

## 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* に関する生理生態学的研究 - *H. circularisquama* の毒性および貝類斃死機構の解明

松山幸彦\*

### Physiological and ecological studies on harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* - Clarification on toxicity of *H. circularisquama* and its mechanisms causing shellfish kills

Yukihiko MATSUYAMA\*

**Abstract** *Heterocapsa circularisquama* Horiguchi (Dinophyceae) is a causative agent of red tide organism, appeared in 1988 in first time and then rapidly dispersed off the coastal waters of western Japan. The red tide due to *H. circularisquama* was associated with massive killing of commercially important bivalve species: pearl oyster *Pinctada fucata martensii*, Pacific oyster *Crassostrea gigas*, manila clam *Ruditapes philippinarum*, blue mussel *Mytilus galloprovincialis*, etc. Until 2000, 31 cases of *H. circularisquama* red tide (including 16 incidences leading to fisheries damage) had been recorded in western Japan. Economic losses in shellfish aquaculture by direct killing of marketable products were estimated about at least 10 billion-yen in the last decade. Although the recurrent blooms of *H. circularisquama* had damaged the shellfish aquaculture, no harmful effects on wild and cultured finfish, other marine vertebrates, and public health hazard were recorded. Therefore, this phenomenon is referred to as "novel red tide." The red tide due to *H. circularisquama* has devastates shellfish aquaculture in most of the region, in terms of mass mortality in farming organism, cost of measures to prevent the damage, adversely affects the development of shellfish aquaculture, and secondary damage, i.e. decline of demand due to misinformation. Incidence of this species has increased recently, and the economic losses in aquaculture have been a cause for concern for the industry and society. In the present study, mechanism of damage caused to shellfish aquaculture, toxicity of the organism were conducted, in order to clarify the mechanism to be causing shellfish death due to *H. circularisquama* red tide.

In field observations, pearl oysters exposed to 4,000-6,000cells/mL of *H. circularisquama* resulted in death within several days although the level of dissolved oxygen was not critical for their survival. The dead individuals were characterized by various negative symptoms: valve closure, marked shrinkage of the mantle, decrease of glycogen lobe attached to the mantle, gut discoloration, cardiac disorder, paralytic etc.. The symptoms caused by the *H. circularisquama* exposure clearly showed a potent cytotoxic effect on bivalve physiology. The consist cytotoxicity to the bivalve molluscs was also confirmed in laboratory-reared experiment. Further, laboratory exposure experiments revealed that various marine animals such as bivalves, gastropods, ascidians, jellyfish, ciliates, and some naked phytoflagellates are affected by *H. circularisquama* unlike vertebrates, crustaceans, starfish, and sea urchins, and mouse.

2003年6月26日受理 (Received on June 26, 2003)

水産総合研究センター業績 A 第41号 (Contribution No. A 41 from the Fisheries Research Agency)

\* 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5, Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima, 739-0452, Japan)

According to survival experiments using various culture condition of *H. circularisquama*, toxicity of *H. circularisquama* on the mussel were increased in the high water temperature and high salinity culture conditions, but markedly decreased in nitrogen-limited conditions. These results suggested that toxicity of this dinoflagellate was considerably affected by environmental conditions in nature. Further, comparative studies on toxicity of *H. circularisquama* cells showed that toxicity of this algae clearly varied among strains which isolated from various localities in Japan.

