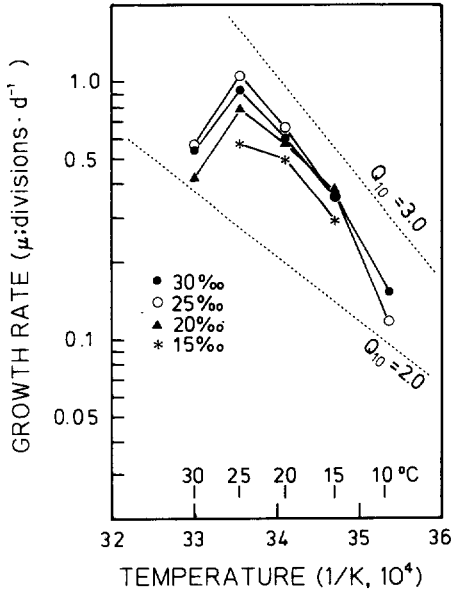


Fig.4-5. Arrhenius plot of the growth rate of *G. nagasakiense* grown in four different salinities. Upper and lower dotted lines indicate theoretical curves the Q_{10} values of which are assumed to be 3.0 and 2.0, respectively.

であり、むしろ低塩分を好む種であると考えられる。これは本種の赤潮が大量の降雨の後に起こるとい現場観察ともよく一致する(飯塚・入江 1969, CHO 1981, 伊藤他 1986, 水産庁他 1986)。

本研究においては塩分10‰の場合、すべての温度条件下で *G. nagasakiense* は増殖しなかった。塩分15‰で増殖させた細胞を、10‰の培養液に接種した後に顕微鏡で観察したところ、寺田他(1987)が冬季の周防灘(水温3.5~3.8°C)や培養(水温4°C)で観察したような球形あるいは風船状の突出物を持った異常形態を呈した。これは低塩分による異常と考えられる。一方、沼口・平山(1972)は大村湾産株が塩素量7.38‰(塩分13.3‰に相当)では増殖しなかったと報告している。以上のことから *G. nagasakiense* の最低塩分限界は10~15‰の間にあるものと考えられる。しかし、熊野灘に出現した *G. nagasakiense* は10‰以下の塩分濃度の水域でも細胞数で 10^3 cells ml⁻¹程度存在することが報告されており(水産庁他 1986), *G. nagasakiense* の低塩分耐性が株間によって異なる可能性も考えられる。

赤潮による漁業被害を防止するためには *G. nagasakiense* がいつ、どこで被害を及ぼす程高い細胞密度にまで増殖するかを的確に予測することが望ましい。このためにはその増殖や生存を支配する物理的、化学的及び生物的要因の影響を数量的に把握する必要がある。先の分散分析の結果、水温と塩分の相互作用が有意であること (Table 4-1), そして各水準が等間隔でとられていることから、増殖速度に及ぼす水温と塩分の関係を数量的に表すために多項式の当てはめを行った。モデルとしては一般に次の式が考えられる;

$$\mu = \beta_{00} + \beta_{10} \cdot T + \beta_{20} \cdot T^2 + \beta_{30} \cdot T^3 + \beta_{01} \cdot S + \beta_{02} \cdot S^2 + \beta_{03} \cdot S^3 + \beta_{11} \cdot T \cdot S + \beta_{12} \cdot T \cdot S^2 + \beta_{21} \cdot T^2 \cdot S + \dots + \beta_{mn} \cdot T^n \cdot S^n + \epsilon$$

ここで μ は増殖速度 (divisions day⁻¹), Tは水温 (°C), Sは塩分 (‰), β_{nn} は偏回帰係数, ε は誤差項をそれぞれ示す。ここでは3次までをとり変数増減法による重回帰分析によって偏回帰係数を求めた (田中他 1984)。その結果, 次に示す項が有意で残り, 重回帰式が求まった。

$$\mu = 1.05753 - 0.30220 \cdot T + 0.01777 \cdot T^2 - 0.00035 \cdot T^3 + 0.00515 \cdot T \cdot S - 0.00010 \cdot T \cdot S^2$$

また重回帰係数は0.94であった。したがって, この式により, 光条件及び栄養塩が制限要因になっていない条件下での増殖速度の予測が行えると考えられる。

第2節 競合赤潮ラフィド藻 *Chattonella* spp. の増殖生理

海産ラフィド藻 *C. antiqua* と *C. marina* は, 大規模な赤潮を形成し養殖魚類の大量斃死を引き起こす原因種として知られている。1972年夏季に播磨灘で発生した *C. antiqua* の赤潮は, 1,400万尾に上る養殖ハマチの大量斃死をもたらした大きな社会問題となった (水産庁瀬戸内海漁業調整事務局 1973)。以来 *Chattonella* (本節では *C. antiqua* と *C. marina* の2種を指すこととする) の赤潮の発生機構を解明するために, 精力的な研究が行われてきた。特に生活史に関しては, *Chattonella* が冬季をシストの状態では海底泥中で過ごし, それらが翌年の赤潮のシードポピュレーションとして重要な役割を果たしていることが明らかにされている (IMAI and ITOH 1987, NAKAMURA *et al.* 1990)。一方, 栄養細胞に関しても, 物理・化学的な要因に対する増殖生理についての知見が蓄積されてきている (NAKAMURA and WATANABE 1983a,b)。しかしそれらのほとんどは単一要因に対する増殖応答の研究にとどまり, 要因間の相互作用を取り扱ったものは *C. marina* に関する報告 (野沢 1984) のみである。また同一条件下で *C. antiqua* と *C. marina* の増殖生理を比較検討した研究報告は見当たらない。さらに, 今井 (1990) は周防灘において *G. nagasakiense* と *Chattonella* との卓越の関係から, 両者の間に競合関係の存在を示唆している。そこで本節においては, 2種の *Chattonella* の無菌培養株を用いてそれらの増殖速度に及ぼす水温, 塩分及び光強度の影響を調べ, さらにはそれら要因間の相互作用も併せて検討した。それらの結果に基づき *G. nagasakiense* と *Chattonella* との生理・生態特性の差異について考察した。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験に用いた *C. antiqua* (OC-B5) と *C. marina* (MS-3P) のうち, 前者は1985年に大阪湾から分離しミクロピペット洗浄法 (岩崎 1967) により無菌化したクローン株である。*C. marina* は南西海区水産研究所今井一郎博士が1985年に周防灘から同様に分離した無菌株を分譲されたものである。継代培養及び実験には, 栄養強化培地である改変 SWM-3培地 (CHEN *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987) を使用した。

2. 増殖速度に及ぼす光強度の影響

光強度 $120 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で前培養を行った上記 2 種の *Chattonella* を、塩分 31.3% の SWM-3 培地 100 ml を分注した 200 ml 容の三角フラスコ各々 10 本に約 50 cells ml^{-1} の濃度になるように接種し、温度 25°C 、光強度は $10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ から $190 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ までの 10 段階で培養を行った。光源には白色蛍光灯を用い、明暗周期は 12hL : 12hD に設定した。培養開始から 1 日間隔で検鏡による細胞数の計数を行い、第 1 節と同じく最小自乗法により増殖速度 ($\text{divisions day}^{-1}$) を計算した。増殖速度と光強度の関係には第 1 節の (2) 式に示す直角双曲線モデルを適用した。モデルへのあてはめは、前節と同様シンプレックス法による逐次計算によって行った。

3. in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度の測定

改変 SWM-3 培地 500 ml を分注した 2 本の三角フラスコに 2 種の *Chattonella* を各々接種し、温度 25°C 、光強度 $130 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、12hL : 12hD の明暗周期で培養を行った。1 日間隔で培養液 20 ml を採取し、検鏡による細胞数及び in vivo クロロフィル蛍光の測定を行い培養日数に伴う両者の関係を調べた。蛍光値は蛍光光度計 (TURNER DESIGNS 社製 model 110) で測定した。

4. 増殖に及ぼす水温と塩分の影響

増殖に及ぼす水温と塩分の影響は前節と同じく 2 因子要因計画実験によって調べた。培養実験温度は、10, 15, 20, 25, 30°C の 5 段階に設定した。また SWM-3 培地の塩分濃度は、10, 15, 20, 25, 30, 35% の 6 段階に調整した。30% 以下の塩分は基本海水を超純水により希釈して、また 35% の濃度を得るためには、海水を 50°C の恒温槽中で濃縮して調製した。このようにして塩分濃度を設定した後に培地成分を添加し培養液を調製した。培養実験は上記の水温と塩分のすべての組合せ、すなわち 30 通りについて実施した。

保存株を実験条件に馴致させるため以下の操作を行った。まず温度については、保存株の培養温度である 22°C から少しづつ温度を上昇あるいは下降させながら、実験温度条件に馴致させた。次に各温度で増殖した細胞を 6 段階の塩分濃度の培地に接種した。それぞれの実験条件下で少なくとも一ヶ月間継代培養したものを前培養とした。本培養は、培地 4 ml を分注した PP キャップ試験管 (13×120 mm) に適宜希釈した前培養を 1 ml 接種し (3 本立て)、光強度 $120 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明暗周期 12hL : 12hD で前培養と同じ温度で行った。接種細胞密度は、約 50 cells ml^{-1} に調整した。培養開始後 1 日おきに in vivo クロロフィル蛍光を測定し、その結果から先の光強度の実験と同様の方法で増殖速度を求めた。

結果

1. 増殖速度に及ぼす光強度の影響

C. antiqua の増殖速度と光強度との関係を Fig. 4-6 に示す。本種は $10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ では増殖できなかった。増殖は光強度 $30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以上で認められ、 $110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以上ではほぼ $1.0 \text{ division day}^{-1}$ の増殖速度で飽和した。逐次計算によって得られた μ_m は $1.34 \text{ divisions day}^{-1}$ 、 K_s は $42.35 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、 I_0 は $10.31 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。この結果に基づき、増殖速度と光強度の関係は Fig.

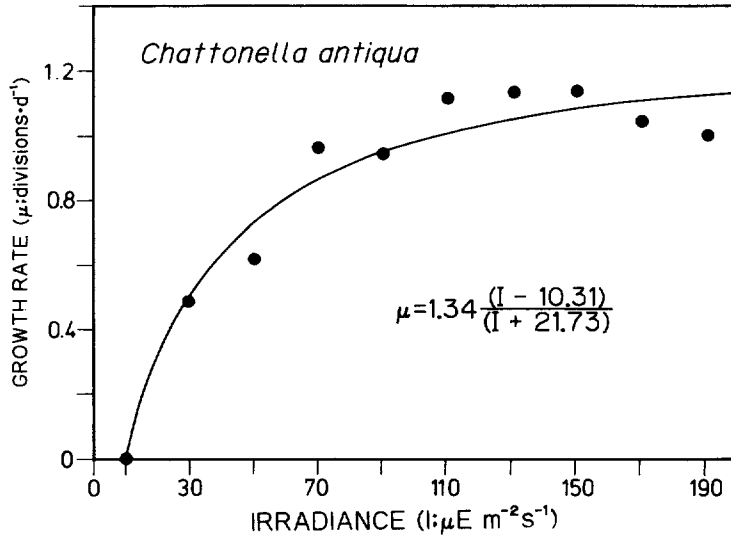


Fig.4-6. The effect of light intensity (I) on the growth rate of *C. antiqua* (μ). Rectangular hyperbola equation in the figure was fitted by simplex minimization procedure.

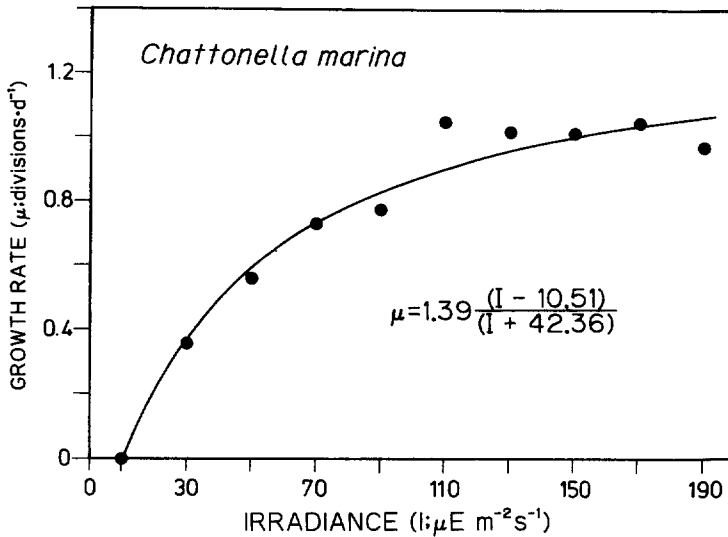


Fig.4-7. The effect of light intensity (I) on the growth rate of *C. marina* (μ). Refer to Fig. 4-6 for other legends.

4-6中の式で表すことができた。

C. marina の増殖速度と光強度の関係を Fig. 4-7 に示す。本種は *C. antiqua* とほぼ同様の光強度と増殖速度の関係を示した。逐次計算により μ_m は 1.39 divisions day $^{-1}$, K_s は 63.38 μ E m $^{-2}$ s $^{-1}$, I_0 は 10.51 μ E m $^{-2}$ s $^{-1}$ と計算された。この結果から増殖速度と光強度の関係は図中の計算式で表せた。*C. marina* における K_s は *C. antiqua* よりも約 20 μ E m $^{-2}$ s $^{-1}$ 大きいことから、*C. marina* はより高い光強度を増殖に要求することが示唆された。

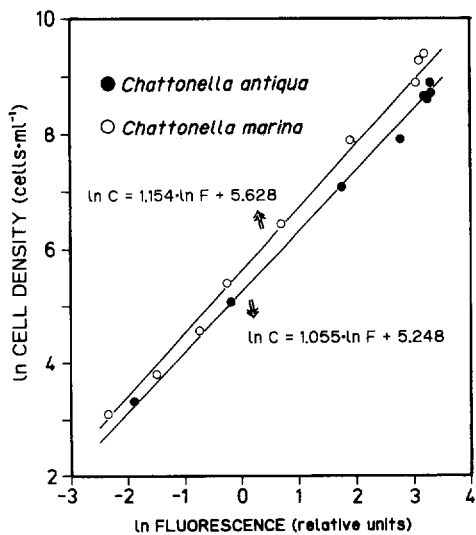


Fig.4-8. Relationship between cell density (C) and in vivo chlorophyll fluorescence (F) in *C. antiqua* and *C. marina*.

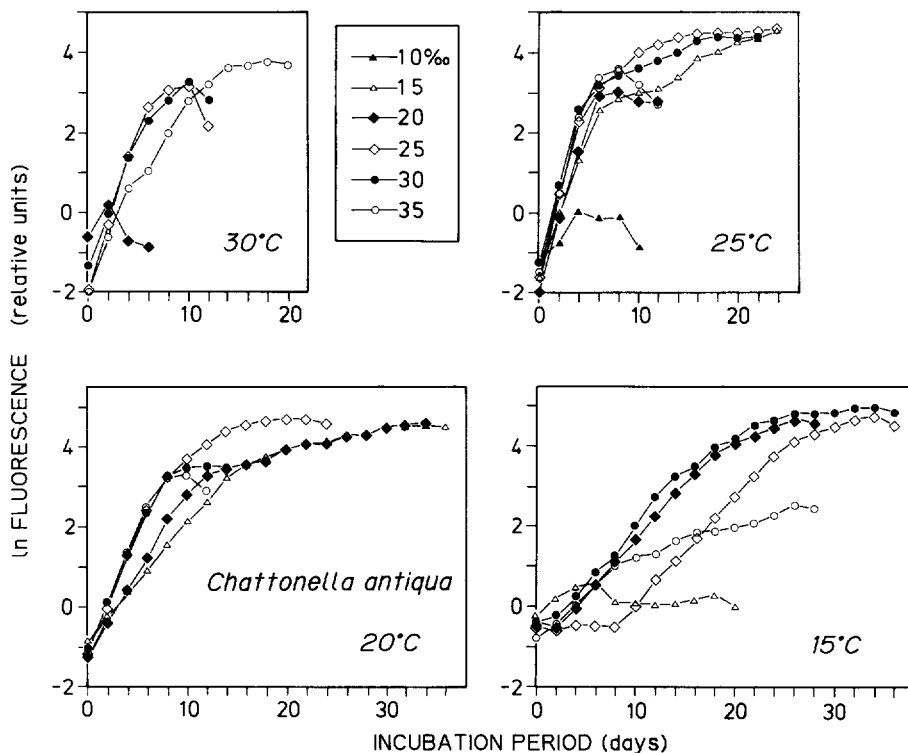


Fig.4-9. Growth curves of *C. antiqua* grown at various temperature and salinity combinations. Growth expressed as natural logarithm of in vivo fluorescence intensity averaged over three replicates.

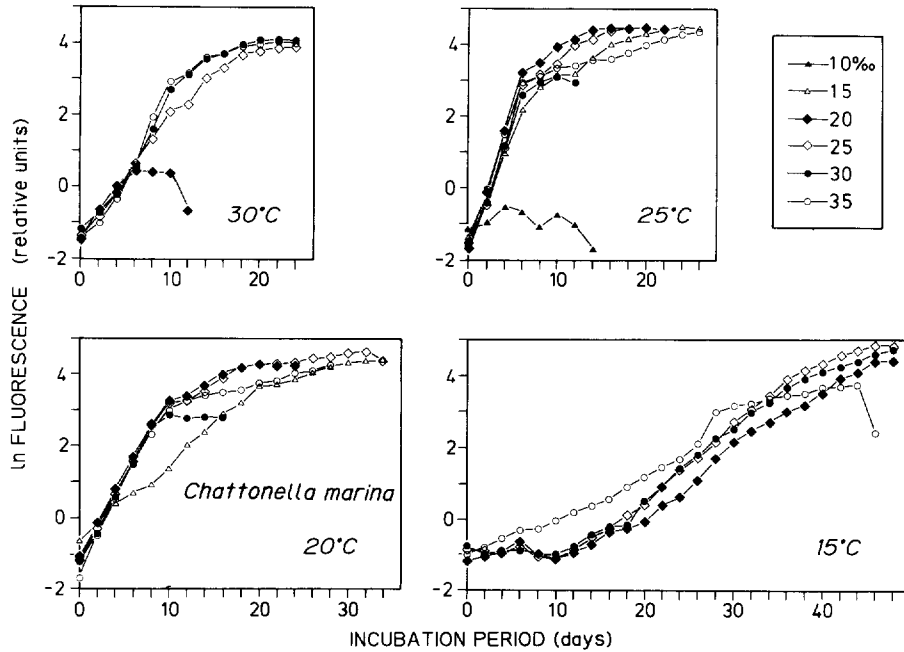


Fig.4-10. Growth curves of *C. marina* grown at various temperature and salinity combinations. Refer to Fig. 4-9 for other legends.

2. 増殖に及ぼす水温と塩分の影響

C. antiqua と *C. marina* の増殖に伴う細胞密度 (C) と, in vivo クロロフィル蛍光 (F) の関係を Fig. 4-8 に示す。両者の間には次式で示されるように高い相関関係が認められた。

C. antiqua

$$\ln C = 1.055 \ln F + 5.248 \quad (r^2=0.996)$$

C. marina

$$\ln C = 1.154 \ln F + 5.628 \quad (r^2=0.996)$$

このことから細胞数の代わりに蛍光値を測定することによって、増殖速度が計算できることが判明した。

種々の水温と塩分条件下で培養した *C. antiqua* の増殖曲線を Fig. 4-9 に示す。本種は 10°C では全く増殖不可能であった。またそれ以上の温度でも前培養において増殖が見られなかった実験区については本培養は行わず、増殖速度は 0 とした。水温 30°C の場合、塩分 20‰ 以上で増殖が観察されたが、20‰ での最大収量は非常に低かった。25°C の場合、すべての塩分条件下で本種は増殖した。ただし、10‰ での最大収量は低かった。20°C では 15‰ 以上で増殖が見られたが、塩分の低下に従って増殖速度も低下した。15°C においては 15‰ 以上で増殖が認められた。しかし、35‰ と 15‰ では増殖速度及び最大収量は共に小さかった。

C. marina の増殖曲線を Fig. 4-10 に示す。本種も *C. antiqua* と同様に 10°C では増殖できなかった。30°C では、20‰ 以上で増殖が確認されたが、20‰ での最大収量は低かった。25°C では

Table 4-2. Summary of two-way analysis of variance of the growth rate of *Chattonella* spp. as a function of temperature, salinity and their interaction.

Species	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean square	F
<i>C. antiqua</i>	Temperature	4	6.207	1.552	1291.93***
	Salinity	5	2.348	0.470	391.02***
	Interaction	20	1.184	0.059	49.29***
	Error	60	0.072	0.001	
	Total	89	9.812		
<i>C. marina</i>	Temperature	4	4.229	1.057	1561.43***
	Salinity	5	1.566	0.313	462.40***
	Interaction	20	0.778	0.039	57.47***
	Error	60	0.041	0.001	
	Total	89	6.614		

*** significant at the 1% level.

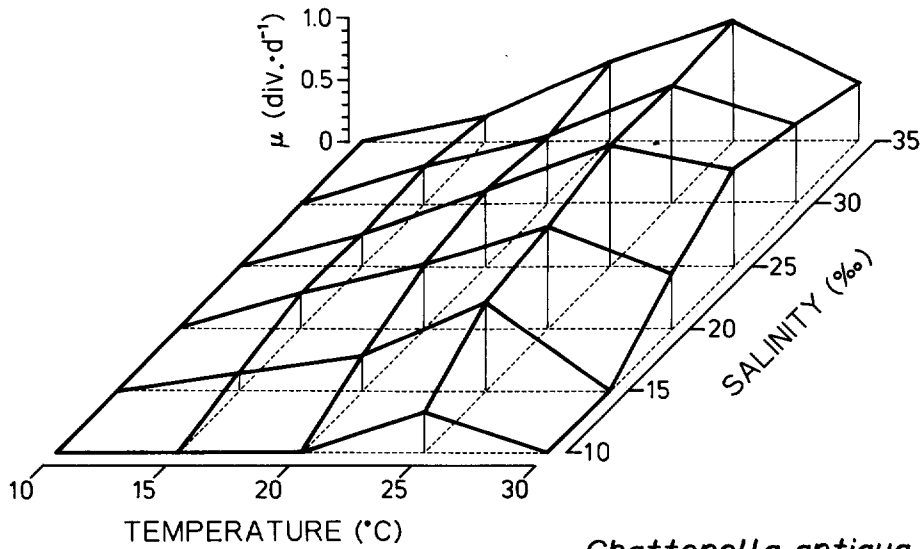
すべての塩分条件下で増殖が見られた。しかし、10%における最大収量は非常に小さかった。20°Cにおいては、本種は15%以上で増殖したが、15%における増殖速度及び最大収量は共に小さかった。15°Cの場合、20%以上で増殖が観察された。ただし、35%においても他の塩分と同程度に増殖できること、及び15%では全く増殖できない点が *C. antiqua* と異なっていた。

以上の増殖曲線から計算された増殖速度を水温と塩分の2因子要因計画法によって解析した (Table 4-2)。その結果 *C. antiqua* と *C. marina* の両種とも水温、塩分の主効果及びそれらの相互作用が有意水準1%で有意であった。また両種とも総平方和のうち64%程度が水温によって占められていた。これにより水温が増殖速度に最も大きく影響していることが示唆された。

水温と塩分の組み合わせに対する *C. antiqua* と *C. marina* の増殖速度を3次元的に示すと Fig. 4-11と Fig. 4-12のようになる。水温と塩分に対する増殖応答は両種ともほぼ同様のパターンを示した。温度の影響を見ると、25°Cを境に低温側でなだらかに、高温側でやや急激に低下するといった微細藻類に典型的な温度応答 (EPPLEY 1972) を示した。塩分について見ると、増殖の限界付近の低塩分で増殖速度は急激に低下するが、それ以上では変化は小さかった。最大増殖速度を与える水温と塩分の組合せは、*C. antiqua* では25°Cと25%であり (Fig. 4-11)、一方 *C. marina* では25°Cと20%であった (Fig. 4-12)。そして最大値としてそれぞれ、0.97 divisions day⁻¹, 0.81 divisions day⁻¹が得られた。

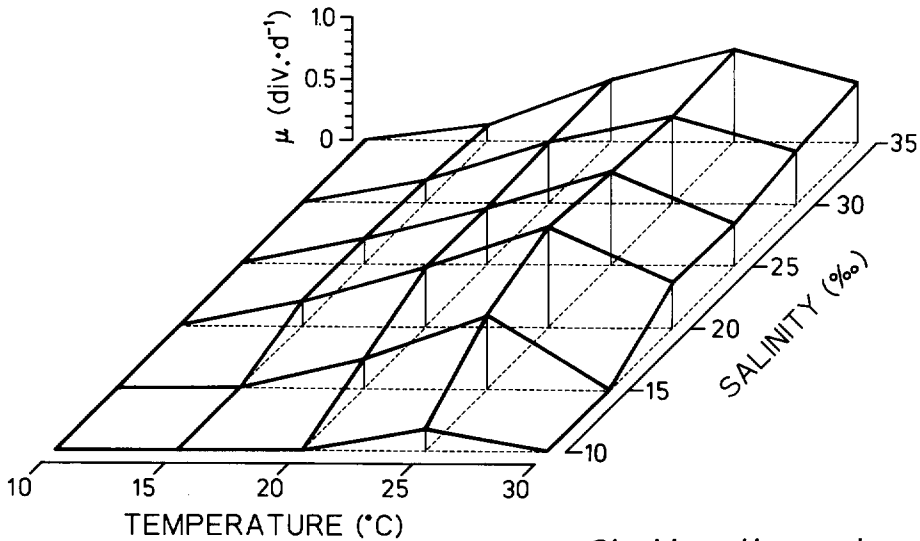
考 察

数値モデルを構築しシミュレーションによって赤潮の発生予知を行う場合、定式化に重要な要素は増殖速度である。したがって、増殖速度に対する種々の環境要因の影響を、それらの相互作用も含めて、定量的に把握する必要がある。水温、塩分及び光強度に対する *Chattonella* の増殖応答に関しては、池田 (1971)、岩崎 (1971)、NAKAMURA and WATANABE (1983a)、野



Chattonella antiqua

Fig.4-11. Multivariate response surface of the growth rate of *C. antiqua* as a function of temperature and salinity.



Chattonella marina

Fig.4-12. Multivariate response surface of the growth rate of *C. marina* as a function of temperature and salinity.

沢 (1984), 矢持 (1984) の報告がある。しかし野沢 (1984) の報告以外は単一要因に対する増殖応答しか調べられていない。また増殖を最大収量で検討している場合が多いが、第1節の *G. nagasakiense* の例に示されるように、最大収量を与える条件と最大増殖速度を与える条件とは必ずしも一致しない場合がある。以下の考察では、本節で得られた結果に基づき *Chattonella* の増殖応答の特徴について論じ、*G. nagasakiense* のそれとの比較を行った。さらに増殖速度と水温・塩分との関係を定式化した。

C. antiqua と *C. marina* は共に光強度 $10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ では増殖できず、また増殖速度が飽和する光強度は $110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった (Fig. 4-6 と Fig. 4-7)。また、*C. marina* は *C. antiqua* に比べ若干高い光強度を要求することが示された。播磨灘産の *C. antiqua* の増殖は $0.011 \text{ ly min}^{-1}$ 以上で見られ、増殖速度は 0.04 ly min^{-1} で飽和したと報告されている (NAKAMURA and WATANABE 1983a)。これらの光強度は、波長 550 nm で換算すると (有賀・横浜 1979) それぞれ 35 及び $128 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に相当する。したがって、今回の実験結果は播磨灘株の結果にほぼ一致したと見なすことができよう。このことは、*Chattonella* の光に対する増殖応答は、株間にも種間にも、それほど差がないことを意味している。

周防灘においては、夏季に *Chattonella* が卓越する年と *G. nagasakiense* が卓越する年とがあり、*Chattonella* が卓越するためには豊富な日照時間が必要であることが示唆されている (今井 1990)。さらに大村湾や福岡湾でも低日射量の年に *G. nagasakiense* 赤潮が発生し易い傾向が認められている (飯塚 1989, 山本他 1989)。本実験結果から弱光は *Chattonella* の増殖に不適であることが判明した (Fig. 4-6 と Fig. 4-7)。それに対して、*G. nagasakiense* は $10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の低光強度下でも十分増殖が可能であった (前節 Fig. 4-1)。これらの実験結果は、現場海域における卓越種の交替過程に光強度に対する増殖応答の差が大きく影響することを裏付けるものである。

NAKAMURA and WATANABE (1983a) によれば、*C. antiqua* は水温 15°C から 28°C の範囲で増殖し、 25°C で最大増殖速度を示したとされている。矢持 (1984) は *C. antiqua* 及び *C. marina* の最大収量と温度との関係を調べ、*C. antiqua* の好適温度は $20\sim 30^\circ\text{C}$ で、 11°C では全く増殖しないこと、*C. marina* は $21\sim 30^\circ\text{C}$ で良好に増殖するが、 13°C では増殖せず、低温に敏感であることを報告している。彼はさらに、両種の間には $13\sim 17^\circ\text{C}$ の間で応答に差が見られ、*C. antiqua* の方が高い収量を示したと述べている。野沢 (1984) は、鹿児島湾産の *C. marina* の増殖が、 $17.5\sim 27.5^\circ\text{C}$ の温度範囲で見られ、その適温は 22.5°C であることを報告している。水温に関するこれらの知見は、2種の *Chattonella* の増殖可能水温が広範囲にわたることを示している。本研究で得られた結果は、上記の報告よりさらに広い温度範囲で *Chattonella* の増殖が可能であることを示した。すなわち、水温 $15\sim 30^\circ\text{C}$ が *Chattonella* の増殖可能範囲と考えて良さそうである。しかも増殖速度は温度の変化に最も敏感に応答することが判明した (Table 4-2)。

C. antiqua 及び *C. marina* の最大増殖速度を与える温度は共に 25°C 付近にあることが明らかとなった。IWASAKI (1979) によれば、 25°C 以上に増殖の最適水温 (ただし増殖速度と最大収量の両者を含む) を有する植物プランクトン種は少ない。したがって、このように高い最適水温を有することは *Chattonella* が夏季に生息場を優占できる重要な要因であると言えよう。しかし、*Chattonella* の増殖最適温度は *G. nagasakiense* のそれとほぼ一致することから、温度がこれら両種の交替要因になっているとは考えにくい。

Chattonella は 10°C では全く増殖不可能であった (Figs. 4-11 と 4-12)。この実験結果は、冬季に水温が 7°C 付近まで低下する瀬戸内海 (小村 1983) において *Chattonella* が栄養細胞のままでは越冬できないことを示している。そのため *Chattonella* はシストの状態越冬するが、シ

シストの成熟には11℃以下の低温を必要とし (IMAI and ITOH 1987), さらにその発芽の最適水温は22℃であると報告されている (今井他 1984)。このようなシストの生理及びここで明らかになった栄養細胞の温度応答を考慮すると, *Chattonella* は瀬戸内海の温度環境に極めて良く適応している生物と言える。一方, 鹿児島湾においては, 冬季の水温が14~15℃であり (久万田他 1987), 増殖可能な水温範囲の下限付近に相当する。そのため栄養細胞の状態越冬できる可能性がある。本研究で得られた *Chattonella* の温度特性は, 現場におけるそれらの出現状況 (吉松・小野 1986, HONJO 1987) や, 赤潮発生時の水温 (田中他 1977, 寺田他 1982, 高山 1983) と良く一致している。

以上のような *Chattonella* の低温度耐性は, 前節の *G. nagasakiense* のそれと大きく異なる。前述のように, *Chattonella* はシストという越冬手段を用いることによって瀬戸内海の水温環境に適応している。シストの機能としては, このような栄養細胞の生存不適環境に対する耐性以外にも, 赤潮の発生源, 種の分布拡大, 有性生殖による遺伝的多様性の維持等が挙げられる (WALL 1971, 1975)。しかしシストはこのような生き残り戦略上の利点を有する反面, その成熟や発芽のために一定の環境条件を必要とする (ANDERSON and MOREL 1979, ANDERSON 1980) など, 不都合な点も有する。例えば *Chattonella* のシストはその成熟に低温を必要とするし, さらに成熟が完了しても発芽に適当な温度条件が整うまで強制休眠を余儀なくされる (今井他 1984, IMAI and ITOH 1987)。さらに渦鞭毛藻のシストは多くが有性生殖の結果形成されるが (DALE 1983), 有性生殖が誘導されるためにも一定の条件 (光, 温度, 栄養塩等) が満たされる必要がある (VON STOSCH 1973, PFIESTER 1975, 1976, 1977, SAKO *et al.* 1984, 1985, 1987)。これに対して, 栄養細胞は休眠や発芽といった段階を経ずとも好適条件下では直ちに増殖を開始し, 個体群の増大を図ることが可能である。したがって, 生活史上にシストを有することが必ずしも種の生存戦略として有利であるとは言えないように思われる。このことは数千種といわれる現生の渦鞭毛藻の中で, シストの存在が知られている種がたかだか58種であるという事実 (福代 1987b) と良く符合する。ただしシストを持たない場合には栄養細胞の増殖可能な環境条件の幅が広く, 大きな増殖速度を持つことが個体群の維持に必要となる (中原・左子 1987)。前節で述べたように, *G. nagasakiense* の場合は特に温度に対する耐性限界の幅を広くすることによって栄養細胞で周年存在し, 個体群の維持・拡大を図っているものと考えられる。

岩崎 (1971) は *Eutreptiella* sp. (= *C. antiqua*) の最大収量と塩分の関係を調べ, 本種がCl 10% (塩分18.1%) 付近で最も良く増殖し, 好適塩分範囲はCl 8~17% (塩分14.4~30.7%) であると述べている。また池田 (1971) も *C. antiqua* の好適塩分はCl 9~17% (塩分 16.3~30.7%) で, Cl 4.6% (塩分8.3%) では増殖しないと報告している。さらに, NAKAMURA and WATANABE (1983a) は, 25~41%の塩分範囲で *C. antiqua* の増殖速度が一定であったと述べている。一方, 鹿児島湾産の *C. marina* は15.5~30.1%で高い細胞密度に増殖することが報告されている (野沢 1984)。本研究結果によれば, 最大増殖速度を示す25℃における2種の *Chattonella* の増殖は10から35%と, 極めて広い塩分範囲にわたって観察された。以上の

Table 4-3. Cubic regression equations for predicting the growth rate of *Chattonella* spp..

	Estimated regression coefficients	
	<i>C. antiqua</i>	<i>C. marina</i>
T	-1.49979	-1.21833
T ²	0.07380	0.05924
T ³	-0.00117	-0.00092
S ²	ns	-0.00157
S ³	-0.00001	ns
TS	0.00389	0.00669
TS ²	-0.00003	0.00001
T ² S	-0.00003	-0.00015
Constant	9.34751	7.43755
Adjusted R ²	0.93	0.92

ns: not significant at the 5% level.

結果を総合すると、*C. antiqua* も *C. marina* も広塩分性種であると判断される。ただし、増殖可能な塩分範囲は温度によって影響を受けることに留意する必要がある。

Chattonella 赤潮は、降雨による塩分低下時と(田中他 1977, 寺田他 1981, 寺田他 1982), 1984年の周防灘(寺田・神菌 1986)や1987年の播磨灘(水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1988)のように塩分が高い場合、の両方で発生が確認されている。このような現場観察は、*Chattonella* が広い塩分範囲で高い増殖速度を維持できるといった生理特性によって良く説明できよう。

赤潮による漁業被害を未然に防止するためには、*Chattonella* の増殖を的確に予測することが望まれる。先の分散分析の結果、水温と塩分の相互作用が有意であること (Table 4-2), そして各水準が等間隔に設定されていることから、第IV章第1節と同様の多項式モデルによる増殖速度と水温及び塩分の関係の定式化を行った。その結果 Table 4-3 に示す項が有意で残り、重回帰式が求まった。光強度や栄養塩濃度が制限的でない場合には、本多項式によって増殖速度を予測できると考えられる。

これまで述べたように、*Chattonella* の増殖には水温と塩分の2因子間でも相互作用が有意であった。また、前節で述べたように *G. nagasakiense* でも同様の結果が得られている。これらの結果は、赤潮原因プランクトンの個体群動態と環境との関係を論ずる際に、要因相互の関係が無視できないことを強く示唆している。このような相互作用は、水温と塩分以外にも、光条件 (JITTS *et al.* 1964, SMAYDA 1969) や栄養塩 (RHEE and GOTHAM 1981) の間にも存在することが報告されている。今後は実験計画法的手法を駆使することにより、増殖に及ぼすより多くの要因をそれらの相互作用も含めて解析して行く必要があろう。

第3節 珪藻類の増殖生理

温帯域においては植物プランクトン種組成の季節遷移に一定のパターンが見られることが知られている。すなわち、春先には珪藻類のブルームが起り、それに続いて晩春から初秋にかけては鞭毛藻類（渦鞭毛藻やラフィド藻等）が卓越するが、それ以降は再び珪藻類が優先する（DURBIN *et al.* 1975, NAKAHARA 1978）。SMAYDA (1980) はこのような季節遷移の要因を他発的 (allogenic) と自発的 (autogenic) 要因の二つに大別しており、前者には水温、塩分、光強度等が、また後者には生活史、栄養塩、捕食等が含まれるとしている。本節では主な珪藻類の増殖に及ぼす水温と塩分の影響を前節（第1, 2節）と同様の手法で明らかにし、*G. nagasakiense* の増殖生理との比較を行った。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験に用いた珪藻類は1989年3月に広島湾より分離し、マイクロピペット洗浄法（岩崎1967）によって無菌化した4種、*Chaetoceros didymum* var. *protuberans*, *Ditylum brightwellii*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* sp. のクローン株である。継代培養及び以下の実験には改変SWM-3培地（CHEN *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987）を用いた。

2. in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度の測定

SWM-3培地500 mlを分注した1 liter容の三角フラスコに上記4種の珪藻を接種し、15°C、光強度 $120 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ （明暗周期12hL:12hD）の条件下で培養した。その後毎日培養20 mlを採取し、細胞数及びin vivo クロロフィル蛍光の測定を行い、培養日数に伴う両者の変化を調べた。

3. 増殖に及ぼす水温と塩分の影響

増殖に及ぼす水温と塩分の影響は前節と同様2因子要因計画によって調べた。4種の珪藻を水温5段階（10~30°C）、塩分6段階（10~35‰）のすべての組合せ（30通り）の条件に馴致させるため、それらの水温条件で少なくとも一ヵ月、その後種々の塩分条件で少なくとも2週間継代培養を行ったものを前培養とした。それぞれの実験条件で増殖が見られた培養を、SWM-3培地4 mlを分注したPPキャップ試験管（3本立て）に接種し、前培養と同じ条件下で本培養を開始した。光強度は $120 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ （明暗周期12hL:12hD）とした。培養開始後毎日in vivo クロロフィル蛍光の測定を行い、その変化から前節と同様最小自乗法によって増殖速度（divisions day⁻¹）を計算した。

結 果

1. 珪藻類の増殖速度測定法

培養日数の経過に伴う細胞数（C）とin vivo クロロフィル蛍光（F）の関係をFig. 4-13に示す。4種とも両者の間には次式で示される明瞭な直線関係が得られた。

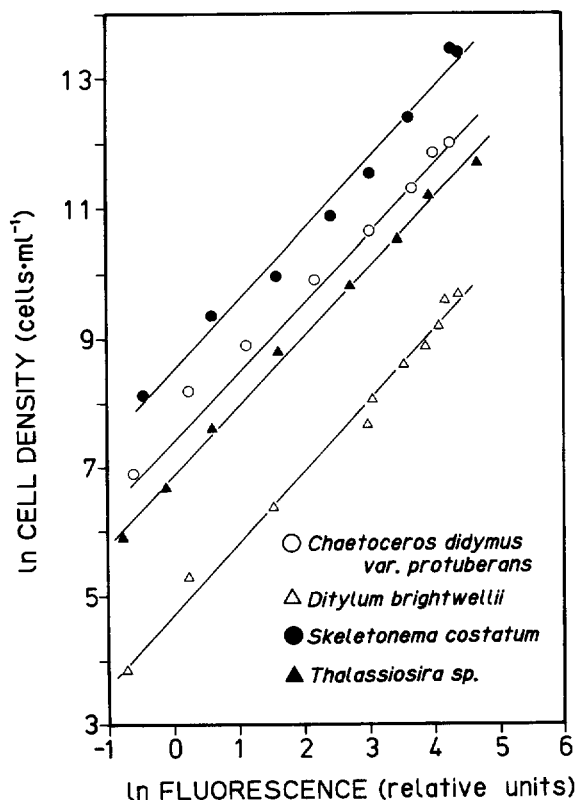


Fig. 4-13. Relationship between cell density and in vivo chlorophyll fluorescence in four species of diatom.

C. didymum var. *protuberans*

$$\ln C = 1.002 \ln F + 7.699 \quad (r^2=0.994)$$

D. brightwellii

$$\ln C = 1.096 \ln F + 4.729 \quad (r^2=0.990)$$

S. costatum

$$\ln C = 1.087 \ln F + 8.482 \quad (r^2=0.986)$$

Thalassiosira sp.

$$\ln C = 1.076 \ln F + 6.837 \quad (r^2=0.997)$$

以上の結果から、細胞数の代わりに in vivo クロロフィル蛍光を用いて増殖速度が測定可能であることが分かった。

2. 増殖に及ぼす水温と塩分の影響

種々の水温と塩分の組合せ条件下で培養した4種の珪藻類の増殖曲線をFigs. 4-14~4-17に示した。

まず *C. didymum* var. *protuberans* の結果であるが、本種は10℃から25℃の範囲で増殖した。しかし、30℃では全く増殖が見られなかった。増殖が可能な塩分範囲は温度によって異なる

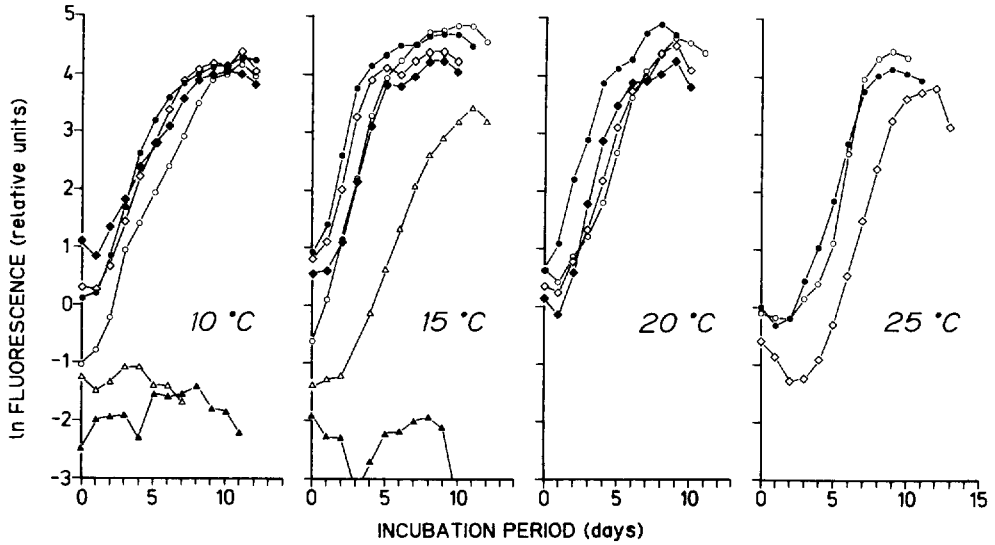


Fig.4-14. Growth curves of *C. didymum* var. *protuberans* grown under various temperature and salinity combinations. Growth expressed as natural logarithm of in vivo fluorescence intensity averaged over three replicates. Symbols: \blacktriangle —,10‰; \triangle —,15‰; \blacklozenge —,20‰; \lozenge —,25‰; \bullet —,30‰; \circ —,35‰.

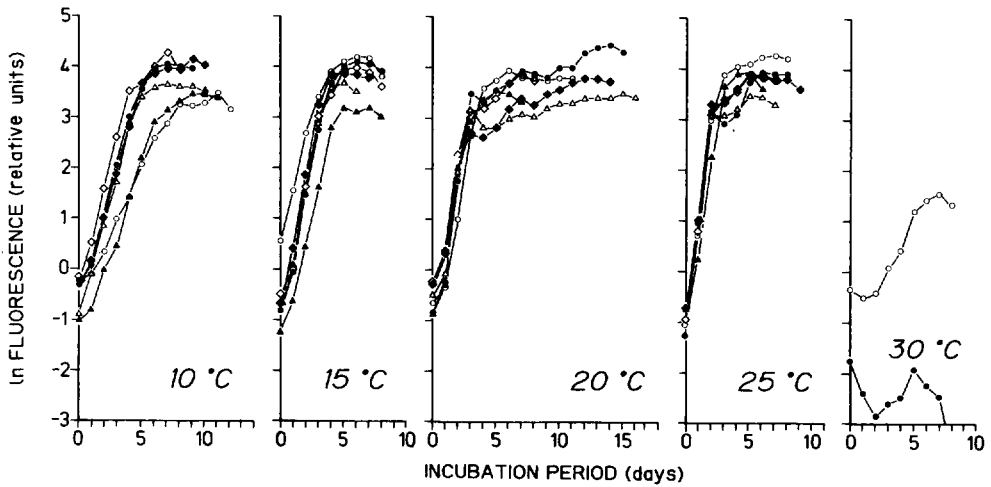


Fig.4-15. Growth curves of *D. brightwellii* grown under various temperature and salinity combinations. Refer to Fig. 4-14 for other legends. Symbols: \blacktriangle —,10‰; \triangle —,15‰; \blacklozenge —,20‰; \lozenge —,25‰; \bullet —,30‰; \circ —,35‰.

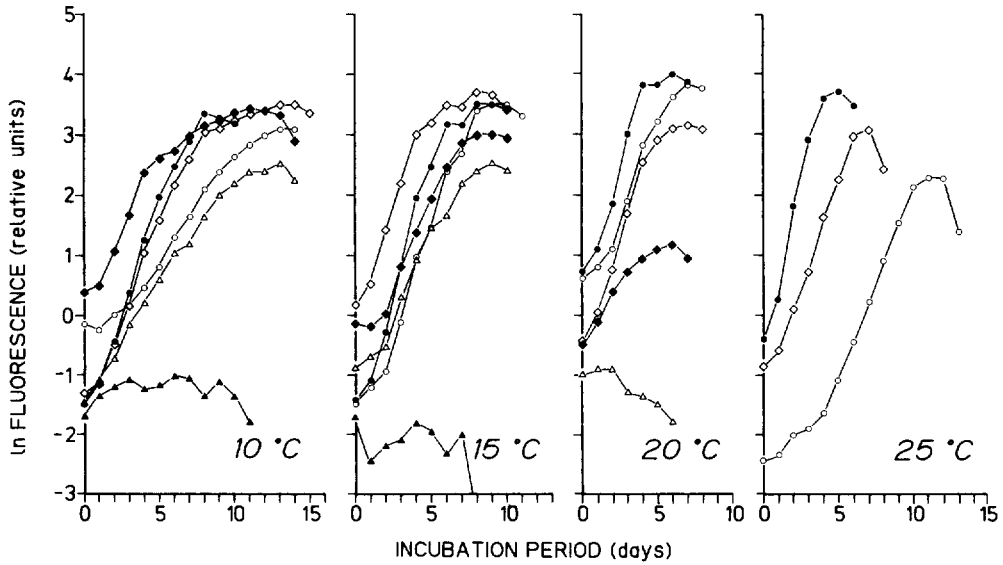


Fig.4-16. Growth curves of *S. costatum* grown under various temperature and salinity combinations. Refer to Fig. 4-14 for other legends. Symbols: -▲-, 10‰; -△-, 15‰; -◆-, 20‰; -◇-, 25‰; -●-, 30‰; -○-, 35‰.

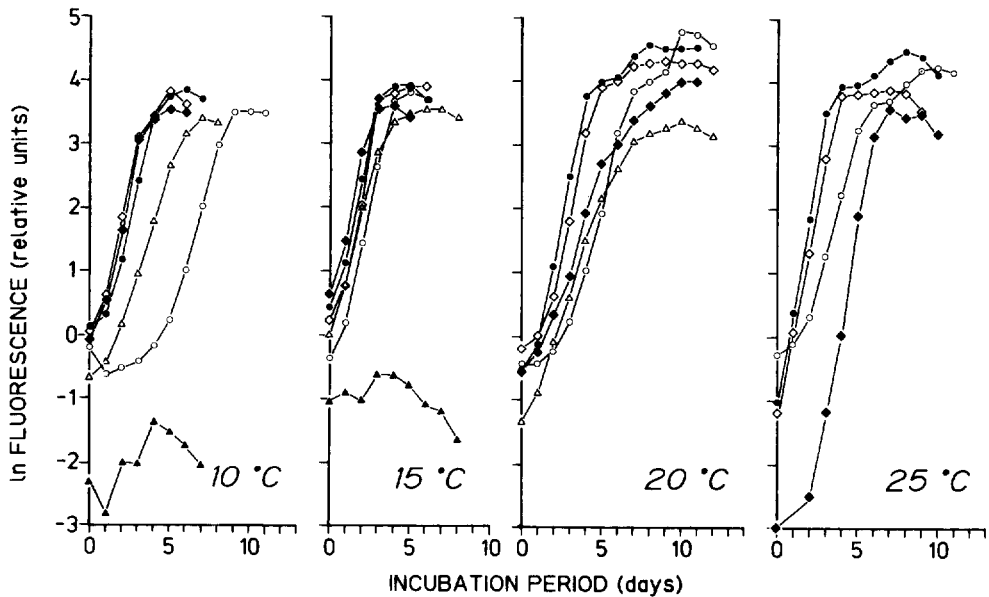


Fig.4-17. Growth curves of *Thalassiosira* sp. grown under various temperature and salinity combinations. Refer to Fig. 4-14 for other legends. Symbols: -▲-, 10‰; -△-, 15‰; -◆-, 20‰; -◇-, 25‰; -●-, 30‰; -○-, 35‰.

Table 4-4. Summary of two-way analysis of variance of the growth rate of four species of diatom as a function of temperature, salinity and their interaction.

Species	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean square	F
<i>C. didymum</i>	Temperature	4	15.644	3.911	356.61***
	Salinity	5	16.110	3.222	293.80***
	Interaction	20	12.216	0.611	55.69***
	Error	60	0.658	0.011	
	Total	89	44.628		
<i>D. brightwellii</i>	Temperature	4	73.162	18.291	465.33***
	Salinity	5	2.131	0.426	10.84***
	Interaction	20	3.856	0.193	4.90***
	Error	60	2.358	0.039	
	Total	89	81.507		
<i>S. costatum</i>	Temperature	4	9.687	2.422	352.20***
	Salinity	5	11.389	2.278	331.25***
	Interaction	20	7.007	0.350	50.96***
	Error	60	0.413	0.007	
	Total	89	28.494		
<i>Thalassiosira</i> sp.	Temperature	4	26.900	6.725	443.61***
	Salinity	5	21.452	4.290	283.01***
	Interaction	20	11.731	0.587	38.69***
	Error	60	0.910	0.015	
	Total	89	60.992		

*** Significant at the 1% level.

り、特に高温側でその範囲が小さくなった。すなわち、25℃では20%以下で、20℃では15%以下の低塩分で増殖が見られなかった。一方、15℃ではすべての塩分（10~35%）で増殖が見られたが、10%での最大収量は非常に小さく、このような低塩分での最大収量の低下は10℃における15%以下の低塩分でも同様にみられた（Fig. 4-14）

次に *D. brightwellii* の増殖曲線を Fig. 4-15に示す。本種は10℃から30℃のすべての温度で増殖が見られた。また25℃以下の温度では10%から35%のすべての塩分で増殖が可能であった。ただし、30℃では25%以下の塩分で増殖できず、さらに30%以上の塩分での最大収量も小さいなど、高温における増殖可能塩分範囲は減少した。

S. costatum の増殖曲線を Fig. 4-16に示す。本種は30℃では全く増殖できなかった。また温度によって増殖可能塩分範囲が異なり、25℃では20%以下の塩分で、また20℃では10%で増殖が起こらないなど、高温では増殖可能な塩分範囲が減少した。一方、15℃以下の温度では10%での最大収量がかなり小さかった。

Thalassiosira sp. の増殖曲線を Fig. 4-17に示す。本種も30℃では増殖できず、また25℃では15%以下、20℃では10%以下の塩分で増殖不能であった。15℃以下では10%での最大収量が小さかった。

以上の増殖曲線から増殖速度を求め、水温と塩分の組み合わせに対する応答曲面として3次元

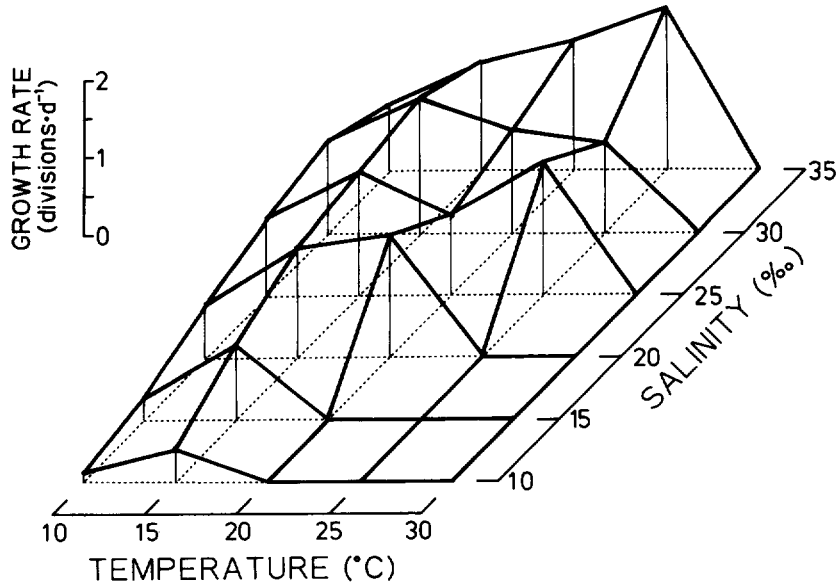


Fig.4-18. Multivariate response surface of the growth rate of *C. didymum* var. *protuberans* as a function of temperature and salinity.

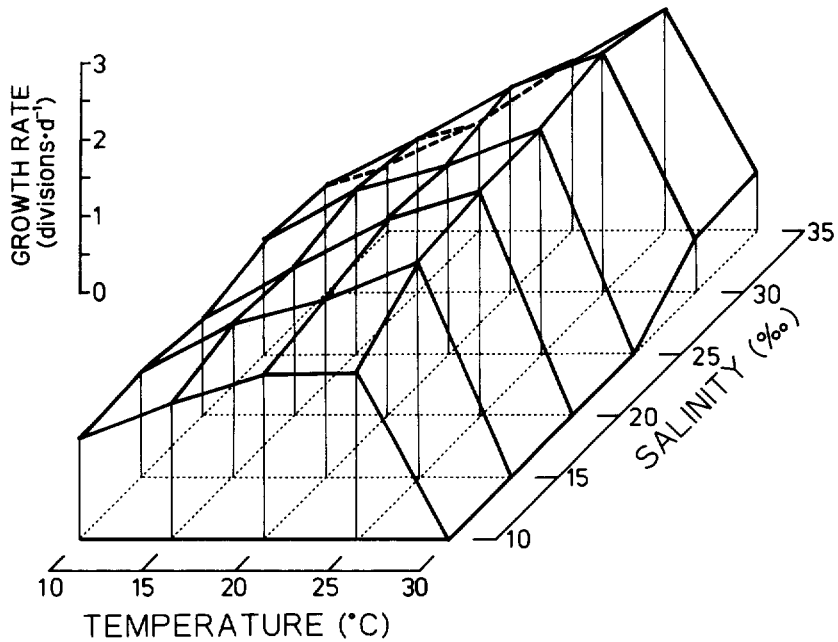


Fig.4-19. Multivariate response surface of the growth rate of *D. brightwellii* as a function of temperature and salinity.

的に表した (Figs. 4-18 ~ 4-21)。さらにそれらの関係を 2 因子要因計画で解析した結果を Table 4-4 に示した。*C. didymum* var. *protuberans* では、25°C を上限として高温・高塩分ほど増殖速度が大きくなる傾向が見られた。最大増殖速度を与える水温と塩分の組み合わせは

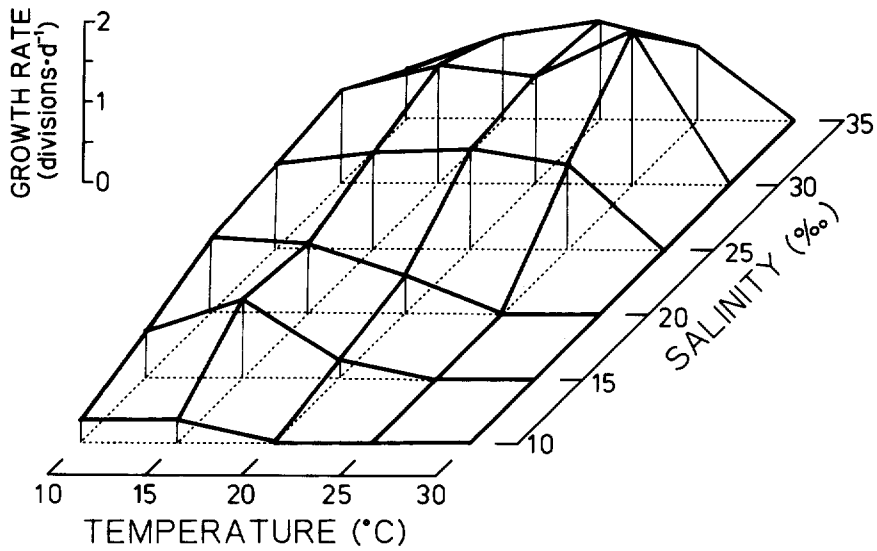


Fig.4-20. Multivariate response surface of the growth rate of *S. costatum* as a function of temperature and salinity.

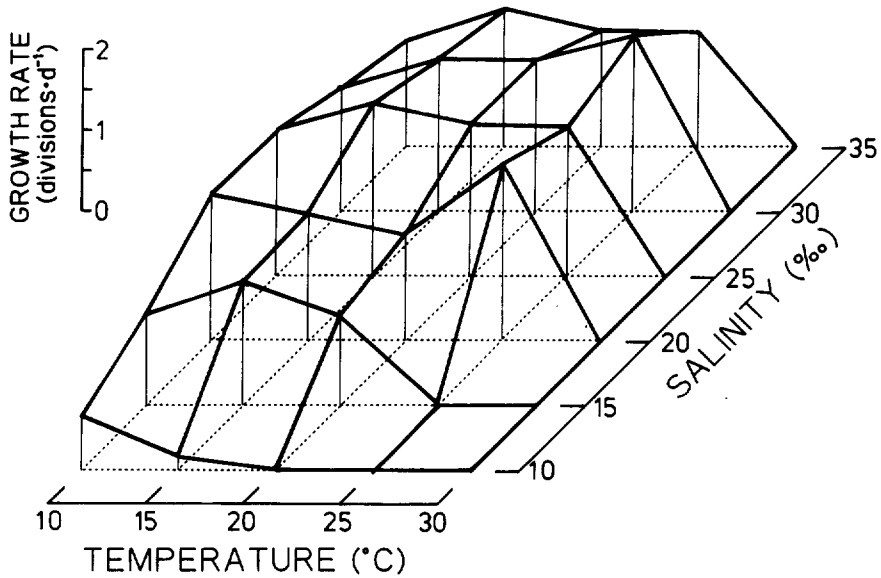


Fig.4-21. Multivariate response surface of the growth rate of *Thalassiosira* sp. as a function of temperature and salinity.

25°C, 35‰で、最大値 2.1 divisions day⁻¹が得られた (Fig. 4-18)。分散分析の結果、水温と塩分の主効果及び交互作用が有意であり、平均平方で見た場合、水温と塩分の効果はほぼ等しかった (Table 4-4)。

D. brightwellii では25°Cを上限として温度の上昇とともに増殖速度が増大した。しかし同一温度内では塩分による増殖速度の差はほとんど見られなかった。最大増殖速度を与える水温と

塩分の組み合わせは25°C, 30 ‰であり, 最大値として3.1 divisions day⁻¹が得られた (Fig. 4-19)。分散分析の結果, 水温と塩分の主効果及び交互作用が有意であった (Table 4-4)。また総平方和のうち90%が水温で占められており, 本種の増殖速度の変動はほぼ水温のみで説明できることが判明した。

S. costatum では25°C, 30 ‰を上限として高温・高塩分ほど増殖速度が増大するといった, *C. didymum* var. *protuberans* とほぼ同様の傾向が見られた。最大増殖速度を与える水温と塩分の組み合わせは25°C, 30 ‰で, 1.9 divisions day⁻¹の増殖速度が得られた (Fig. 4-20)。分散分析の結果, 水温と塩分の主効果及び交互作用が有意であり, 水温と塩分の効果はほぼ等しかった (Table 4-4)。

Thalassiosira sp. は *C. didymum* var. *protuberans* 及び *S. costatum* と, *D. brightwellii* との中間的な傾向を示した。すなわち低温あるいは低塩分における増殖速度があまり低下せず, 比較的広範囲の水温・塩分の組み合わせ条件下で高い増殖速度が維持された (Fig. 4-21)。最大増殖速度を与える水温と塩分の組み合わせは25°C, 30 ‰で, 最大2.2 divisions day⁻¹が得られた。分散分析の結果, 水温と塩分の主効果及び交互作用が有意であった。水温の効果の方が塩分よりやや大きかった (Table 4-4)。

考 察

現場海域における植物プランクトンの出現には明瞭な季節変化が見られることが知られており (IGNATIADES and SMAYDA 1970, NAKAHARA 1978), 季節遷移と呼ばれている。そのような季節性をもたらす環境要因としては, 光 (HITCHCOCK and SMAYDA 1977), 水温 (SMAYDA 1973), 塩分 (QASIM *et al.* 1972) 等の物理的な要因のみならず, 多数の環境因子が挙げられている (SMAYDA 1980)。このように植物プランクトン種の遷移は極めて複雑な生態現象であるため (GUILLARD and KILHAM 1977), 本研究結果のみから遷移機構について論ずることは困難であると考えられる。したがって, ここでは珪藻類の水温と塩分に対する増殖特性に基づいて出現の季節性について論じ, 浦ノ内湾で観察された *G. nagasakiense* と珪藻類との出現時期の違い (前章 Fig. 3-17) について考察を試みる。

本研究の結果, 4種の珪藻類は温度10~25°C, 塩分10~35 ‰で増殖が可能であったことから広温・広塩分性であると判断される。またそれらの好適水温及び塩分はこれまでの研究結果とほぼ一致した (TAKANO 1963, JITTS *et al.* 1964, EPPLEY 1977, SHIMURA *et al.* 1979)。ただし好適環境条件を論じる際に, 水温によって増殖可能な塩分範囲が変化するという要因間の相互作用が存在することに留意する必要がある。

ほとんどの珪藻類の場合, 最大増殖速度は25°Cで観察されたが, 増殖可能塩分範囲が最も広い温度は15°Cで, 両者の間には10°Cもの差が見られた (Figs. 4-18~4-21)。したがって, 増殖可能塩分範囲から見た場合, 好適水温は15~20°Cにあるとも言える。第III章で述べたように, この水温は浦ノ内湾における珪藻類の増殖盛期とほぼ一致している (Fig. 3-17)。しかし, 第1節及び2節で述べた *G. nagasakiense* や *Chattonella* の場合には, 最大増殖速度を与える温度と

増殖可能な塩分範囲が最も広い温度とは一致しており、この点は珪藻類と大きく異なるところである。ところで、珪藻類 *Detonula confervacea*, *T. nordenskiöldii* や *S. costatum* では、現場海域で高密度に出現する水温が実験条件下で得られたそれらの増殖最適水温よりもかなり低いことが知られている (JITTS *et al.* 1964, SMAYDA 1969, 1980)。本研究で明らかになったように要因間に相互作用があることを考慮すると、現場海域では水温以外の環境因子が増殖の制限要因になっており、その結果このような相違がもたらされた可能性が考えられる。したがって、SMAYDA (1980) も指摘しているように、温度のみが種の遷移機構を制御するのではなく、他の要因あるいはそれらの組み合わせが遷移過程に影響を及ぼしているのであろう。

YODER (1979) は *S. costatum* のクローン株が広範囲の温度で増殖できることから、冬～春季の増殖と夏～秋季のそれとは同一のシードポピュレーションから始まっていると考えた。それに対して GALLAGHER (1980) は *S. costatum* の冬季群は夏季群と遺伝的に異なることを示し、単一クローン株は個体群すべてを代表しているとは言えず、集団遺伝学的な見地から個体生態学的手法に疑問を投げかけている。したがって、個体群の動態を個体生態学的に明らかにしようとする場合、複数のクローン株について増殖生理を明らかにして行く必要があろう。

上述のように水温と塩分に対する増殖応答は珪藻種によってそれぞれ異なった。しかし、大別すると水温と塩分の変化に敏感で高温かつ低塩分で増殖できない種 (*C. didymum* var. *protuberans*, *S. costatum* 及び *Thalassiosira* sp.) と、温度のみに敏感で塩分の影響がほとんどない種 (*D. brightwellii*) に区別できた。ところで、NAKAHARA (1978) は舞鶴湾に出現する植物プランクトンの季節変化を詳細に調べ、*S. costatum* と *C. didymum* の出現の季節性には高い正の相関が見られることを示した。彼はその要因を両種の好適増殖条件が等しいか、あるいは一方の種によって他種の増殖が促進されたためと考えた。本研究結果は両種の増殖好適条件が等しいという前者の考えを実験的に裏付けたことになる。

第III章で述べたように、浦ノ内湾における珪藻類と *G. nagasakiense* の出現盛期には相違が見られた (Fig. 3-17)。すなわち、珪藻類の出現は5月から9月後半にかけて散発的で小規模であったが、10月から12月初旬にかけての期間、及び2月には高い細胞密度 ($>10^3$ cells ml^{-1}) で出現した。一方、*G. nagasakiense* は珪藻と相反するように7～8月の夏季と12月中旬から1月初旬にかけての冬季に比較的高い密度 ($>10^2$ cells ml^{-1}) で出現した。ではこのような出現時期の相違は何に起因しているのであろうか。GOLDMAN and RYTHER (1976) は水温が植物プランクトン種の遷移に大きく影響を及ぼすことを連続培養実験によって明らかにした。すなわち、10℃以下では *S. costatum* が優占するが、温度の上昇とともに優占種が *Phaeodactylum tricornutum* から *Nitzschia closterium* へと変化し、さらに25℃を越えると珪藻以外の鞭毛藻が卓越した。したがって夏季における珪藻類の衰退は、本実験結果からも明らかのように、高温及び低塩分で増殖できないといった珪藻類の増殖特性によって説明されよう。それに対して、*G. nagasakiense* 等の渦鞭毛藻は高温でも増殖可能であるため、夏季に卓越できるものと考えられる。このように温度は夏季に両者の出現の相違をもたらす重要な要因の一つであると考えられる。

ところが、初冬（12月中旬～1月下旬）及び初春（3月）における珪藻出現密度の低下は水温と塩分では説明できず、他の要因を考慮する必要がある。北半球の温帯域ではこの季節の光強度は弱く、さらに日照時間も短いため、植物プランクトンは光制限下におかれているものと考えられる。したがって、この時期の珪藻類の減少要因の一つには光条件が挙げられる。さらに、珪藻類は生活上に休眠胞子を形成することが知られており、その形成のため栄養塩の欠乏が重要であることが指摘されている（HARGRAVES and FRENCH 1975, 1983, SMETACEK 1985）。初冬及び初春における珪藻密度の減少の以前には高い増殖が見られている（Fig. 3-17）。したがって、秋及び2月に見られた高密度の増殖によって水域の栄養塩レベルが低下し、それによって珪藻類の胞子形成が行われ、沈降によって水柱から消失して行ったものと推察される。栄養塩をめぐる競合者である珪藻が排除されたことにより、*G. nagasakiense* は低温によって増殖速度は低下するものの着実に個体群密度を高めることができたのであろう。

TANAKA *et al.* (1983) は英虞湾から分離した植物プランクトンの増殖最適塩分に基づき、それらが34‰付近の塩分が好適な群（外洋性型）、28‰が好適な群（沿岸性型）、そして25‰以下の塩分が好適な群（河口域型）の3群に区別できることを示した。さらにそれらの群に属する植物プランクトンの出現に季節性が見られ、外洋性群は河口域性群に比べて夏季に多く冬に少ない傾向を認めた。ただしこの季節性と現場の塩分とが一致しないことから、塩分は種組成の変化をもたらす要因ではないと考察している。

以上のように水温と塩分はそれら単独では種の遷移機構を説明するものではないが、ここで示されたように *G. nagasakiense* と珪藻との出現時期の違いを律する重要な要因であることは間違いないと考えられる。

第4節 *G. nagasakiense* の増殖に及ぼす栄養塩（窒素、リン）の影響

自然条件下における植物プランクトンは互いに限りある栄養塩を競合していると考えられる。したがって、赤潮の発生機構を考える上で、赤潮藻類がどのような形態の栄養塩をどの位の速度で取り込み増殖に用いているかといった、栄養塩濃度と増殖速度の定量的関係を明らかにすることは重要な課題である。栄養塩の吸収及び利用能に関して、特定種が他種より生態的に優位であるならば、流入・回帰する栄養塩を直ちに吸収することによって海域における栄養塩レベルを低く保ち、他種の増殖を制限することにより生息場の独占を図ることが可能であろう。しかるに、栄養塩の利用特性と増殖の動力学 (Kinetics) の詳細が明らかにされている赤潮藻類は、ラフィド藻の *C. antiqua* と *H. akashiwo* の2種のみである (TOMAS 1978, 1979, 1980, WATANABE *et al.* 1982, NAKAMURA and WATANABE 1983a,b)。

本節ではまず *G. nagasakiense* の培養実験に必要な人工海水培地の検討を行い、次に *G. nagasakiense* による形態別窒素及びリンの利用能を把握し、同時に実験を行った珪藻類のそれと比較した。最後に窒素あるいはリン制限下における *G. nagasakiense* の増殖動力学を検討し、赤潮発生に関わる栄養塩の影響について考察した。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験に用いた *G. nagasakiense* は1985年に周防灘で分離後、ピペット洗浄法 (岩崎 1967) によって無菌化したクローン株 (G303 AX-2) である。また比較のため用いた珪藻類は前節で用いた広島湾産の *C. didymum* var. *protuberans*, *D. brightwellii*, *S. costatum*, *Thalassiosira* sp. の無菌クローン株である。培地には特に明記しない場合は改変 SWM-3 (CHEN *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987) を用いた。

2. *G. nagasakiense* 用の人工海水培地の検討

検討した人工海水培地は ASP₂-NTA (IWASAKI 1961), Medium K (KELLER *et al.* 1987), ESAW (HARRISON *et al.* 1980), NH-15 (GATES and WILSON 1960) の4種類である。ESAW については沈澱を避けるため培地組成を2つに分けてオートクレーブする方法と、孔径0.1 μm のポリカーボネートメンブレンフィルター (Nuclepore 社) で濾過滅菌する方法の2通りで培地を調製した。これらの培地を10 ml づつネジ口試験管に分注し、それに天然海水を基本とした改変SWM-3で継代培養を行っていた *G. nagasakiense* を1 ml 接種し25°C, 120 μE m⁻²s⁻¹ (明暗周期は14hL:10hD) の条件で培養を行い、増殖の可否を調べた。増殖が見られた場合には更に同種の培地に植え継ぎ、継代培養の可能性を検討した。

3. *G. nagasakiense* の細胞内窒素及びリン含量

G. nagasakiense を対象となる窒素及びリンを除いた改変 SWM-3培地に接種し、2週間の前培養を行った。単一の窒素源としては硝酸 (NaNO₃), アンモニア (NH₄Cl) あるいは尿素を、単一のリン源としては無機リン (Na₂HPO₄) あるいはグリセロリン酸ナトリウムを用いた。SWM-3培地の基本海水には黒潮表層水を用い、窒素及びリンの添加量はそれぞれ0~25 μM, 0~2.5 μMとした。窒素源に関する実験の際にはリン源としてリン酸ナトリウムを、またリン源の実験には窒素源として硝酸ナトリウムを、それぞれ SWM-3 の基本組成通り添加した (N: 2 mM, P: 100 μM)。なおオートクレーブによる変化 (MCLACHLAN 1979) を防ぐため、これらの窒素・リン源は濾過滅菌後 (0.1 μm シリンジフィルター, ANOTEC 社), 前もってオートクレーブしておいた窒素あるいはリン無添加の SWM-3 へ無菌的に加えた。このようにして調製した培地100 ml を分注した三角フラスコに前培養を接種し (接種密度 50 cells ml⁻¹), 25°C, 130 μE m⁻²s⁻¹ (明暗周期 12hL:12hD) で培養した。その後1週間おきに検鏡による細胞数の計数を行った。さらに最大収量と添加栄養塩濃度から次式に従って細胞内含量 (Q) を計算した。

$$Q = \frac{S}{N_t - N_0}$$

ここで S は初期栄養塩濃度 (μM), N_t と N₀ はそれぞれ最高細胞密度, 接種細胞密度 (cells ml⁻¹) を示している。またそれらの差 (N_t - N₀) を最大収量とした。

4. 珪藻類による形態別窒素及びリンの利用能

先に示した4種の珪藻類は対象となる窒素あるいはリンを除いた改変 SWM-3培地であらかじめ10日間前培養された。窒素源としては、硝酸 (NaNO_3)、アンモニア (NH_4Cl) あるいは尿素を、またリン源としては無機リン (Na_2HPO_4) あるいはグリセロリン酸ナトリウムを用いた。上述の方法で調製した SWM-3 培地 (窒素:0~250 μM , リン:0~25 μM) を PP キャップ試験管 ($\phi 25$ mm) に分注し、それぞれの珪藻類を接種後、温度15°C, 光強度280 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (明暗周期14hL:10hD) で培養した。培養開始後、蛍光光度計 (TURNER DESIGN 社 model 110) により毎日 in vivo クロロフィル蛍光を測定し、増殖の有無を判定した。

5. *G. nagasakiense* による窒素及びリンの利用能と栄養塩制限下における増殖の動力学

窒素あるいはリン無添加の SWM-3 で2週間にわたり前培養した *G. nagasakiense* を、上述の方法で調製した形態別窒素 (0~250 μM) あるいはリン (0~25 μM) を含む SWM-3 培地を分注した PP キャップ試験管 ($\phi 25$ mm) に接種し、温度25°C, 光強度250 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (明暗周期14hL:10hD) で培養した。窒素及びリンの添加はすべて濾過滅菌法 (0.1 μm シリンジフィルター, ANOTEC 社) によって行った。培養開始後1日おきに蛍光光度計により in vivo クロロフィル蛍光を測定し、その結果に基づき、第1節に示した計算式で増殖速度 (divisions day⁻¹) を計算した。増殖速度と栄養塩濃度との関係を表すために、以下に示す Monod の式の適用を検討した。

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$$

ここで μ_m と K_s はそれぞれ最大増殖速度及び増殖速度の半飽和定数 (μM) を示す。これらの増殖パラメータは次の関数 $f(\mu_m, K_s)$ を最小にする値をシンプレックス法を用いた逐次計算法によって求めた。

$$f(\mu_m, K_s) = \sum_{i=1}^n [\mu_i - \mu_m S_i / (K_s + S_i)]^2$$

ここで μ_i , S_i は増殖速度及び栄養塩濃度の測定値である。

結 果

1. 人工海水培地による *G. nagasakiense* の増殖

人工海水培地として ASP₂-NTA, Medium K, ESAW, NH-15 を検討したが、いずれの場合にも3回の植え継ぎ以降 *G. nagasakiense* は増殖せず、継代培養には至らなかった。そのため以下の実験には1990年8月に高知沖 (32° 10'N, 134° 05'E) で採取した黒潮表面水 (DIN:0.81 μM , DIP:0.028 μM) を基本とした改変 SWM-3を用いた。

2. *G. nagasakiense* の細胞内窒素・リン含量

種々の窒素濃度から得られた *G. nagasakiense* の最大収量と細胞内窒素含量 (Q) を Table 4-5 に示す。最大収量は窒素濃度の上昇とともに増加し、25 μM の硝酸とアンモニアではほぼ同様の細胞密度 ($6\sim 7\times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$) に達した。しかし25 μM の尿素における収量は硝酸等の2分の1であった。細胞内窒素含量は硝酸で平均3.95 pmol cell^{-1} 、アンモニアで平均3.74 pmol cell^{-1} で、ほぼ等しい値が得られた。

種々のリン濃度における最大収量と細胞内リン含量 (Q) を Table 4-6 に示す。*G. nagasakiense* の最大収量はリン濃度の上昇とともに増加した。無機リンよりもグリセロリン酸の方で高い収量が得られた。細胞内リン含量は前者で0.35 pmol cell^{-1} 、後方で0.23 pmol cell^{-1} と算出された。

3. *G. nagasakiense* による形態別窒素・リン利用能

最大収量 (in vivo クロロフィル蛍光値) に及ぼす形態別窒素及びリン濃度の影響を Fig. 4-22 に示す。本種は窒素源として硝酸、アンモニア及び尿素のすべてを利用した。硝酸及びアンモニアの場合には、窒素濃度の上昇とともに最大収量も増加した。しかし、尿素では6.4 μM

Table 4-5. Final cell yields (N: cells ml^{-1}) and minimum cell quotas of nitrogen (Q: pmol cell^{-1}) in *G. nagasakiense* grown at the different concentrations of nitrogen.

(μM)	NaNO_3		NH_4Cl		Urea	
	N	Q	N	Q	N	Q
None	312	2.60	312	2.60	312	2.60
0.256	286	3.72	313	3.41	400	3.31
0.64	390	3.72	374	3.88	539	3.88
1.6	498	4.83	569	4.24	1,170	3.43
4	1,020	4.72	1,420	3.39	2,280	3.86
10	2,520	4.29	2,410	4.49	2,910	7.15
25	6,820	3.78	6,150	4.20	3,140	16.18
Mean		3.95		3.74		5.77

Table 4-6. Final cell yields (N: cells ml^{-1}) and minimum cell quotas of phosphorus (Q: pmol cell^{-1}) in *G. nagasakiense* grown at the different concentrations of phosphorus.

(μM)	NaH_2PO_4		Glycerophosphate	
	N	Q	N	Q
0.0256	145	0.37	240	0.22
0.064	259	0.36	499	0.18
0.16	636	0.30	1,083	0.17
0.4	1,790	0.24	2,730	0.16
1.0	3,720	0.28	6,530	0.16
2.5	6,910	0.37	11,040	0.23
Mean		0.35		0.23

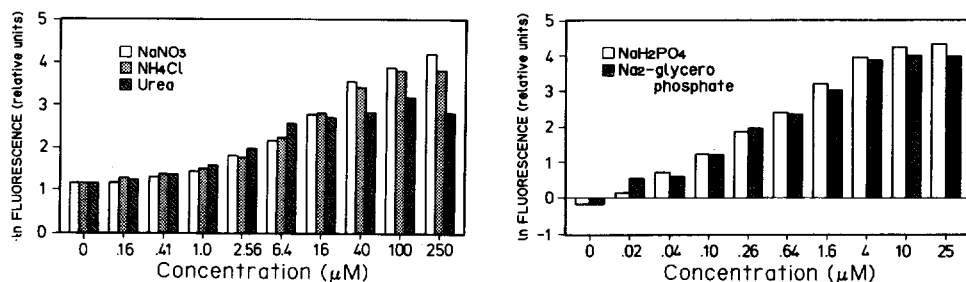


Fig.4-22. Growth of *G. nagasakiense* at different nitrogen (left) and phosphorus (right) sources.

以上になると最大収量の増加は見られなかった。一方、本種はリン源として無機リン及びグリセロリン酸の両者を利用し、その最大収量は $4 \mu\text{M}$ 以上でほぼ飽和した (Fig. 4-22)。

4. 珪藻類の形態別窒素・リン利用能

4種の珪藻類による形態別窒素及びリンの利用能をFig. 4-23に示した。これら4種は窒素源として硝酸とアンモニアをほぼ同程度利用した。しかし、尿素添加区の最大収量が無添加区を若干でも上回ったのは *D. brightwellii* のみであり、他の珪藻類は尿素を全く利用しなかった。また、珪藻類は無機・有機両形態のリンを利用したが、*S. costatum* と *Thalassiosira* sp. は低濃度での増殖が悪く、特に *S. costatum* は低濃度のグリセロリン酸をほとんど利用しなかった。このように珪藻類は有機態窒素である尿素が利用できず、また低濃度で存在するリン（特に有機態リン）の利用能力が低いことが判明した。

5. *G. nagasakiense* の増殖の動力学

種々の形態別窒素濃度（硝酸，アンモニア及び尿素）で培養した *G. nagasakiense* の増殖曲線を Figs. 4-24～4-26に示す。硝酸の場合，添加濃度が高くなるにつれて最大収量が増大し，さらに対数増殖期の期間も長くなった (Fig. 4-24)。アンモニアの場合にも硝酸とほぼ同様の増殖曲線が得られた。ただし， $250 \mu\text{M}$ で増殖曲線の傾きがかなり小さくなった (Fig. 4-25)。一方，尿素の場合には硝酸やアンモニアとは異なる結果が得られた。すなわち，培養開始から4日目に増殖曲線の変曲点があり，それ以降で曲線の傾きが減少した (Fig. 4-26)。これは基本海水に含まれていた無機態窒素 ($0.81 \mu\text{M}$) が先に利用され，それが枯渇した後に尿素が利用されたことを示している。したがって，動力的解析には4日以降の直線部分について求めた増殖速度を用いた。

種々の形態別リン濃度で培養した *G. nagasakiense* の増殖曲線を Fig. 4-27と4-28に示す。本種は無機リン酸 (Fig. 4-27) 及びグリセロリン酸 (Fig. 4-28) でほぼ同様の増殖を示した。すなわち，低濃度ではほとんど増殖が見られないが，リン濃度の増加につれて増殖曲線の傾き及び収量ともに増大し， $4 \mu\text{M}$ 以上ではほぼ同じ増殖曲線が得られた。

以上の増殖曲線から増殖速度を計算し，先に示した逐次計算法によって増殖パラメータ μ_m 及び K_s を求めた (Table 4-7)。 μ_m については尿素を除いた窒素源及びリン源で本種の最大増殖速度である $1.0 \text{ division day}^{-1}$ (飯塚・峯 1983) に相当する値が得られた。しかし尿素ではそ

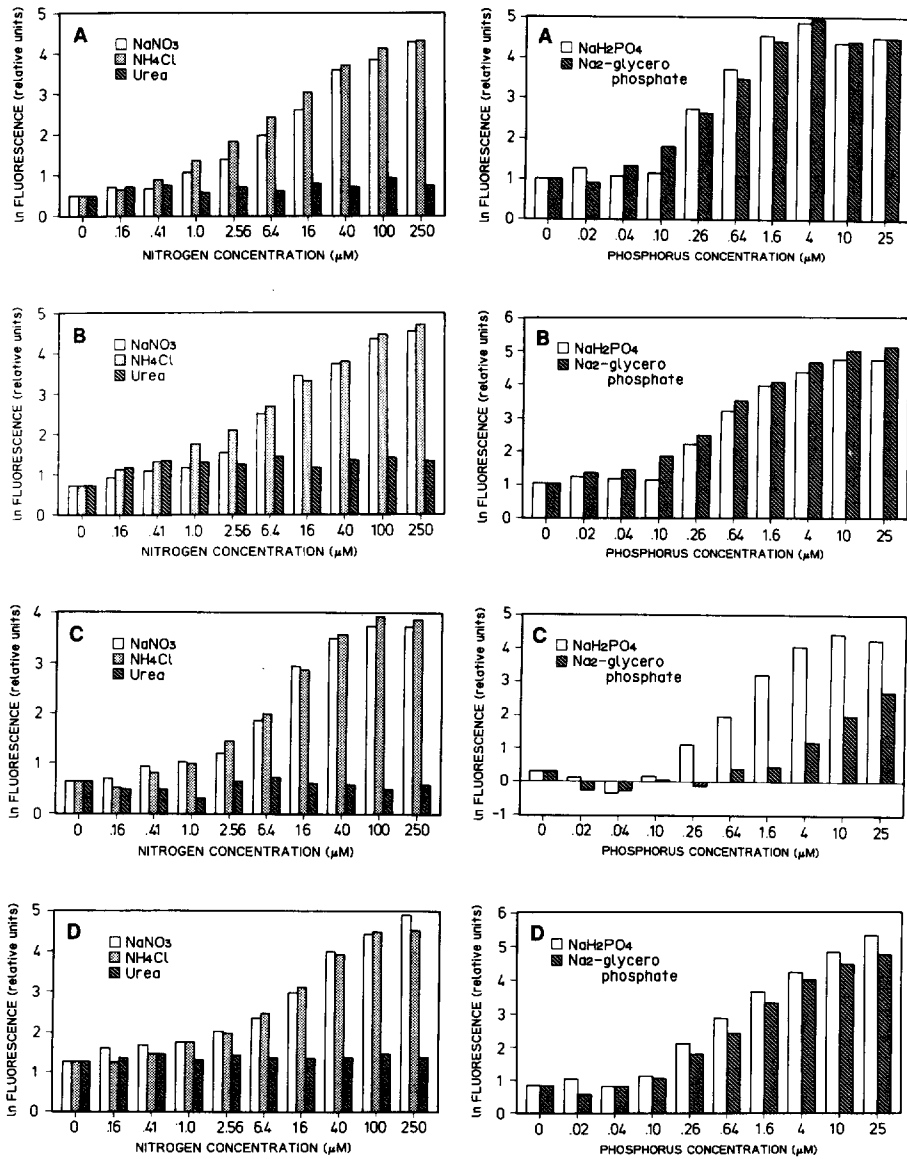


Fig.4-23. Growth of four species of diatom at different nitrogen (left) and phosphorus (right) sources.

A: *C. didymum* var. *protuberans*, B: *D. brightwellii*,

C: *S. costatum*, D: *Thalassiosira* sp.