The toxicity of *H. circularisquama* to bivalves molluscs was clearly mediated by a chemical agent. The toxic effect of *H. circularisquama* on bivalves was not due to extracellular metabolites, cell exudates, and "naked cells" prepared by sonication and centrifugation. Furthermore, SDS (sodium dodecyl sulfate), triethanolamin, and trypsin treatments were found to decrease drastically the toxicity of *H. circularisquama* cells. The metabolism inhibitor for protein and glycochains also reduced the toxicity of *H. circularisquama*. Therefore, labile glycoprotein-like complex localized on the cell surface of *H. circularisquama* presumably exerts a detrimental effect on bivalves. Furthermore, *H. circularisquama* did not affect on the anterior byssus retractor muscle of the mussel *M. galloprovincialis* but significantly affects on the radula retractor muscle of rapa whelk *Rapana venosa*, having various chemical receptors against peptide and other related substances. These results indicated that *H. circularisquama* does not synthesize monoamines such as dopamine and acetyl-cholin, alternating bivalve physiology. Some bivalve species resulted in gill damage and cardiac disorder in early periods of the exposure experiment. Histological study on manila clam exposed to *H. circularisquama* demonstrated that marked collapse of the mitochondria and muscle fiber occurred in several minutes. This is considered as a potential factor causing short-term death in shellfish species. Further, *H. circularisquama* showed lethal effects on the early stage of bivalve species. Exposure of *H. circularisquama* to non-fertilized eggs of bivalve causes rapid collapse of vitelline envelope of eggs. These results indicated that a receptor destroying enzyme or related substances in the cell surface of *H. circularisquama* is the causative agent of shellfish kills. Further, affected larval stage of *R. philippinarum* by the *H. circularisquama* showed drastic increases of intracellular calcium concentration. Therefore, detrimental effects of *H. circularisquama* cells to the targeted organs (gills and mantle etc) led significant increases the concentration of intracellular calcium at critical level, that is probably brought about collapse of bivalve homeostasis.

The toxicity of *H. circularisquama* can easily be lost by the simple mechanical disturbance such as centrifugation of their cells. Further, the toxicity of *H. circularisquama* cells has been dropped by gentle treatments of SDS (sodium dodecyl sulfate), triethanolamine, and trypsin. These detoxicated cells are readily cleared by the filter-feeding bivalve without any negative responses. Therefore, physiological and chemical treatments can be applied to prevent the detrimental effect of *H. circularisquama* in the future. However, widespread application of these procedures for marine environments may exert a secondary harmful effect on other valuable aquatic organisms. It is necessary to improve the economically cost and to assess risk management. Biological control of *H. circularisquama*; i. e. diatoms growth promoting due to silicate conditioning in coastal waters and clearances of *H. circularisquama* cells by other filter-feeder such as dense population of ascidians is likely to be low cost and environmentally acceptable technique for mitigation in the future.

**Key words:** *Heterocapsa circularisquama*, dinoflagellate, bivalve, mortality, toxicity

---

## 目 次

第1章 序 論	第5章 H. circularisquama の毒性物質の性状
第2章 Heterocapsa circularisquama 赤潮の発生および貝類に対する漁業被害の概要	第1節 H. circularisquama の毒性の生化学的解明
第1節 本邦におけるH. circularisquama の赤潮発生状況および貝類斃死事例	第1項 H. circularisquama の毒性物質抽出の試み
第2節 H. circularisquama 以外の生物を原因とする赤潮による貝類斃死事例	第2項 抽出操作法によるH. circularisquama の毒性変化
第3章 現場におけるH. circularisquama 赤潮が二枚貝に及ぼす影響	第3項 H. circularisquama の毒性物質の効率の抽出法の検討
第1節 英虞湾におけるアコヤガイ斃死状況と環境要因	第4項 間接的手法によるH. circularisquama の毒性物質の推定
第2節 広島湾における二枚貝斃死状況と環境要因	第2節 H. circularisquama による二枚貝斃死機構の解明
第4章 H. circularisquama 培養株を用いた二枚貝類等への影響評価	第1項 貝類組織を用いた生物検定
第1節 各種二枚貝の生残・ろ水率に及ぼすH. circularisquama の影響	第2項 二枚貝成体に対する影響の組織学的検討
第2節 環境要因がH. circularisquama の致死活性に及ぼす影響	第3項 二枚貝幼生を用いた生物検定
第3節 H. circularisquama の毒性の地域間比較	第6章 H. circularisquama 赤潮の被害防止
第4節 H. circularisquama が各種海産生物等に及ぼす影響	第1節 H. circularisquama の物理化学的処理による被害防除
	第2節 生物学的手法によるH. circularisquama の制御
	第3節 H. circularisquama に対する耐性獲得能
	総 括
	謝 辞
	引用文献