これらの5分の1に留まった。また、窒素に関する K_s 値は $0.6 \sim 1.0 \mu\text{M}$ で、アンモニアで最も小さかった。リンの K_s 値は $0.15 \mu\text{M}$ で無機態及び有機態リン間に差は見られなかった。

μ_m と K_s によって決定された双曲線と実際の栄養塩濃度で得られた増殖速度の測定値をプロットしたのが Fig. 4-29 (窒素) 及び Fig. 4-30 (リン) である。Figs. 4-29と4-30に示される

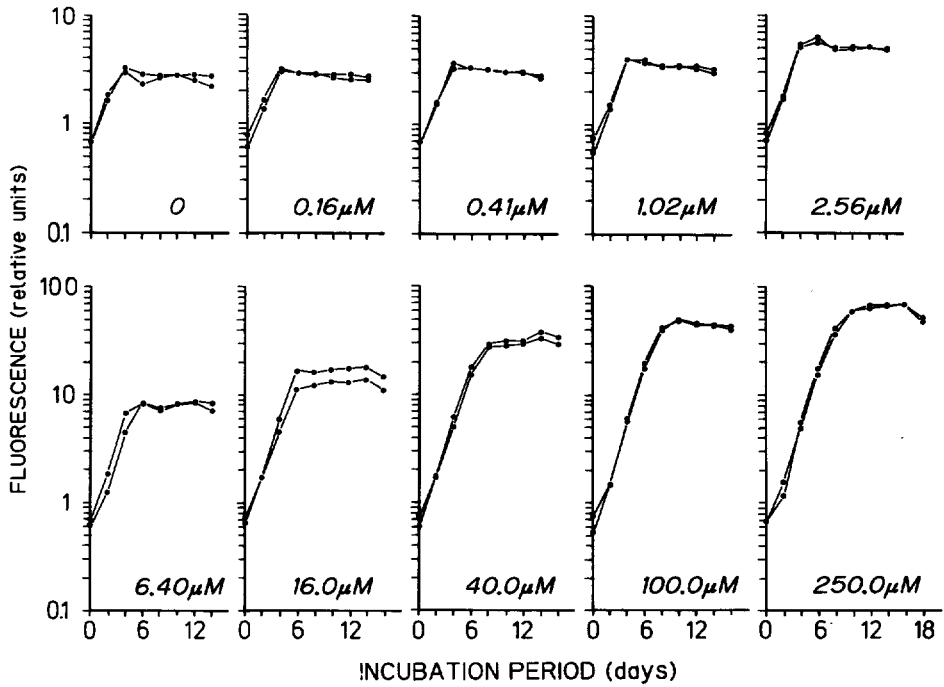


Fig.4-24. Growth curves of *G. nagasakiense* at different concentrations of nitrate at 25 °C. Numbers below each curve are the nitrate concentrations added to the medium.

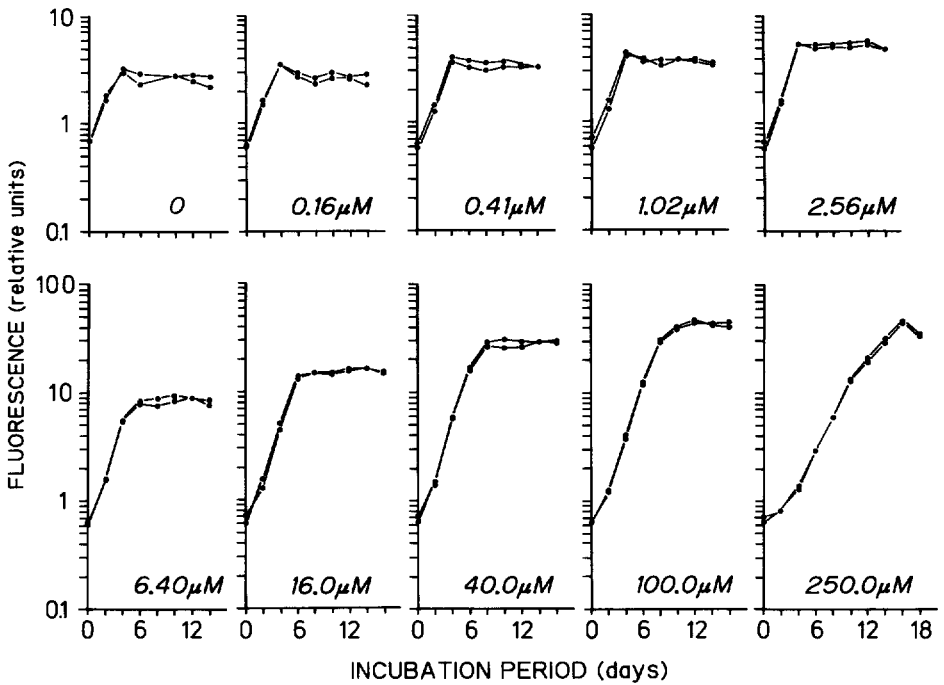


Fig.4-25. Growth curves of *G. nagasakiense* at different concentrations of ammonium at 25 °C. Refer to Fig. 4-24 for other legends.

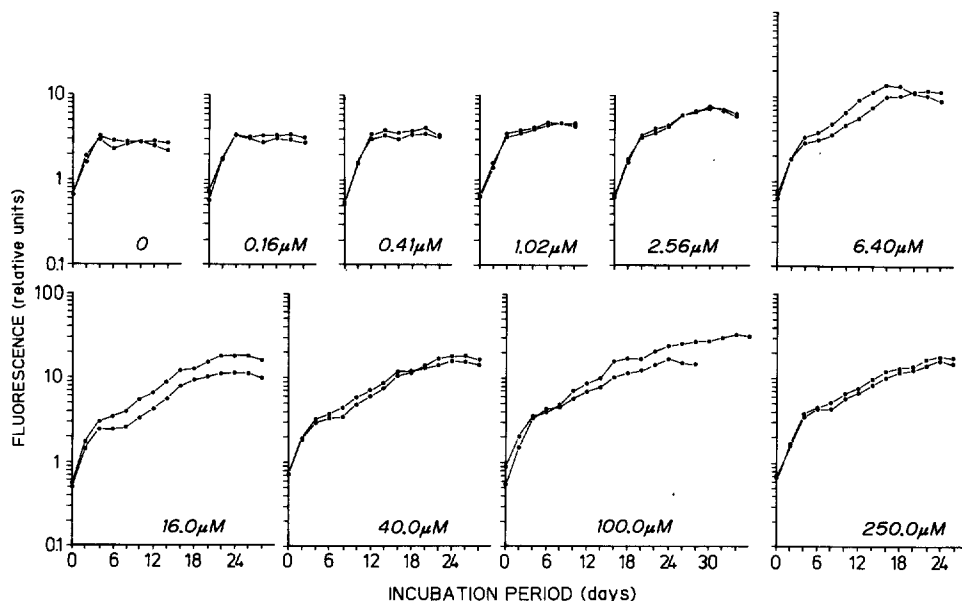


Fig.4-26. Growth curves of *G. nagasakiense* at different concentrations of urea at 25 °C. Refer to Fig. 4-24 for other legends.

Table 4-7. Growth parameters of *G. nagasakiense* for nitrogen and phosphorus sources.

Nutrient	μ_m (divisions day ⁻¹)	K_s (μ M)
NaNO ₃	0.97	0.78
NH ₄ Cl	0.98	0.58
Urea	0.18	1.02
NaH ₂ PO ₄	0.82	0.14
Glycerophosphate	0.83	0.15

ように理論値と測定値が良く一致することから、栄養塩濃度と *G. nagasakiense* の増殖速度との関係は Monod の式に従うことが明らかとなった。まず硝酸態窒素の場合、増殖速度は窒素濃度の増加とともに急激に増大し、添加濃度 6.4 μ M でほぼ飽和した (Fig. 4-29)。アンモニアの場合も硝酸と同様の関係が見られた。ただし、100 μ M 以上から増殖速度が低下し始め、250 μ M では最大増殖速度の 2 分の 1 となった (Fig. 4-29)。尿素の場合には、硝酸等と比べ増殖速度が非常に小さい反面、高濃度でもその低下が見られなかった。無機リンとグリセロリン酸における増殖速度とリン濃度との間にも Monod の式で表される双曲線関係が見られた (Fig. 4-30)。両形態別リンに対する *G. nagasakiense* の増殖応答はほぼ等しかった。

窒素制限 (N:20 μ M, P:20 μ M) 及びリン制限 (P:2 μ M, N:200 μ M) 培地で *G. nagasakiense* を培養すると、それらの細胞の大きさが異なる現象が認められた (Fig. 4-31)。それらの細胞長と細胞幅を計測した結果、リン制限では平均細胞長 29.9 μ m、窒素制限では 22.2 μ m で、両者の間には統計的に有意な差が認められた (t-検定, $p < 0.01$)。さらにリン制限細胞では細胞長よ

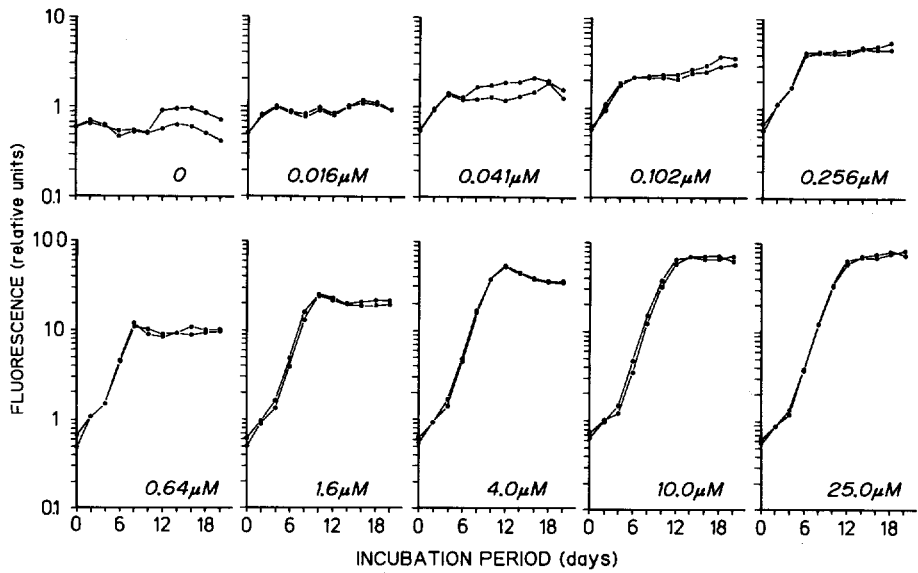


Fig.4-27. Growth curves of *G. nagasakiense* at different concentrations of phosphate at 25 °C. Refer to Fig. 4-24 for other legends.

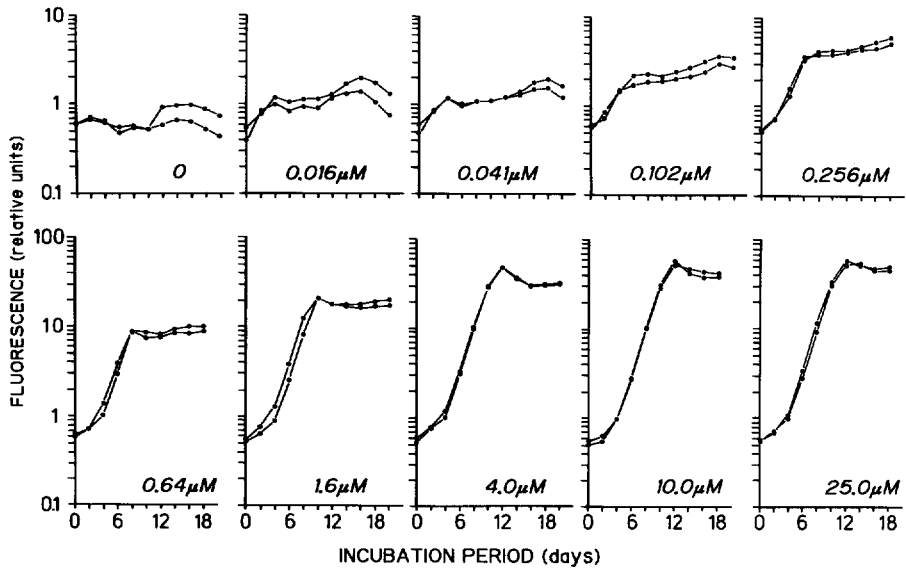


Fig.4-28. Growth curves of *G. nagasakiense* at different concentrations of glycerophosphate at 25 °C. Refer to Fig. 4-24 for other legends.

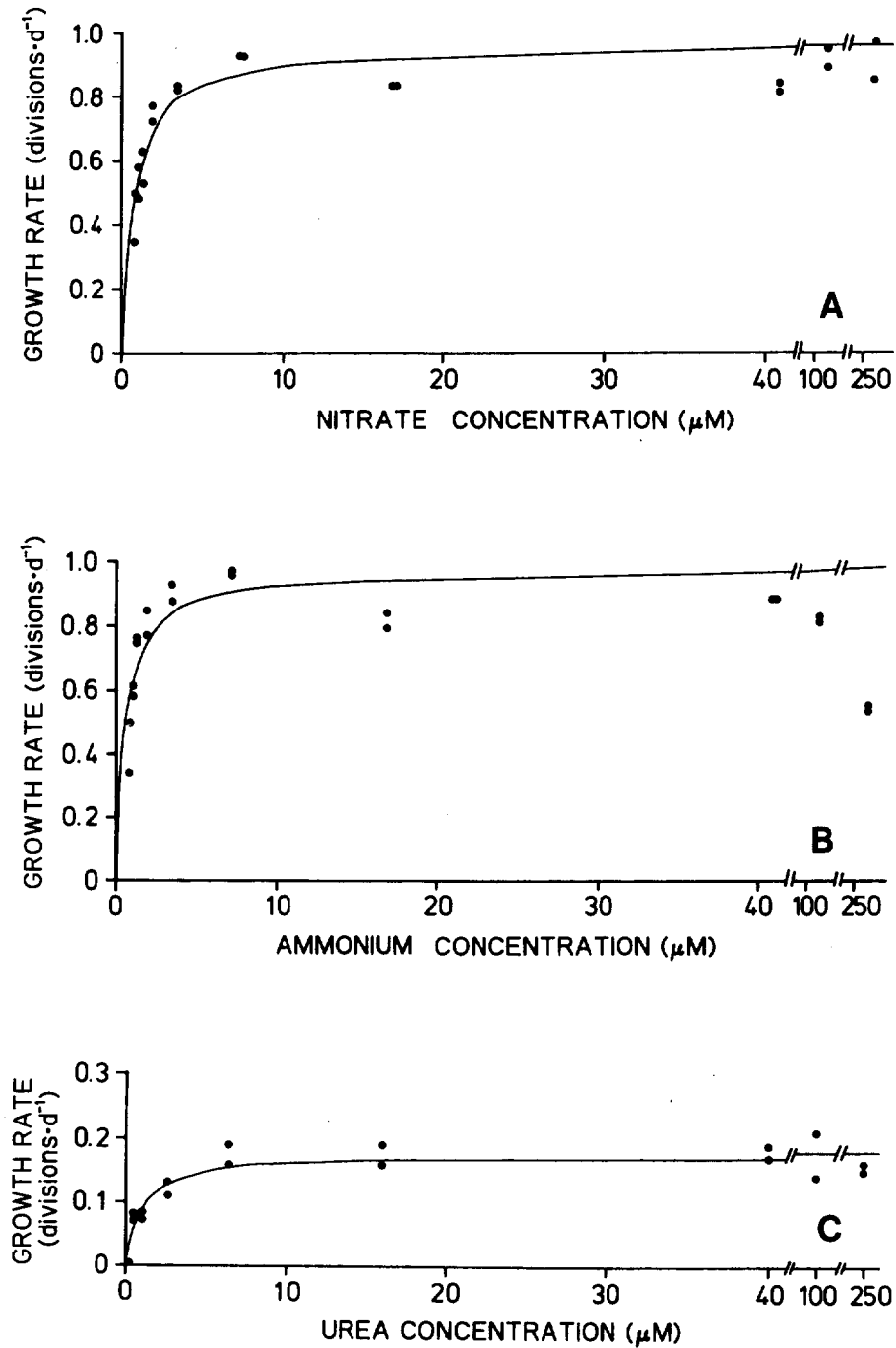


Fig.4-29. Relationship between the growth rate of *G. nagasakiense* and different nitrogen concentrations. A: nitrate, B: ammonium, C: urea. Rectangular hyperbola in the figure was fitted by simplex minimization procedure.

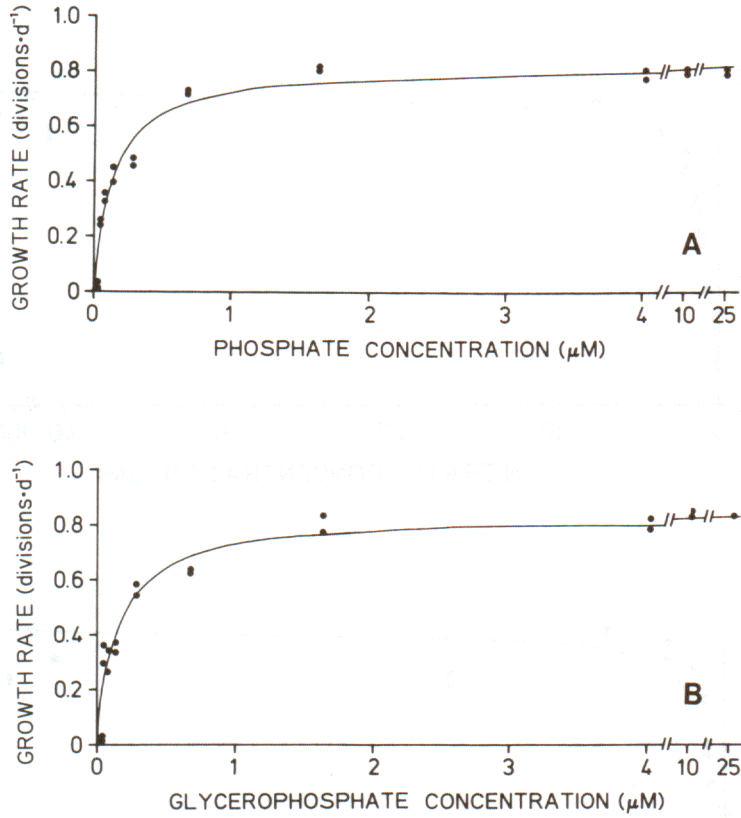


Fig.4-30. Relationship between the growth rate of *G. nagasakiense* and different phosphorus concentrations. A: phosphate, B: glycerophosphate. Refer to other legends for Fig. 4-29.

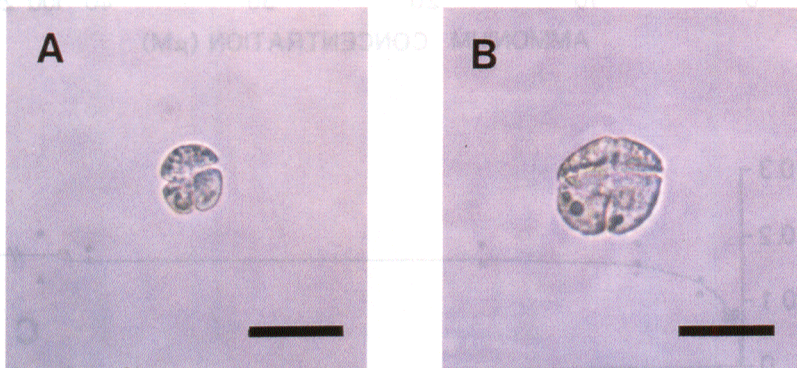


Fig.4-31. Photomicrographs of the vegetative cells of *G. nagasakiense* grown in nitrogen-limited (A) and phosphorus-limited (B) media. Scale bars=30 μm.

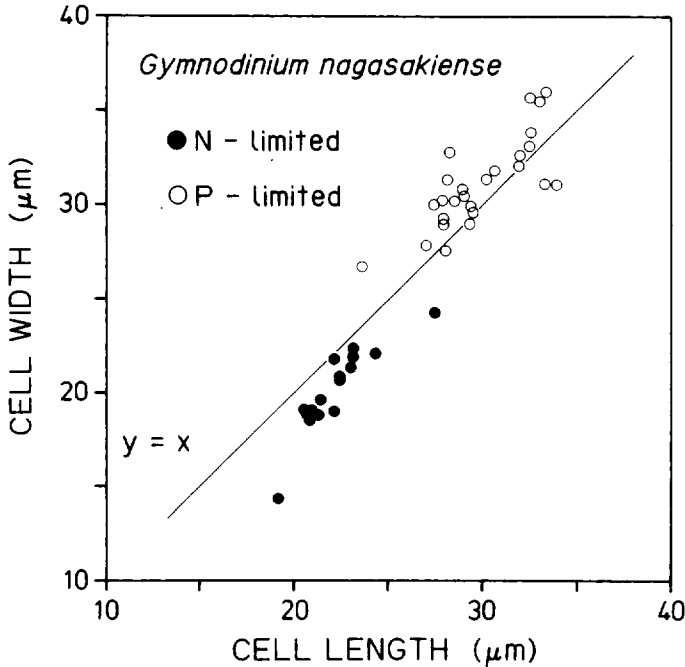


Fig.4-32. Scatter diagram of cell size of *G. nagasakiense* grown in nitrogen-limited and phosphorus-limited media.

りも細胞幅が大きい傾向が見られた (Fig. 4-32)。これらの細胞について第VI章で述べる顕微鏡蛍光測光法によって核 DNA 量を調べたところ、両者の間に差は見られなかった。しかし、細胞当りのクロロフィル蛍光強度は窒素制限細胞の方が低くリン制限細胞の60%であった。

考 察

人工海水培地による *G. nagasakiense* の無菌株の培養は不可能であった。この原因については現在のところ不明であるが、培地組成に含まれない未知の微量栄養素が関与している可能性が考えられる。このような現状で本種の栄養塩に対する増殖生理を明らかにするためには、なるべく窒素・リン濃度が低い外洋海水を基本とした培地を使用せざるを得ない。今回用いた黒潮表層水を基本とした SWM-3では、窒素・リンを十分添加することにより本種の最大増殖速度に近い値が得られている (Table 4-7)。したがって、窒素及びリン以外の因子が制限因子となっている可能性はほとんど無く、窒素・リンの効果が正しく評価されているものと判断される。本種と形態的に類似する *Gyrodinium aureolum* でも人工海水培地による培養は成功に至っていない (DIXON and HOLLIGAN 1989)。

G. nagasakiense の細胞内窒素含量は平均 $3.74 \sim 3.95 \text{ pmol cell}^{-1}$ であった (Table 4-5)。この値は *C. antiqua* の $11 \text{ pmol cell}^{-1}$ (NAKAMURA and WATANABE 1983b) と *H. akashiwo* の $1.44 \text{ pmol cell}^{-1}$ (WATANABE *et al.* 1982) のほぼ中間的な値である。また、細胞内リン含量は $0.23 \sim 0.35 \text{ pmol cell}^{-1}$ と計算された (Table 4-6)。これに関しては *C. antiqua* で $1.0 \text{ pmol cell}^{-1}$

(NAKAMURA and WATANABE 1983b), *H. akashiwo* で95 fmol cell⁻¹ (WATANABE *et al.* 1982) と報告されており, *G. nagasakiense* で得られた値は細胞サイズから見れば妥当な値であると考えられる。これらの結果から細胞内 N:P 比を計算すると13となり, いわゆる Redfield 比 (C:N:P=106:16:1) に近い値であった。これらの細胞内窒素・リン含量と現場における栄養塩濃度との関係から *G. nagasakiense* が現場海水で増殖可能な細胞密度 (AGP) を計算することができる (NAKAMURA and WATANABE 1983b)。Table 4-8に西部周防灘及び浦ノ内湾について計算した結果を示す。Table 4-8に示すように *G. nagasakiense* は天然海水でも100~8,000 cells ml⁻¹の細胞密度まで増殖可能であることが判明した。この細胞密度は物理的・生物集積が加われば, 十分赤潮状態になりうる密度である。ところで, 本種は無機態のみならず有機態の窒素・リンも増殖に利用可能であった (Fig. 4-22)。さらに現場海域における溶存態窒素・リンの約半分は有機態のもので占められていることも報告されている (城 1986)。しかし, Table 4-8に示した栄養塩には有機態のものは含まれていない。したがって, ここに示した増殖可能密度は過小推定の可能性があり, 現場海水の有する潜在的な増殖可能密度は更に大きいものと予想される。なお浦ノ内湾では窒素の方がリンより増殖可能密度が小さく, したがって本海域では窒素が増殖の制限因子になり易いことが推察される。

IWASAKI *et al.* (1990) によれば, 五ヶ所湾産の *G. nagasakiense* は300 μgN l⁻¹ (=21 μM) のアンモニアと尿素で増殖が阻害されている。さらに, *C. antiqua* は150 μM 以上で, また *H. akashiwo* では50 μM のアンモニアで増殖が阻害されることが知られている (TAKAHASHI and FUKAZAWA 1982, NAKAMURA and WATANABE 1983b)。本研究で用いた周防灘産の *G. nagasakiense* は250 μM のアンモニアでも増殖が見られており (Fig. 4-22), これらの種あるいは株に比して高いアンモニア耐性を有していると言える。

尿素は窒素換算で硝酸やアンモニアの2倍に相当する。したがって, 尿素を窒素源とした場合には硝酸等の2倍の最大収量が得られるはずである。ところが, 6.4 μM 以上の尿素における最大収量は硝酸等より低かった (Fig. 4-22)。このような尿素による増殖阻害は, 有毒渦鞭毛藻 *Gonyaulax catenella* (現在 *Alexandrium catenella*) についても報告されている (NORRIS and

Table 4-8. Minimum cell quotas of *G. nagasakiense* for nitrogen and phosphorus (Q: pmol cell⁻¹), DIN and PO₄-P concentrations of the seawater (S: μM) in western Suo Nada and Uranouchi Inlet, and estimated growth potentials (S/Q: ×10³ cells ml⁻¹).

Nutrient	Q	Suo-Nada		Uranouchi Inlet	
		S* ¹	S/Q	S* ²	S/Q
Nitrogen	3.85	0.80-10.55	0.21-2.74	1.23-18.15	0.32-4.71
Phosphorus	0.29	0.03- 0.71	0.10-2.45	0.13- 2.42	0.45-8.34

*¹ Monthly mean value (Fukuoka Buzen Fish. expl Stn.: 1987-1989)

*² Mean of each survey from Apr. 1989 to Mar. 1990 (Kochi Pref. Fish. expl Stn.: Personal communication)

CHEW 1975)。

尿素を単一の窒素源とした場合、 μ_m が著しく低く K_s は大きかった (Table 4-7, Fig. 4-29)。したがって、その利用形態は硝酸等とは異なるものと考えられる。尿素的取り込みに関しては2つの酵素 (Urease あるいは ATP:urea amidolyase) が関与することが知られている (LEFTLEY and SYRETT 1973)。渦鞭毛藻では尿素は Urease によってまず2分子のアンモニアに加水分解され、それが取り込まれるようである。実際、渦鞭毛藻 *Prorocentrum micans* に尿素を単一の窒素源として与えた場合、まず培地中にアンモニアが蓄積され、それがある濃度以上になると増殖が見られることが報告されている (UCHIDA 1976)。これらのことより、*G. nagasakiense* では尿素的加水分解速度が何等かの原因で律速要因となって十分なアンモニア濃度が得られず、その結果として増殖速度が低下したのと考えられる。

有機態リンであるグリセロリン酸は多くの赤潮藻類によって利用されることが報告されている (MAHONEY and McLAUGHLIN 1977, IWASAKI 1979)。しかしラフィド藻 *H. akashiwo* の一部の株や *C. antiqua* はグリセロリン酸を利用しない (WATANABE *et al.* 1982, NAKAMURA and WATANABE 1983b)。さらに、本研究の結果代表的な珪藻類は尿素がほとんど利用できず、さらに低濃度のリンで増殖が悪い種が認められた (Fig. 4-23)。したがって、有機態の窒素・リンの利用能から見れば、*G. nagasakiense* はこれらの種に比べて生態的に優位にあると考えられる。

K_s 値の生態学的重要性については DUGDALE (1967) や EPPLEY and COATSWORTH (1968) によって指摘されている。この K_s 値は栄養塩濃度に対する親和性の指標であり、 K_s が小さいほど低濃度の栄養塩でも増殖が可能であることを示すものである。そこで *G. nagasakiense* で得られた結果と比較するため、種々の海産微細藻類について報告されている K_s 値を Table 4-9 に取りまとめた。それによると、*G. nagasakiense* で得られた K_s 値は、各栄養塩ともに、これまで他種について得られている範囲に収まっており、しかもかなり小さい値であることが判る。特に渦鞭毛藻の中では最低の値である。EPPLEY *et al.* (1969) は K_s 値に見られる一般的傾向として、(1)大型種は高い K_s 値を有する、(2)硝酸の K_s 値が高いとアンモニアのそれも高い、(3)外洋性種の K_s 値は沿岸性種に比べて低い、(4) K_s 値は温度に依存する、を挙げている。TOMAS (1979) に従って細胞の大きさから期待される硝酸の K_s 値を求めると測定値の約5倍の $4 \mu\text{M}$ となり、*G. nagasakiense* は細胞の大きさの割には小さい K_s 値を有し、外洋性種について得られた値 (EPPLEY *et al.* 1969) に匹敵していることが判明した (Table 4-9)。したがって、本種は低い栄養塩濃度の下でも十分増殖できる特性を備えた生物であると言える。

K_s 値は温度によって影響を受け、温度の上昇に伴い増大することが報告されている (THOMAS and DODSON 1974, EPPLEY 1977)。したがって、高水温期に増殖する植物プランクトンは高温とそれによる栄養塩への要求性の増加といった2重のストレスを受けることになる。前節で示したように高水温は珪藻類の増殖に不適であった (Figs. 4-18~4-21)。さらに、その増殖は低濃度のマクロ栄養素のもとでは非常に悪いことが報告されている (TAKAHASHI and FUKAZAWA 1982)。以上のことは、成層が著しい夏季の内湾域における物理・化学的環境

Table 4-9. Summary of reported half-saturation constant (K_s ; μM) for nitrogen and phosphorus on various marine phytoplankton species.

Nutrient	Species	K_s	Reference
Nitrate	<i>Asterionella japonica</i>	0.7-1.3	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
		0.9-1.1	ROMEO & FISHER 1982
	<i>Chaetoceros gracilis</i>	0.1-0.3	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Coscinodiscus lineatus</i>	2.4-2.8	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>C. wailesii</i>	2.1-5.1	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Ditylum brightwellii</i>	0.6	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
		2.0-4.0	EPPLEY & COATSWORTH 1968
	<i>Fragilaria pinnata</i>	0.6-1.6	CARPENTER & GUILLARD 1971
	<i>Leptocylindrus danicus</i>	1.2-1.3	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Rhizosolenia stolterfothii</i>	1.7	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Skeletonema costatum</i>	0.4-0.5	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
		2.1	ROMEO & FISHER 1982
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	0.5-1.0	EPPLEY & RENGER 1974
	<i>Alexandrium tamarense</i>	1.5-2.8	MACISSAC <i>et al.</i> 1979
	<i>Gonyaulax polyedra</i>	8.6-10.3	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Gymnodinium sanguineum</i>	3.8	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
		1.0-6.6	THOMAS & DODSON 1974
	<i>Chattonella antiqua</i>	0.9	NAKAMURA & WATANABE 1983c
	<i>Olisthodiscus luteus</i>	2.0-2.5	TOMAS 1979
	<i>Gymnodinium nagasakiense</i>	0.8	This study
Ammonium	<i>Asterionella japonica</i>	0.6-1.5	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Chaetoceros gracilis</i>	0.3-0.5	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Coscinodiscus lineatus</i>	1.2-2.8	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>C. wailesii</i>	4.3-5.5	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Ditylum brightwellii</i>	1.1	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Leptocylindrus danicus</i>	0.5-3.4	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Rhizosolenia stolterfothii</i>	0.5	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Skeletonema costatum</i>	0.8-3.6	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	0.02-0.66	EPPLEY & RENGER 1974
	<i>Alexandrium tamarense</i>	1.9	MACISAAC <i>et al.</i> 1979
	<i>Gonyaulax polyedra</i>	5.3-5.7	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Gymnodinium sanguineum</i>	1.1	EPPLEY <i>et al.</i> 1969
	<i>Olisthodiscus luteus</i>	2.0-2.3	TOMAS 1979
	<i>Gymnodinium nagasakiense</i>	0.6	This study
Urea	<i>Ditylum brightwellii</i>	0.4	MCCARTHY 1972
	<i>Skeletonema costatum</i>	1.4	MCCARTHY 1972
	<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	1.7	MCCARTHY 1972
	<i>Gymnodinium nagasakiense</i>	1.0	This study
Phosphate	<i>Chaetoceros gracilis</i>	0.12	THOMAS & DODSON 1968
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	0.6-0.7	PERRY 1976
	<i>Amphidinium carterae</i>	0.01	DEANE & O'BRIEN 1981
	<i>Chattonella antiqua</i>	0.29	NAKAMURA & WATANABE 1983c
	<i>Olisthodiscus luteus</i>	1.0-1.98	TOMAS 1979
	<i>Pyrocystis noctiluca</i>	1.9-34.0	RIVKIN & SWIFT 1982
<i>Gymnodinium nagasakiense</i>	0.14	This study	

は珪藻類の増殖に極めて不都合であることを示している。それに対して、渦鞭毛藻類やラフィド藻類は表層に比べ低温でかつ栄養塩濃度が高い底層に移動する能力を備えることによってこれらの悪条件を克服し、夏季でもその増殖を可能にしているものと考えられる。事実、HONJO *et al.* (1990) は五ヶ所湾における *G. nagasakiense* が夜間鉛直移動を行っているとして報告しており、また第III章で述べたように周防灘においても同様の鉛直移動が示唆されている。

以上のように *G. nagasakiense* は比較的low濃度から高濃度にわたる広い範囲の窒素及びリンで増殖し、さらに有機態の窒素・リンも同様に利用できることが判明した。このことは、本種が外洋域から内湾域にわたる幅広い栄養塩レベルの海域で赤潮を引き起こしている事実とよく一致している。このような栄養塩に対する増殖特性は、前節で述べた幅広い物理的耐性限界と相俟って、本種が種々の環境条件下において個体群の維持を可能にし、さらに他種との競争に打ち勝つための重要な要因であると考えられる。

第V章 *Gymnodinium nagasakiense* の増殖速度の測定

赤潮による漁業被害を防止するため種々の対策が模索されてきたが、実用化に至ったものは皆無に等しい。したがって、赤潮の発生を事前に予知することによって被害の軽減を図ることがより一層重要となってくる (安楽 1985a, 1985b)。

赤潮は特定の種の増加が捕食や流出等による減少を上回った結果発生するものと考えられる。したがって、その増加要因を把握することは赤潮の発生機構の解明のみならず、その発生を予知する上でも重要な課題である。CHANG and CARPENTER (1985) は、北米東海岸における *Gyrodinium aureolum* 赤潮の発生要因の一つにこの種の高い増殖速度を挙げている。また飯塚 (1987) は、大村湾の *G. nagasakiense* 個体群が赤潮発生直前まで約10日間にわたり本種の最大増殖速度 ($1.0 \text{ division day}^{-1}$) で指数的に群密度を増大すると述べている。以上のことから、現場個体群の増殖速度を測定することによって、その個体群の動態を把握し、赤潮の発生を予知することが可能ではないかと考えられる。

ところで、現場における植物プランクトンの増殖速度を測定するため、これまで種々の手法が用いられてきた。これらには、炭素や窒素等の元素の同化速度 (EPPLÉY 1980)、ATP 合成速度 (SHELDON and SUTCLIFFE 1978)、 ^{14}C による Chlorophyll 標識法 (REDALJE and LAWS 1981)、DNA 合成速度 (FALKOWSKI and OWENS 1982) などの方法が挙げられる。しかし、いずれの方法も群集全体の増殖速度の測定に留まり、特定種ごとの増殖速度は測定できない。さらにこれらの方法は様々な問題点が指摘されている瓶培養によらなければならない。また同位元素を用いる方法は ^{14}C や ^{15}N の取り込み速度の測定は容易であるが、植物プランクトン生物量の測定が困難であるなどの問題点を有している。

種類別の増殖速度を測定できる方法として、オートラジオグラフ (DOUGLAS 1984) や DNA への ^3H -Thymidine 取り込み (RIVKIN and VOYTEK 1986) を用いる方法が挙げられる。しか

し、わが国では放射性同位元素の現場での使用が制限されていることや、細胞一個づつを分離しその放射能を測定する必要があることを考慮すると、これらの方法を日常的な調査に応用することは困難である。

一方、細胞数の変化から増殖速度の測定を行う場合でも、水塊の移動、生物自身の移動及び捕食による減耗など、増殖以外にも細胞数の変化をもたらす要素が多い。そのため、信頼できる測定値を得るためには、組織的な調査体制を組む必要が生じる。

このような従来の増殖速度測定法に関わる問題点を克服し、より簡便な手法を開発することを目的として、本章では個体群内に占める分裂中の細胞の割合 (Frequency of Dividing Cells : FDC) を指標とした増殖速度測定法 (FDC 法) の検討を行った。

第 1 節 培養条件下における増殖速度測定法の検討

前述の FDC 法は、HAGSTRÖM *et al.* (1979) により自然水中の細菌群集の増殖速度測定に適用され、また真核生物である植物プランクトンについても WEILER and CHISHOLM (1976) や WEILER and EPPLEY (1979) らによって用いられている。FDC 法によって平均増殖速度を求めるために、種々の計算式が報告されてきたが、McDUFF and CHISHOLM (1982) はそれらの研究を総説し、理論的説明を加えることによって、部分的同調分裂を行っている個体群について次に示す計算式を提唱した。

$$\mu_{\text{FDC}} = \frac{1}{n \cdot T_d} \sum_{i=1}^n \ln(1 + f_i) \quad (1)$$

ここで、 μ_{FDC} は FDC から求めた平均増殖速度 (divisions day⁻¹)、 n は試料採取の回数、 T_d は細胞分裂に要する時間 (day)、 f_i は i 時間における FDC である。本節では、まず *G. nagasakiense* の細胞分裂過程を室内実験によって明らかにし、次いで FDC 法に不可欠なパラメータである T_d に対する光強度と温度の影響を調べた。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験に用いた *G. nagasakiense* は、1985年7月に周防灘から分離しマイクロピペット洗浄法により無菌化したクローン株 (G303 AX-2) である。培地には、海水強化培地である改変 SWM-3 (CHEN *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987) を用いた。保存株は温度 22°C、光強度 100 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、14hL:10hD の明暗周期下で継代培養を行った。

2. 光制御条件下における T_d の測定

改変 SWM-3 培地 100 ml を分注した 300 ml 容のフラスコに保存培養を接種し、温度 25°C、継代培養と同じ光条件下で 1 週間前培養を行った。その後、培地 300 ml が入った 10 本の 1 liter 容三角フラスコに細胞密度が 20 cells ml⁻¹ となるように前培養を接種した。種々の増殖速度を得

るため、各フラスコを10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170及び190 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ の10段階の光強度下に設置して培養を開始した。明暗周期は14hL:10hD(明期は05:00~19:00)、温度は25°Cに設定した。その後毎日10:00に細胞数の計数を行い(第IV章 第1節材料及び方法参照)、増殖段階を把握した。8日後、各フラスコにおける培養が中期から後期対数期に達したところで、08:00から24時間にわたり2時間ごとに各フラスコより5 mlの細胞懸濁液を採取し、等量の1%グルタルアルデヒド海水溶液と混合して固定後、冷蔵庫に保存した。

固定試料に蛍光染料4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を最終濃度で1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ となるように添加し、細胞核の染色を行った (IMAI and ITOH 1988)。落射蛍光顕微鏡を用いて、以下の3つの細胞分裂段階に属する細胞をそれぞれ計数した。すなわち、静止核(単核)の細胞(non-dividing cells) (Fig. 5-1 AとE), 2核を有する細胞(2核細胞: 2 nuclei) (Fig. 5-1 BとF及びCとG), そして細胞質分裂中の細胞(分裂細胞: paired cells) (Fig. 5-1 DとH)の3段階である。2核細胞と分裂細胞の区別は、細胞内に2核を有しさらに細胞に明瞭なくびれが認められるか否かで行った。すなわち、くびれが明らかな細胞は分裂細胞、そうでないものは2核細胞とした。i時間に得られた各試料について200細胞以上を鏡し、次式により2核細胞と分裂細胞ごとにそれぞれ f_i を求めた。

$$f_i = D_i / C_i \quad (2)$$

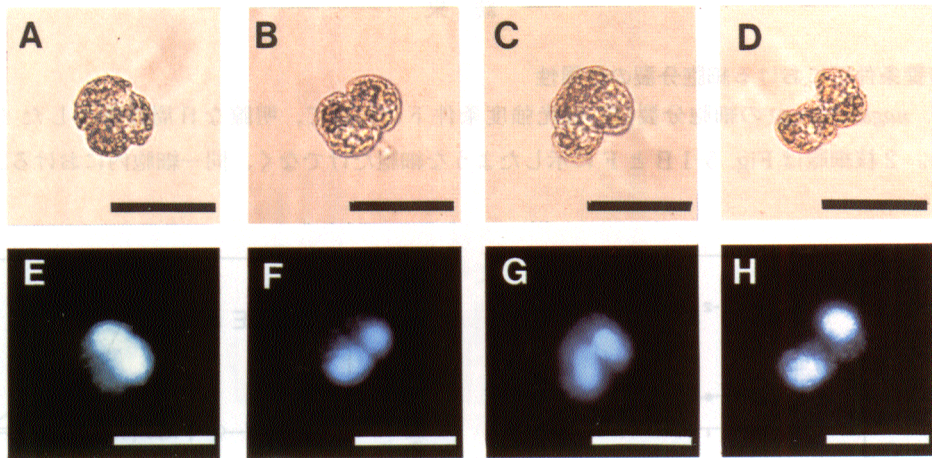


Fig.5-1. Cell division stages of *G. nagasakiense* observed under light (A, B, C, D) and epifluorescence (E, F, G, H) microscope. Scale bar = 30 μm .

- A. Vegetative cell without apparent sign of cell division.
- B. Vegetative cell which are morphologically undistinguishable from non-dividing cells.
- C. Vegetative cell with slightly elongated hypococone.
- D. Cell undergoing cytokinesis.
- E. The same cell as in A observed under ultraviolet excitation. Blue white fluorescence is visible from the single nucleus (non-dividing stage).
- F. The same cell as in B. Two nuclei which divided perpendicular to the antero-posterior axis were visible in each cell (2 nuclei stage).
- G. The same cell as in C. The axis of fission of the nucleus is orientated antero-posteriorly (2 nuclei stage).
- H. The same cell as in D. Each daughter cell contains single nucleus (paired cells stage).

ここで、 D_i は i 時間における 2 核細胞あるいは分裂細胞の細胞数、 C_i は全細胞数をそれぞれ示す。平均増殖速度 (μ : divisions day⁻¹) は次式で計算した；

$$\mu = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{\ln 2} \quad (3)$$

ここで N_0 はサンプリング開始時の細胞数、 N_1 は 24 時間後の細胞数を示す。そして $\Sigma \ln(1+f_i)$ と (3) 式による増殖速度から (1) 式を解いて、2 核細胞及び分裂細胞に対する T_d を求めた。

3. 温度制御条件下における T_d の測定

10, 15, 20, 25 及び 30°C の温度条件に最低 10 日間以上馴致させた前培養を、改変 SWM-3 培地 500 ml を入れた 5 本の 1 liter 容三角フラスコに接種し、それぞれ前培養と同じ温度条件の下、光強度 $120 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で培養を行った。実験は 2 回行い、それぞれの明暗周期は 14hL:10hD 及び 12hL:12hD に設定した。実験開始時の増殖段階を対数増殖期初期から中期にそろえるため、各温度における培養日数を 4 日から 25 日間に調整した。実験開始日の午前 10:00 から 24 時間にわたり 2 時間間隔で細胞懸濁液を 10 ml 採取し、前述の方法で固定し染色後、核の観察を行った。同時に細胞数の増加から (3) 式により平均増殖速度を計算した。検鏡結果から $\Sigma \ln(1+f_i)$ を求め、(3) 式による増殖速度から (1) 式を解いて各温度条件下における T_d を計算した。

結 果

1. 培養条件下における細胞分裂の日周期性

G. nagasakiense の細胞分裂は、各光強度条件下において、明瞭な日周期性を示した (Fig. 5-2)。2 核細胞は Fig. 5-1 B と F に示したような細胞だけでなく、同一細胞内における 2 核の

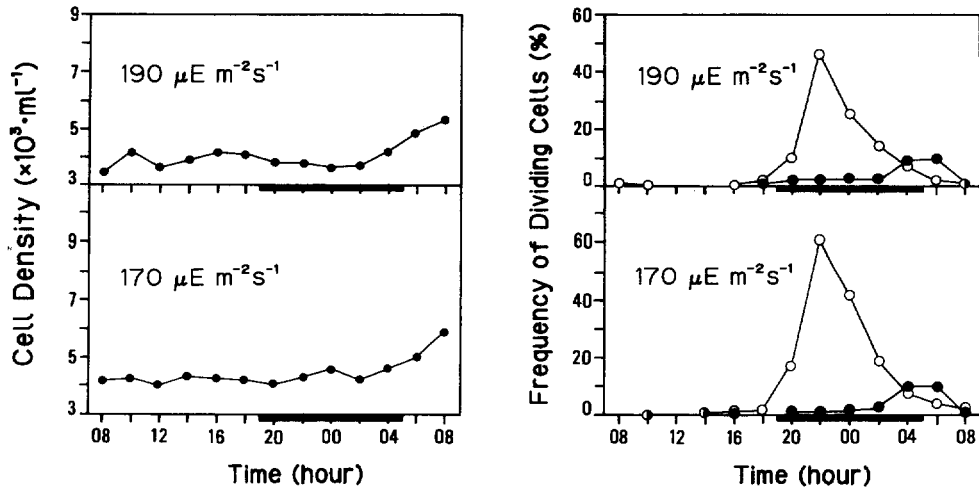


Fig.5-2. Changes in cell density (left) and diel patterns of frequency of dividing cells (right) in cultured *G. nagasakiense* under different light intensities (170 and $190 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Open and closed circles in the right column indicate 2 nuclei and paired cells, respectively. Dark bars represent the dark period of the L:D cycle.

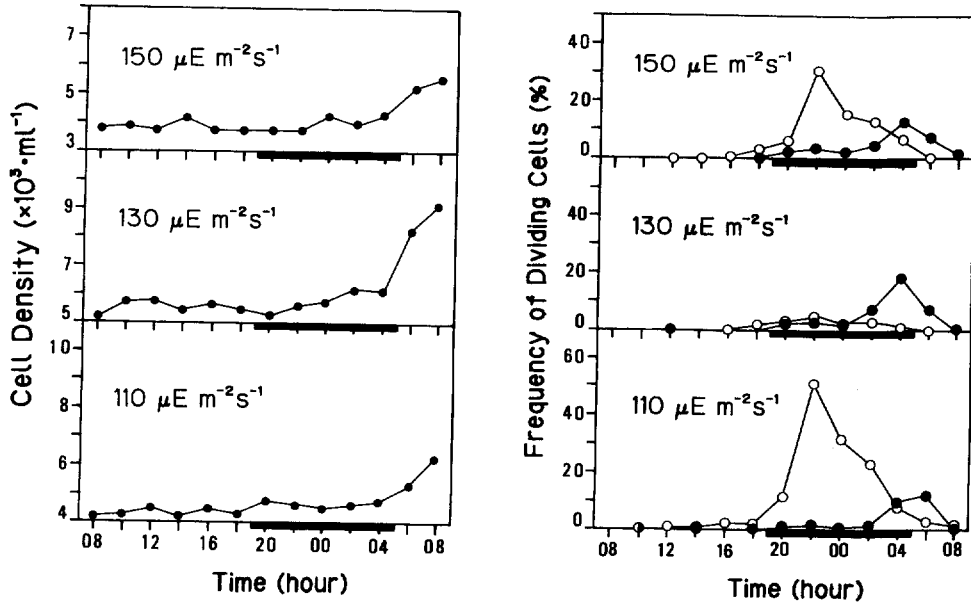


Fig.5-2. (Continued).
Light intensities ($110 \sim 150 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

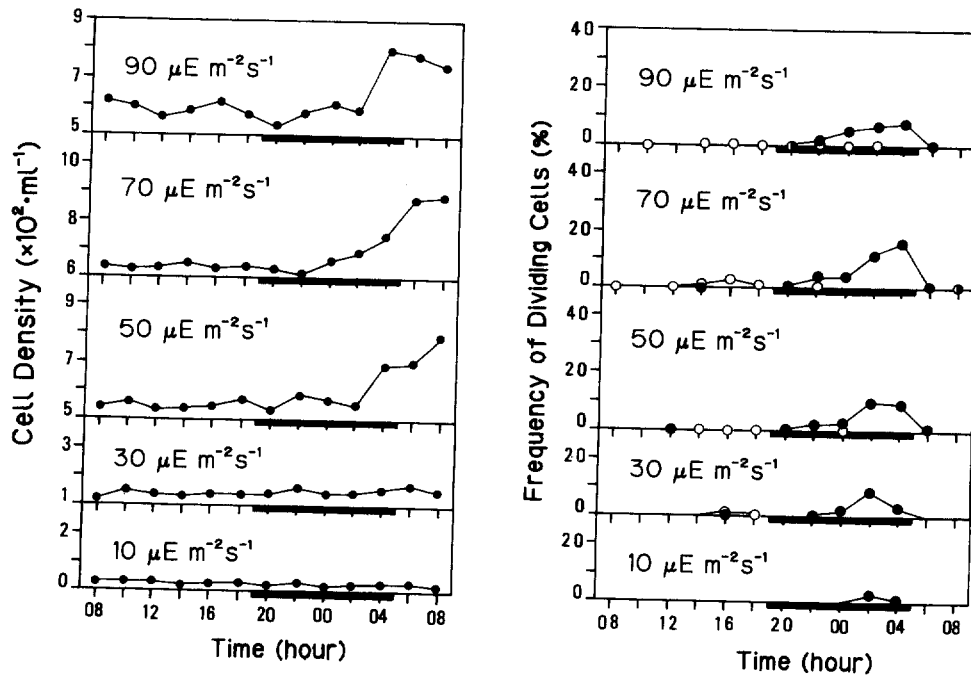


Fig.5-2. (Continued).
Light intensities ($10 \sim 90 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

大きさが相当異なる場合もあった。しかし、それらも2核細胞に属するものとして計数した。光強度が $110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以上では、2核細胞は16:00より増加し始め、その出現頻度は22:00に最大となった (Fig. 5-2)。光強度 $110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ から $190 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の各培養における2核細胞の最大頻度は、それぞれ51, 4.7, 30, 61及び46%であった。2核細胞の出現頻度は22:00以降急激に減少し、明期開始後1時間で見られなくなった。一方、分裂細胞は暗期の開始時から出現し始め、04:00から06:00の間に最大の出現頻度を示した。光強度 $110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ から $190 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の各培養における最大出現頻度はそれぞれ12.8, 18.6, 12.8, 9.9及び9.5%であった。またこの時間帯は細胞数の増加期と一致した。光強度 $90 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以下の場合、2核細胞の出現頻度は3%以下まで大きく低下した (Fig. 5-2)。また最大出現頻度の時間が早まり、暗期に入る前に移行する傾向がみられた。光強度が $10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の場合、2核細胞は観察できなかった。一方、分裂細胞は最大頻度の出現が約2時間早くなったが、 $110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以上の場合と同様の出現傾向を示した。光強度 $10 \sim 90 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ における分裂細胞の最大出現頻度は、それぞれ3.3, 8.5, 9.9, 15.9及び8.0%であった。

2. 光制御培養条件下における T_d の測定

G. nagasakiense の細胞分裂は、Fig. 5-1 A ~ H に示す順序で進行した。2つの分裂段階、すなわち2核細胞と分裂細胞のFDCに基づいて計算した T_d と増殖速度 (μ) との関係を図5-3に示す。2核細胞の場合 T_d は 1.79 ± 2.01 h (平均±標準偏差) と変動が大きく、特に μ が 0.5 divisions day^{-1} 付近で変動が大きかった。一方、分裂細胞の場合 T_d は 1.09 ± 0.16 h であり、 μ が $0.2 \sim 0.8$ divisions day^{-1} の範囲でほぼ一定であった。このことから光強度によって増殖速度を制御した場合 T_d はほとんど変化しないことが判明した。FDC法により増殖速度の推定を行う

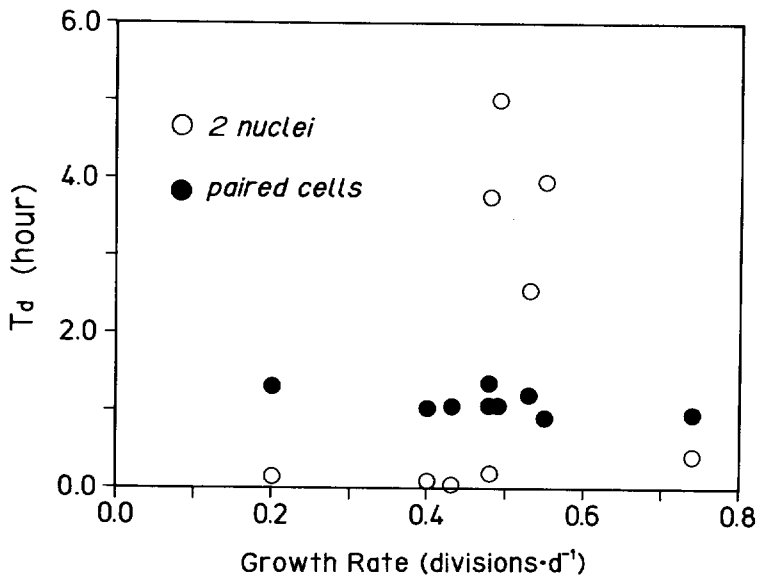


Fig. 5-3. Relationship between duration of division stages (T_d) and growth rate of *G. nagasakiense* grown under different light intensities (10 to $190 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). T_d was calculated from two division stages; i.e., 2 nuclei and paired cells.

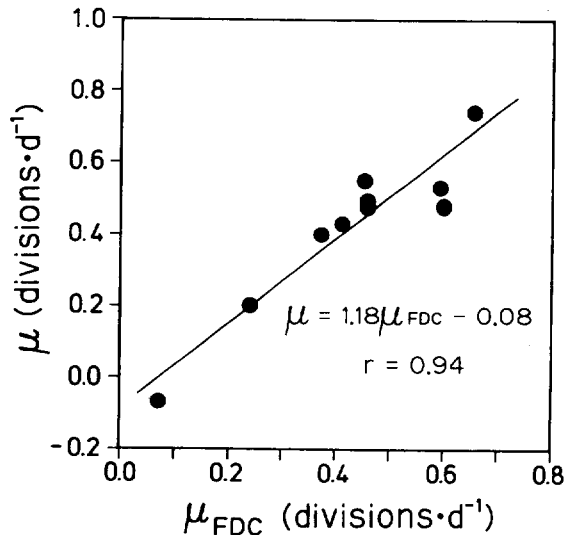


Fig.5-4. Relationship between growth rate estimated by the FDC technique (μ_{FDC}) using laboratory derived T_d value (1.09 h) and that calculated from increase in cell number (μ).

際には、環境の変化に対して T_d が一定である必要がある (CAMPBELL and CARPENTER 1986)。したがって、2核細胞から求めた T_d は増殖速度の計算には用いることができないと判断されたので、以下の計算には分裂細胞について得られた T_d を用いた。 $T_d = 1.09$ hとしてFDCによって計算した平均増殖速度 (μ_{FDC}) と、細胞数に基づいて計算した増殖速度 (μ) との間には次式で示される直線関係 ($r=0.94$, $p<0.001$, $df=8$) が認められた (Fig. 5-4)。

$$\mu = 1.18\mu_{FDC} - 0.08$$

このことは、 T_d が一定であれば分裂細胞のFDCによって *G. nagasakiense* の平均増殖速度が推定できることを示している。なお、2核細胞から求めた T_d を用いた場合には、このような相関関係は得られなかった。

3. T_d に及ぼす温度の影響

分裂細胞のFDCから得られた T_d によって平均増殖速度が推定可能であることが判明したことから、以下の検討は分裂細胞の T_d について行った。明暗周期14hL:10hDの下で、10℃から30℃の5段階の温度で培養した *G. nagasakiense* における分裂細胞の出現の日周変化を Fig. 5-5に示す。なお明暗周期12hL:12hDで行った実験からも同様の結果が得られた。15℃以上において分裂細胞の出現は顕著な日周性を示した。分裂細胞は暗期の開始頃から増加し始め、04:00から06:00に最大となり、それ以降急激に減少した。一方10℃では低頻度ながら終日分裂細胞の出現が認められたが、最大出現頻度は15℃以上の場合と同様に明期開始時の06:00に見られた。各温度で培養した *G. nagasakiense* の T_d と、培養温度との関係を Fig. 5-6に示す。2回の実験の結果、 T_d の対数値と温度 (T) との間には、有意な負の相関関係 ($r=-0.92$;

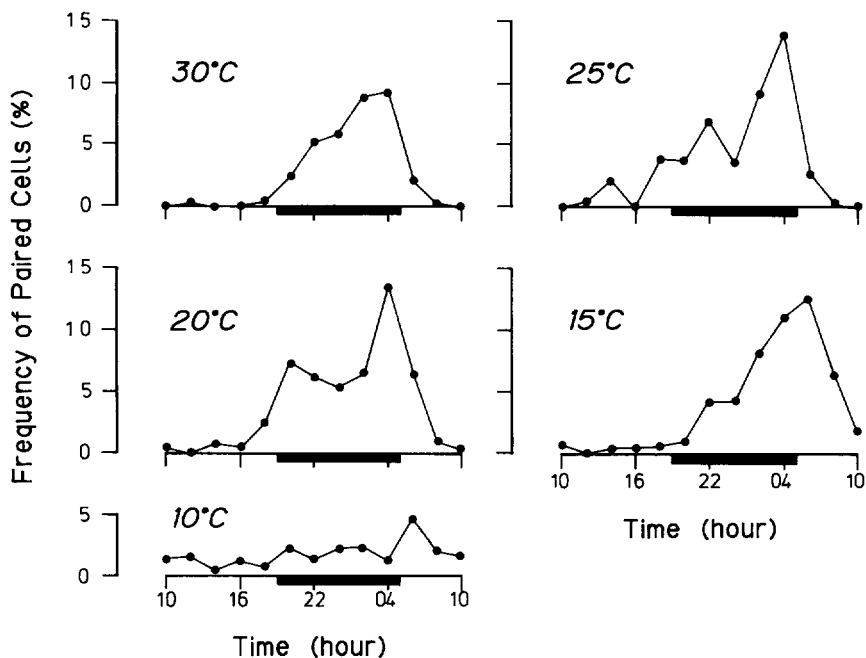


Fig.5-5. Diel patterns of frequency of paired cells in cultured *G. nagasakiense* at various temperatures. Dark bars represent the dark period of the L:D cycle.

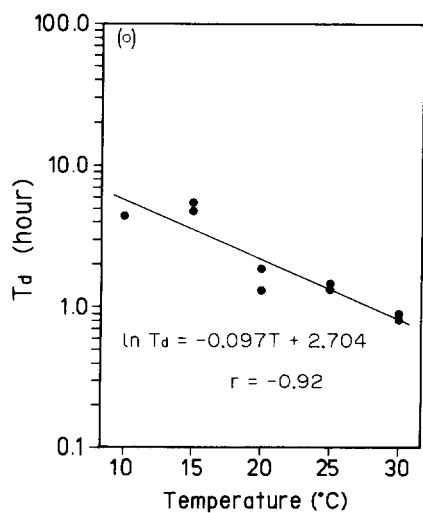


Fig.5-6. Effect of temperature (T) on duration of division stage (T_d) for laboratory cultured *G. nagasakiense*. One open circle in the parentheses was omitted from calculation of the regression equation.

$p < 0.001$, $df=7$) のあることが判明した；

$$\ln T_d = -0.097T + 2.704 \quad (4)$$

以上の結果から、温度の上昇に伴い T_d は指数関数的に減少することが明らかとなった。また T_d が温度の関数として表されることから、(4) 式を用いることによって任意の温度における T_d が推定可能になった。

考 察

培養条件下における *G. nagasakiense* の細胞分裂は特定の時間帯に集中して起こる、すなわち本種は同調的細胞分裂 (phased cell division) を行っていることが明らかとなった (Figs. 5-2と5-5)。種々の微細藻類の細胞分裂は、培養条件下及び現場海域で同調的に起こることが報告されており (CHISHOLM 1981), 渦鞭毛藻では, *Amphidinium carterae* (CHISHOLM and BRAND 1981), *Ceratium* 属 (ELBRÄCHTER 1973, TORIUMI 1976, WEILER and CHISHOLM 1976, WEILER and EPPLEY 1979, ELSER and SMITH 1985), *Exuviella cordata* と *Prorocentrum micans* (STOLBOVA *et al.* 1982), *Gonyaulax polyedra* (SWEENY and HASTINGS 1958), *Gyrodinium aureolum* (CHANG and CARPENTER 1985, DAHL and BROCKMANN 1985), *Peridinium cinctum* f. *westii* (POLLINGER and SERRUYA 1976), *Pyrocystis* spp. (SWIFT and DURBIN 1972) 及び *Pyrodinium bahamense* (BUCHANAN 1968, MACLEAN 1977) などの種類で部分的同調分裂が報告されている。しかし、種によって分裂の盛期は異なっているようである (CHISHOLM and BRAND 1981)。

飯塚・峯 (1983) は、12hL:12hD の明暗周期で *G. nagasakiense* を培養した場合、暗期開始後 6 時間目から 3 時間以内に分裂が集中したと述べている。彼らは核分裂の観察は行っていないが、分裂細胞を下錘体左下端部が伸張し始めた状態から分離する直前までと規定している。この時間帯 (本実験では 01:00~04:00 に相当) は、本研究の実験では 2 核細胞のピークより後で、分裂細胞の最大出現時間の直前に相当した。また、小野 (1988) は核分裂中の細胞の出現ピークは暗期の 4~7 時間目頃に見られると報告している。したがって、本研究結果はこれらの観察結果とはほぼ一致したと見なすことができる。

G. nagasakiense の増殖最適温度である 25°C (第IV章 Fig. 4-4) における T_d は (4) 式から 1.3 h と計算される。この値は、*Ceratium* 属で報告されている 2~3 h (WEILER and CHISHOLM 1976, ELSER and SMITH 1985) より短く、*Gyrodinium aureolum* (CHANG and CARPENTER 1985) の 27 min の約 3 倍であった。*Ceratium* 属では分裂過程を詳細に観察し、核分裂から細胞質分裂の終了までの時間から T_d が求められている (ELSER and SMITH 1985)。しかし、分裂の開始や終了が明瞭でない場合には、培養実験を通して細胞数による増殖速度と FDC から (1) 式を解いて T_d を求める必要がある (CHANG and CARPENTER 1985, CAMPBELL and CARPENTER 1986)。このように、種類や観察した分裂段階並びに推定法の違い、さらには培養温度等が T_d に影響するようである。したがって、FDC 法によって増殖速度を推定する際には、 T_d の算出について十分な検討を行う必要がある。

2 核細胞の FDC より求めた T_d は、分裂細胞について求めたものに比べ変動が大きかった。さらに、この T_d を用いて計算した μ_{FDC} と増殖速度 (μ) との間に相関も認められなかった。この原因の一つには、同一細胞内に大きさの異なる 2 核が観察された場合でも、それを 2 核細胞として計数したことによる観察上の誤差が挙げられる。特に Fig. 5-1 B と F に示したような細胞の縦軸と直角に分裂面が見られるものの多くは間期 (G_1 期) 核内における染色体の不均一分布に

よる可能性が考えられる (PARTENSKY 私信)。2核細胞と分裂細胞における FDC の差 (Fig. 5-2) もそれに起因しているものと思われる。したがって細胞核の DNA 定量によって、大きさの異なる 2核を有する細胞が細胞周期のどの段階に属するかを今後正確に特定する必要がある。

McDUFF and CHISHOLM (1982) は、試料の採集間隔 T_s が分裂時間 T_d と大きく異なる場合 FDC 法による平均増殖速度の推定値に誤差が生じ、特に T_s が T_d より長い場合にはその誤差が大きくなることを示した。本研究においては T_s を 2h としたため、(4) 式より 20°C 以下では T_s は T_d より短く誤差は小さいはずである。しかし、それ以上の温度では、例えば 30°C の T_d は 0.8h と計算されるように、 T_s が T_d を上回り、誤差が大きくなる可能性がある。したがって、水温 20°C 以上で FDC 法を用いる際には採水間隔 (T_s) を 1 時間程度に短縮することが望ましい。

G. nagasakiense の増殖速度を光によって制御した場合には T_d は一定であったが、それを温度で制御した場合、温度の下降につれ T_d は指数関数的に増大した。このことは、*G. nagasakiense* の細胞周期の各段階 (G_1 期, S 期, G_2+M 期) に及ぼす影響が光と温度では異なることを示唆している。特に、温度が T_d に影響を及ぼすという結果は、*Ceratium* 属の核分裂時間が、温度の低下とともに長くなるという WEILER and EPPLEY (1979) の観察と一致するものである。

FDC 法によって増殖速度を推定する際には、いくつかの条件が満たされる必要がある。第 1 に環境条件によって T_d が左右されないこと、第 2 に個体群中のすべての細胞の T_d が同じであること、第 3 に個体群中のすべての細胞が増殖能を有していることである (CAMPBELL and CARPENTER 1986)。まず第 1 の T_d の安定性の問題であるが、本研究で明らかになったように光強度は T_d に影響を及ぼさなかった。一方、温度は T_d に顕著な影響を与えたが、両者の関係が (4) 式で示した指数関数で表せることが判明した。したがって、FDC 法を現場個体群に应用する際には現場温度における T_d を求め、それを用いることによって温度の影響を考慮に入れることが可能になった。

G. nagasakiense の場合、培養条件下における分裂細胞の出現パターンはほぼ一定であり、常に暗期の終わり頃に集中して見られることが判った (Figs. 5-2 と 5-5)。したがって、 T_d は個体群中の細胞間でほとんど一定であり、第 2 の問題は起こっていないものと考えられる。

現場海域における *G. nagasakiense* 個体群中の細胞が、すべて増殖能を有しているか否かは現時点では不明である。しかし、増殖能力を持たない細胞の割合が多いと FDC 法による増殖速度の推定値は過小評価となることが指摘されているので (HAGSTRÖM *et al.* 1979)、この問題が FDC 法に及ぼす影響については今後検討して行く必要がある。

本研究で使用した DAPI 染色は、操作が非常に簡便であり、蛍光顕微鏡によって個々の分裂細胞 (核分裂を含む) を容易に観察できること、バックグラウンド蛍光がほとんど無いため洗浄等の作業が不要であること、固定試料を用いた観察が可能であること等の利点を有する。また、FDC 法は瓶培養を必要としないため、培養期間に生じる栄養塩の枯渇等様々な問題を全く

考慮する必要がない。さらに特定の種ごとの増殖速度が推定できることから、本手法は現場における *G. nagasakiense* 個体群の増殖速度の測定に極めて有効な手段であると考えられる。したがって、FDC 法による増殖速度測定法は赤潮の短期予知手法としての実用化が期待される。

第 2 節 現場海域における同調分裂と増殖速度

前節では、FDC 法によって室内培養条件下における *G. nagasakiense* の平均増殖速度が測定可能であることを示した。しかし、自然条件下では様々な環境因子が複雑に関連しながら増殖に影響を及ぼしていると考えられる。そのため、FDC 法を *G. nagasakiense* の現場個体群に適用するには、本種がその前提条件である同調的細胞分裂を行っているか否かをまず明らかにしておく必要がある。本節では異なる 2 海域（周防灘及び広島湾）において計 3 回の現場調査を実施し、*G. nagasakiense* の自然個体群が同調的細胞分裂を行なっていることを確認するとともに、FDC 法による平均増殖速度を推定した。

材料及び方法

1. 周防灘における現場調査

調査は周防灘に設けた定点 St.2 (Fig. 5-7) で、1987 年 8 月 8 日～9 日に南西海区水産研究所調査船「しらふじ丸」によって実施した。8 月 8 日の午前 10:00 から、24 時間にわたり 2 時間ごとに定点の 0 m, 5 m, 海底上 1 m (B-1m) 層よりバンドーン採水器により採水を行った。試水 250 ml をポリカーボネートメンブランフィルター (Nuclepore 社, 径 47 mm, 孔径 3 μm) を用いた吸引濾過濃縮法 (板倉他 1990) により 10 ml に濃縮した。濃縮した植物プランクトン試料に等量の 1% グルタルアルデヒド海水溶液を加えて固定後、DAPI 溶液を最終濃度で 1 μg

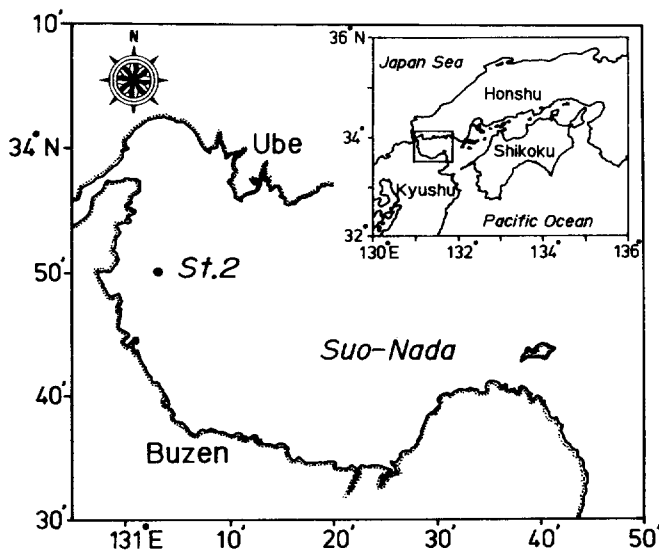


Fig.5-7. Location of the sampling station (St.2) in Suo-Nada, western Seto Inland Sea.

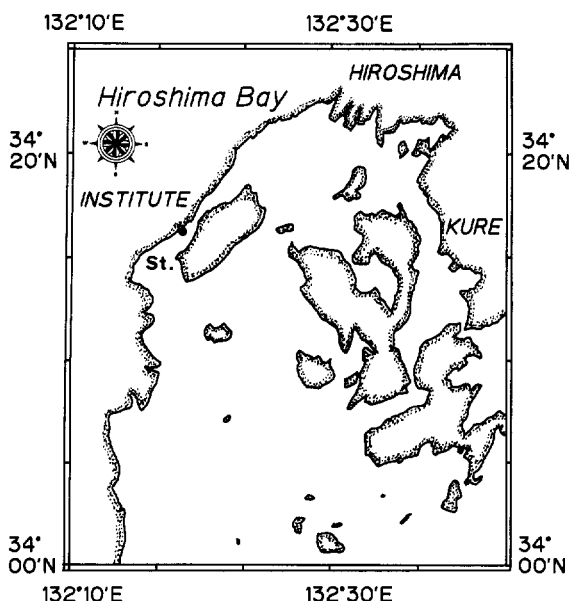


Fig.5-8. Location of the sampling station in Hiroshima Bay.

m^{-1} となるように添加して核染色を行い検鏡に供した。各時刻に得られた試料についてそれぞれ200細胞以上検鏡し、前節の(2)式にしたがってFDCを求めた。各採水時刻における各層水温の測定結果から前節の(4)式より T_d を計算し、(1)式から平均増殖速度 μ_{FDC} を求めた。

2. 広島湾における現場調査

・ 調査は広島湾に設けた定点 (Fig. 5-8) で1989年9月12~13日及び1990年9月17~18日の2回実施した。午前10:00 (1989年調査) あるいは正午 (1990年調査) から24時間にわたり0 m, 2 m及び4 m (1990年調査では0, 2 m層のみ) より採水し、ガラス繊維濾紙 (Whatman GF/C, ϕ 150 mm) によって2~3literを50m l 程度に濃縮した。濃縮試料は前節の方法で固定後Utermöhlの沈澱法によってさらに10 m l まで濃縮した。以後の染色及び検鏡方法は周防灘調査に準じた。

結果

1. 周防灘における調査

1987年8月8日~9日の周防灘の定点における *G. nagasakiense* の分裂細胞の割合の日周変化を Fig. 5-9に示す。分裂細胞の出現頻度は、20:00から増加し始め、5 m層では22:00に、またB-1 m層では02:00にそれぞれ5%及び3.3%の最大出現頻度を示した後に減少した。ただし0 m層では *G. nagasakiense* がほとんど分布しなかったため計数はできなかった。この結果から、周防灘における *G. nagasakiense* 個体群が部分的同調分裂を行っていることが明らかとなった。調査時の定点における水温は、5 m層及びB-1m層で、それぞれ25.9°Cと23.9°Cであった。この温度から前節の(4)式によって T_d を求めると、それぞれ1.21 h及び1.47 hと計

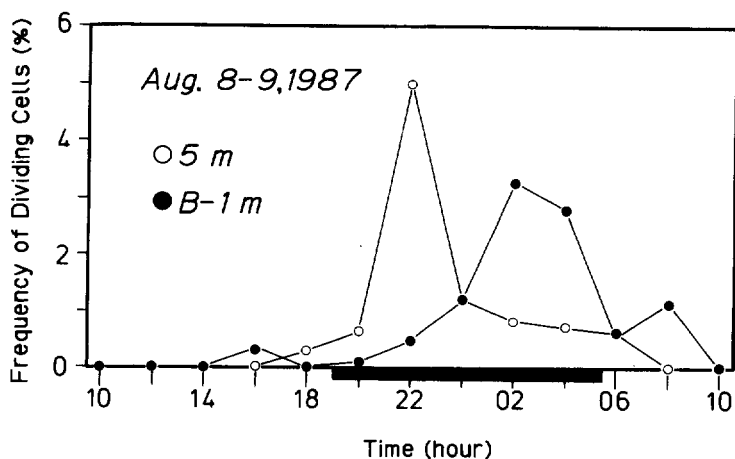


Fig. 5-9. Diel pattern of dividing cells in the natural population of *G. nagasakiense* in Suo-Nada. Night period is indicated by blackened bar on the abscissa.

算され、この T_d を用いて前節の (1) 式から平均増殖速度を計算した結果、5 m 及び B-1m 層でそれぞれ 0.14 及び 0.12 divisions day⁻¹ の値が得られた (Table 5-1)。

2. 広島湾における調査

1989年9月の広島湾における *G. nagasakiense* 個体群の分裂細胞の出現割合の日変化を Fig. 5-10に示す。本調査でも *G. nagasakiense* 個体群が明瞭な同調的細胞分裂を行っていることが判明した。すなわち、昼間には分裂中の細胞はほとんど観察されなかったが、日没から約2時間後の20:00からその割合が増加し始め、2 m以深では02:00に、また0 mでは04:00に最大出現頻度を示した後、08:00にはほとんど見られなくなった。分裂細胞の最大出現頻度は0, 2, 4 mでそれぞれ6.5, 5.2及び6.9%であった。この調査時における各層水温、 T_d 及び μ_{FDC} を Table 5-1に示す。 μ_{FDC} は0 m, 2 m 及び 4 m 層でそれぞれ0.40, 0.27, 0.36 divisions day⁻¹であった。

1990年9月の調査結果を Fig. 5-11に示す。本調査でも1989年調査とほぼ同様の分裂細胞の出現パターンが見られた。ただし0 m層における出現頻度は20:00から04:00にかけてほぼ

Table 5-1. In situ growth rates of *G. nagasakiense* estimated by FDC technique.

Locality	Date	Depth (m)	Water Temp. (°C)	T_d (h)	μ_{FDC} (div. d ⁻¹)
Suo Nada	1987 Aug. 8-9	5	25.9	1.21	0.14
		B-1	23.9	1.47	0.12
Hiroshima Bay	1989 Sep. 12-13	0	26.1	1.19	0.40
		2	25.5	1.26	0.27
		4	24.8	1.35	0.36
Hiroshima Bay	1990 Sep. 17-18	0	24.9	1.33	0.29
		2	25.0	1.32	0.52

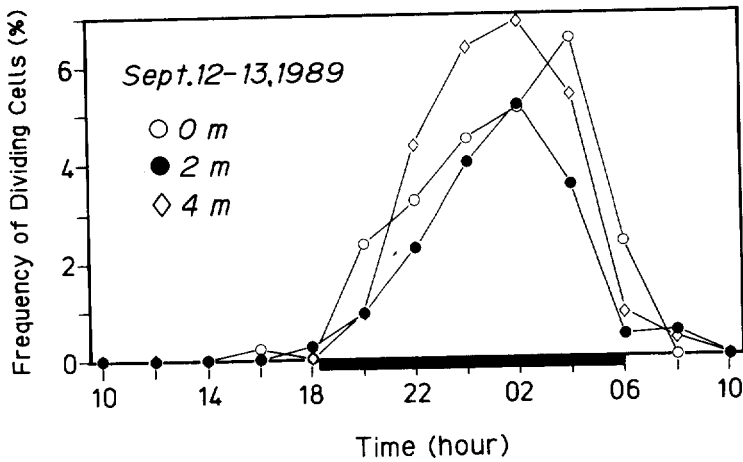


Fig.5-10. Diel pattern of dividing cells in the natural population of *G. nagasakiense* in Hiroshima Bay in 1989. Night period is indicated by blackened bar on the abscissa.

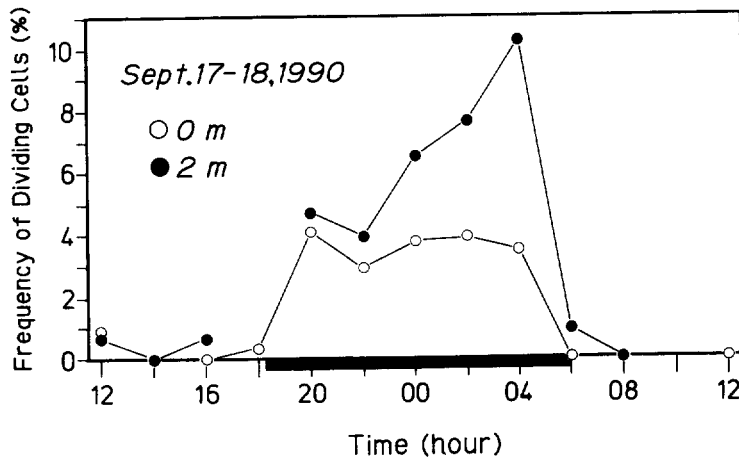


Fig.5-11. Diel pattern of dividing cells in the natural population of *G. nagasakiense* in Hiroshima Bay in 1990. Refer to Fig.5-10 for other legends.

3.5%前後で等しく、そのため出現の盛期は明瞭でなかった。しかし、2 m層では04:00に10.2%の明瞭な出現ピークが認められた。本調査では特に0 m層で細胞密度が極めて低く、FDCを求められなかった試料もあった。しかし、2 m層における18:00を除いて、それらの試料は細胞分裂がほとんど観察されない昼間のものであったため、他調査と同様に μ_{FDC} を計算した(Table 5-1)。その結果、各層の μ_{FDC} は0 m層が $0.29 \text{ divisions day}^{-1}$ 、2 m層が $0.52 \text{ divisions day}^{-1}$ であった。ただし、2 m層の結果については先の理由から過小推定の可能性がある。

考 察

現場海域における *G. nagasakiense* 個体群の細胞分裂も、前節で述べた室内培養同様、同調的に起こっていることが周防灘及び広島湾の調査で明らかになった。現場海域における分裂盛期

は、周防灘では22:00~02:00に (Fig. 5-9)、広島湾では02:00~04:00に観察された (Figs. 5-10と5-11)。これらの結果を総合すると、本種は深夜から早朝にかけて分裂する種類と判断される。

G. nagasakiense 現場個体群における分裂盛期の時刻は前節で述べた培養株のそれよりも2~4時間早かった。周防灘で得られた結果は光強度が弱い5m以深の個体群についてのものであり、また広島湾の調査では2回とも雨天のため日照時間は不照あるいは3時間と極めて短かった (広島地方気象台 1989, 1990)。培養条件下でも低光強度のもとでは分裂盛期が早まる傾向が見られており (Fig. 5-2)、このような分裂盛期の時間的ずれは現場と室内における光強度の差に起因するものと考えられる。以上の結果から、FDC法による増殖速度測定的前提条件である同調的細胞分裂が現場個体群についても確認された。さらに分裂細胞の出現がほぼ夜間のみに限られていたことから、FDCの測定を夜間のみに限定しても増殖速度の測定値自体には大きな誤差は生じないと考えられる。このように試料採集回数を減らすことができれば、現場調査及び検鏡作業の軽減が図られ、迅速に測定結果を得ることが可能になろう。

FDC法で得られた *G. nagasakiense* 個体群の増殖速度は周防灘では0.12と0.14 divisions day⁻¹、広島湾では0.27~0.52 divisions day⁻¹であった (Table 5-1)。これらの値は、第IV章及び飯塚・峯 (1983) で示された培養条件下における本種の最大増殖速度 (1.0 division day⁻¹) に比べるとかなり低い。飯塚 (1987) は、大村湾における *G. nagasakiense* の平均増殖速度をチューブ採水法によって水柱ごとに求め、赤潮前の表層個体群では最大1.0 division day⁻¹の増殖速度が得られたとしている。それに対して、中層及び底層個体群における増殖速度はかなり低く、0.55~0.49 divisions day⁻¹に留まったことから、全水柱当りでは0.59 divisions day⁻¹という値が示されている。また、HONJO *et al.* (1990) は五ヶ所湾における *G. nagasakiense* の平均増殖速度として0.32~0.47 divisions day⁻¹という値を報告している。したがって、FDC法によって広島湾で得られた増殖速度は大村湾あるいは五ヶ所湾で得られた結果とほぼ一致している。これらの結果から、非赤潮時の *G. nagasakiense* 現場個体群が本種の最大増殖速度を示すことはまれで、通常はそれよりもかなり低い速度で増殖しているものと考えられる。

一方、周防灘における平均増殖速度は広島湾に比べても低かった (Table 5-1)。周防灘の調査期間の日出と日没から明暗周期を求めるとほぼ14hL:10hDであり、前節で T_d を求めた実験条件と等しい。また、光強度は T_d に影響しないことが判っており、さらに T_d は前節の (4) 式に現場水温を代入して求めている。ただし周防灘における FDC は最大5%で、前節で述べた培養個体群での値に比べ低かった。以上のことから、この低い増殖速度は方法論上の問題に起因するものではないと結論できる。大村湾では表層個体群にくらべて、中層及び底層個体群の増殖速度はかなり低いことが報告されている (飯塚 1987)。周防灘の測定値も、5m層以深の中・底層個体群について得られたものであり、光あるいは栄養塩濃度等の影響によって増殖が制限されていた可能性が考えられる。第III章で述べたように1985年から周防灘全域を対象に行った調査結果によれば、大規模な *G. nagasakiense* 赤潮が発生した1985年や、一部赤潮状態となった1986年に比べ、本調査が行われた1987年には *G. nagasakiense* の増殖はほとんど見ら

れなかった。実際、1987年の周防灘西部海域では、本種の赤潮の発生は一件も記録されておらず、本種の増殖速度が極めて小さかったことも、その要因の一つであると考えられる。

現場海域において動物プランクトン等による捕食圧が分裂中の細胞に対して集中的に加わると、FDC法による増殖速度は過小推定となる (CHISHOLM 1981)。事実、珪藻 *Ditylum brightwellii* の分裂細胞が橈脚類によって選択的に捕食されることや (RICHMAN and ROGERS 1969)、橈脚類の摂食行動が植物プランクトンの分裂盛期である夜間に活発に行われることが報告されている (STEARNS 1986)。現場海域における *G. nagasakiense* でも分裂細胞が夜間に集中して見られることから (Figs. 5-9~5-11)、動物プランクトン等の摂食活動が過小推定の原因になる可能性もある。しかし、*G. nagasakiense* を捕食する橈脚類は少ないという実験結果も得られており (UYE and TAKAMATSU 1990)、選択的な捕食圧が増殖速度の測定に及ぼす影響については今後検討する必要がある。

以上述べてきたように、FDC法で求めた *G. nagasakiense* 現場個体群の増殖速度は綿密な調査で得られたこれまでの測定結果とほぼ一致することが判明した。このことはFDC法が増殖速度推定法として有効であることを示している。また、現場海域における *G. nagasakiense* 個体群の増殖速度が小さい場合、結果として赤潮の発生は認められておらず、これは増殖速度が赤潮予知の指標となり得ることを傍証するものであろう。

第Ⅵ章 *Gymnodinium nagasakiense* の細胞周期

細胞が分裂しながら増殖している際には、DNAを始めとする細胞構成要素を倍加する反応が繰り返し進行している。その過程は新生した娘細胞が生長・分裂して再び娘細胞を生じる過程であって、このような一連の過程を細胞周期と呼ぶ (広川 1977)。真核生物の細胞周期はDNA合成期 (S期) と細胞分裂期 (M期) という2つの主要な段階から構成されており、さらにS期の前後にはG₁期とG₂期と呼ばれる間期 (Gap) がある (PUISEUX-DAO 1981)。

赤潮の発生機構を考える上で赤潮生物の生活史を明らかにすることは重要な課題である。第Ⅲ章で述べたように、浦ノ内湾では *Gymnodinium nagasakiense* の栄養細胞が周年にわたり観察された。一方、第Ⅳ章の室内実験から、本種が瀬戸内海における年間の最低水温に近い10℃でも増殖できることが判明した。さらに、海底泥試料を培養しても栄養細胞が出現しないことも報告されている (板倉他 1990)。以上の結果は、夏期の赤潮のシードポピュレーションとして越冬した栄養細胞が重要であること、さらに本種は生活史にシストを持たない可能性が大きいことを示している。しかし、変動する環境に適応して行くためには接合によるDNAの組み替えを行って heterogeneity を保持することが必要であると考えられることから (左子・石田 1986)、シストが存在しなくても有性生殖過程が存在する可能性がある。実際に渦鞭毛藻のシストは有性的に形成されるのか無性的に形成されるのか明らかでない種も多く (中原 1986)、さ

らに有性生殖がシストの形成を伴わない場合もある (ZINGMARK 1970, 内田 1991)。このような有性生殖過程を含む生活史を明らかにするためには、それらの各段階における核相を調べることが重要である。しかし、一般に渦鞭毛藻の染色体を計数することは、それらの染色体数が多数であり、さらに通常の押しつぶし法では観察しにくいことから、困難な作業である (LOPER *et al.* 1980, HOLT and PFIESTER 1982)。さらに染色体の計数には細胞を破壊する必要があるため、種々の植物プランクトン種が混在する天然試料にはほとんど使用できない。それゆえ、染色体数の計数に代わるものとして、一細胞ごとの核DNA量を簡便に測定する手法を確立し単相と複相を識別可能にすることは、*G. nagasakiense* の生活史を解明する上で極めて有効であると考えられる。

第V章では、*G. nagasakiense* 赤潮の発生を予知するための生物学的な指標として種の増殖速度に着目し、細胞分裂指数 (FDC: Frequency of Dividing Cells) によるその推定法について述べた。分裂期 (M 期) は細胞周期の中の重要な段階の一つであるため、分裂指数法の基礎を固める上で本種の細胞周期を明らかにしておく必要がある。さらに、ごく最近細胞周期解析に基づく増殖速度の測定法が開発されてきている (CARPENTER and CHANG 1988, CHANG and CARPENTER 1988)。この手法は分裂指数法に比べて測定精度が高いこと、そして試料採取頻度が少なく済むなどの利点を有している。しかし、この手法を *G. nagasakiense* の場合に応用するためにも、その細胞周期に関する基本的な情報が不可欠である。

以上のような背景から、本章では赤潮の発生予知及び生活史解明のための基礎資料を得るため、*G. nagasakiense* の細胞周期を明らかにすることを目的とした。まず第1節では顕微蛍光測光による核DNA量の測定法を確立し、第2節ではその手法を用いて培養条件下における本種の細胞周期を明らかにした。さらに、第3節では細胞周期に及ぼす温度の影響を調べ、第4節では現場個体群における細胞周期を明らかにした。

第1節 核DNA量測定法の確立

細胞が分裂し増殖するにはDNAの合成が必要である。このようにDNA量は細胞の成熟度の指標であることから、DNA分布から細胞周期解析を行うことができる (高橋 1983)。従来の細胞周期解析では放射性チミジン ($[^3\text{H}]\text{-TdR}$) を用いたオートラジオグラフィによる分裂指数法 (labeled mitotic index) や2重標識法が用いられてきた (団 1981)。しかし、これらには多大な労力を要すること、放射性同位元素の使用が不可欠であること等、日常的な使用には困難が伴う。近年それに代わるものとしてフローサイトメトリー (Flow Cytometry) が登場し、細胞生物学の飛躍的進歩に貢献している (太田 1988)。そのため、オートラジオグラフィによる細胞周期解析は次第に過去のものとなりつつある (高橋 1983)。しかし、フローサイトメトリーでは機器自体がかなり高額であるため、植物プランクトン分野におけるその利用は未だ一般的にはなっていない。顕微蛍光測光法 (Microfluorometry) はフローサイトメトリーに比べ測定に長時間を要する反面、個々の細胞を直接検鏡でき、さらに操作も容易である

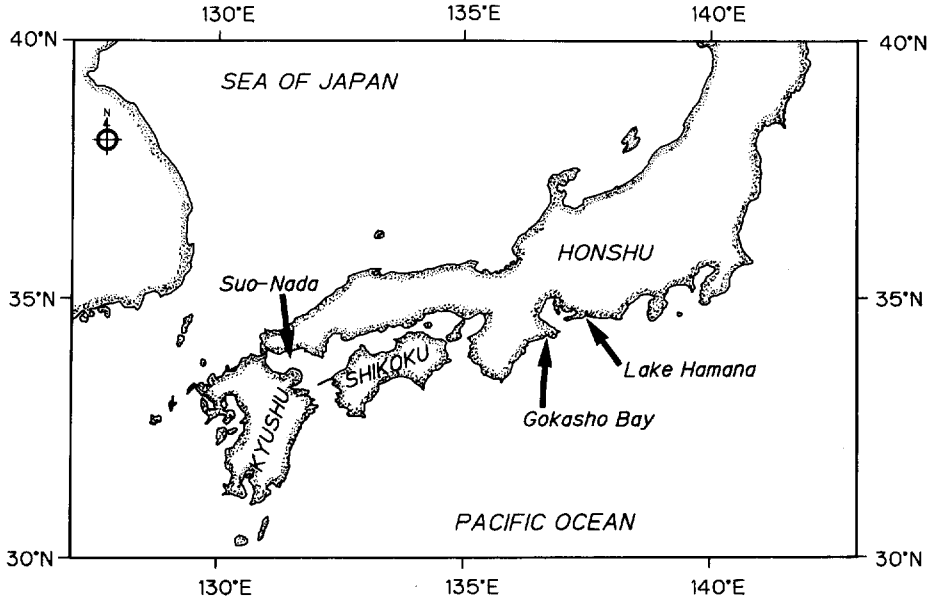


Fig.6-1. Locations of sampling areas. An axenic culture of *G. nagasakiense* was isolated from Suo-Nada in July 1985, and living cells from natural populations were obtained in June (Gokasho Bay) and July (Lake Hamana), 1990.