## 第1章 序 論

赤潮 (red tide) とは、海水中のプランクトンが多量に増殖し、海水の色調変化を引き起こす現象を総称する。赤潮は単なる海水の着色を伴うだけでなく、通常観察されない種々の異常現象を引き起こすことも知られている。最も良く知られているのが発光現象である。赤潮を引き起こす植物プランクトンの中でも、「渦鞭毛藻」は生物発光 (bioluminescence) 能力を有している種類が多数知られている (Schmitter *et al.*, 1976; Sweeney, 1987; 小泉ら, 2001)。ヤコウチュウ *Noctiluca scintillans* は代表的な発光性渦鞭毛藻であり、春先から初夏にかけて日本沿岸で赤潮を形成する。夜間になると渚に打ち寄せる波や船の航跡、魚影に沿って独特の青白い発光が観察できる。また、アメリカインディアンは夜砂浜を眺め、渚に打ち寄せる波が発光する時は二枚貝を食べないよう習慣づけられていた (Quayle,

1969)。これは現在この地で多発して問題となっている有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* のブルームを監視する上で実に単純かつ効果的なモニタリング手法であったと言える。

赤潮発生に伴う異常現象が、海水の着色や発光現象を引き起こす程度で留まれば何ら問題はない。しかし、残念ながら、赤潮は我々人類活動にとって実に様々な問題を引き起こして社会的・経済的な損失を引き起こす。特に水産業から見た場合、水生生物に毒性を示すプランクトンを原因とする赤潮は、養殖魚介類などの大量斃死現象を引き起こして甚大な漁業被害を及ぼす。また、人体に有毒な生物毒を有したプランクトンの場合、その毒成分が食物連鎖を通じて濃縮され、それらを消費した人間や海産ほ乳類に中毒を引き起こすことも知られている。また、無害な生物であっても、魚介類の鰓などを物理的に閉塞したり傷つけることで生理的な悪影響を及ぼしたり、プランクトン自身が死

滅する過程で貧酸素や硫化水素の生成を引き起こして二次的な被害を及ぼすこともある。

赤潮による漁業被害は西川（1901）および西川（1903）あたりから記録が見られ始め、岡村（1916）や尾田（1935）においても詳細な報告がなされている。多くは当時主要な産業であった真珠（アコヤガイ）養殖業に対する影響を述べたものである。これらの記録の中で、沿岸性の天然魚介類の斃死も幅広く観察されている。その後戦中・戦後赤潮に関する学術調査は一旦見られなくなったものの、1950～1960年代以降赤潮が日本沿岸で頻発するようになる。Fig. 1に示すように、瀬戸内海における赤潮発生件数は、戦後の高度経済成長と富栄養化の進行とともに増加し、1950～1960年代以降赤潮の発生頻度が増加し、1970年代の中頃にピークを迎えた。赤潮は当時急速に発展していた魚類養殖業を直撃し、特に1970年代に瀬戸内海で頻発した*Chattonella*赤潮は、その強い魚毒性のためハマチ養殖業に甚大な漁業被害を及ぼした（岡市、1996；岡市、1997）。真っ赤に帯状に広がる赤潮、生け簀表面に斃死・腐乱したハマチが累々と横たわる映像、処理に追われる養殖業者の苦悩の表情が新聞やテレビなどのメディアを通じて発信され続け、大きな社会的問題を引き起こした（岡市、1996）。

その後、瀬戸内海環境保全臨時措置法の恒久化や工場排水のCOD規制及び無リン洗剤の普及など取り組みが積極的に行われてきた結果、赤潮発生件数は1974年以降急激に減少を続け、現在は年間90件程度と最盛期の1/3にまで減少している。また、Fig. 1下段に示したように、赤潮による漁業被害も1970年代のピーク時に比べれば発生件数同様減少傾向にある。赤潮の発生件数や漁業被害が低下している一方で、近年になって赤潮を構成する種の遷移現象が見られるようになった。特に、1970年代から1980年代にかけて猛威を振って

た*Chattonella*属の出現が急激に減少し、これにともなって漁業被害の発生も散発的になってきている（Fig. 2）。これに代わって、近年は渦鞭毛藻*Karenia mikimotoi* (= *Gymnodinium* type65', *Gymnodinium nagasakiense*, *Gymnodinium mikimotoi*)の赤潮が全体の50～90%を占めるまでに至っている。こうした種の遷移現象は特に1980年代後半から顕著である（本城、松山、2000）。