等の利点を有する。そこで本節では、顕微蛍光測光によって *G. nagasakiense* の細胞当りの DNA 量を測定するための方法を確立することを目的とした。

材料及び方法

1. 供試株と培養条件

培養実験に用いた *G. nagasakiense* は1985年に瀬戸内海西部の周防灘 (Fig. 6-1) から分離し無菌化したクローン株 (G303 AX-2) である。培地には改変 SWM-3 (CHEN *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987) を用い、培養は温度22°C, 光強度100 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 明暗周期は14hL:10hD で行った。さらに、培養細胞と天然細胞における核DNA量の相違を調べるため三重県五ヶ所湾及び静岡県浜名湖 (Fig. 6-1) より採取した海水試料中の *G. nagasakiense* 細胞を用いた。

2. 核DNA測定試料の調製

10 ml 容のガラス製ねじ口遠心管中に *G. nagasakiense* の培養 5 ml を入れ、それに等量の 1% グルタルアルデヒド海水溶液を加えて細胞の固定を行った。固定試料は分析まで冷蔵庫 (4°C 暗条件) に保存した。固定試料を遠心分離 (200×g, 15 min) し、その上澄みを捨てた。核 DNA 測定時におけるクロロフィルの影響を調べるため、遠心後の細胞ペレットに 4°C の冷却メタノール (99%) を 5 ml 加え、4°C で一晩クロロフィルの抽出を行った (OLSON *et al.* 1983)。遠心分離 (200×g, 15 min) によってメタノールを除去した後、細胞ペレットに 4°C の Tris 緩衝液 (10 mM Tris, 10 mM EDTA-2Na, 100 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethylamine hydrochloride, pH=7.4) (HAMADA and FUJITA 1983) を 5 ml を加えて再懸濁させ、再び

遠心分離 (200×g, 15 min) して細胞の洗浄を行った。その後、細胞ペレットに上述の Tris 緩衝液に溶解させた 4', 6-diamidino-2-phenyl indole (DAPI) を 5 ml 加え、4℃の暗条件下で染色を行った。

染色に最適な DAPI 濃度を明らかにするため、細胞を種々の DAPI 濃度 (0.005~5 μg ml⁻¹) の下で染色し蛍光強度を比較した。さらに最適染色時間及び染色細胞の蛍光寿命を検討するため、DAPI 染色後に 4℃の暗条件下で保存した細胞について、最大 39 日にわたり蛍光強度の経時変化を調べた。

3. 顕微鏡蛍光測光

染色が終了した細胞を遠心分離 (200×g, 15 min) によって濃縮し、細胞懸濁液数滴をパスツールピペットで無蛍光スライドガラス上に落とし、カバーガラスで封入した。細胞核の蛍光強度は落射蛍光顕微鏡 (Olympus BHS-RFC) と顕微鏡蛍光測光装置 (Olympus OSP-1) の組み合わせにより測定した。各フィルターの組み合わせは以下のように設定した。励起フィルターは UG-1 (380 nm)、バリヤフィルターは L430 (435 nm)、ダイクロイックミラーは DM400+L 420、測光フィルターは MF450W とした。励起光源には 100W 水銀ランプ (OSRAM HBO 100 W/2) を用いた。検鏡は倍率 200 倍で行った。個々の細胞を視野中に設けた直径 40 μm の蛍光測定用ピンホール内に入れ、その核の蛍光強度を測定した。蛍光値の標準化には径 4.29 μm の蛍光標準粒子 (Fluoresbrite carboxylate microspheres, 蛍光波長 = 468 nm, Polyscience 社) を使用した。測光データは接続しているコンピュータに転送され、そこで蛍光値の平均及び標準偏差を計算するとともに、DNA ヒストグラムを出力させた。なお、核 DNA 量は染色体分析による結果 (たとえば 1n あるいは 2n) と区別するため、染色体数に相当する DNA 量、すなわち 1C (one complement of DNA) あるいは 2C (two complements of DNA) で示した。

結 果

メタノール処理 (クロロフィル除去) が DAPI 染色を行った *G. nagasakiense* の細胞核から発せられる蛍光強度に及ぼす影響を Fig. 6-2 に示す。まずメタノール無処理区では一つの幅広いピークのみが得られた。このピークの変動係数 (Coefficient of variation: CV) は 31% と非常に大きかった。ところが、メタノール処理区では二つのピークが明瞭に認められた。これらのピークのうち、DNA 量の少ないピークは細胞周期の G₁ 期の細胞 (1C DNA) で、もう一方の DNA 量の多いピークは同じく G₂+M 期の細胞 (2C DNA) で構成されていると見なされる。また複相核の平均蛍光強度は単相のそれのほぼ 2 倍であった。それら各々のピークの CV はそれぞれ 3.5% と 3.4% であった。さらに、メタノール無処理区に比べて、ほぼ 2 倍の蛍光強度が得られることが判明した。以上の結果から、細胞内のクロロフィルは DNA-DAPI 複合体からの蛍光強度を減少させることが明らかとなった。

核染色に最適な DAPI 濃度を検討した結果を Table 6-1 に示す。DAPI 濃度 0.005~0.5 μg ml⁻¹ の範囲では、その濃度の増加にしたがって G₁ 及び G₂+M の各ピークとも蛍光強度の増加が認められた。ただし低 DAPI 濃度における蛍光強度の変動係数 CV は 8% 以上と大きかった。

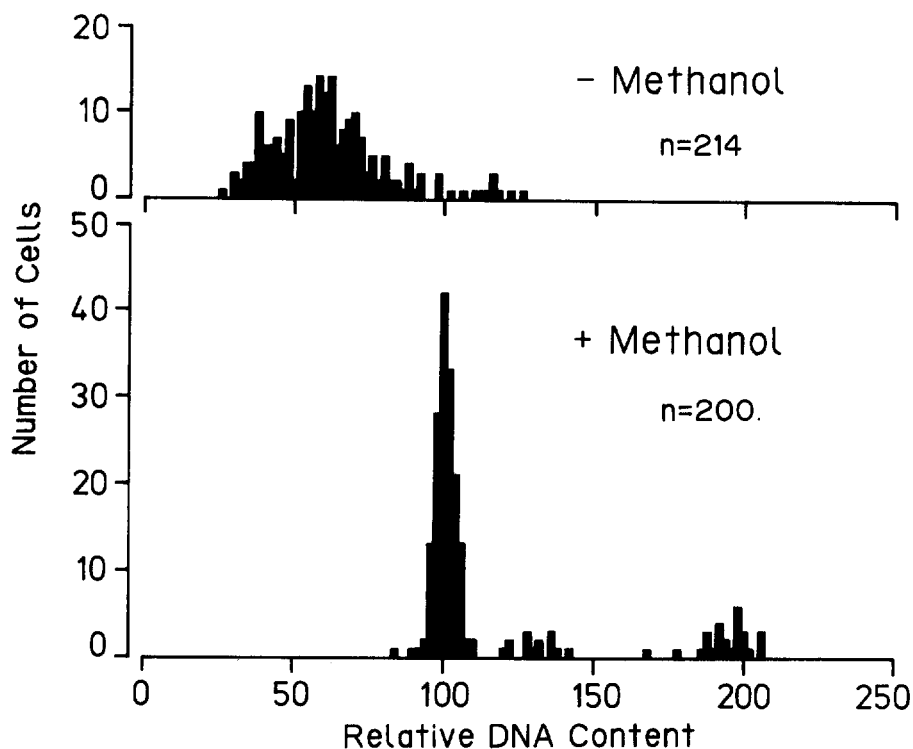


Fig.6-2. Nuclear DNA content of methanol untreated (upper panel) and treated (lower panel) cells of *G. nagasakiense*. Histograms are normalized with the mode of G_1 peak in the methanol treated cells as 100.

Table 6-1. Effect of DAPI concentration on mean fluorescence intensity of cells in G_1 and G_2+M phases of *G. nagasakiense*.

DAPI Conc. ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	n	Mean		CV		Mean ratio (G_2+M/G_1)
		G_1	G_2+M	G_1	G_2+M	
0.005	150	0.24	-	26.85	-	-
0.05	160	2.44	3.92	16.90	8.69	1.60
0.5	163	6.30	11.87	3.63	3.86	1.88
5.0	170	5.34	9.17	8.65	6.49	1.72

$5 \mu\text{g ml}^{-1}$ では蛍光強度は低下し、さらに変動係数も増加した。この濃度で染色した細胞を顕微鏡観察すると、核以外にも細胞質が染色され黄色の蛍光が観察された。そのため核の青色蛍光は不明瞭であった。DAPI濃度 $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ における G_1 と G_2+M ピークの CV は 3.6~3.9%と最も小さく、さらに両ピークの蛍光強度の比も 1.88と最も大きかった。以上の結果から、*G. nagasakiense* の核染色及び蛍光測光のための最適 DAPI 濃度は $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ であると判断された。

染色後 4°C の暗所に保存した細胞の時間経過に伴う DNA 蛍光の変化を Table 6-2 に示した。 G_1 及び G_2+M 各ピークの蛍光強度、並びにそれらのピークの CV から判断すると、染色後

Table 6-2. Time course of mean fluorescence intensity of cells in G₁ and G₂+M phases of *G. nagasakiense* stained with DAPI at 0.5 μg ml⁻¹ and kept in the dark at 4 °C.

Time (day)	n	Mean		CV		Mean ratio (G ₂ +M/G ₁)
		G ₁	G ₂ +M	G ₁	G ₂ +M	
0	163	6.30	11.87	3.63	3.86	1.88
1	95	7.23	13.77	3.87	3.09	1.90
5	100	6.87	13.09	3.16	4.62	1.91
8	110	6.96	13.12	4.34	4.47	1.89
13	100	6.91	12.80	4.57	5.54	1.85
39	100	6.12	11.79	3.80	4.12	1.93

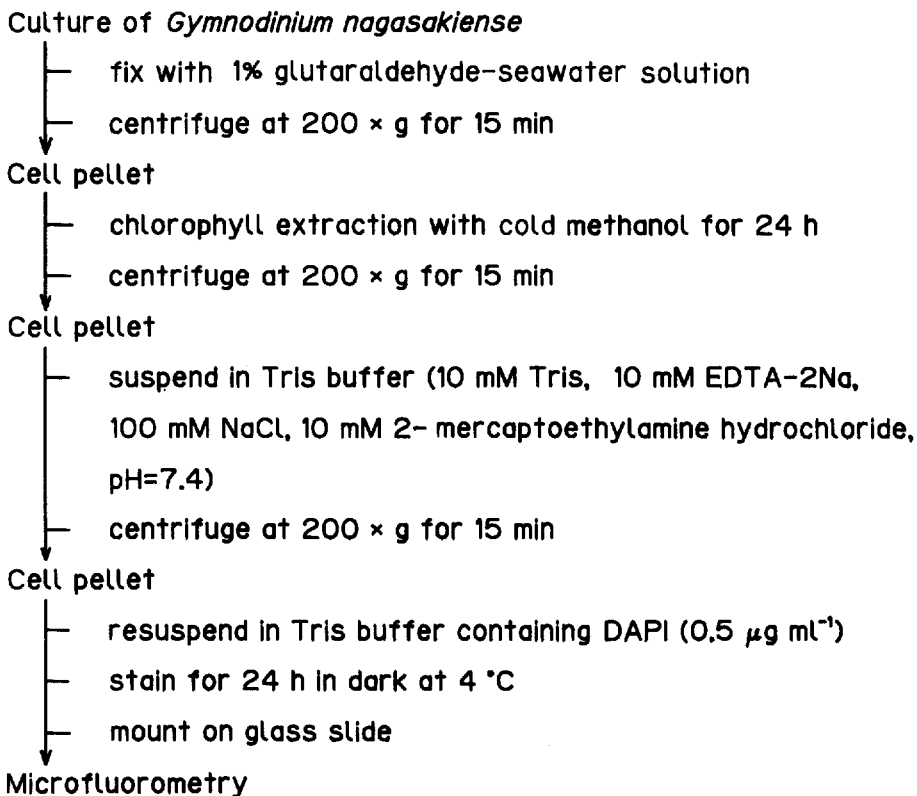


Fig.6-3. Method for the determination of nuclear DNA content using epifluorescence microfluorometry.

24時間以降に測光を行った場合に良好な結果が得られた。さらに、染色後の細胞を冷暗所に保存すれば、最低一ヵ月間にわたり蛍光強度は安定であった (Table 6-2)。

紫外線連続照射による蛍光の退色を調べた結果、HAMADA and FUJITA (1983) の Tris 緩衝液で調製した DAPI を用いた場合、5分以内の連続照射では退色は見られず、さらに10分でも5%程度の退色にとどまった。

以上述べたような検討結果に基づき、顕微蛍光測光による *G. nagasakiense* の核 DNA 量測定の手順は Fig. 6-3 のようにまとめられる。

Fig. 6-4 に周防灘産の G303 株及び五ヶ所湾と浜名湖より得られた天然細胞について得られた DNA ヒストグラムを示す。天然細胞は南西海区水産研究所に到着した後に光点灯中の培養器に入れ、10 時間の暗期を経験した後、次の明期開始から約 3 時間後に固定したものである。これは明確な明暗周期を経験させることによって、輸送中（暗所）に乱れたであろう細胞周期を揃え、明瞭な G_1 及び G_2+M のピークを得るための処理である。Fig. 6-4 から明らかなように、培養細胞 (G303) と上記二カ所から得られた天然細胞の DNA ヒストグラムにおける G_1 及

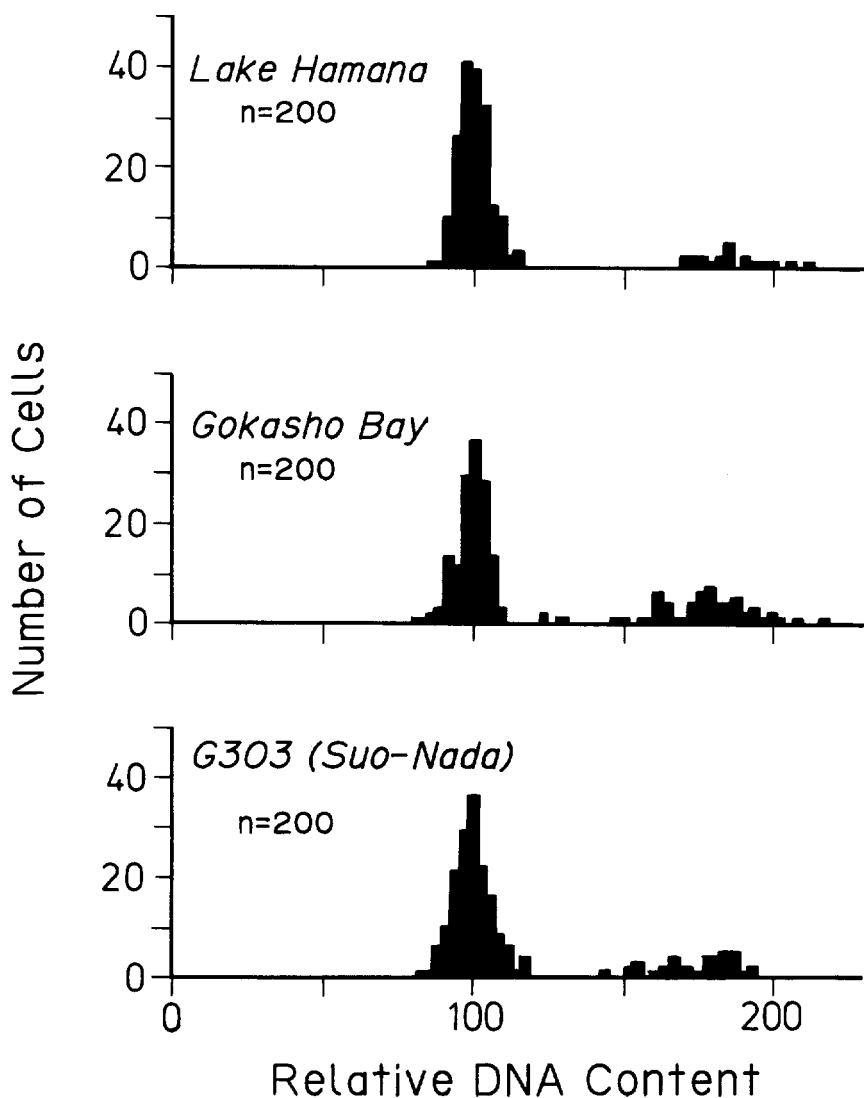


Fig.6-4. Nuclear DNA contents of cultured and natural populations of *G. nagasakiense* obtained from the locations shown in Fig. 6-1. Histograms are normalized with the mode of G_1 peak in strain G303 as 100.

び G_2+M のピークはほぼ同じ横軸上の位置にみられた。さらに、それらの G_1 細胞の蛍光強度の平均値間には統計的に有為な差は見られなかった (F-test $df=2, 472, p>0.05$)。したがって、異なる 3 海域から得られた *G. nagasakiense* は同じ核 DNA 量を持つことが明らかとなった。さらにこの結果はここで用いた DNA 測定法が十分な再現性を持つこと、そして天然細胞にも適用可能であることを示している。

考 察

YENTSCH *et al.* (1983) は、有毒渦鞭毛藻 *Gonyaulax tamarens* var. *excavata* (= *Alexandrium tamarens*) の DNA 量を mithramycin 染色を行ってフローサイトメトリーで測定する際に、クロロフィル等の色素タンパクによる蛍光の減衰が起こることを指摘している。本研究においても *G. nagasakiense* の細胞を DAPI で染色した際に発せられる蛍光強度は、メタノール処理によるクロロフィルの除去によって約 2 倍になり、さらに G_1 及び G_2+M の各ピークが明瞭に分離された (Fig. 6-2)。メタノール無処理区における蛍光強度の低下及びピークの非分離の原因は、DAPI-DNA 複合体の蛍光波長 450 nm (KASTEN 1989) とクロロフィル a の吸収波長 440 nm とがほぼ一致することから、核から発せられる青色蛍光がクロロフィル a によって再吸収されるためと考えられる。OLSON *et al.* (1983) は DAPI よりも蛍光波長が長い蛍光色素 Hoechst 33342 (蛍光波長 465 nm, KASTEN 1989) を用いた場合でも同様の現象を指摘している。したがって、DAPI 染色と顕微鏡蛍光測光の組合せによって DNA 量の測定を行う場合には、あらかじめクロロフィルを抽出除去することが不可欠であることが明らかである。*G. nagasakiense* の場合にはメタノール処理法が有効であることが判明した。

近年種々の細胞の核 DNA を定量するためにフローサイトメトリーが用いられている (DEAN 1985)。フローサイトメトリーに比較すると、ここで用いた顕微鏡蛍光測光法は測定に長時間を要する。本研究では、細胞密度にもよるが、200 細胞の蛍光強度を測定するのに約 20~30 分要した。そのため、紫外線の連続照射による蛍光の退色が顕微鏡蛍光測光法におけるもう一つの重要な誤差要因となる可能性がある。事実、HULL *et al.* (1982) は mithramycin による染色の場合には退色が著しく速く、3 分の紫外線照射で蛍光値が当初の 33~44% に減少すると報告している。しかし、本研究では HAMADA and FUJITA (1983) の Tris 緩衝液を用いた結果、10 分の紫外線連続照射でも退色は 5% であった。実際の測定の際には、顕微鏡のステージを動かすことによって広い視野にわたり対象細胞を探索する。そのため同一視野に長時間留まることはなく、この程度の退色であれば測定値への影響を考慮する必要はないと考えられる。

CHANG and CARPENTER (1988) は有殻渦鞭毛藻 *Heterocapsa triquetra* の核染色に適当な DAPI 濃度は、 $0.5\sim 5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ と比較的広範囲であったと述べている。しかし、*G. nagasakiense* の場合、最適濃度は $0.5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ であり、 $5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ では明らかに過染色 (細胞質が黄色、核の青色蛍光強度の低下) になることが判った (Table 6-1)。この結果は COLEMAN *et al.* (1981) の観察とも一致しており、明らかに過染色と考えられる。以上のことは種によって DAPI の核への染色性が異なることを示している。このような染色性の差をもたらす要因としては、種の

違い以外にも DAPI 溶液を調製するために用いた緩衝液及び塩類濃度の差が考えられる。例えば、濾過海水で調製した DAPI で染色した *G. nagasakiense* は、塩類を含まない蒸留水で調製した DAPI を用いた場合よりも蛍光値が低いことが判明した。このような NaCl による蛍光値への影響は、他の蛍光プローブである Propidium Iodide (PI) でも報告されている(野村・星野 1988)。したがって、DAPI 溶液を調製するには適当な緩衝液を用いることが必要である。さらに、天然海水中に粘土粒子等の浮遊物質が多量に含まれる場合にも、DAPI による染色が悪くなることが認められた。したがって、異なる培養種あるいは天然個体群に本方法を応用する際には、あらかじめ適正な DAPI 濃度を検討しておく必要がある。

本研究で得られた *G. nagasakiense* の G_1 及び $G_2 + M$ ピークの変動係数 (CV) は 3.09 ~ 5.54% であった (Table 6-2)。OLSON *et al.* (1983) によれば、彼らのフローサイトメーターで蛍光粒子を測定した場合の CV は約 3% であるが、植物プランクトン試料では種によってかなり異なり、6 ~ 14% であった。一方、CHANG and CARPENTER (1988) は、テレビカメラを用いた顕微蛍光測光によって渦鞭毛藻 *H. triquetra* の核 DNA を測定した場合の CV は 6.22% であったと述べている。したがって、本研究によって得られた CV 値はフローサイトメトリーに匹敵するものである。

これまで述べてきたように、顕微蛍光測光法を用いて *G. nagasakiense* の核 DNA 量が測定可能であることが明らかとなった。本手法の優れる点として、フローサイトメーターのような高額な機器を必要としないこと、測光する細胞の形態を直接確認できることや、低い細胞密度の場合あるいは群体を作る種でも個々の細胞が測定可能であるため天然試料にも適用可能なことが挙げられる。

第 2 節 培養条件下における細胞周期

渦鞭毛藻の細胞分裂は明暗周期のもとでは特定の時間に同調的に起こることが知られている。したがって、その DNA 合成もある時間帯に集中して起こるように思える。しかしながら、これまでの研究によれば渦鞭毛藻の DNA 合成は様々であり、ある種では真核生物と同様の S 期が存在するが、別の種では連続的な DNA 合成が報告されている (TRIEMER and FRITZ 1984)。第 V 章で述べたように *G. nagasakiense* についても同調的細胞分裂が室内実験及び現場海域で確認された。しかし、その DNA 合成については不明であり、細胞周期解析による増殖速度推定法 (CARPENTER and CHANG 1988, CHANG and CARPENTER 1988) を本種に応用する上でも、その細胞周期を明らかにしておく必要がある。

本節では前節で確立した *G. nagasakiense* の DNA 測定法を用いて本種の核 DNA 分布の日周変化を明らかにするとともに、分裂指数及び細胞体積の経時変化を調べることによって本種の基本的な細胞周期を検討した。その結果に基づき本種の細胞周期の特徴について論じた。

材料及び方法

1. 供試株

実験には周防灘より分離した *G. nagasakiense* の無菌クローン株 (G303 AX-2) を用いた。

2. 培養実験

改変 SWM-3培地700 ml を入れた 1 liter の三角フラスコに *G. nagasakiense* を接種し、温度 25°C、光強度 $120 \mu E m^{-2} s^{-1}$ 、明暗周期 12hL:12hD の条件下で培養を行った。明期の開始は 06:00 に、また暗期の開始は 18:00 に設定した。培養が対数増殖期初期 (細胞密度 $800 cells ml^{-1}$) に達したところで、午前 10:00 から 24 時間にわたり 2 時間ごとに培養 10 ml を採取した。暗期における試料採取は暗所 (光強度 $5 \times 10^{-3} \mu E m^{-2} s^{-1}$) で行った。採取した培養試料は等量の 1% グルタルアルデヒド海水溶液と混合して固定後、前節の方法でクロロフィルを除去した後に細胞核を染色し、顕微蛍光測光法によって核 DNA 量の測定を行った。各試料について 200 細胞以上の測定を行い、採取時間ごとの DNA ヒストグラムを作成した。また培養採取と同時に Coulter Multisizer (aperture tube = $100 \mu m$) (Coulter 社) による生細胞の粒径組成を測定した。さらに固定試料について第 V 章に示した方法によって細胞分裂指数 (FDC) を求めた。

結果

室内培養条件下における *G. nagasakiense* (G303株) の分裂指数及び細胞密度の経時変化を Fig. 6-5 に示した。本種は明瞭な同調的細胞分裂パターンを示した。細胞密度は 10:00 から 00:00 まではほぼ一定であったが、その後 00:00 から 06:00 にかけて急激に増加し、06:00 以降再び一定となった。分裂指数は暗期開始 4 時間後の 22:00 から増加し始め、02:00~04:00 に最大値を示した後、06:00 には急激に低下した。分裂指数の最大を示した時刻は細胞数の増加期と一致した。これらの結果から、本種の細胞分裂は 00:00 から始まり 06:00 には完了することが判明した。

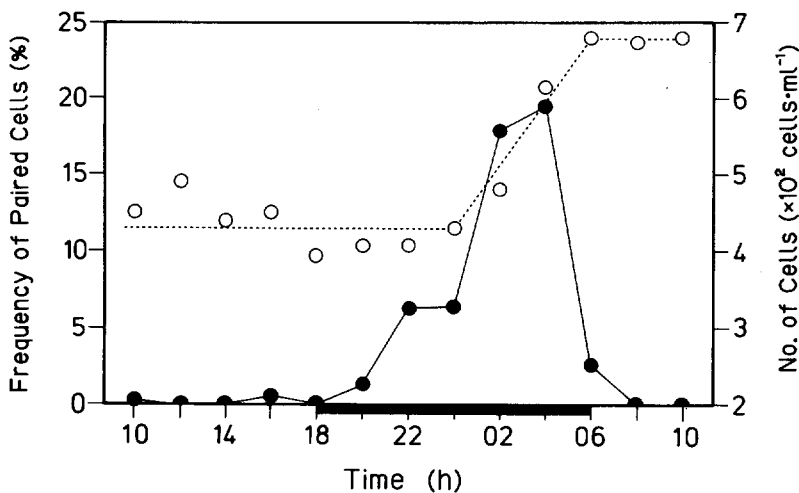


Fig.6-5. Diel changes in cell density (open circle) and frequency of paired cells (closed circle) in an exponentially growing culture of *G. nagasakiense* at 25°C. Dark bar represents the dark period.

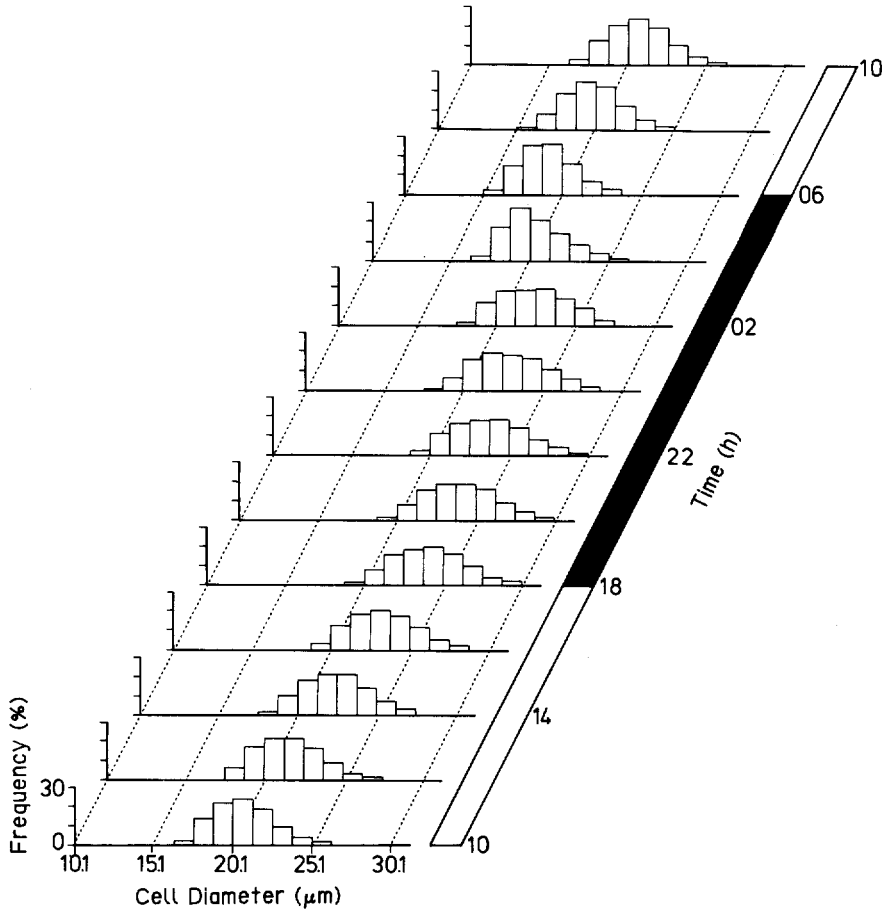


Fig.6-6. Diel changes in cell size frequency distribution in an exponentially growing culture of *G. nagasakiense* at 25°C. Dark bar represents the dark period.

細胞の粒径組成の経時変化を Fig. 6-6に示す。細胞径は正弦関数的に変化した。すなわち、10:00から18:00にかけて細胞は大きくなり、それ以降22:00までは変化しなかったが、00:00以降06:00にかけてその減少が見られた。この細胞径の減少の時刻は細胞分裂の時刻と一致した (Fig. 6-5)。その後06:00から10:00にかけて再び細胞径の増大がみられた。

各時刻における核 DNA ヒストグラムの変化を Fig. 6-7に示す。核 DNA 分布は顕著な日周変化を示した。実験開始時の10:00にはほとんどの細胞は1CのDNAを有していた。それ以降時間の経過につれて、1Cと2Cの中間のDNA量を有する細胞の割合が増加し、22:00にはほとんどの細胞が2CのDNA量を持つに至った。その後00:00から再び1CのDNAを有する細胞が増加し始め、06:00にはほとんどの細胞のDNA量は1Cとなった。以降08:00までは明瞭な変化は見られなかったが、10:00になると再び中間量のDNAを有する細胞が見られ始めた。

考 察

渦鞭毛藻は真核生物と原核生物の両方の特徴を備えた核を有していることが知られている。

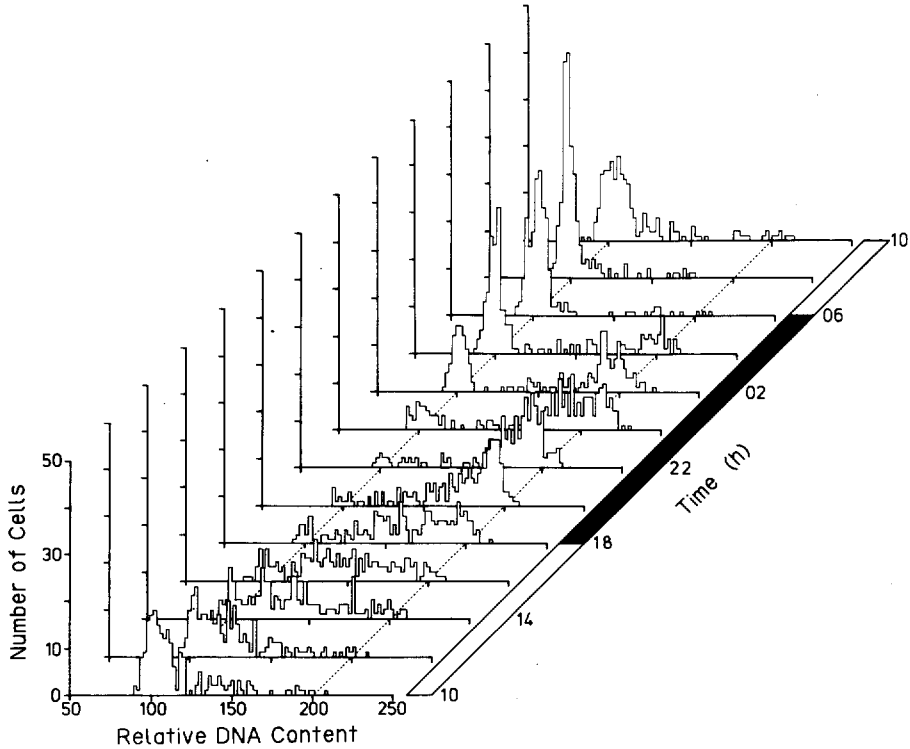


Fig.6-7. Diel changes in nuclear DNA contents in an exponentially growing culture of *G. nagasakiense* at 25 °C. Histograms are normalized with the mode of G₁ peak at 08:00 as 100. Dark bar represents the dark period.

すなわち、(a)組織化学的に検出可能なヒストンが存在しないこと、(b)クロマチンの径が3～6 nm であること、(c)染色体が核膜に付着すること、(d)有糸分裂の紡錘体が存在しないこと、(e) DNA 合成が連続的であること、(f)クロマチン繊維の超微細構造が細菌の核様体 (nucleoid)と同様の渦状を示すこと、(g)染色体が常時凝集していること、等の特徴が挙げられる (LOEBLICH 1976)。そのため、渦鞭毛藻は原核生物から真核生物への進化の過程で早い時期に分岐したと考えられている (LOEBLICH 1976)。また、これらを原核生物と真核生物の中間に位置するもの、すなわち“mesokaryote”と考える研究者もいる (DODGE 1965, HAMKALO and RATTNER 1977)。ただしこの考え方は論争的となっている (RIZZO 1987)。このように、渦鞭毛藻は極めて特異な生物群であるため、そのDNA合成に関してそれがいつどのように行われるのか等々、細胞周期に関わる様々な疑問と興味の対象となってきた (TRIEMER and FRITZ 1984)。渦鞭毛藻のDNA合成に関するこれまでの報告をTable 6-3にまとめた。ここに示されるように、多くの種では真核生物のように明瞭なS期を有しているが、*Alexandrium tamarense*、*Amphidinium carterae*及び*Prorocentrum micans*では原核生物のように連続的なDNA合成が報告されている。本研究において*G. nagasakiense*の核DNA量の日周変化を調べた結果、明らかにDNA量で1Cと2Cの中間量を有する細胞の割合が特定の時間帯のみに高頻度で見られることが判明した (Fig. 6-7)。このことから、*G. nagasakiense*は明瞭に区別され

Table 6-3. Types of DNA synthesis in dinoflagellates.

Species	DNA synthesis		References
	Distinct S	Continuous	
<i>Alexandrium tamarense</i>	+(2 clones)	+(2 clones)	KARENTZ 1983
<i>Amphidinium carterae</i>	+		KARENTZ 1983
		+	GALLERON & DURRAND 1979
<i>Cachonia niei</i>	+		LOEBLICH 1977
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	+		FRANKER <i>et al.</i> 1974
<i>Gonyaulax polyedra</i>	+		CETTA & ANDERSON 1990
<i>Gymnodinium nagasakiense</i>	+		This study
<i>G. nelsoni</i>	+		KARENTZ 1983
<i>Gyrodinium uncatenum</i>	+		CETTA & ANDERSON 1990
<i>Heterocapsa pygmaea</i>	+		KARENTZ 1983
<i>Peridinium cinctum</i>	+		SPECTOR <i>et al.</i> 1981
<i>Prorocentrum micans</i>	+		BHAUD & SOYER-GOBILLARD 1986
		+	DODGE 1966
		+	FILFILAN & SIGEE 1977
<i>P. triestinum</i>	+	+(one clone)	KARENTZ 1983
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	+		KARENTZ 1983

るDNA合成期 (S期) を有しており、それはほぼ10:00から22:00付近にあると考えられる。これは真核生物における細胞周期の特徴である (LOEBLICH 1976, SPECTOR *et al.* 1981)。以上の結果を踏まえ、細胞分裂指数 (Fig. 6-5) 及び細胞粒径組成 (Fig. 6-6) の日周変化を加えて検討した結果、温度25°C, 12hL:12hDの明暗周期のもとで培養した *G. nagasakiense* の細胞周期は、Fig. 6-8に示す模式図のように進行しているものと考えられる。

これまで細胞周期のうち有糸分裂期 (M期) が種ごとの増殖速度測定のための指標として用いられてきた (WEILER and CHISHOLM 1976, WEILER and EPPLEY 1979)。MCDUFF and CHISHOLM (1982) は、細胞分裂指数測定のための試料採取間隔に対して、より長時間の分裂指標を用いる方が増殖速度の測定精度向上に有効であることを報告している。上述のように、*G. nagasakiense* におけるS期の細胞は10:00~22:00にかけて見られた (Fig. 6-8)。そこでS期のピークとG₂+M期のピークまでの時間差からDNA合成期の長さを推定すると (HELLER 1977, CETTA and ANDERSON 1990)、ほぼ10hと計算された。この時間は *A. carterae* の6~9h (GALLERON and DURRAND 1979)、*Cachonia niei* の7h (LOEBLICH 1977)、*Gonyaulax polyedra* の1~3hや *Gyrodinium uncatenum* の2~4h (CETTA and ANDERSON 1990)、*Heterocapsa triquetra* の2.8~4.4h (CHANG and CARPENTER 1988)、*P. micans* の4h (BHAUD and SOYER-GOBILLARD 1986) のいずれに比べても長い。したがって、S期とG₂+M期の和を分裂指標とすることにより、増殖速度測定の精度向上及び試料採取回数の軽減が期待される (CHANG and CARPENTER 1988)。

KARENTZ (1983) は6種8株の渦鞭毛藻のDNAと細胞密度の経時変化を調べ、DNA合成は必ずしも細胞分裂と同調していないことを示した。しかし本研究の結果から、*G. nagasakiense*

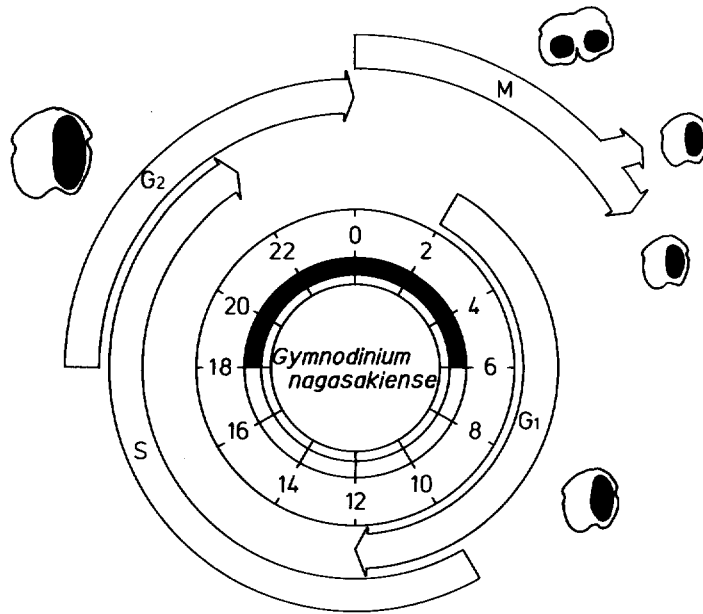


Fig.6-8. Diagrammatic representation of cell cycle events in a 12hL:12hD synchronized culture of *G. nagasakiense* at 25°C. Inner circle shows the time (h). Open bar, light phase; closed bar, dark phase.

のDNA合成は特定の時間帯に位置するS期に起こり、それは細胞分裂(M期)に先行していることが明らかになった (Fig. 6-8)。また前章では *G. nagasakiense* の細胞分裂がやはり同調的に起こっていることが明らかとなっている。これらのことから、本種の細胞周期の各段階は互いに順序よく進行しており、細胞周期の進行になんらかの調節機構が存在するものと考えられる。ところで、*G. uncatenum* ではG₁期は非常に短く、有糸分裂の直後にDNA合成が開始されることが報告されている (CETTA and ANDERSON 1990)。しかし、*G. nagasakiense* では明瞭なG₁期が存在しており、*G. uncatenum* のようなDNA合成パターンは独立栄養型の渦鞭毛藻では例外的なものと考えられる (KARENTZ 1983)。

渦鞭毛藻の生活史には有性的な過程と無性的な過程が見られる場合がある (PFIESTER and ANDERSON 1987)。有性生殖過程では栄養細胞から配偶子が形成され、それらが接合して運動性接合子 (planozygote) となる。そして運動性接合子がほとんどの場合休眠接合子 (hypnozygote) あるいはシストに至る。有性生殖過程を明らかにするためにはこれらの段階を識別することが必要となるが、外部形態のみで行うことは困難である (福代 1987b)。ただし核相で見ると栄養細胞と配偶子は単相、接合子は複相であるため (PFIESTER and ANDERSON 1987)、核DNA量の違いからそれらの識別が可能になる。*G. nagasakiense* の場合には細胞周期の各段階が極めて明瞭に区別され、複相 (2C DNA) の細胞の出現はほぼ暗期に限られることから、接合子の検出はもしそれが存在するとすれば比較的容易であると考えられる。

以上述べたように、*G. nagasakiense* は明瞭なS期を有し真核生物に典型的な細胞周期にしたがって増殖していることが明らかとなった。ただし、細胞周期は種々の環境因子によって影響を受けることが考えられることから、今後その方面からの解析が必要となろう。さらに、細胞周期の調節機構を明らかにするためには、細胞周期の各過程で見られる形態的、生化学的变化を調べるのみならず、遺伝子レベルでの研究が今後必要であると考えられる。

第3節 細胞周期に及ぼす温度の影響

細胞周期に関する研究はほ乳類や酵母等について精力的に行われ、多くの知見が得られている (SLATER *et al.* 1977, MITCHISON 1984)。しかし、海産植物プランクトンの細胞周期や、それに及ぼす環境因子の影響は数種について知られているに過ぎない (OLSON and CHISHOLM 1986, OLSON *et al.* 1986, VAULOT *et al.* 1986, NEMOTO *et al.* 1987, VAULOT *et al.* 1987)。したがって、細胞周期を基本とした増殖速度測定法 (CARPENTER and CHANG 1988, CHANG and CARPENTER 1988) を *G. nagasakiense* に応用するためには、細胞周期に及ぼすこれら環境因子の影響をあらかじめ評価しておく必要があると考えられる。

温度は植物プランクトンの増殖生理に影響を及ぼす最も基本的な環境因子である。第IV章で述べたように、*G. nagasakiense* は10~30°Cまでの極めて広い温度範囲で増殖することが明らかとなった。また第V章では温度が細胞分裂時間 T_d に影響し、温度が下降するにつれて T_d が増大することが示された。以上のことから、本節では温度が細胞周期に及ぼす影響を検討するため、種々の温度条件下における *G. nagasakiense* の細胞周期を調べた。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験には周防灘より分離した *G. nagasakiense* の無菌クローン株 (G303 AX-2) を用いた。培地には改変 SWM-3培地 (CHEN *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987) を用いた。

2. DNA 組成の日周変化

改変 SWM-3培地700 ml を分注した1 liter 三角フラスコ4本に10, 15, 20, 30°Cで前培養しておいた *G. nagasakiense* をそれぞれ接種し、前培養と同じ温度条件下、光強度 $120 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明暗周期は12hL:12hD (明期は06:00~18:00) で培養を行った。培養開始後1~5日ごとに培養の一部を取り出し細胞数の計数を行って増殖段階を把握した。培養が対数増殖期に達したところで ($250\sim 2,000 \text{ cells ml}^{-1}$)、24時間にわたり2時間ごとに培養の一部を取り、等量の1% グルタルアルデヒド海水溶液で固定した。固定試料は第1節に示した方法で染色し、顕微蛍光測光法によって核DNA量を測定した。さらに試料採取と同時に生細胞について第2節と同様に Coulter Multisizer による細胞粒径組成の測定を行った。また固定試料について第V章第1節にしたがって分裂指数を求めた。

各温度で得られたDNAヒストグラムを以下の方法にしたがって細胞周期の各段階(G₁, S,

G₂+M)に分解した。まず、S期の細胞が見られない時間帯のDNAヒストグラムからG₁及びG₂+M期の細胞のモード及びピーク幅を求めた。そしてG₁のモードにそのピーク幅の2分の1を加えた蛍光値以下の細胞をG₁期に属する細胞、またG₂+Mのモードからそのピーク幅の2分の1を差し引いた値より大きい蛍光値のものをG₂+M期の細胞とした。そして、ある時刻におけるヒストグラムの総細胞数からG₁及びG₂+Mに属する細胞数を引いた残りをS期の細胞とした。ただしS期の細胞が終日見られた実験区(15°C以下)では30°Cで得られた蛍光値の境界値に基づいてヒストグラムを分解した。このようにして得られたi時刻におけるG₁期、S期及びG₂+M期に属する細胞の割合をP_i(G₁)、P_i(S)、P_i(G₂+M)とする。ここでP_i(G₁) + P_i(S) + P_i(G₂+M) = 1である。この値からCARPENTER and CHANG (1988)にしたがってG₁期、S期、及びG₂+M期に要する時間T(G₁)、T(S)、T(G₂+M)を温度ごとに計算した。μを平均増殖速度(divisions day⁻¹)、nを24時間中の試料採取回数とすると次式が成り立つ；

$$T(S) + T(G_2+M) = \frac{1}{n \cdot \mu} \sum_{i=1}^n \ln [1 + P_i(S) + P_i(G_2+M)]$$

ここでα、βを以下のように定義すると、

$$\alpha = [T(S) + T(G_2+M)]/2$$

$$\beta = \frac{\sum_{i=1}^n \ln [1 + P_i(S) + P_i(G_2+M)]}{\sum_{i=1}^n \ln [1 + P_i(G_2+M)]} - 1$$

求めるT(S)、T(G₂+M)は次式で与えられる；

$$T(S) = 2\alpha\beta / (\beta + 1)$$

$$T(G_2+M) = 2\alpha / (\beta + 1)$$

また、

$$T(G_1) = GT - [T(G_2+M) + T(S)]$$

ここでGTは世代時間(day)を示す。

結 果

各温度条件下における核DNA分布の経時変化をFig. 6-9に示す。30°Cでは前節に示した25°Cの場合と同様に明瞭な日周パターンが見られた。すなわち、実験開始時にはほとんどの細胞は1CのDNAを有していたが、時間の経過と共に1Cと2Cの間量を示す細胞が増加し、22:00にはほぼすべての細胞が2CのDNAとなった。その後再び1CのDNAを有する細胞が増加し始め、06:00にはほぼすべてが1Cとなった。このようなDNA分布の変化は20°Cでも同様に見ら

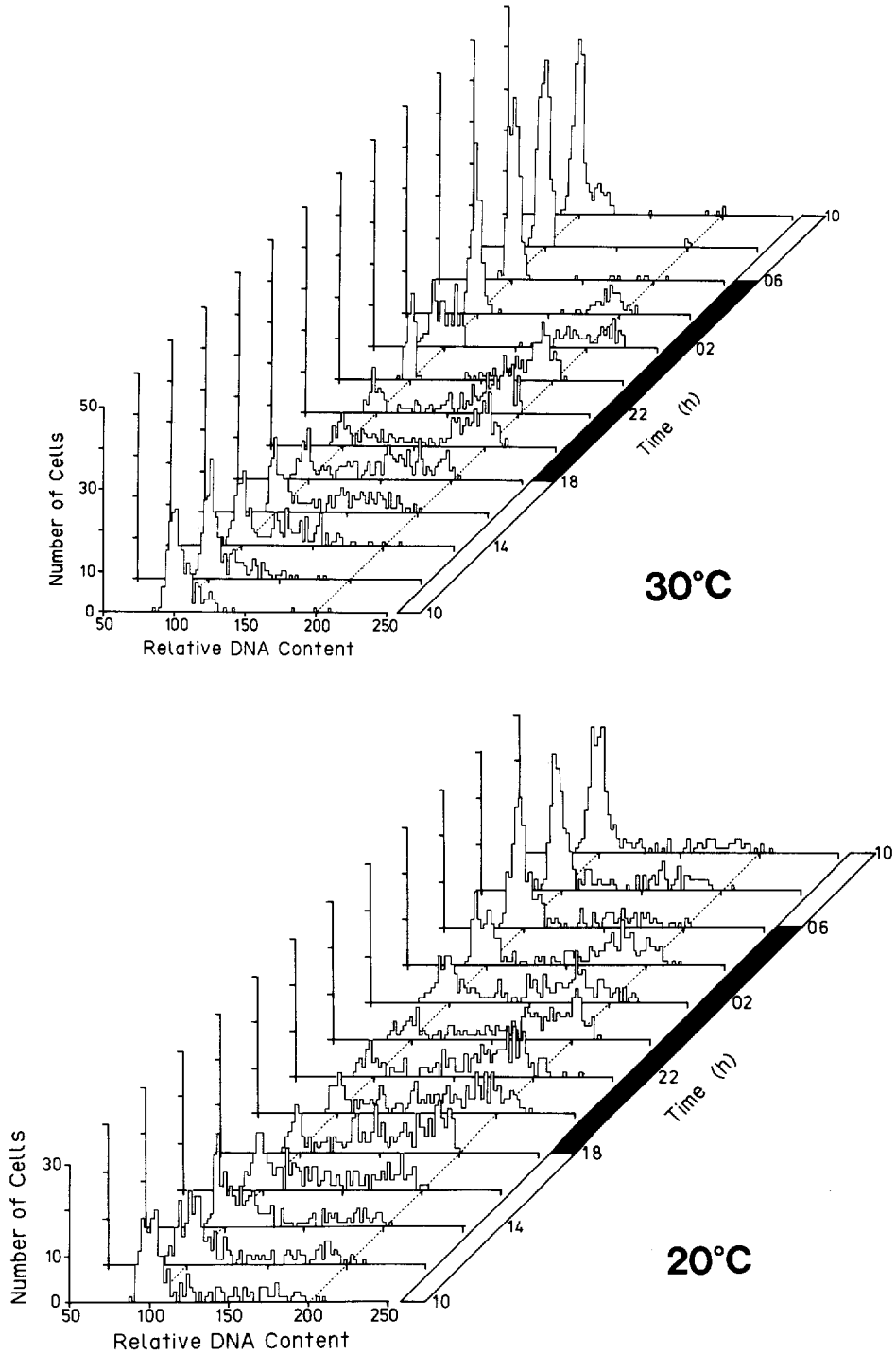


Fig.6-9. Diel changes in nuclear DNA contents in an exponentially growing culture of *G. nagasakiense* at various temperatures. Upper panel:30°C, Lower panel:20°C. Histograms are normalized with the mode of G₁ peak at 08:00 as 100. Dark bars represent the dark period.

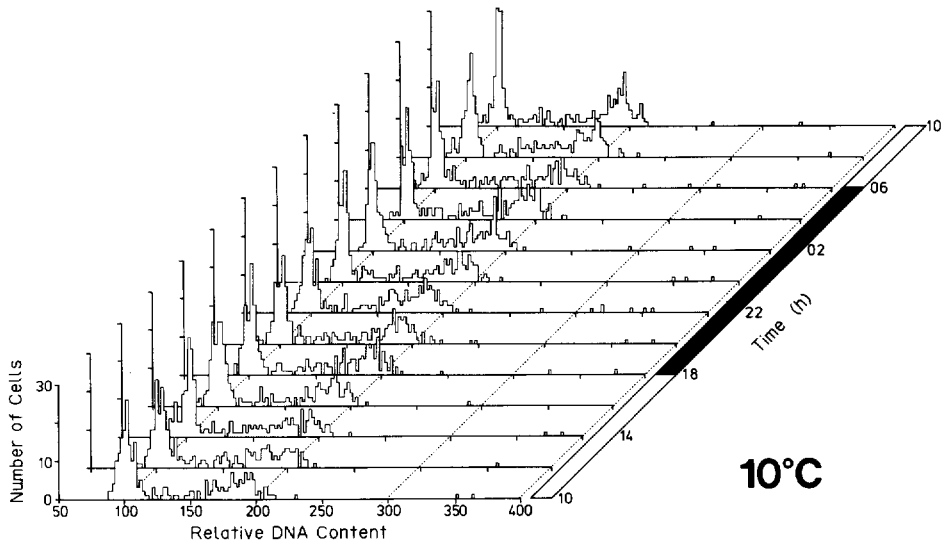
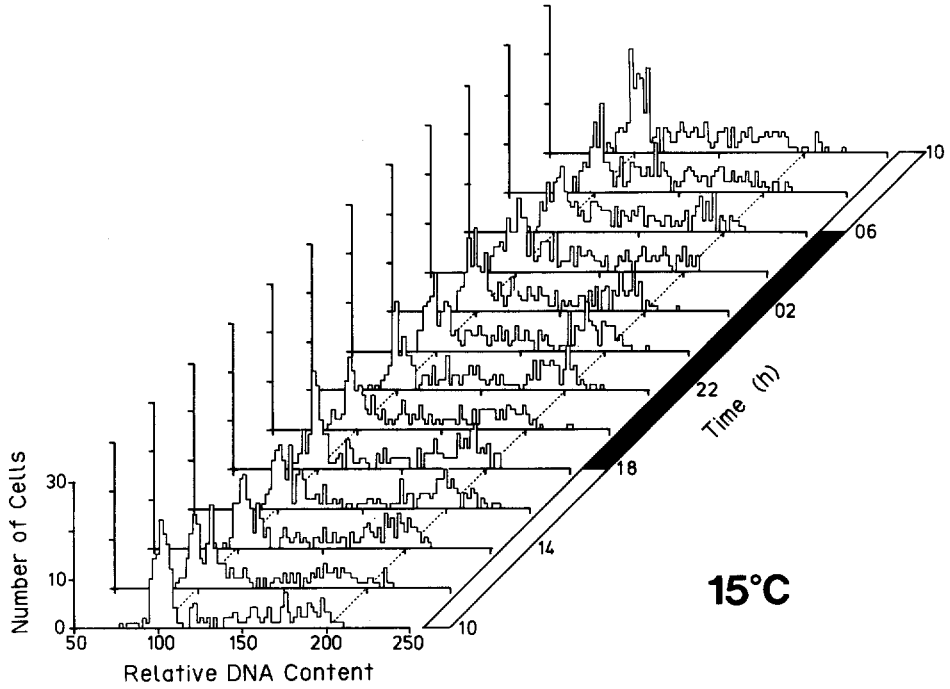


Fig.6-9. (Continued). Upper panel:15°C, Lower panel:10°C.

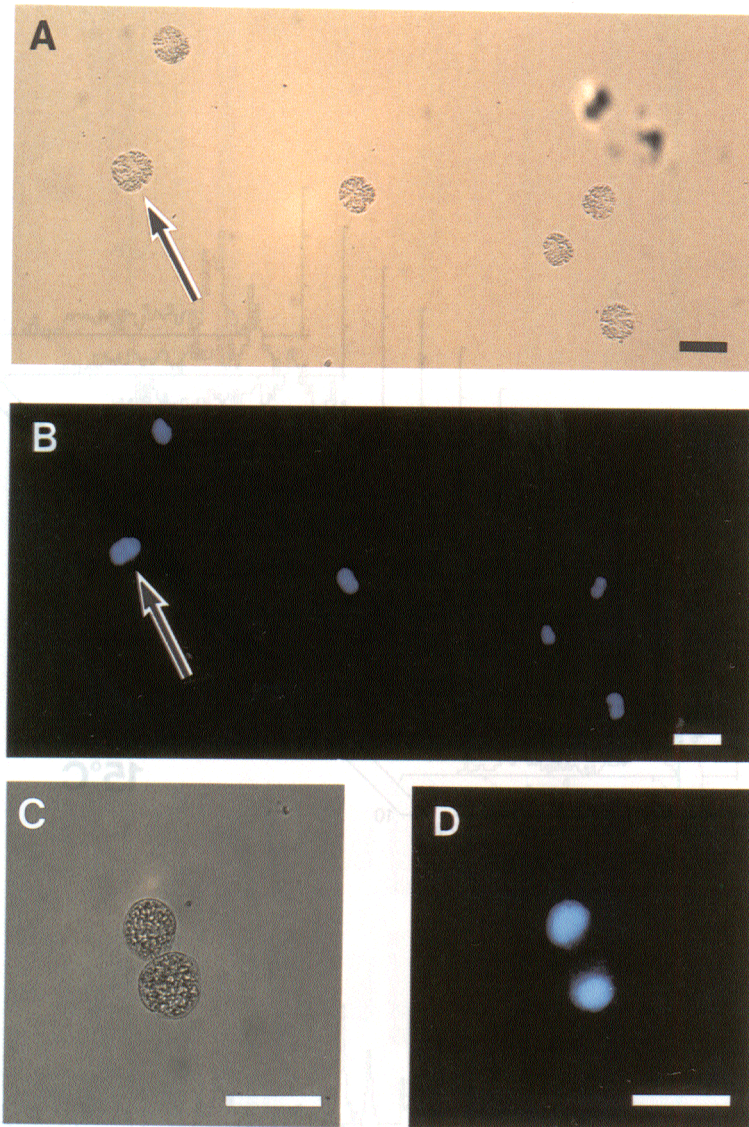


Fig.6-10. Light (A, C) and epifluorescence (B, D) micrographs of *G. nagasakiense* cultured at 10 °C. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars=50 μm.

- A. Vegetative cells. Cell with 4C DNA is indicated with arrowhead.
 B. The same cells as in A. Nucleus with 4C DNA is indicated with arrowhead.
 C. Dividing cell with 4C DNA.
 D. The same as in C.

れた。しかし、15°CになるとDNA分布の変化は不明瞭になり、終日G₁、S及びG₂+M期の細胞が観察された。さらに10°Cになると、DNA分布にはほとんど経時変化が見られなかった。また、2Cを越え3Cあるいは4CのDNAを有する細胞が暗期を中心に少数ながら観察された。これらの中には分裂途中の形態を示し、4CのDNAを有する細胞も観察された (Fig. 6-10)。

各温度における細胞周期の各段階の割合P (G₁)、P (S) 及びP (G₂+M) の経時変化をFig. 6-11に示す。*G. nagasakiense* の場合、各段階の境界値は相対蛍光強度で114未満がG₁期の細

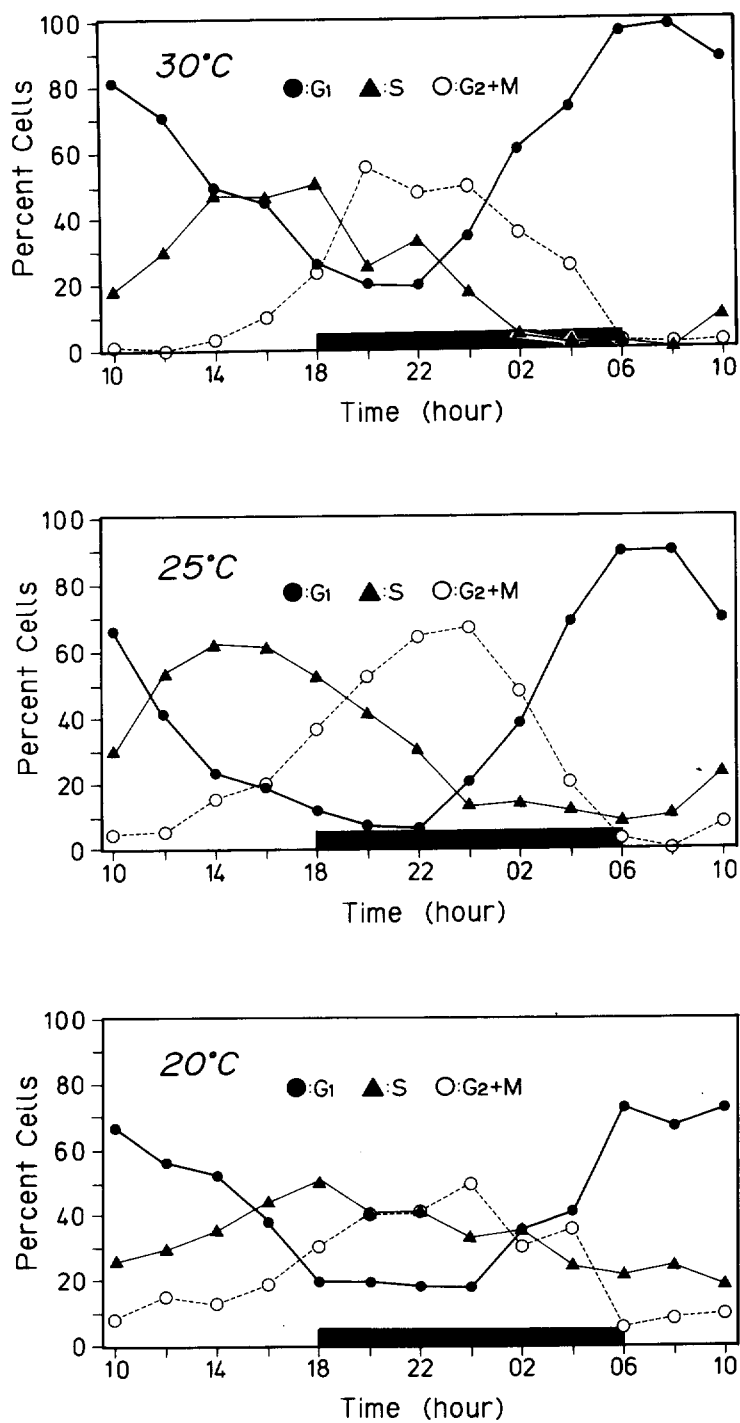


Fig.6-11. Percentages of cell cycle phase (G₁, S, G₂ + M) in *G. nagasakiense* grown at various temperatures. Dark bars represent the dark periods.

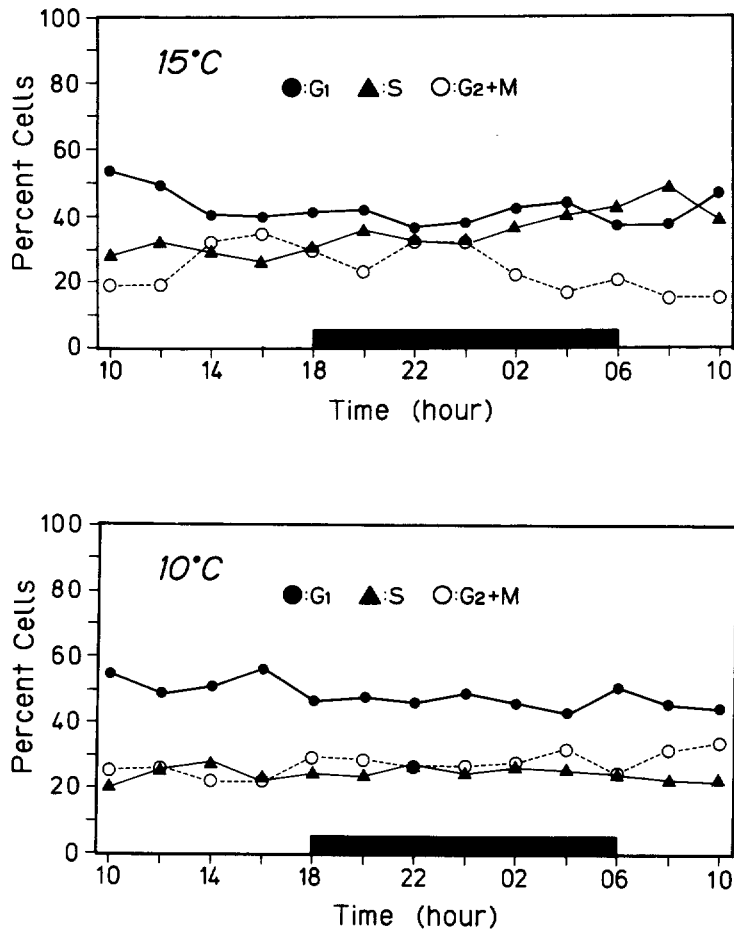


Fig.6-11. (Continued).

胞, 114~178までがS期の細胞, 178以上がG₂+Mに属する細胞と判断された。なお, Fig.6-11のうち25°Cのデータについては, 前節で得られたDNAヒストグラムを分解した結果である。まず30°Cの場合であるが, 細胞周期の各段階(G₁, S, G₂+M)の割合は互いに一定の位相のずれを保ちながら正弦関数的に変化した。すなわち, 10:00には80%の細胞がG₁期に属したが時間の経過とともにその割合が減少し, 22:00に最小となった。それ以後再び増加に転じ, 08:00にはほとんどすべての細胞がG₁期のもので占められた。このP(G₁)の経時変化から*G. nagasakiense*の細胞周期時間はほぼ24時間であることが推察された。S期の細胞は10:00から増加し始め, 18:00付近で最大値を示した後, 02:00から08:00にかけては全く出現しなかった。G₂+M期の細胞はS期のものより6時間程度遅れた16:00から増加し始め, 20:00~00:00付近で最大値を示した後減少し, 06:00には見られなくなった。25°Cの結果は30°Cとほぼ同様であった。20°Cでは各段階の経時変化は勾配がなだらかで最大値も低く推移したが, 基本的には25°C以上の場合と同様のパターンを示した。ただし, G₁期の細胞が暗期でも20%程度見られた。

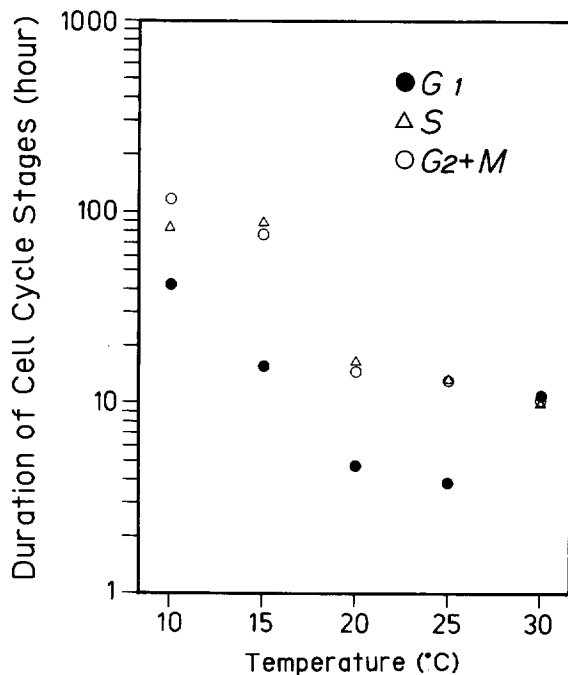


Fig.6-12. Relationship between temperature and duration of the cell cycle phase (G₁, S, G₂+M) in *G. nagasakiense*.

15℃になると各ピークが不明瞭になった。しかし、G₁期の細胞は10:00でその比率が高く22:00で低い、S期の細胞は08:00付近で多く出現し16:00で少ない、さらにG₂+M期の細胞は16:00から00:00にかけて多いが04:00以降減少する、等の変化が認められた。10℃になるとそれぞれの段階の細胞の出現に明瞭な変化は見られなかった。一日を通してG₁期の細胞が約50%を占め、残りの50%をS期とG₂+M期の細胞が同じ割合で存在していた。

温度とG₁期、S期及びG₂+M期に要する時間との関係を Fig. 6-12に、また各温度における増殖速度、世代時間及び細胞周期の各段階に要する時間 (T (G₁), T (S) 及びT (G₂+M)) を計算した結果を Table 6-4にまとめた。G₁期に要する時間は本種の増殖最適水温である25℃よ

Table 6-4. Duration of cell cycle phases of *G. nagasakiense* grown at various temperatures.

Temp. (°C)	Growth rate (div. d ⁻¹)	Generation time (h)	Durations of cell cycle		
			G ₁ (h)	S (h)	G ₂ +M (h)
10	0.10	240.0	40.7	83.7	115.6
15	0.13	181.8	15.6	89.8	76.4
20	0.66	36.3	4.8	16.8	14.7
25	0.78	30.9	3.9	13.6	13.4
30	0.75	31.9	11.0	10.3	10.6

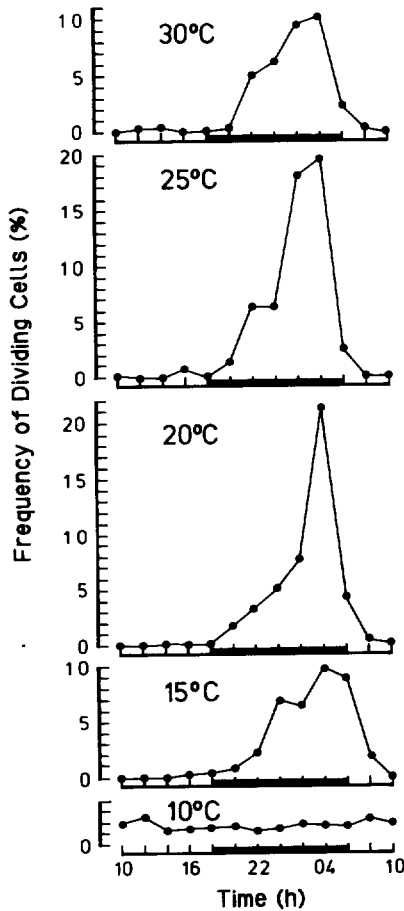


Fig.6-13. Diel changes in frequency of paired cells of *G. nagasakiense* grown at various temperatures.

りも上昇しても、下降しても増加し (Fig. 6-12), 25°Cでは最小3.9 h, 10°Cで最大40.7 hであった (Table 6-4)。一方, S期及びG₂+M期に要する時間は30°Cで最小であり, それより温度が下降するにつれて増加した (Fig. 6-12)。G₁期は10.3~89.8 h, G₂+M期は10.6~115.6 hの範囲にあった (Table 6-4)。

各温度で培養した *G. nagasakiense* の分裂指数の経時変化を Fig. 6-13に示す。細胞分裂は同調的に起こっており, 15°C以上の各温度では04:00に分裂細胞の最大出現が見られた。15~30°Cにおける分裂細胞の最大出現頻度はそれぞれ, 9.8, 21.3, 19.5及び10.3%であった。10°Cでは明瞭な分裂パターンは観察されなかったが, 12:00に最大出現頻度2.5%が得られた。

細胞径から計算した細胞体積の経時変化を Fig. 6-14に示す。15°C以上における細胞体積は18:00に最大値を, 06:00に最小値を持つ正弦曲線状に変化した。細胞体積は $3 \times 10^3 \sim 7 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ の範囲にあった。それに対して10°Cで培養した場合細胞体積には明瞭な日周変化は見られず, また細胞体積も $8 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ と15°C以上の場合に比べ約2倍に大型化していることが判明した。

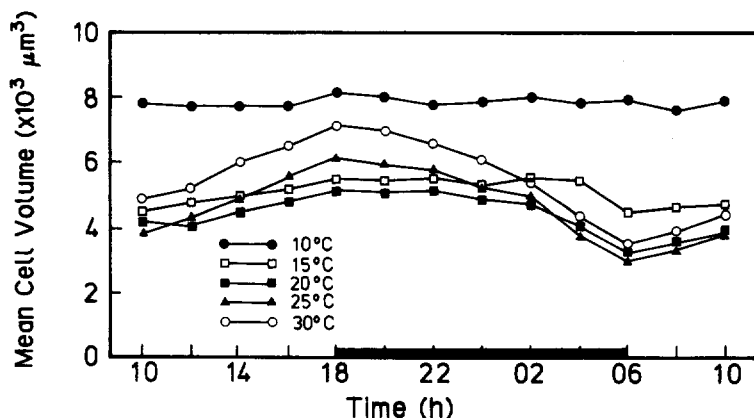


Fig.6-14. Diel changes in cell volume of *G. nagasakiense* grown at various temperatures.

考 察

植物プランクトンの増殖は種々の環境因子によって制御されていることから、増殖の基本となる細胞周期も、それらの因子によって影響を受けることが予想される。海産植物プランクトンの細胞周期に対する環境因子の影響については、数種について報告があるものの (OLSON *et al.* 1986, VAULOT *et al.* 1986, NEMOTO *et al.* 1987, VAULOT *et al.* 1987), 渦鞭毛藻に限っては *Amphidinium carterae* に関する報告があるに過ぎない (OLSON and CHISHOLM 1986)。

OLSON *et al.* (1986) は、円石藻 *Hymenomonas carterae* と珪藻 *Thalassiosira weissflogii* の細胞周期に及ぼす温度、光及び窒素の影響を検討し、温度制限下では両種ともG₁期、S期、G₂+M期のすべての段階で延長が見られるが、窒素制限下ではG₁期のみが延長することを明らかにした。さらに彼らは、光制御下における *H. carterae* ではG₁期のみ延長が見られたのに対して、*T. weissflogii* ではG₁期とG₂+M期の2つの段階で延長が起こったと述べている。また OLSON and CHISHOLM (1986) は、光あるいは窒素制御下で培養した *A. carterae* の場合、G₁期のみが延長したことを報告している。以上のように細胞周期に及ぼす影響は制限要因となっている環境因子で異なり、さらに種によっても異なるようである。

温度は *G. nagasakiense* の細胞周期の全段階 (G₁, S, G₂+M期) に影響を及ぼし、それらに要する時間を延長させることが判明した (Fig. 6-12, Table 6-4)。この結果は OLSON *et al.* (1986) による *T. weissflogii* 及び *H. carterae* に関する報告と一致するものである。したがって、このような細胞周期に及ぼす温度の影響は植物プランクトンに共通するものと言えそうである。

10°Cで培養した *G. nagasakiense* では細胞体積が15°C以上の場合の約2倍に増加し (Fig. 6-14), さらに4CのDNAを有する細胞が観察された (Figs. 6-9と6-10)。このような低温における細胞体積の増加は *Alexandrium tamarense* (WATRAS *et al.* 1982) や *T. weissflogii* 及び *H. carterae* (OLSON *et al.* 1986) でも観察されている。OLSON *et al.* (1986) はこの現象の要

因として、低温が細胞自体の生長よりも分裂速度に影響を及ぼしたためと考えている。これらの種における体積増加は最大40%程度であり、DNA量の増加は不明かあるいは観察されていない。しかし、*G. nagasakiense* の場合はこれらの場合とは異なり、細胞分裂速度の影響とは考えにくい。また、渦鞭毛藻に通常見られる有性生殖過程では栄養細胞と配偶子は単相(1C DNA)であり、配偶子が接合した運動性接合子や休眠接合子が複相(2C DNA)である(PFIESTER and ANDERSON 1987)。したがって、有性生殖過程のみではここで観察された4CのDNA量は説明できないであろう。このような4CのDNA量を説明し得る現象として倍数性(Polyploidy)が考えられる。渦鞭毛藻の倍数性は培養年月が長期にわたると出現することが報告されており(LOPER *et al.* 1980, HOLT and PFIESTER 1982), また渦鞭毛藻の種分化の一つの要因とも考えられている(LOEBLICH *et al.* 1981)。本種の場合、倍数性は低水温で出現していることから、その生活史を明らかにする上でも興味深い知見と言えよう。一般に藻類の倍数性はコルヒチンや紫外線等の人為処理、有性生殖あるいは植え継ぎの繰り返しによって起こるとされている(NICHOLS 1980)。しかし、*G. nagasakiense* については現状のところ倍数性の確証は不十分であり、その成因も含めて今後解明されなければならないであろう。

各温度で得られた増殖速度は最適温度である25℃でも0.78 divisions day⁻¹であり(Table 6-4), 本種の最大増殖速度(1.0 division day⁻¹)より小さかった。これは2時間ごとの試料採取時に細胞の均一化を図るため攪拌を行ったことに起因するものと考えられる。一般に渦鞭毛藻は攪拌に弱く(CHANG and CARPENTER 1988, DIXON and SYRETT 1988), 特に細胞分裂期の細胞はその影響に敏感である(POLLINGER and ZEMEL 1981)。したがって、本種の場合も細胞分裂期(M期)で攪拌による細胞数の減少が起こった可能性が考えられる。その結果、細胞数の増加から求めた増殖速度が過小推定となったのであろう。これらのことから、Table 6-4に示した細胞周期の各時間は、S期及びG₂+M期については過大評価、そしてG₁期については過小評価となっている可能性がある。ただしその誤差は最大20%以内にあると考えられる。

上述のように温度は本種の細胞周期の各段階すべてに影響を及ぼし、低温度ではそれらの期間が延長されることが判明した。したがって、先のFDC法と同様、細胞周期に基づき増殖速度を推定する際にもこのような温度の影響に留意する必要がある。

第4節 現場個体群の細胞周期

これまで培養条件下における*G. nagasakiense*の細胞周期とそれに及ぼす温度の影響を明らかにした。しかし、現場個体群は様々な環境因子の影響下にさらされており、どのような細胞周期で増殖しているかは不明である。そこで本節では現場個体群の細胞周期を明らかにするため、広島湾において現場調査を行い、*G. nagasakiense* 現場個体群のDNA分布の経時変化を調べた。

材料及び方法

現場調査は前章 Fig. 5-8に示す広島湾の定点で1990年9月17~18日に実施した。17日の10:00より24時間にわたり0 m 及び2 m 層よりニスキン採水器によって採水し、その2~3 liter をガラス繊維濾紙(Whatman GF/C, ϕ 150 mm)によって50 ml 程度に濃縮した。濃縮試料は1% グルタルアルデヒド海水溶液と混合して固定後、冷蔵庫中で沈澱法によってさらに10 ml まで濃縮した。濃縮試料について第1節で述べた方法により DAPI 染色を行い、顕微蛍光測光によって DNA 量を測定した。

結果及び考察

現場調査期間の日没は18:15、日の出は05:54であり、したがって明暗周期はほぼ12hL:12hD であった。また水温は表層及び2 m 層の平均で $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、天候は曇り時々雨であった。

広島湾における *G. nagasakiense* 現場個体群の核 DNA ヒストグラムの経時変化を Fig. 6-15に示す。表層(0 m)及び2 m 層における DNA 分布は顕著な日周性を示した。すなわち、9月17日の10:00にはほとんどの細胞は1CのDNAを有していたが、時間が経過するにつれて1Cと2Cの中間量のDNAを有する細胞が増加し、22:00にはかなりの細胞のDNAは2Cとなった。それ以降再び1Cの細胞が増加し始め、9月18日の06:00にはほぼ全部の細胞のDNAは1Cとなった。その後10:00になると、再び1Cを越えるDNAを有する細胞が見られ始めた。以上の結果から、*G. nagasakiense* の現場個体群は明瞭なDNA合成期(S期)を有していることが示された。

以上のDNAヒストグラムから、前節に基づき細胞周期の各段階の割合P(G₁)、P(S)及びP(G₂+M)を求めた(Fig. 6-16)。その結果、細胞周期の各段階は互いに一定の位相のずれを保ちながら、ほぼ正弦関数的に変化することが判明した。この結果は前節の室内実験の20~30°Cで得られた結果と基本的に一致していた。

広島湾における調査においても4CのDNAを有する細胞が非常に少ないながら認められた(Fig. 6-17)。これらは通常の細胞に比べて細胞自体及び核が大型であること以外、外部形態上の特徴は見られなかった。現場海域においても倍数体細胞が存在することが確認されたことから、前節で述べた培養条件下における倍数性の出現は人為的な影響によるものではないことが明らかとなった。ただし、現場では25°Cにおいて検出されており、培養条件下とは異なっていた。培養条件下における4CのDNAを有する細胞の出現は暗期に多い傾向が見られ、また2Cと4Cの中間量のDNAを有する細胞や分裂途中の細胞も観察された(Fig. 6-10)。このような4C細胞の成因については2つの可能性が考えられる。第一の可能性は、通常の細胞周期で増殖していた細胞が何らかの原因で倍数化し、2倍体を単相の配偶体とした別の単相世代型的生活環が存在する場合である。第二の可能性は、有性生殖によって接合が起こり2Cの接合子が生じる。この接合子がシストとならずに減数分裂を行ない、その過程で4C細胞(planomeiocyte)が生じる可能性である。このような2倍体を基本とした生活環のサブサイクルや有性生殖過程は本種ではこれまで知られておらず、その検証については将来の課題と言えよう。

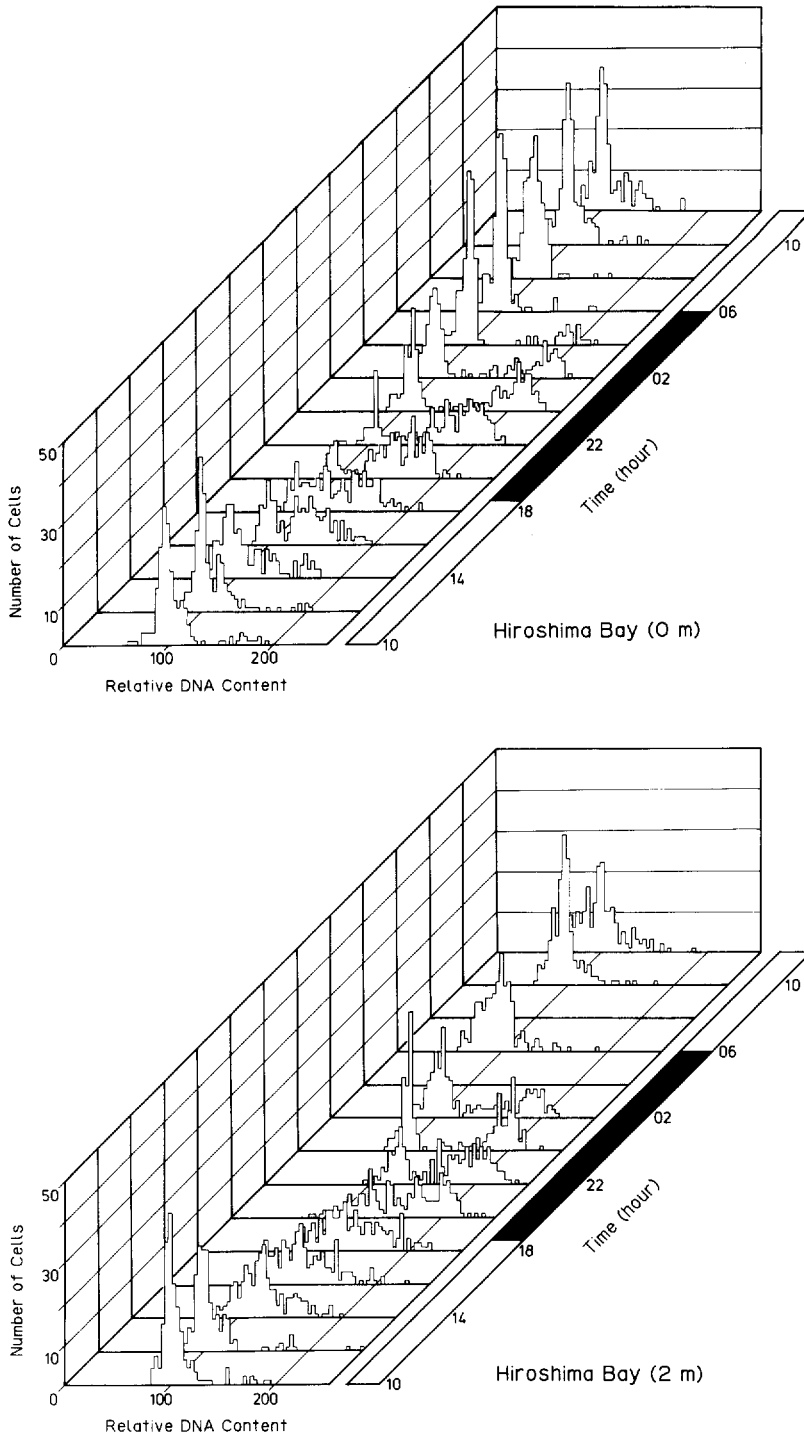


Fig.6-15. Diel changes in nuclear DNA contents in the natural population of *G. nagasakiense* in Hiroshima Bay in September 1990. Histograms are normalized with the mode of G₁ peak at 10:00 as 100. Dark bar represents the night period.