さらに、この10年間は、これまでほとんど知られていなかった生物による赤潮も頻繁に見られるようになってきた。その代表的な生物が、1988年以降西日本沿岸で猛威を振っている渦鞭毛藻*Heterocapsa circularisquama* Horiguchiによる赤潮である。本種の電子顕微鏡写真をFig. 2に、現場の赤潮写真をFig. 3に示した。本種の赤潮が水産生物に与える影響は極めて特異である。1970年代以降多発した赤潮生物、たとえば*Chattonella*属や*K. mikimotoi*の赤潮においては、漁業被害を受けたのは、ハマチを中心とした養殖魚類であった。二枚貝類は赤潮終期に時折発生する貧酸素水塊による影響を除けばほとんど被害を受けず、一般的に「二枚貝は赤潮では死なない」というのが多くの漁業者の常識であった。ところが、*H. circularisquama*の赤潮はこれまでの赤潮種と異なり、二枚貝や巻貝だけを特異的に斃死させ、魚類等には全く影響を及ぼさない（吉松ら、1990；山本、田中、1990；松山ら、1995；吉田、宮本、1995；Matsuyama *et al.*, 1996；松山ら、1997；江藤ら、1998；Matsuyama, 1999）。本来赤潮に強いはずの貝類が赤潮で次々と死んで行く現象はこれまで全く知られておらず、関係者を驚かせた。

1992～1999年の間、本種の赤潮（Fig. 1参照）発生件数は年間5～7件であり、まだ全体の赤潮発生件数に占める割合は少ないものの、この7年間の累計の漁業被害は判明しているだけでも100億円近くに達するな

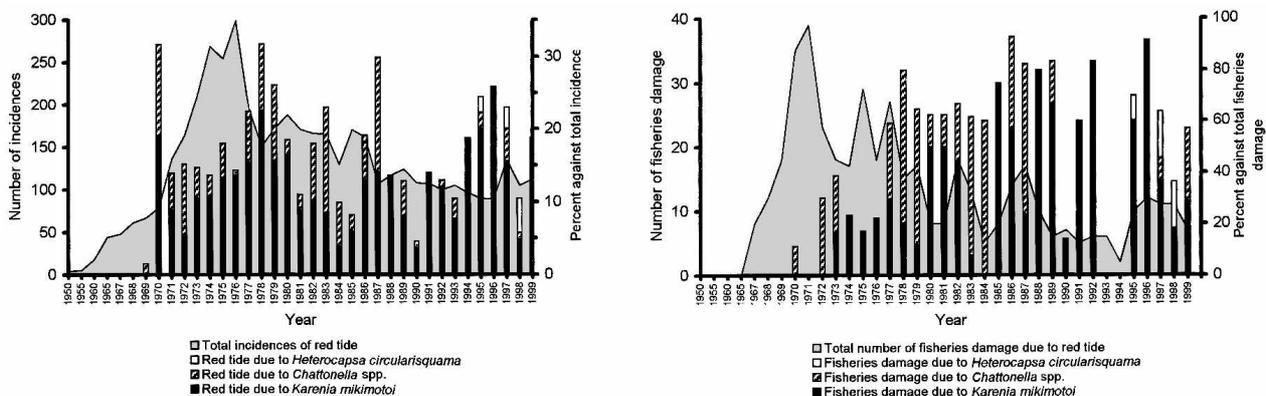


Fig. 1. Temporal changes of red tide incidences and the associated fisheries damage in the Seto Inland Sea, Japan. Left: number of red tide. Right: number of fisheries damage.

ど、同じ期間に発生した*K. mikimotoi*の赤潮による被害額を遙かに超える漁業被害を引き起こしている。特に全国第2位の生産高を誇る英虞湾の真珠養殖業、全国シェアの50%前後を占める広島湾のカキ養殖、あ

るいは熊本県や福岡県のアサリ養殖業など、本邦の主要な二枚貝の産地で*H. circularisquama*が毎年のように猛威を振るい (Fig. 4), 二枚貝養殖産業は危機的状況に置かれていると言える。実際にこうした海域で