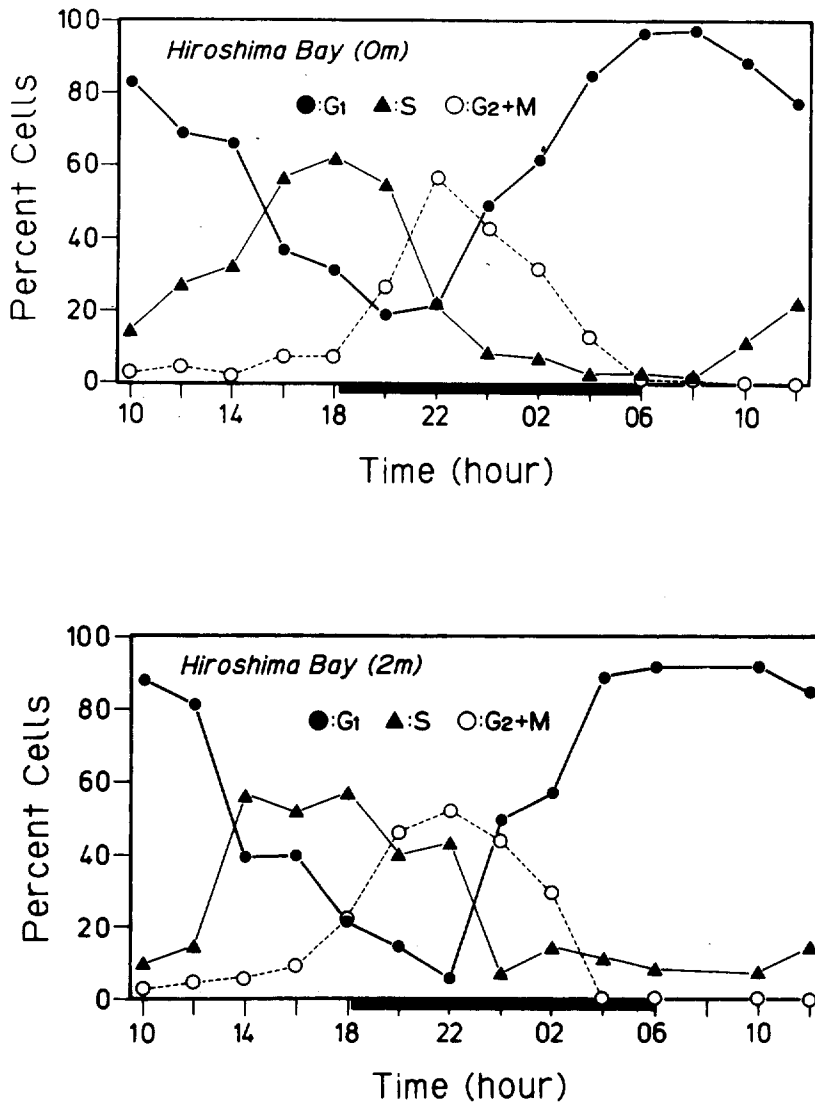


Fig.6-16. Percentages of cell cycle phase (G₁, S, G₂ + M) in natural populations of *G. nagasakiense* in Hiroshima Bay. Dark bars represent the night periods.

以上のように *G. nagasakiense* の現場個体群も培養条件下と基本的に同様の細胞周期で増殖していることが確認された。渦鞭毛藻の現場個体群における細胞周期が明らかにされた例は他に見当たらず、本種が恐らく初めての報告であろう。以上の結果は細胞周期解析による増殖速度測定法が本種にも適用可能であることを示しており、より精度の高い増殖速度を得るためにはこの手法の導入および現場での検証が今後の課題となろう。

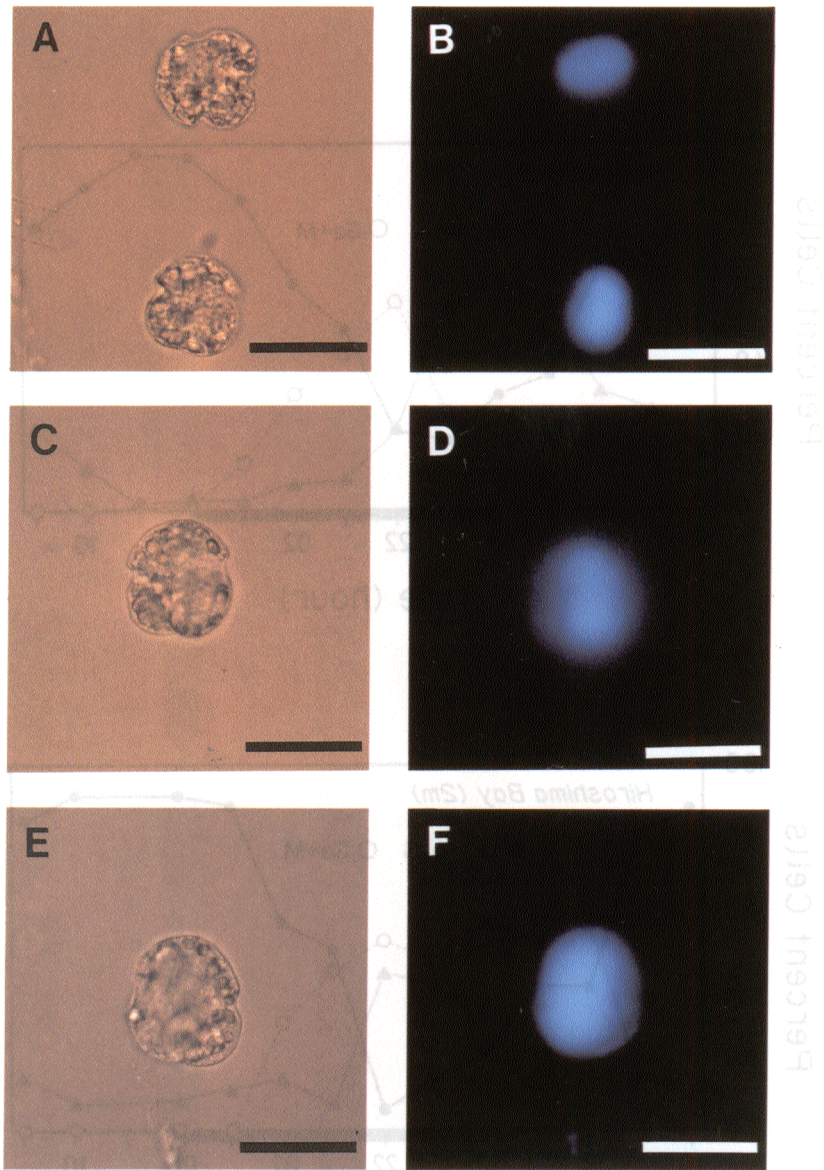


Fig.6-17. Light (A, C, E) and epifluorescence (B, D, F) micrographs of natural cells of *G. nagasakiense* from Hiroshima Bay. Scale bars=30 μ m.

A, B: Vegetative cells with 1C DNA.

C, D: Vegetative cell with 2C DNA.

E, F: Vegetative cell with 4C DNA.

第Ⅶ章 総 括

海産渦鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* は、わが国における赤潮原因生物のうち甚大な漁業被害をもたらす有害種として知られている。本種は1965年夏に長崎県大村湾で大規模な赤潮を形成して以来、西日本の沿岸域を中心に赤潮を引き起こし漁業被害を及ぼし続けている。近年では、1984年の熊野灘及び1985年の周防灘における赤潮が顕著で、漁業被害はそれぞれ43億円及び10億円に上る。また九州沿岸域でも深刻な被害が報告されている。このように *G. nagasakiense* は *Chattonella* について有害な赤潮生物と言える。そのため、本種による赤潮の発生機構及びそれに対する対策が切に望まれてきた。しかし *Chattonella* などに比べて培養が容易でないことなどから、無菌株を用いた系統的な生理・生態学的研究は少なく、解明されていない部分が多く残されていた。

これまで赤潮による漁業被害を防止するため、種々の対策が試みられてきた。しかし、一旦赤潮が発生した後の対策法として実用化されているものは皆無に等しい。その原因としては、赤潮の発生を事前に予知する技術及び赤潮被害を最小限に抑える技術の開発が遅れていることが挙げられる。したがって、より正確な赤潮予知手法の開発が必要であり、そのためにはまず赤潮の発生機構を明らかにすることが前提となる。

以上のような背景から、本研究では *G. nagasakiense* 赤潮の発生機構の解明と赤潮予知のための生物学的情報の強化を図ることを主目的とした。まず、現場調査によって赤潮発生に係わる環境因子の抽出を行うとともに、室内実験によって本種の物理・化学的環境要因に対する増殖生理特性を定量的に明らかにした。また、赤潮予知指標の一つとして増殖速度に着目し、現場におけるその推定法を検討した。さらに本種の細胞周期を明らかにすることによって、増殖速度推定法の基礎を固めるとともに、精度の向上に役立てることを目標とした。本研究によって得られた成果の概要を以下に要約する。

1. 1985年から1987年の夏季（6月～8月）に周防灘全域を対象とした現場調査を実施し、*G. nagasakiense* の遊泳細胞の出現と分布及び赤潮発生時における環境要因を調べた。この3年間のうち、1985年は灘全域にわたる大規模赤潮発生年、1986年は一部局所的な小規模赤潮発生年、また1987年は非発生年であった。これら3年間の海況を比較した結果、周防灘における *G. nagasakiense* の大規模赤潮を引き起こす環境要因として、多量の降雨による表層水の著しい低塩分化、密度成層の発達による鉛直安定度の増大及び底層の貧酸素化の程度と規模が重要であることが示された。

2. 現場海域における *G. nagasakiense* の季節的消長を把握するため、1989年4月から1990年4月の1年間にわたり、ほぼ1週間毎（秋季から冬季は2週間毎）に高知県浦ノ内湾における栄養細胞の出現密度を調べた。浦ノ内湾における年間の水温は12℃～29℃の範囲で推移した。栄養細胞が検出できなかったのは1989年9月の2回の調査のみであり、したがって同湾で

は *G. nagasakiense* が周年にわたって存在することが示された。高い細胞密度 ($>10^2$ cells ml^{-1}) が観察されたのは、夏季 (7~8月)、冬季 (12月中旬~1月) 及び春季 (4月) の3回であった。また *G. nagasakiense* の出現と珪藻類の出現との間には逆相関が認められた。鉛直分布の中心は2~5mの中層域に見られた。

3. 培養実験によって *G. nagasakiense* の増殖速度に及ぼす光強度の影響を調べた。本種は $10 \mu Em^{-2}s^{-1}$ の弱光下でも増殖が可能であり、増殖速度は $110 \mu Em^{-2}s^{-1}$ で飽和した。また $190 \mu Em^{-2}s^{-1}$ まで強光阻害は見られなかった。これらの結果から、本種は弱光下の増殖に有利であり、このような光に対する増殖特性を備えることによって、本種は中層域や低日射量下でもその個体群の増大を可能にしているものと考えられた。

4. *G. nagasakiense* の増殖速度に及ぼす水温と塩分の影響を調べるため、それら2要因(水温: 10, 15, 20, 25, 30°C, 塩分: 10, 15, 20, 25, 30%) のすべての組合せ条件下で培養実験を行った。本種は温度10~30°C, 塩分15~30%の範囲で増殖可能であったが、増殖可能塩分範囲は温度によって異なった。最大増殖速度を与える水温と塩分の組合せは25°C, 25%であり、 1.06 divisions day^{-1} の増殖速度が得られた。分散分析の結果、水温及び塩分それぞれの主効果とそれらの交互作用が有意であった。したがって、これら2要因が相互に関連しながら増殖速度に影響を及ぼしていることが明らかになった。以上の結果から、本種は広温・広塩分性であると判断された。さらに瀬戸内海の年間最低水温に近い10°Cでも十分増殖可能であることから、本種は栄養細胞で越冬し、それが翌年の赤潮のシードポピュレーションとなるものと考えられた。

5. 周防灘では *G. nagasakiense* が卓越する年と *Chattonella* が卓越する年があることが現場調査によって明らかになった。そこで、両者の水温、塩分及び光に対する増殖生理を比較するため、*C. antiqua* と *C. marina* についても培養実験を行った。その結果、*Chattonella* は *G. nagasakiense* に比べて増殖に強い光を要求することが判明した。したがって、現場における卓越種の交替に日射量が大きく影響している可能性が示唆された。一方、水温と塩分に対する増殖応答でも、*Chattonella* は10°Cでは全く増殖できないこと、さらにその増殖速度には水温が非常に大きく影響する点で *G. nagasakiense* とは異なった。このような *Chattonella* と *G. nagasakiense* の温度応答の違いから、両者の生活様式の差異が示唆された。すなわち、*Chattonella* は栄養細胞では越冬できないためシストという越冬手段を必要とするが、*G. nagasakiense* は幅広い温度耐性を有するため栄養細胞で越冬でき、そのためシストのような越冬手段は必要としないと考えられる。本種は周年にわたり栄養細胞で存在することによって、休眠や発芽等の段階を必要とせず、さらに好適条件下では直ちに増殖できるといった生存戦略を有するものと思われる。

6. 浦ノ内湾の調査から *G. nagasakiense* と珪藻類の間には何等かの競合関係が存在することが示唆された。そのため4種の珪藻類 (*Chaetoceros didymum*, *Ditylum brightwellii*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* sp.) について水温と塩分に対する増殖応答を培養実験により調べた。その結果、30°Cでも増殖が見られたのは *D. brightwellii* のみであり、しかも増殖

速度は極めて小さかった。したがって、珪藻類は高温かつ低塩分の下では増殖しにくいことが判明した。最大増殖速度を与える水温と塩分の組み合わせは4種でほぼ等しく、25℃と30‰であり、増殖速度は2～3 divisions day⁻¹の範囲にあった。ただし25℃では増殖可能な塩分範囲が狭いことから、増殖速度は大きいものの生理的には好適な温度ではないものと考えられる。以上のことから、夏季の現場海域における水温・塩分条件は珪藻類よりも *G. nagasakiense* の増殖に好適であると言える。一方、冬季の水温環境は珪藻類に有利であり、*G. nagasakiense* が優占するためには珪藻類との競合からの解放が必要であると考えられた。

7. *G. nagasakiense* の無菌株を用いて窒素及びリンの利用能を把握した。本種は窒素源として硝酸態、アンモニア態窒素及び尿素のすべてを利用した。硝酸及びアンモニアでは250 μMまで最大取量の低下は見られなかったが、尿素では6.4 μM以上で飽和した。リン源としては無機リン、グリセロリン酸ともに良く利用された。これらの結果から、*G. nagasakiense* は広い濃度範囲にわたって栄養塩を利用でき、さらに有機態の窒素・リンも利用可能であることが判明した。このことは本種が外洋域から内湾域にわたる幅広い栄養環境の下で赤潮を形成し得ることを示している。一方、珪藻類(前述の4種)はすべて尿素を利用できず、さらに *S. costatum* ではグリセロリン酸の利用能が低かった。したがって、有機態窒素・リンの利用能から見ると、*G. nagasakiense* は代表的珪藻類及びラフィド藻(*Heterosigma akashiwo* 及び *C. antiqua*) よりも生態的に優位にあると考えられる。

8. *G. nagasakiense* の細胞内窒素及びリン含量はそれぞれ3.7～4.0 pmol cell⁻¹と0.23～0.35 pmol cell⁻¹で、*C. antiqua* と *H. akashiwo* で報告されている値の中間値であった。この細胞内窒素・リン含量と現場海域における栄養塩濃度から海水の持つ潜在的な細胞増殖密度を計算すると、周防灘では200～4,700 cells ml⁻¹、浦ノ内湾では100～8,300 cells ml⁻¹に達することが判った。このことは、通常の現場海水の栄養塩レベルでも本種は赤潮状態にまで増殖できることを示している。

9. 窒素あるいはリン制限下における *G. nagasakiense* の増殖の動力学を培養実験によって検討した。その結果、増殖速度と窒素あるいはリン濃度との関係は Monod の式に従うことが判明した。増殖の半飽和定数(最大増殖速度の1/2を与える栄養塩濃度)は窒素で0.58～0.78 μM、リンで0.14～0.15 μMであった。この値はこれまで渦鞭毛藻で報告されている中で最も小さい値であり、本種は低濃度の栄養条件でも十分増殖できる特性を備えた生物であると言える。

10. 現場海域における *G. nagasakiense* の増殖速度を測定するため、細胞分裂指数を用いた推定法を検討した。培養条件下における本種の細胞分裂は、明暗周期の下では暗期の終わり頃に同調的に起こった。この分裂盛期の時刻は光強度や温度によっては影響されないことから、本種の細胞分裂は概日リズム(circadian rhythm)に支配されているものと考えられた。

分裂指数法による増殖速度推定法に必要なパラメータである細胞分裂時間(T_d)は、増殖速度を光強度によって制御した場合には一定であったが、それを温度で制御すると変化した。しかし、温度と分裂時間の間に対数直線関係が得られたことから、その関係式を用いることにより任意の現場水温における分裂時間を推定することが可能であった。培養条件下では、分裂指

数法と細胞数の増加から計算した増殖速度の間には高い相関関係 ($r=0.94$) が得られた。したがって、分裂指数法により増殖速度を推定し得ることが判明した。

11. 現場海域における *G. nagasakiense* の細胞分裂の同調性を調べるため、1987年8月に周防灘、また1989年9月及び1990年9月には広島湾でそれぞれ調査を行った。その結果、いずれの海域においても本種は同調的細胞分裂を行っていることが判明した。分裂指数法によって求めた増殖速度は、周防灘で0.12と0.14 divisions day⁻¹、広島湾では0.27~0.52 divisions day⁻¹であり、本種の最大増殖速度である1.0 division day⁻¹に比べて低かった。両海域とも *G. nagasakiense* の分布密度は低く、赤潮発生には至らなかった。その原因の一つにはこのような低い増殖速度が影響していたものと考えられた。

12. *G. nagasakiense* の細胞周期を明らかにするため、まず顕微蛍光測光と DAPI 染色の組合せによる核 DNA 量の測定法を確立した。この方法を用いて、25°C、12hL:12hDの明暗周期で培養した *G. nagasakiense* の核 DNA 量、細胞の粒径組成及び分裂指数を経時的に調べた。その結果、DNA 量で1Cと2Cの中間量を持つ細胞の割合が特定の時間帯に高くなることが判明した。さらにその前後には明瞭な間期 (G₁及びG₂期) が認められた。このことから本種は明瞭な DNA 合成期 (S期) を有し、他の真核生物と同様の細胞周期に基づいて増殖することが明らかとなった。

13. 温度が細胞周期に及ぼす影響を調べるため、10~30°Cの5段階の温度条件で培養実験を行った。20°C以上ではG₁期の細胞の割合は正弦関数的に変化した。そのピークの間隔から *G. nagasakiense* はほぼ24時間の細胞周期で増殖していることが判った。しかし温度が低下するにつれて細胞周期の各段階 (G₁期、S期、G₂+M期) に属する細胞の出現ピークが不明瞭になり、10°Cでは24時間にわたってほぼ一定となった。これらの結果に基づき細胞周期の各段階に要する時間を計算した。その結果、温度は細胞周期のすべての段階に影響を及ぼし、低温になるにつれてそれらに要する時間を増加させることが判った。また10°Cでは15°C以上の場合に比べ細胞の大きさが増大すること、さらに通常の4倍量のDNAを有する細胞が出現することが確認された。この結果は低温による倍数化が起こっている可能性を示している。

14. 1990年9月に広島湾で調査を行い、現場個体群における細胞周期を調べた。その結果、*G. nagasakiense* 個体群は培養条件下と同様の細胞周期によって増殖していることが判明した。したがって、分裂指数法による増殖速度測定の際に、細胞周期の各段階 (S期、G₂+M期) も細胞分裂の指標として利用することが可能となり、測定精度の向上及び調査回数の削減など実用面での改善が期待できた。

15. 本種の分類は形態のみに依存していたため分類学的に不確定な部分があり、混乱している現状から、形態分類を補強するための客観的な分類規準として本種の染色体数を調べた。用いた *G. nagasakiense* は周防灘、広島湾、浦ノ内湾及び五ヶ所湾から得られた4株であった。本種の染色体は幅1.5~2 µm、長さ10~20 µmのヒモ状を呈した。4株における染色体計数値には統計的に有為な差は見られず、全計数値に基づく平均±標準偏差は113±5 (n=105) であった。このように安定した計数値が得られたことから、染色体数は本種の分類基準として有効で

あると考えられた。

本研究の結果、物理・化学的要因に対する *G. nagasakiense* の増殖生理が明らかになった。本種は種々の環境要因（光、温度、塩分及び栄養塩）に対して極めて広い増殖可能範囲を有する生物であることが判明した。ところで、赤潮の発生過程には大きく分けて3つの段階があると考えられている（STEIDINGER 1975）。第1の段階は初期個体群の増加、第2段階は適度な環境下での増殖、第3段階は赤潮状態の持続と集積である。そしてそれらの各段階に関与する種々の生物、物理及び化学的要因と赤潮発生過程との関係が種々想定されている（飯塚 1972, 岩崎 1973, 吉田 1980, 西島 1985, 木村 1989, 今井 1990）。ここではこれらの報告を参照し、さらに本研究によって得られた生物学的諸特性に基づき、*G. nagasakiense* 赤潮の発生に至る諸過程とそこに関与すると考えられる要因を Fig. 7-1に整理した。まず、赤潮のシードポピュレーションとしては越冬した栄養細胞が考えられる。これらの栄養細胞は水温上昇に伴って徐々に細胞密度を増してゆく。そして降雨による塩分低下や栄養塩の補給、日照不足による競合種の脱落、梅雨後の水温及び日射量の増大、鉛直安定度の増加、捕食圧の低下のもとでは最大増殖速度 ($1.0 \text{ division day}^{-1}$) に近い増殖速度で飛躍的に個体群密度を増大させ、さらには物理的な集積等も加わって赤潮形成に至るのであろう。赤潮衰退後は低温度耐性によって栄養細胞のまま存在し、珪藻類の衰退時にはわずかではあるが細胞密度を増加させながら越冬し、再び初夏の増殖へと向かうものと考えられる。

以上のような *G. nagasakiense* 赤潮の発生過程を考える時、その予知にはどのような方策が考えられるであろうか。まず中・長期的な方法としては、生態モデルを構築しシミュレーションを行うことが挙げられよう。そのためには本研究で得られた本種の増殖速度と種々の環境因子との数量的関係が利用できる。また短期的な予知手法としては、定期的な調査によって細胞密度を把握し、さらにここで確立した細胞分裂指数法によって現場個体群の増殖速度を監視することが考えられる。*G. nagasakiense* 赤潮は依然として西日本各地で猛威を振るっており、それに対する有効な対策が無い現状では、その発生を事前に予知し漁業被害を最小限に食い止めることが最も重要である。本研究で得られた知見も、今後現場での検証を経て、赤潮発生機構の解明及び予知手法の開発のための基礎資料となるものと期待される。

摘 要

海産渦鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* は1965年以降、西日本各地で赤潮を頻発し、しばしば数十億円に上る漁業被害を及ぼす有害種として知られている。そのため、本種による赤潮の発生機構及びそれに対する対策が切に望まれてきた。しかし、無菌株を用いた系統的な生理生態学的研究は少なく、未解明の部分が数多く残されていた。本論文は *G. nagasakiense* 赤潮の発生機構の解明と赤潮予知のため、現場海域における赤潮発生要因の抽出、種々環境因子に対する増殖特性の解明、現場における増殖速度の測定法の開発及びその基礎の確立等、生物学的情報を取りまとめたもので、その主な内容は次の通りである。

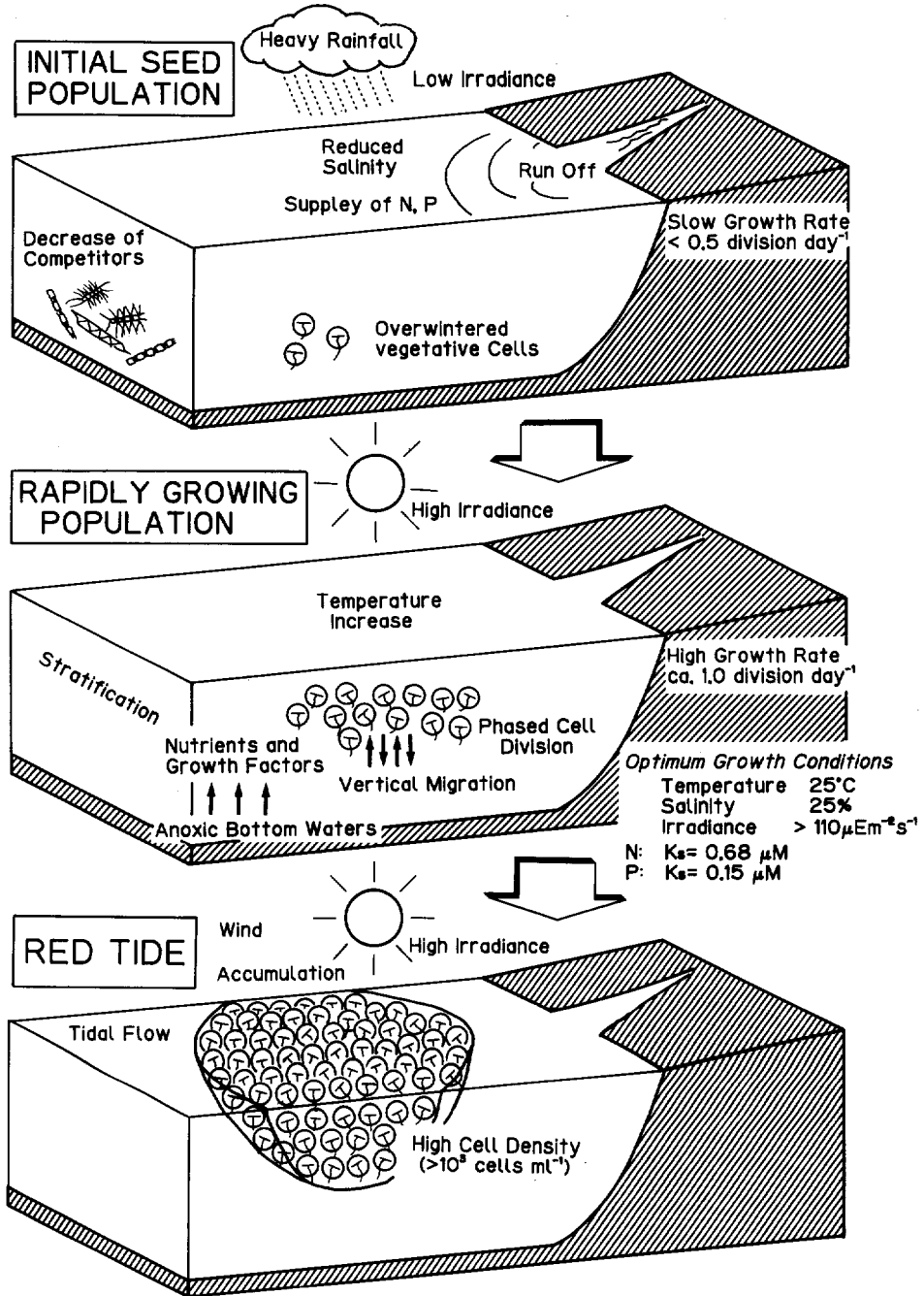


Fig.7-1. A schematic representation of biological phase of *G. nagasakiense* red tide and the factors affecting red tide development.

周防灘全域を対象とした現場調査により *G. nagasakiense* の遊泳細胞の出現と分布及び赤潮発生期における環境要因を調べた。大規模赤潮を引き起こす海況要因として、多量の降雨による表層水の著しい低塩分化、密度成層の発達による鉛直安定度の増大及び底層の貧酸素化の程度と規模が重要であることを明らかにした。また、高知県浦ノ内湾における本種の季節的助長を詳細に調査し、本種が周年にわたって栄養細胞で存在することを明らかにした。

培養実験によって *G. nagasakiense* の増殖に及ぼす光強度、水温、塩分及び栄養塩の影響を調べた。本種は $10 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ の弱光下でも十分増殖可能であることが判明した。このような光に対する増殖特性を備えることによ

って、本種は中層域や低日射量下でも他種に優先してその個体群の増大をはかることができると考えられた。

本種は水温 $10\sim 30^\circ\text{C}$ 、塩分 $15\sim 30\%$ の範囲で増殖可能であり、最大増殖速度は 25°C 、 25% で $1.06 \text{ divisions day}^{-1}$ であることが判明した。したがって、本種は広温・広塩分性種であること、さらに瀬戸内海の冬季水温に近い 10°C でも十分増殖可能であるため栄養細胞で越冬でき、それが翌年の赤潮の初期個体群として重要であると考えられた。

本種は窒素源として硝酸態、アンモニア態窒素及び尿素のすべてを、またリン源としては無機リン、グリセロリン酸を低濃度から高濃度にわたり利用できることが判明した。このような有機態窒素・リンの利用能を他種と比較した結果、*G. nagasakiense* は珪藻類及びラフィド藻よりも生態的に優位であることが判明した。

本種の細胞内窒素及びリン含量はそれぞれ $3.7\sim 4.0 \text{ pmol cell}^{-1}$ と $0.23\sim 0.35 \text{ pmol cell}^{-1}$ であった。この細胞内窒素・リン含量と現場海域における栄養塩濃度から海水の持つ潜在的な細胞増殖密度を計算すると $100\sim 8,300 \text{ cells mL}^{-1}$ に達することが判った。したがって、通常の現場海水の栄養塩レベルでも本種は赤潮状態にまで増殖し得ることが明らかとなった。

本種の増殖速度と栄養塩濃度との関係は Monod の式に従うことが判明した。増殖の半飽和定数 (K_s 値) は窒素で $0.58\sim 0.78 \mu\text{M}$ 、リンで $0.14\sim 0.15 \mu\text{M}$ であった。この値はこれまで渦鞭毛藻で報告されている中で最も小さく、本種は低濃度の栄養条件でも十分増殖できる特性を有することが判明した。

現場海域における *G. nagasakiense* の増殖速度測定法を開発するため、細胞分裂指数による方法を検討した。本種の細胞分裂は夜間に同調的に起こることが判った。分裂に要する時間は光強度によって影響されなかったが、温度によって変化し低温になるにつれ増加した。しかし、温度と分裂時間の間には対数直線関係があり、この関係式に基づき任意の水温における分裂時間が計算できた。分裂指数法と細胞数の増加から計算した増殖速度との間には高い相関関係が得られ、分裂指数法により増殖速度が測定できることが判明した。

顕微鏡蛍光測光と DAPI 染色の組合せによる核 DNA 量の測定法を確立し、それを用いて細胞周期を調べた。その結果、本種は明瞭な DNA 合成期 (S 期) を有し、他の真核生物と同様の細胞周期に基づいて増殖することが判明した。したがって、分裂指数法による増殖速度測定の際に、細胞周期の S 期及び G_2+M 期も分裂指標として使用可能なことが明らかとなり、測定精

度の向上及び試料採取回数削減など実用面での改善が期待できた。

謝 辞

本稿をとりまとめるにあたり、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜った京都大学農学部教授石田祐三郎先生に深甚なる感謝の意を表しますとともに、本論文について御助言と御校閲の労を賜った前京都大学熱帯農学専攻 吉田陽一教授に衷心より感謝します。

本研究の機会を与えられ、その遂行に温かい御理解と便宜を与えて下さった前南西海区水産研究所赤潮部長 安楽正照博士（現海外漁業協力財団）に深厚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、有益な御教示を賜った前三重大学生物資源学部 岩崎英雄教授、並びに広島大学生物生産学部 遠部 卓教授に深く感謝の意を表します。南西海区水産研究所赤潮環境部長 本城凡夫博士、同赤潮生物研究室長 今井一郎博士、養殖研究所環境管理部長 伊藤克彦博士には終始懇切なる御指導と温かい励ましを頂きました。心から御礼申し上げます。また、本校に有益な御意見を頂いた赤潮環境部海況動態研究室長 内田卓志博士に御礼申し上げます。

現場調査にあたり、有益な情報と御助言並びに試料採取にご協力頂いた前福岡県豊前水産試験場の寺田和夫氏、福岡県豊前水産試験場 神園真人氏（現福岡県海洋技術センター豊前海研究所）、高知県水産試験場の村田 宏氏（現高知県室戸漁業指導所）、森山貴光氏（現高知県内水面漁業センター）、三重県南勢町種苗生産施設 川村龍彦、中村 治の両氏、静岡県水産試験場浜名湖分場 長谷川 仁氏（現静岡県水産試験場）、花井孝之氏（現静岡県水産課）に厚く御礼申し上げます。

さらに、現場調査にあたって船上作業に御協力頂いた南西海区水産研究所調査船「しらふじ丸」の乗組員各位に厚く御礼申し上げます。

本研究に対し、多くの御協力と有益な御意見を頂いた南西海区水産研究所赤潮環境部 板倉茂枝官、資源増殖部 有馬郷司室長、東京水産大学 東海 正博士、東北区水産研究所海洋環境部 松尾 豊博士に深謝します。また、研究の遂行に献身的な御協力を頂いた伊藤賀代子氏に記して感謝します。

文 献

- 安部哲文・平山和次, 1979: *Gymnodinium* sp. のシオミズツボウムシ *Brachionus plicatilis* に対する致死作用. 長崎大学水産学部研報, **46**, 1-6.
- 安達六郎, 1972: 赤潮生物の分類学的研究. 三重県立大学水産学部紀要, **9**, 9-145.
- ANDERSON, D.M., 1980: Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarens* (Dinophyceae) hypnozygotes. *J. Phycol.*, **16**, 166-172.
- ANDERSON, D.M. and F.M.M. MOREL, 1979: The seeding of two red tide blooms by the germination of benthic *Gonyaulax tamarens* hypnocysts. *Estuar. coast. Shelf Sci.*, **8**, 279-293.
- ANDERSON, D.M. and K.D. STOLZENBACH, 1985: Selective retention of two dinoflagellates in a well-

- mixed estuarine embayment: the importance of diel vertical migration and surface avoidance. *Mar. Biol.*, **25**, 39-50.
- 安楽正照, 1985a: プランクトン研究ノート(34) 環境調査とプランクトン(26) 赤潮の発生子知-1. 海洋と生物, **38**, 183-188.
- 安楽正照, 1985b: プランクトン研究ノート(35) 環境調査とプランクトン(27) 赤潮の発生子知-2. 海洋と生物, **38**, 302-307.
- 有賀祐勝・横浜康継, 1979: 環境要因の測定. 「藻類研究法」(西澤一俊・千原光雄編), 共立出版, 東京, 436-453.
- BHAUD, Y. and M.O. SOYER-GOBILLARD, 1986: DNA synthesis and cell cycle of a primitive dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehr. *Protistologica* **22**, 23-30.
- BRAARUD, T. and B.R. HEIMDAL, 1970: Brown water on the Norwegian coast in autumn 1966. *Nytt Mag. Bot.*, **17**, 91-97.
- BRAND, L.E., R.R.L. GUILLARD and L.S. MURPHY, 1981: A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankt. Res.*, **3**, 193-201.
- BUCHANAN, R.J., 1968: Studies at Oyster Bay in Jamaica, West Indies. IV. Observations on the morphology and asexual cycle of *Pyrodinium bahamense* Plate. *J. Phycol.*, **4**, 272-277.
- CAMPBELL, L. and E.J. CARPENTER, 1986: Diel patterns of cell division in marine *Synechococcus* spp. (Cyanobacteria): use of the frequency of dividing cells technique to measure growth rate. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **32**, 139-148.
- CARPENTER, E.J. and J. CHANG, 1988: Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. I. Concept of the method. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **43**, 105-111.
- CARPENTER, E.J. and R.R.L. GUILLARD, 1971: Intraspecific differences in nitrate half-saturation constants for three species of marine phytoplankton. *Ecology*, **52**, 183-185.
- CETTA, C.M. and D.M. ANDERSON, 1990: Cell cycle studies of the dinoflagellates *Gonyaulax polyedra* Stein and *Gyrodinium uncatenum* Hulbert during asexual and sexual reproduction. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **135**: 69-84.
- CHANG, J. and E.J. CARPENTER, 1985: Blooms of the dinoflagellate *Gyrodinium aureolum* in a Long Island estuary: Box model analysis of bloom maintenance. *Mar. Biol.*, **89**, 83-93.
- CHANG, J. and E.J. CARPENTER, 1988: Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. II. DNA quantification and model verification in the dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **44**, 287-296.
- CHEN, L.C.M., T. EDELSTEIN and J. McLACHLAN, 1969: *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.*, **5**, 211-220.
- CHISHOLM, S.W., 1981: Temporal patterns of cell division in unicellular algae. In "Physiological bases of phytoplankton ecology" (ed. by T. PLATT), *Can. Bull. Fish. aquat. Sci.*, **210**, 150-181.
- CHISHOLM, S.W. and L.E. BRAND, 1981: Persistence of cell division phasing in marine phytoplankton in continuous light after entrainment to light:dark cycles. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **51**, 107-118.
- CHO, C.-H., 1981: On the *Gymnodinium* red tide in Jinhae Bay. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **14**, 227-232.
- COLEMAN, A.W., M.J. MAGUITRE and J.R. COLEMAN, 1981: Mithramycin- and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-DNA staining for fluorescence microspectrophotometric measurement of DNA in nuclei, plastids, and virus particles. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 959-968.
- DAHL, E and U.H. BROCKMANN, 1985: The growth of *Gyrodinium aureolum* Hulbert in in situ experimental bags. In "Toxic Dinoflagellates" (ed. by D.M. ANDERSON, A.W. WHITE and D. G. BADEN), Elsevier, New York, 233-238.
- DALE, B., 1983: Dinoflagellate resting cysts: "benthic plankton". In "Survival strategies of the algae" (ed. by G.A. FRYXELL), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 69-136.
- 団 勝磨, 1981: 細胞周期の概念とその研究法. 「細胞周期」(日本動物学会編) 現代動物学の課題 6, 学会出版センター, 東京, 1-16.

- DEAN, P.N., 1985 : Methods of data analysis in flow cytometry. In "Flow cytometry: Instrumentation and data analysis" (ed. by M.A. VAN DILLA, P.N. DEAN, O.D. LAERUM and M. R. MELAMED), Academic Press, London, 195-221.
- DEANE, E.M. and R.W. O'BRIEN, 1981 : Uptake of phosphate by symbiotic and free-living dinoflagellates. *Arch. Microbiol.*, **128**, 307-310.
- DIXON, G.K. and P.M. HOLLIGAN, 1989 : Studies on the growth and nitrogen assimilation of the bloom dinoflagellate *Gyrodinium aureolum* Hulburt. *J. Plankt. Res.*, **11**, 105-118
- DIXON, G.K. and P.J. SYRETT, 1988 : The growth of dinoflagellates in laboratory cultures. *New Phytol.*, **109**, 297-302.
- DODGE, J.D., 1963a : Chromosome numbers in some marine dinoflagellates. *Botanica mar.*, **5**, 121-127.
- DODGE, J.D., 1963b : The nucleus and nuclear division in the Dinophyceae. *Arch. Protistenk.*, **106**, 442-452.
- DODGE, J.D., 1965 : Chromosome structure in the dinoflagellate and the problem of mesokaryotic cell. *Int. Congr. Ser. Excerpta Med.*, **91**, 264-265.
- DODGE, J.D., 1966 : The Dinophyceae. In "The chromosomes of the algae" (ed. by M.B.E. GODWARD), St. Martin's Press, New York, 99-114.
- DOUGLAS, D.J., 1984 : Microautoradiography-based enumeration of photosynthetic picoplankton with estimates of carbon-specific growth rates. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.*, **14**, 223-228.
- DUGDALE, R.C., 1967 : Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification, and significance. *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 685-695.
- DURBIN, E.G., R.W. KRAWIEC and T.J. SMAYDA, 1975 : Seasonal studies on the relative importance of different size fractions of phytoplankton in Narragansett Bay (USA). *Mar. Biol.*, **32**, 271-287.
- ELBRÄCHTER, M., 1973 : Population dynamics of *Ceratium* in coastal waters of the Kiel Bay. *Oikos Suppl.*, **15**, 43-48.
- ELSER, M.M. and W.O. SMITH, 1985 : Phased cell division and growth rate of a planktonic dinoflagellate, *Ceratium hirundinella*, in relation to environmental variables. *Arch. Hydrobiol.*, **104**, 477-491.
- EPPLEY, R.W., 1972 : Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fishery Bull. natn. mar. Fish. Serv., U.S.*, **70**, 1063-1085.
- EPPLEY, R.W., 1977 : The growth and culture of diatoms. In "The biology of diatoms" (ed. by D. WERNER), Blackwell, Oxford, 24-64.
- EPPLEY, R.W., 1980 : Estimating phytoplankton growth rates in the central oligotrophic oceans. In "Primary productivity in the sea" (ed. by P.G. FALKOWSKI), Plenum Press, New York, 231-242.
- EPPLEY, R.W. and J.L. COATSWORTH, 1968 : Uptake of nitrate and nitrite by *Ditylum brightwellii*—kinetics and mechanisms. *J. Phycol.*, **4**, 151-156.
- EPPLEY, R.W. and E.H. RENGER, 1974 : Nitrogen assimilation of an oceanic diatom in nitrogen-limited continuous culture. *J. Phycol.*, **10**, 15-23.
- EPPLEY, R.W., J.N. ROGERS and J.J. MCCARTHY, 1969 : Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **14**, 912-920.
- FALKOWSKI, P.G. and T.G. OWENS, 1982 : A technique for estimating phytoplankton division rates by using a DNA-binding fluorescent dye. *Limnol. Oceanogr.*, **27**, 776-782.
- FILFILAN, S.A. and D.C. SIGEE, 1977 : Continuous DNA replication in the nucleus of the dinoflagellate *Prorocentrum micans* (Ehrenberg). *J. Cell Sci.*, **27**, 81-90.
- FOY, R.H., C.E. GIBSON and R.V. SMITH, 1976 : The influence of daylength, light intensity and temperature on the growth rates of planktonic blue-green algae. *Br. phycol. J.*, **11**, 151-163.
- FRANKER, C.K., L.M. SAKHRANI, C.D. PRICHARD and C.A. LAMDEN, 1974 : DNA synthesis in *Cryptothecodinium cohnii*. *J. Phycol.*, **10**, 91-94.