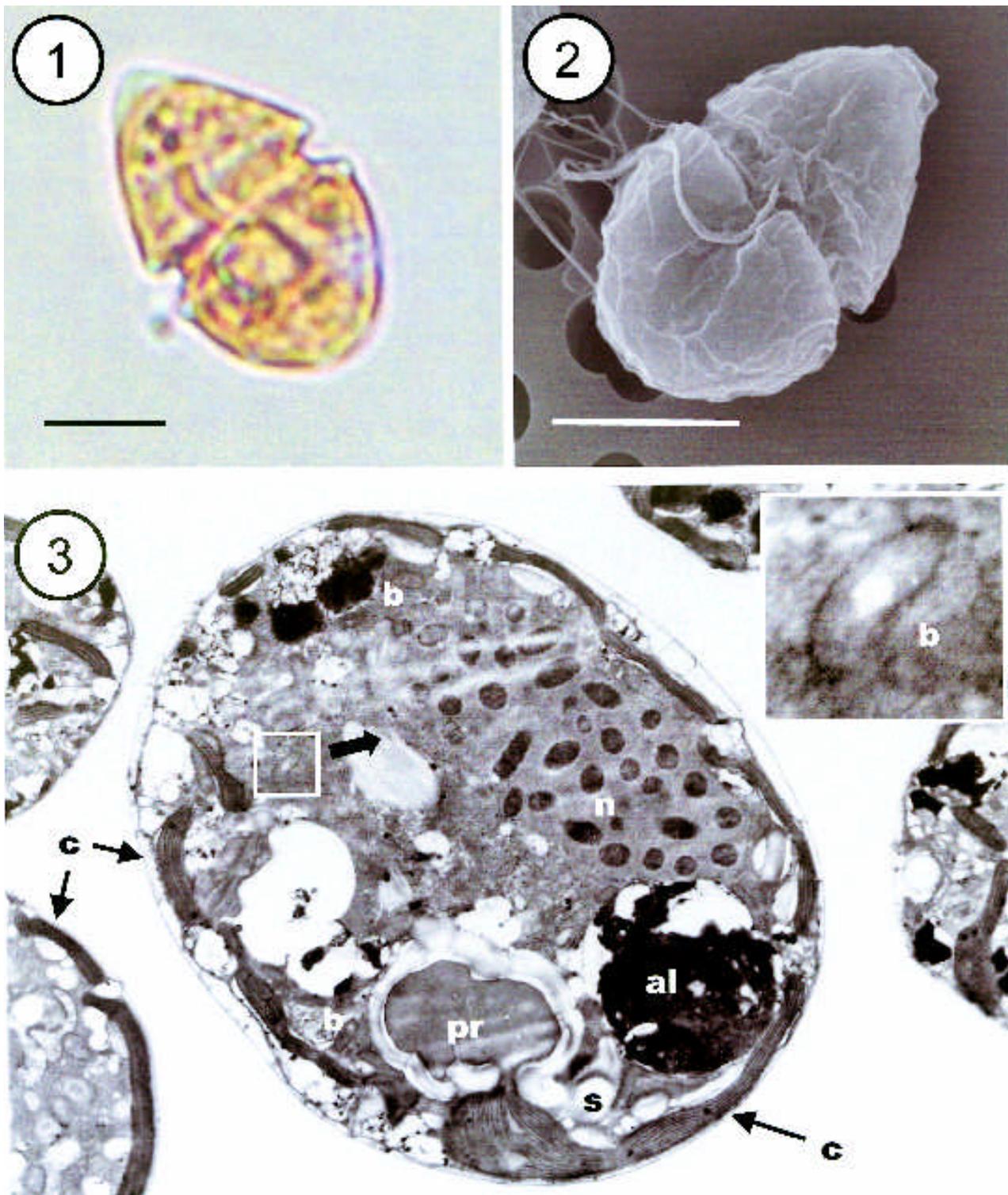


Fig. 2. Light and electron micrographs of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* Horiguchi. 1: Light micrograph (Scale bars = 10  $\mu$  m). 2: Scanning electron micrograph (Scale bars = 5  $\mu$  m). 3: Transmission electron micrograph. autolysosome (al), chloroplast (c), endosymbiosis (b), nucleus (n), pyrenoid (py), starch grain (s).