- 福岡県豊前水産試験場, 1987~1989: 海洋・気象観測資料. No.26~28.
- 福代康夫, 1987a: 渦鞭毛藻. 「赤潮生物研究指針」(日本水産資源保護協会編), 秀和, 東京, 304-476.
- 福代康夫, 1987b: 生活史. 「赤潮の科学」(岡市友利編), 恒星社厚生閣, 東京, 53-61.
- GALLAGHER, J.C., 1980: Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay. *J. Phycol.*, **16**, 464-474.
- GALLERON, C. and A.M. DURRAND, 1979: Cell cycle and DNA synthesis in a marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Protoplasma*, **100**, 155-165.
- GATES, J. and W. WILSON, 1960: The toxicity of *Gonyaulax monilata* Howell to *Mugil cephalus*. *Limnol. Oceanogr.*, **5**, 171-174.
- GOLDMAN, J.C. and J.H. RYTHER, 1976: Temperature-influenced species competition in mass cultures of marine phytoplankton. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1125-1144.
- GUILLARD, R.R.L., 1979: Division rates. In "Handbook of phycological methods. Culture method & growth measurements" (ed. by J.R. STEIN), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 289-311.
- GUILLARD, R.R.L. and P. KILHAM, 1977: The ecology of marine planktonic diatoms. In "The biology of diatoms" (ed. by D. WERNER), Blackwell, Oxford, 372-469.
- HAGSTRÖM, A., U. LARSSON, P. HÖRSTEDT and S. NORMARK, 1979: Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. environ. Microbiol.*, **37**, 805-812.
- HAMADA, S. and S. FUJITA, 1983: DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry*, **79**, 219-226.
- HAMKALO, B.A. and J.B. RATTNER, 1977: The structure of a mesokaryote chromosome. *Chromosoma*, **60**, 39-47.
- HARGRAVES, P.E. and F.W. FRENCH, 1975: Observations on the survival of diatom resting spores. *Nova Hedw. Beiheft.*, **53**, 229-239.
- HARGRAVES, P.E. and F.W. FRENCH, 1983: Diatom resting spores: significance and strategies. In "Survival strategies of the algae" (ed. by G.A. FRYXELL), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 49-68.
- HARRIS, G.P., 1986: Phytoplankton ecology: structure, function and fluctuation. Chapman and Hall Ltd, London, 1-384.
- HARRISON, P.J., R.E. WATERS and F.J.R. TAYLOR, 1980: A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.*, **16**, 28-35.
- HELLER, M.D., 1977: The phased division of the freshwater dinoflagellate *Ceratium hirundinella* and its use as a method of assessing growth in natural populations. *Freshwat. Biol.*, **7**, 527-533.
- HIRAYAMA, K., T. DOMA, N. HAMAMURA and T. MURAMATU, 1989: Role of alkaline phosphatase activity in the growth of red tide organisms. In "Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology" (ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier, New York, 317-320.
- 平山和次・飯塚昭二・米司隆, 1972: 1971年夏季の大村湾海水による赤潮プランクトン *Gymnodinium* '65年型種の培養. 長崎大学水産学部研報, **33**, 11-20.
- 平山和次・川端豊喜, 1982: 大村湾南部水域海水による赤潮プランクトン *Gymnodinium* sp. ('65年型種)の培養-I. 1977, 1978, 1979年夏期の海況と生物学的分析結果. 長崎大学水産学部研報, **52**, 29-40.
- HIRAYAMA, K. and K. NUMAGUCHI, 1972: Growth of *Gymnodinium* Type-'65, causative organism of red tide in Omura Bay, in medium supplied with bottom mud extract. *Bull. Plankt. Soc. Japan*, **19**, 13-21.
- 広川豊康, 1977: 単細胞藻類の生長・分裂および代謝における日周期性. 遺伝, **31**, 15-20.
- 広島地方气象台, 1989: 広島県気象月報. 平成元年9月, 1-26.
- 広島地方气象台, 1990: 広島県気象月報. 平成2年9月, 1-24.
- HITCHCOCK, G.L. and T.J. SMAYDA, 1977: The importance of light in the initiation of the 1972-1973

- winter-spring diatom bloom in Narragansett Bay. *Limnol. Oceanogr.*, **22**, 126-131.
- HOLT, J.R. and L.A. PFIESTER, 1982: A technique for counting chromosomes of armored dinoflagellates, and chromosome numbers of six freshwater dinoflagellate species. *Am. J. Bot.*, **69**, 1165-1168.
- 本城凡夫, 1979: *Gymnodinium* 属の増殖と底泥溶出物質との関係に係わる研究。「*Gymnodinium* 属赤潮の挙動と増殖機構の解明に関する研究報告書 (昭和53年度)」(水産庁・環境庁), 67-78.
- 本城凡夫, 1987: ギムノディニウム。「赤潮の科学」(岡市友利編), 恒星社厚生閣, 東京, 228-237.
- HONJO, T. 1987: Growth potential of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) collected in Gokasho Bay, central Japan. *Bull. Plankt. Soc. Japan*, **34**, 119-124.
- HONJO, T., S. YAMAMOTO, O. NAKAMURA, and M. YAMAGUCHI, 1990: Annual cycle of motile cells of *Gymnodinium nagasakiense* and ecological features during the period of red tide development. In "Toxic Marine Phytoplankton" (ed. by E. GRANÉLI, B. SUNDSTRÖM, L. EDLER, and D.M. ANDERSON), Elsevier, New York, 165-170.
- 保坂三継, 1990: 東京湾における *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi の出現. 日本プランクトン学会報, **37**, 69-75.
- HULBURT, E.M., 1957: The taxonomy of unarmored Dinophyceae of shallow embayments on Cape Cod, Massachusetts. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole*, **112**, 196-219.
- HULL, H.M., R.W. HOSHAW and J.-C. WANG, 1982: Cytofluorometric determination of nuclear DNA in living and preserved algae. *Stain Technol.*, **57**, 273-282.
- IGNATIADIS, L. and T.J. SMAYDA, 1970: Autecological studies on the marine diatom *Rhizosolenia fragilissima* Bergon. I. The influence of light, temperature, and salinity. *J. Phycol.*, **6**, 332-339.
- 飯塚昭二, 1972: 大村湾における *Gymnodinium* '65年型種赤潮の発生機構. 日本プランクトン学会報, **19**, 22-33.
- 飯塚昭二, 1987: 群成長・生物間関係・行動生態。「赤潮の科学」(岡市友利編) 恒星社厚生閣, 東京, 91-123.
- 飯塚昭二, 1989: (4) ギムノディニウムの生理・生態に関する基礎研究. 無酸化現象と *Gymnodinium* 赤潮発生との関連に関する研究。「昭和63年度赤潮対策技術開発試験報告書 2-生物学的赤潮防除技術開発試験」, 1-17.
- 飯塚昭二・入江春彦, 1966: 1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害-II. 後期赤潮とその生物学的特徴について. 長崎大学水産学部研報, **21**, 67-101.
- 飯塚昭二・入江春彦, 1969a: 赤潮無発生年における赤潮プランクトンの動勢. 1966年大村湾の場合. 長崎大学水産学部研報, **27**, 19-37.
- 飯塚昭二・入江春彦, 1969b: 大村湾における *Gymnodinium* 赤潮発生と海底水無酸化現象との関連. 日本プランクトン学会報, **16**, 99-115.
- 飯塚昭二・峯 邦宏, 1983: 培養条件下で期待される赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium* sp. ('65年型種) の最高生長速度. 日本プランクトン学会報, **30**, 139-146.
- 飯塚昭二・中島敏光, 1975: 赤潮鞭毛藻の硫化物に対する反応. 日本プランクトン学会報, **22**, 27-32.
- 池田武彦, 1971: 赤潮プランクトンに関する研究-III. 海産ミドリムシの栄養生理について. 山口内海水試報, (2), 4-9.
- 池田武彦・松野 進・桃山和夫, 1987: 昭和60年夏季発生の *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮について. 山口内海水試報, **15**, 58-66.
- 今井一郎, 1984: 周防灘における海洋細菌の粒子径組成と現存量. 南西水研研報, **17**, 183-196.
- 今井一郎, 1990: 有害ラフィド藻 *Chattonella* のシストに関する生理生態学的研究. 南西水研研報, **23**, 63-166.
- 今井一郎・伊藤克彦・安楽正照, 1984: 播磨灘における *Chattonella* 耐久細胞の分布と発芽温度. 日本プランクトン学会報, **31**, 35-42.
- IMAI, I. and K. ITOH, 1987: Annual life cycle of *Chattonella* spp., causative flagellates of noxious red tides in the Inland Sea of Japan. *Mar. Biol.*, **94**, 287-292.
- IMAI, I. and K. ITOH, 1988: Cysts of *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae) in sediments of the Inland Sea of Japan. *Bull. Plankt. Soc. Japan*, **35**, 35-44.

- 今井一郎・伊藤克彦・寺田和夫・神菌真人, 1986: 周防灘における *Chattonella* 耐久細胞の分布と夏季の赤潮. 日本水誌, **52**, 1665-1671.
- 入江春彦・浜島謙太郎, 1966: 1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害 - I. 1965年夏期大村湾赤潮の概説. 長崎大学水産学部研報, **21**, 59-65.
- ISHIDA, Y., M. EGUCHI and H. KADOTA, 1986: Existence of obligately oligotrophic bacteria as a dominant population in the South China Sea and the West Pacific Ocean. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.*, **30**, 197-203.
- ISHIMARU, T., T. TAKEUCHI, Y. FUKUYO and M. KODAMA, 1989: The selenium requirement of *Gymnodinium nagasakiense*. In "Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology" (ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier, New York, 357-360.
- 板倉 茂・今井一郎・伊藤克彦, 1990: 広島湾における赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* 出現密度の季節変化. 南西水研研報, **23**, 27-33.
- 板倉 茂・今井一郎・山口峰生・松尾 豊・伊藤克彦・寺田和夫・神菌真人・池内 仁, 1988: 1987年夏季の周防灘の海況と *Gymnodinium nagasakiense* 及び *Chattonella* spp. の出現状態. 「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究: 昭和62年度研究報告書」(南西水研・東海水研), 7-17.
- 伊藤克彦・今井一郎, 1987: ラフィド藻. 「赤潮生物研究指針」(日本水産資源保護協会編), 秀和, 東京, 122-130.
- 伊藤克彦・今井一郎・山口峰生・松尾 豊・安楽正照・寺田和夫・神菌真人, 1986: 1985年夏季に周防灘で発生した *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮の経過と海況. 「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究: 昭和60年度研究報告書」(南西水研・東海水研), 7-18.
- 伊藤克彦・今井一郎・山口峰生・松尾 豊・寺田和夫・神菌真人・池内 仁, 1987: 1986年夏季, 周防灘における *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮の出現経過と海況. 「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究: 昭和61年度研究報告書」(南西水研・東海水研), 7-19.
- 伊藤克彦・今井一郎・板倉 茂・山口峰生・松尾 豊・寺田和夫・神菌真人・池内 仁, 1990: 周防灘における *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮の発生環境の特徴. 「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究: 5カ年の研究報告」(南西水研・東海水研), 145-158.
- IWASAKI, H., 1961: The life-cycle of *Porphyrta tenera* in vitro. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole*, **121**, 173-187.
- 岩崎英雄, 1967: 微細藻類の分離と培養. 日本水産資源保護協会, 東京, 1-55.
- 岩崎英雄, 1971: 赤潮鞭毛藻に関する研究 - VI. 1970年, 備後灘に出現した *Eutreptiella* sp. と *Exuviaella* sp. について. 日本海洋学会誌, **27**, 152-157.
- 岩崎英雄, 1973: 赤潮鞭毛藻の生理特性からみた赤潮の発生機構. 日本プランクトン学会報, **19**, 46-56.
- IWASAKI, H., 1979: Physiological ecology of red tide flagellates. In "Biochemistry and physiology of protozoa" (ed. by M. LEVANDOWSKY and S.H. HUTNER), 2nd Ed. Vol.1, Academic Press, New York, 357-393.
- IWASAKI, H., C.-H. KIM and M. TSUCHIYA, 1990: Growth characteristics of a dinoflagellate *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi. *Japan. J. Phycol.*, **38**, 155-161.
- 岩崎英雄・佐々田 憲, 1969: 赤潮鞭毛藻に関する研究 - II. 五ヶ所湾に出現した *Heterosigma inlandica* について. 日本水誌, **35**, 943-947.
- JITTS, H.R., C.D. McALLISTER, K. STEPHENS and J.D.H. STRICKLAND, 1964: The cell division rates of some marine phytoplankters as a function of light and temperature. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **21**, 139-157.
- 城 久, 1986: 大阪湾における富栄養化の構造と富栄養化が漁業生産におよぼす影響について. 大阪水試研報, **7**, 1-174.
- KARENTZ, D., 1983: Patterns of DNA synthesis and cell division in marine dinoflagellates. *J. Protozool.*, **30**, 581-588.
- KASTEN, F. H., 1989: The origins of modern fluorescence microscopy and fluorescent probes. In "Cell structure and function by microspectrofluorometry" (ed. by E. KOHEN and J.G. HIRSCHBERG), Academic Press, San Diego, 3-50.

- KELLER, M.D., R.C. SELVIN, W. CLAUS and R.R.L. GUILLARD, 1987: Media for the culture of oceanic ultraplankton. *J. Phycol.*, **23**, 633-638.
- KIMURA, B., 1989: Studies on chemical and biological factors influencing the growth of *Uroglena americana*, a red tide Crysophyceae in Lake Biwa. *J. Shimonoseki Univ. Fish.*, **38**, 23-70.
- 高知県水産試験場, 1979: 昭和53年度漁場富栄養化対策技術開発試験報告書, 1-68.
- 高知県水産試験場, 1988: (5) ギムノディニウム・ナガサキエンセの増殖機構の解明および被害防止策の検討. 「昭和62年度赤潮対策技術開発試験報告書 5 - 中層増殖性広域赤潮被害防止技術開発試験」, 1-25.
- 小村久美男, 1983: 瀬戸内海の平均的海況. 神戸海洋気象台彙報, **201**, 10-39.
- KUBAI, D. F. and H. RIS, 1969: Division in the dinoflagellate *Gyrodinium cohnii* (Schiller). *J. Cell Biol.*, **40**, 508-528.
- 九万田一巳・武田健二・荒牧孝行, 1987: VI 鹿児島湾海域 1. *Chattonella marina* の出現と海洋構造. 「昭和61年度九州海域赤潮調査報告書(西海ブロック)」(水産庁・福岡県・佐賀県・長崎県・熊本県・鹿児島県・宮崎県), 149-168.
- LEDERMAN, T.C. and P. TETT, 1981: Problems in modeling the photosynthesis-light relationship for phytoplankton. *Botanica mar.*, **24**, 125-134.
- LEE, J.H. and H.S. KWAK, 1986: A study on the *Gymnodinium nagasakiense* red-tide in Jinhae Bay of Korea. *Korean J. Ecol.*, **9**, 149-160.
- LEFTLEY, J.W. and P.J. SYRETT, 1973: Urease and ATP: urea amidolyase activity in unicellular algae. *J. Gen. Microbiol.*, **77**, 109-115.
- LOEBLICH, A.R.III., 1976: Dinoflagellate evolution: speculation and evidence. *J. Protozool.*, **23**, 13-28.
- LOEBLICH, A.R.III., 1977: Studies on synchronously dividing populations of *Cachonina niei*, a marine dinoflagellate. *Bull. japan. Soc. Phycol.*, **25**, Suppl. (Mem. Iss. Yamada), 119-128.
- LOEBLICH, A.R.III., R.J. SCHMIDT and J.L. SHERLEY, 1981: Scanning electron microscopy of *Heterocapsa pygmaea* sp. nov., and evidence for polyploidy as a speciation mechanism in dinoflagellates. *J. Plankt. Res.*, **3**, 67-79.
- LOPER, C.L., K.A. STEIDINGER and L.M. WALKER, 1980: A simple chromosome spread technique for unarmored dinoflagellates and implications of polyploidy in algal cultures. *Trans. Am. microsc. Soc.*, **99**, 343-346.
- MACLEAN, J.L., 1977: Observations on *Pyrodinium bahamense* Plate, a toxic dinoflagellate, in Papua New Guinea. *Limnol. Oceanogr.*, **22**, 234-254.
- MACISAAC, J.J., G.S. GRUNSEICH, H.E. GLOVER and C.M. YENTCH, 1979: Light and nutrient limitation in *Gonyaulax excavata*: Nitrogen and carbon trace results. In "Toxic dinoflagellate blooms" (ed. by TAYLOR, D.L. and H.H. SELIGER), Elsevier, New York, 107-110.
- 前川兼佑, 1961: 瀬戸内海, 特に山口県沿海における漁業の調整管理と資源培養に関する研究. 山口県内海水試調研業績, **11**, 1-483.
- MAHONEY, J.B. and J.J.A. MCLAUGHLIN, 1977: The association of phytoflagellate blooms in Lower New York Bay with hypertrophication. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **28**, 53-65.
- MAHONEY, J.B., P. OLSEN and M. COHN, 1990: Blooms of a dinoflagellate *Gyrodinium* cf. *aureolum* in New Jersey coastal waters and their occurrence and effects worldwide. *J. coast. Res.*, **6**, 121-135.
- 松野 進・池田武彦・桃山和夫, 1988: 昭和61年夏季に発生した *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮について. 山口内海水試報, **16**, 142-148.
- MASTUOKA, K., S. IZUKA, H. TAKAYAMA, T. HONJO, Y. FUKUYO and T. ISHIMARU, 1989: Geographic distribution of *Gymnodinium nagasakiense* TAKAYAMA et Adachi around west Japan. In "Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology" (ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier, New York, 101-104.
- MCCARTHY, J.J., 1972: The uptake of urea by marine phytoplankton. *J. Phycol.*, **8**, 216-222.
- MCDUFF, R.E. and S.W. CHISHOLM, 1982: The calculation of in situ growth rates of phytoplankton

- populations from fractions of cells undergoing mitosis: a clarification. *Limnol. Oceanogr.*, **27**, 783-788.
- MCLACHLAN, J., 1979: Growth media-marine. In "Handbook of phycological methods. Culture method & growth measurements" (ed. by J.R. STEIN), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 25-52.
- MITCHISON, J.M., 1984: Dissociation of cell cycle events. In "Cell cycle clocks" (ed. by L.N. EDMUNDS, Jr.), Marcel Dekker, New York, 163-171.
- 森 勇・入江春彦, 1966: 1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害—III. 赤潮発生時の大村湾沖合域の海況. 長崎大学水産学部研報, **21**, 103-113.
- 村上彰男, 1976: 地理. 「瀬戸内海の世界生態と漁業」(村上彰男編). フジテクノシステム, 東京, 3-13.
- 村上彰男, 1980: 富栄養化の抑制. 「赤潮—発生機構と対策」(日本水産学会編)水産学シリーズ34, 恒星社厚生閣, 東京, 86-89.
- NAGASAKI, K., A. UCHIDA and Y. ISHIDA, 1991: A monoclonal antibody which recognizes the cell surface of red tide alga *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1211-1214.
- NAKAHARA, H., 1978: Studies on phytoplankton in Maizuru Bay. I. Seasonal variation and vertical microdistribution. *Mem. Coll. Agric., Kyoto Univ.*, **112**, 49-82.
- 中原紘之, 1986: 藻類の生活史と生態. 「藻類の生態」(秋山 優・有賀祐勝・坂本 充・横浜康継編), 内田老鶴圃, 東京, 533-592.
- 中原紘之・左子芳彦, 1987: 淡水植物プランクトンの生活史. 「淡水赤潮」(門田 元編), 恒星社厚生閣, 東京, 21-77.
- NAKAMURA, Y., T. UMEMORI, M. WATANABE, D.M. KULIS and D.M. ANDERSON, 1990: Encystment of *Chattonella antiqua* in laboratory cultures. *J. oceanogr. Soc. Japan*, **46**, 35-43.
- NAKAMURA, Y. and M.M. WATANABE, 1983a: Growth characteristics of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) Part 1. Effects of temperature, salinity, light intensity and pH on growth. *J. oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 110-114.
- NAKAMURA, Y. and M.M. WATANABE, 1983b: Growth characteristics of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) Part 2. Effects of nutrients on growth. *J. oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 151-155.
- NAKAMURA, Y. and M.M. WATANABE, 1983c: Nitrate and phosphate uptake kinetics of *Chattonella antiqua* grown in light/dark cycles. *J. oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 167-170.
- 中田憲一・飯塚昭二, 1987: 赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* の越冬に関する一観察. 日本プランクトン学会報, **34**, 199-201.
- NEMOTO, Y., T. KUROIWA and M. FURUYA, 1987: Photocontrol of nuclear DNA replication in *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1043-1049.
- NICHOLS, H.W., 1980: Polyploidy in algae. In "Polyploidy; biological relevance" (ed. by W. H. LEWIS), Plenum Press, New York, 151-161.
- 西島敏隆, 1985: 沿岸海域におけるB群ビタミンの動態に関する研究 —赤潮の発生に関連して—. 高知大学農学部紀要, **43**, 1-154.
- 西村昭史, 1982: 魚類養殖漁場の有機汚染が赤潮生物 *Gymnodinium* type-'65および *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす影響. 日本プランクトン学会報, **29**, 1-7.
- 野村和弘・星野孝夫, 1988: 試料作成法 染色法 DNA, 「フローサイトメトリー —手技と実際—」(太田和雄監修, 野村和弘・高本 滋編)改訂第2版, 蟹書房, 東京, 59-74.
- 野呂忠秀・水野 純・野沢治, 1981: 大村湾産赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium* sp. ('65年型)の超微細構造. 鹿児島大学水産学部紀要, **30**, 179-189.
- NORRIS, L. and K.K. CHEW, 1975: Effect of environmental factors on growth of *Gonyaulax catenella*. In "Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellates" (ed. by V.R. LOCICERO), Mass. Sci. Technol. Found., Massachusetts, 143-152.
- 農林水産省統計情報部, 1990: 平成元年漁業養殖業生産統計年報, 1-280.
- 野沢治, 1984: 鹿児島湾における赤潮生物の生理特性に関する研究. 「大規模赤潮の形成及び赤潮被害抑制に関する研究: 5年間の研究成果」(南西水研・東海区水研・水産大学校), 139-152.
- 沼口克之・平山和次, 1972: 大村湾赤潮原因種 *Gymnodinium* '65年型種の培養に好適な pH と塩分に

- ついて. 長崎大学水産学部研報, **33**, 7-10.
- 尾田方七, 1935: *Gymnodinium mikimotoi* Miyake et Kominami n. sp. (MS.) の赤潮と硫酸銅の効果. 動物学雑誌, **47**, 35-48.
- 大野正夫・井本成彬・八塚 剛, 1971: 浦の内湾の海洋学的調査(1968~1969). 宇佐臨海実験所研究報告, **18**, 1-23.
- 太田和雄, 1988: 巻頭言. 「フローサイトメトリー — 手技と実際 —」(太田和雄監修, 野村和弘・高本滋編) 改訂第2版, 蟹書房, 東京, 1-3.
- 岡市友利, 1980: 魚介類の被害防止策. 「赤潮—発生機構と対策」(日本水産学会編) 水産学シリーズ 34, 恒星社厚生閣, 東京, 124-138.
- OLSON, R.J. and S.W. CHISHOLM, 1986: Effects of light and nitrogen limitation on the cell cycle of the dinoflagellate *Amphidinium carteri*. *J. Plankt. Res.*, **8**, 785-793.
- OLSON, R.J., S.L. FRANKEL, S.W. CHISHOLM and H.M. SHAPIRO, 1983: An inexpensive flow cytometer for the analysis of fluorescence signals in phytoplankton: chlorophyll and DNA distributions. *J. expl. mar. Biol. Ecol.*, **68**, 129-144.
- OLSON, R.J., D. VAULOT and S.W. CHISHOLM, 1986: Effects of environmental stresses on the cell cycle of two marine phytoplankton species. *Pl. Physiol.*, **80**, 918-925.
- 小野知足, 1988: 播磨灘における赤潮生物の細胞周期と群生長速度. 香川赤潮研報, **3**, 1-67.
- 大内 晟・高山晴義, 1984: 赤潮図による *Gymnodinium* '65年型種赤潮の予察について. 日水誌, **50**, 1201-1205.
- PARTENSKY, F. and A. SOURNIA, 1986: Le dinoflagellé *Gyrodinium* cf. *aureolum* dans le plancton de l'Atlantique nord: identification, écologie, toxicité. *Cryptogam. Algol.*, **7**, 251-275.
- PARTENSKY, F., D. VAULOT, A. COUTÉ and A. SOURNIA, 1988: Morphological and nuclear analysis of the bloom-forming dinoflagellates *Gyrodinium* cf. *aureolum* and *Gymnodinium nagasakiense*. *J. Phycol.*, **24**, 408-415.
- PERRY, M.J., 1976: Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus-limited chemostat culture and in the oligotrophic waters of the central North Pacific. *Limnol. Oceanogr.*, **21**, 88-107.
- PFIESTER, L.A., 1975: Sexual reproduction of *Peridinium cinctum* f. *ovoplanum* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **11**, 259-265.
- PFIESTER, L.A., 1976: Sexual reproduction of *Peridinium willei* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **12**, 234-238.
- PFIESTER, L.A., 1977: Sexual reproduction of *Peridinium gatunense* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **13**, 92-95.
- PFIESTER, L.A. and D.M. ANDERSON, 1987: Dinoflagellate reproduction. In "The biology of dinoflagellates" (ed. by F.J.R. TAYLOR), Blackwell, Oxford, 611-648.
- POLLINGER, U. and C. SERRUYA, 1976: Phased division of *Peridinium cinctum* f. *westii* (Dinophyceae) and development of the Lake Kinneret (Israel) bloom. *J. Phycol.*, **12**, 162-170.
- POLLINGER, U. and E. ZEMEL, 1981: In situ and experimental evidence of the influence of turbulence on cell division processes of *Peridinium cinctum* forma *westii* (Lemm.) Lefevre. *Br. phycol. J.*, **16**, 281-287.
- PUISEUX-DAO, S., 1981: Cell-cycle events in unicellular algae. In "Physiological bases of phytoplankton ecology" (ed. by T. PLATT), *Can. Bull. Fish. aquat. Sci.*, **210**, 130-149.
- QASIM, S.Z., P.M.A. BHATTATHIRI and V.P. DEVASSY, 1972: The influence of salinity on the rate of photosynthesis and abundance of some tropical phytoplankton. *Mar. Biol.*, **12**, 200-206.
- REDALJE, D.G. and E.A. LAWS, 1981: A new method for estimating phytoplankton growth rates and carbon biomass. *Mar. Biol.*, **62**, 73-79.
- REYNOLDS, C.S., 1984: The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1-384.
- RHEE, G-Y. and I.J. GOTHAM, 1981: The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*,

26, 635-648.

- RICHMAN, S. and J.N. ROGERS, 1969: The feeding of *Calanus helgolandicus* on synchronously growing populations of the marine diatom *Ditylum brightwellii*. *Limnol. Oceanogr.*, **14**, 701-709.
- RIVKIN, R.B. and E. SWIFT, 1982: Phosphate uptake by the oceanic dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca*. *J. Phycol.*, **18**, 113-120.
- RIVKIN, R.B. and M.A. VOYTEK, 1986: Cell division rates of eucaryotic algae measured by tritiated thymidine incorporation into DNA: Coincident measurements of photosynthesis and cell division of individual species of phytoplankton isolated from natural populations. *J. Phycol.*, **22**, 199-205.
- RIZZO, P.J., 1987: Biochemistry of the dinoflagellate nucleus. In "The biology of dinoflagellates" (ed. by F.J.R. TAYLOR), Blackwell, Oxford, 143-173.
- ROMEO, A.J. and N.S. FISHER, 1982: Intraspecific comparisons of nitrate uptake in three marine diatoms. *J. Phycol.*, **18**, 220-225.
- 左子芳彦・石田祐三郎, 1986: 渦鞭毛藻における有性生殖の生態学的意義。「微生物の生態14 進化をめぐって」(日本微生物生態学会編), 学会出版センター, 東京, 99-113.
- SAKO, Y., Y. ISHIDA, H. KADOTA and Y. HATA, 1984: Sexual reproduction and cyst formation in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 743-750.
- SAKO, Y., Y. ISHIDA, H. KADOTA and Y. HATA, 1985: Excystment in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 267-272.
- SAKO, Y., Y. ISHIDA, T. NISHIJIMA and Y. HATA, 1987: Sexual reproduction and cyst formation in the freshwater dinoflagellate *Peridinium penardii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 473-478.
- SAKO, Y., A. UCHIDA and Y. ISHIDA, 1989: Electrophoretic analysis of isozymes in red tide dinoflagellates (*Gymnodinium nagasakiense*, *Protogonyaulax catenella* & *Peridinium bipes*). In "Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology" (ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier, New York, 325-328.
- SHELDON, R.W. and W.H. SUTCLIFFE, Jr., 1978: Generation times of 3 h for Sargasso Sea microplankton determined by ATP analysis. *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 1051-1055.
- SHIMURA, S., H. SHIBUYA and S. ICHIMURA, 1979: Growth and photosynthesis properties of some planktonic marine diatoms at various salinity regimes. *La Mer*, **17**, 149-155.
- 塩川 司・入江春彦, 1966: 1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害-VI. 赤潮による水産被害について. 長崎大学水産学部研報, **21**, 115-129.
- 代田昭彦, 1980: 赤潮生物の駆除。「赤潮-発生機構と対策」(日本水産学会編) 水産学シリーズ 34, 恒星社厚生閣, 東京, 105-123.
- SHYAM, R. and Y.S.R.K. SARMA, 1978: Cytology of Indian freshwater Dinophyceae. *Bot. J. Linn. Soc.*, **76**, 145-159.
- SIGEE, D.C., 1986: The dinoflagellate chromosome. *Adv. bot. Res.*, **12**, 205-264.
- SLATER, M.L., S.O. SHARROW and J.J. GART, 1977: Cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* in populations growing at different rates. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3850-3854.
- SMAYDA, T.J., 1969: Experimental observations on the influence of temperature, light, and salinity on cell division of the marine diatom, *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *J. Phycol.*, **5**, 150-157.
- SMAYDA, T.J., 1973: The growth of *Skeletonema costatum* during a winter-spring bloom in Narragansett Bay, Rhode Island. *Norw. J. Bot.*, **20**, 219-247.
- SMAYDA, T.J., 1980: Phytoplankton species succession. In "The physiological ecology of phytoplankton" (ed. by I. MORRIS), Blackwell, Oxford, 493-570.
- SMETACEK, V.S., 1985: Role of sinking in diatom life-history cycles: ecological, evolutionary and geological significance. *Mar. Biol.*, **84**, 239-251.
- SPECTOR, D.L., 1984: Dinoflagellate nuclei. In "Dinoflagellates" (Ed. by D.L. SPECTOR), Academic

- Press, Orlando, 107-147.
- SPECTOR, D.L., A.C. VASCONCELOS and R.E. TRIEMER, 1981: DNA duplication and chromosome structure in the dinoflagellates. *Protoplasma*, **105**, 185-194.
- STEARNS, D.E., 1986: Copepod grazing behavior in simulated natural light and its relation to nocturnal feeding. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.*, **30**, 65-76.
- STEIDINGER, K.A., 1975: Basic factors influencing red tides. In "Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellates" (ed. by V.R. LOCICERO), Mass. Sci. Technol. Found., Massachusetts, 153-162.
- STOLBOVA, N.G., V.I. VEDERNIKOV and A.S. MIKAE LYAN, 1982: Diurnal cell-division rhythm of dinoflagellates from the Black Sea. *Oceanology*, **22**, 365-368.
- STOSCH, H.A.VON, 1973: Observations on vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, *Gymnodinium pseudopalustre* Schiller and *Woloszynskia apiculata* sp. nov. *Br. phycol. J.*, **8**, 105-134.
- 杉山 宏・佐々木康夫・飯塚昭二, 1979: 赤潮時における鞭毛藻の光-光合成曲線. 長崎大学水産学部研報, **47**, 29-33.
- 水産庁九州漁業調整事務所, 1990: 平成元年九州海域の赤潮, 1-55.
- 水産庁・三重県・和歌山県, 1986: 昭和59年熊野灘に発生したギムノディニウム・ナガサキエンセ赤潮に関する調査報告書, 1-140.
- 水産庁瀬戸内海漁業調整事務局, 1973: 昭和47年夏期東部瀬戸内海養殖はまち大量へい死事故の全容, 1-51.
- 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所, 1973-1990: 瀬戸内海の赤潮.
- 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所, 1986: 昭和60年夏期西部瀬戸内海ギムノディニウム赤潮の発生状況と被害の概要, 1-18.
- 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所, 1988: 昭和62年夏期東部瀬戸内海シャットネラ赤潮の発生状況と被害の概要, 1-79.
- 鈴木玲子・石丸 隆, 1988: *Gymnodinium nagasakiense* の色素組成. 1988年度日本海洋学会秋季大会講演要旨集, 日本海洋学会, 232.
- SWEENEY, B.M. and J.W. HASTINGS, 1958: Rhythmic cell division in populations of *Gonyaulax polyedra*. *J. Protozool.*, **5**, 217-224.
- SWIFT, E. and E.G. DURBIN, 1972: The phased division and cytological characteristics of *Pyrocystis* spp. can be used to estimate doubling times of their populations in the sea. *Deep-Sea Res.*, **19**, 189-198.
- 高橋 学, 1983: Flow Cytometry の生物学への応用. 化学と生物, **21**, 728-738.
- TAKAHASHI, M. and N. FUKAZAWA, 1982: A mechanism of "red-tide" formation. II. Effect of selective nutrient stimulation on the growth of different phytoplankton species in natural water. *Mar. Biol.*, **70**, 267-273.
- TAKANO, H., 1963: Diatom culture in artificial sea water-I. Experiments on five pelagic species. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **37**, 17-25.
- 高野秀昭, 1971: 渦鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* の原記載. 日本プランクトン学会報, **18**, 103-104.
- 高山晴義, 1981: 走査電子顕微鏡による *Gymnodinium* 属 2 種の観察. 日本プランクトン学会報, **28**, 121-129.
- 高山晴義, 1983: 広島県沿岸に出現する赤潮生物-I. *Chattonella antiqua* (Hada) Ono と *Chattonella marina* (Subrahmanyam) Hara et Chihara. 広島水試研報, **13**, 59-64.
- 高山晴義, 1986: 広島県沿岸に出現する赤潮生物-IV, ナガサキハダカウズモ *Gymnodinium nagasakiense* TAKAYAMA et Adachi. 広島水試研報, **16**, 39-44.
- TAKAYAMA, H. and R. ADACHI, 1984: *Gymnodinium nagasakiense* sp. nov., a red-tide forming dinophyte in the adjacent waters of Japan. *Bull. Plankt. Soc. Japan*, **31**, 7-14.
- 竹内照文・金盛浩吉・渡辺勇二郎・芳養晴雄・金丸誠司・中西 一・小川満也・竹内淳一・南 忠七, 1986: 1984年7月熊野灘南部域に出現した *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮について (調査報告). 和歌山県水試事業報告, 昭和59年度, 54-111.

- TANAKA, N., M. SUGIYAMA and K. OHWADA, 1983: Ecological studies of phytoplankton in Ago Bay with special reference to the relation between growth and salinity. *Bull. Plankt. Soc. Japan*, **30**, 1-10.
- 田中俊次・藤田真吾・杉山元彦・西岡純・中西雅幸, 1977: 1975年10月, 舞鶴湾で発生した *Hemientrepitia antiqua* 赤潮について. 京都府立海洋センター研報, **1**, 94-112.
- 田中義興・川上大和・川辺克己, 1979: 博多湾における *Gymnodinium* '65型種の出現と環境について. 福岡県福岡水試研業報告, 昭和52年度, 171-181.
- 田中豊・垂水共之・脇本和昌, 1984: パソコン統計解析ハンドブック II 多変量解析編, 共立出版, 東京, 16-37.
- TANGEN, K., 1977: Blooms of *Gyrodinium aureolum* (Dinophyceae) in north European waters, accompanied by mortality in marine organisms. *Sarsia*, **63**, 123-133.
- TANGEN, K. and T. BJÖRNLAND, 1981: Observations on pigments and morphology of *Gyrodinium aureolum* Hulbert, a marine dinoflagellate containing 19'-hexanoyloxyfucoxanthin as the main carotenoid. *J. Plankt. Res.*, **3**, 389-401.
- TAYLOR, F.J.R., 1985: The taxonomy and relationships of red tide flagellates. In "Toxic dinoflagellates" (ed. by D.M. ANDERSON, A.W. WHITE and D.G. BADEN), Elsevier, New York, 11-26.
- 寺田和夫, 1987: *Gymnodinium nagasakiense* の昼夜移動について. 福岡県豊前水試研業報, 昭和60年度, 169-170.
- 寺田和夫・池内仁・高山晴義, 1987: 冬季の周防灘沿岸で観察された *Gymnodinium nagasakiense*. 日本プランクトン学会報, **34**, 201-204.
- 寺田和夫・神菌真人, 1986: 昭和59年7月周防灘に発生した *Chattonella* 赤潮について. 福岡豊前水試研報 (昭和59年度), 106-117.
- 寺田和夫・神菌真人・佐々木和之, 1982: 豊前海の赤潮とその発生環境について. 福岡豊前水試研報 (昭和55年度), 91-106.
- 寺田和夫・神菌真人・渡辺昭二, 1981: 豊前海の赤潮発生状況について 第VIII報. 福岡豊前水試研報 (昭和54年度), 87-93.
- THOMAS, W.H. and A.N. DODSON, 1968: Effects of phosphate concentration on cell division rates and yield of a tropical oceanic diatom. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole*, **134**, 199-208.
- THOMAS, W.H. and A.N. DODSON, 1974: Effect of interactions between temperature and nitrate supply on the cell-division rates of two marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, **24**, 213-217.
- TOMAS, C.R., 1978: *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). I. Effects of salinity and temperature on growth, motility and survival. *J. Phycol.*, **14**, 309-313.
- TOMAS, C.R., 1979: *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). III. Uptake and utilization of nitrogen and phosphorus. *J. Phycol.*, **15**, 5-12.
- TOMAS, C.R., 1980: *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). IV. Effects of light intensity and temperature on photosynthesis, and cellular composition. *J. Phycol.*, **16**, 149-156.
- TORIUMI, S., 1976: Cell division in marine *Ceratium*. II. Mitotic behavior and phasing in cell division. *Cytologia*, **41**, 445-452.
- TRIEMER, R.E. and L. FRITZ, 1984: Cell cycle and mitosis. In "Dinoflagellates" (ed. by D.L. SPECTOR), Academic Press, Orlando, 149-179.
- UCHIDA, T., 1976: Excretion of ammonia by *Prorocentrum micans* Ehrenberg in urea-grown culture. *Japan. J. Ecol.*, **26**, 43-44.
- 内田卓志, 1991: 室蘭産 *Scrippsiella trochoidea* の有性生殖. 日水誌, **57**, 1215.
- UYE, S. and K. TAKAMATSU, 1990: Feeding interactions between planktonic copepods and red-tide flagellates from Japanese coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **59**, 97-107.
- VAULOT, D., R.J. OLSON and S.W. CHISHOLM, 1986: Light and dark control of the cell cycle in two marine phytoplankton species. *Exp. Cell Res.*, **167**, 38-52.
- VAULOT, D., R.J. OLSON, S. MERKEL and S.W. CHISHOLM, 1987: Cell-cycle response to nutrient starvation in two phytoplankton species, *Thalassiosira weissflogii* and *Hymenomonas carterae*.

- Mar. Biol.*, **95**, 625-630.
- WALL, D., 1971: Biological problem concerning fossilizable dinoflagellates. *Geoscience and Man*, **3**, 1-15.
- WALL, D., 1975: Taxonomy and cysts of red tide dinoflagellates. In "Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellates" (ed. by V.R. LOCICERO), Mass. Sci. Technol. Found., Massachusetts, 249-255.
- WATANABE, M.M., Y. NAKAMURA, S. MORI and S. YAMOCHI, 1982: Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada from Osaka Bay, Japan. *Japan. J. Phycol.*, **30**, 279-288.
- WATRAS, C.J., S.W. CHISHOLM and D.M. ANDERSON, 1982: Regulation of growth in an estuarine clone of *Gonyaulax tamarensis* Lebour: salinity-dependent temperature responses. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **62**, 25-37.
- WEILER, C.S. and S.W. CHISHOLM, 1976: Phased cell division in natural populations of marine dinoflagellates from shipboard cultures. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **25**, 239-247.
- WEILER, C.S. and R.W. EPPLEY, 1979: Temporal pattern of division in the dinoflagellate genus *Ceratium* and its application to the determination of growth rate. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **39**, 1-24.
- WHITE, A.W., 1976: Growth inhibition caused by turbulence in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax excavata*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **33**, 2598-2602.
- WONG, P.S., 1989: The occurrence and distribution of red tides in Hong Kong-applications in red tide management. In "Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology" (ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier, New York, 125-128.
- 山本千裕・寺井千尋・田中義興, 1989: I 福岡湾海域 1. *Gymnodinium nagasakiense* による赤潮発生と環境。「昭和63年度九州海域赤潮調査報告書(西海ブロック)」(水産庁・福岡県・佐賀県・長崎県・熊本県・鹿児島県・宮崎県), 1-8.
- 矢持 進, 1984: 大阪湾に出現する赤潮鞭毛藻 6種の増殖に及ぼす水温の影響. 日本プランクトン学会報, **31**, 15-22.
- YENTSCH, C.M., F.C. MAGUE, P.K. HORAN and K. MUIRHEAD, 1983: Flow cytometric DNA determinations on individual cells of the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* var. *excavata*. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **67**, 175-183.
- YODER, J.A., 1979: Effect of temperature on light-limited growth and chemical composition of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **15**, 362-370.
- 米田勇一・吉田陽一, 1957: 赤潮の生理生態学的研究-I. 赤潮プランクトンの垂直的移動について(1). 日水誌, **19**, 405-409.
- 吉田陽一, 1980: 赤潮の発生予察。「赤潮-発生機構と対策」(日本水産学会編)水産学シリーズ 34, 恒星社厚生閣, 東京, 90-104.
- 吉田陽一・河口克己, 1983: *Chattonella antiqua* (Hada) Ono の浮上性および走光性. 日本プランクトン学会報, **30**, 11-19.
- 吉松定昭・小野知足・藤沢節茂, 1985: 1982年備讃瀬戸西部海域に発生した *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮. 香川赤潮研報, **1**, 17-27.
- 吉松定昭・小野知足, 1986: 播磨灘南部での赤潮生物および鞭毛藻類の季節的消長. 香川赤潮研報, **2**, 1-42.
- ZINGMARK, R.G., 1970: Sexual reproduction in the dinoflagellate *Noctiluca milialis* Suriray. *J. Phycol.*, **6**, 122-126.