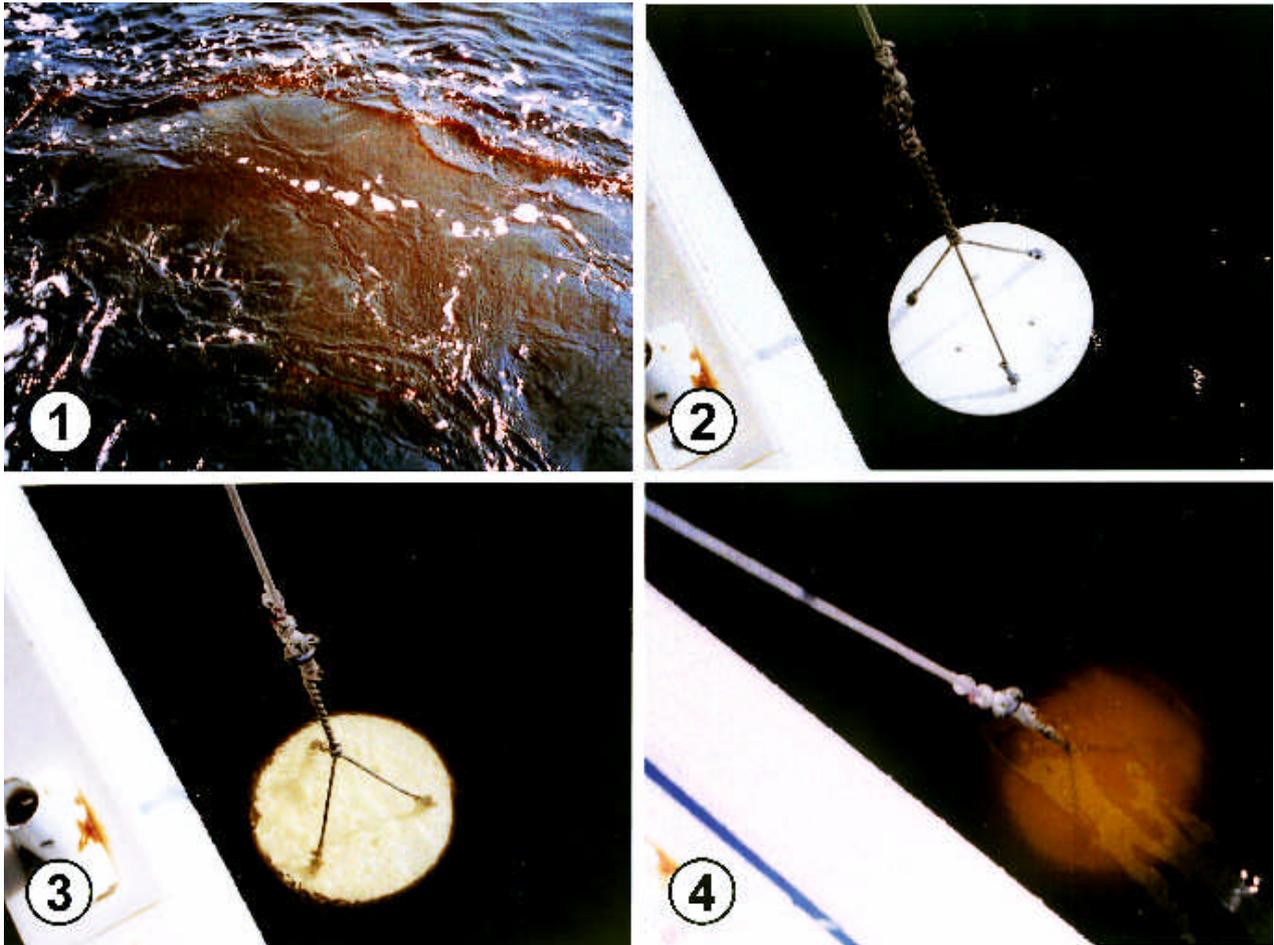


Fig. 3. The red tide of the *Heterocapsa circularisquama* occurred in Etajima Bay, a small branch of the Hiroshima Bay, in September 1997

はたび重なる赤潮のため、避難作業による過労が重なったことによる死亡事故、養殖員の損失あるいは風評被害によって甚大な人的・経済的損失を受けている。二枚貝養殖は基本的には粗放的な無給餌養殖業であり、魚類養殖などで赤潮対策の柱とされている「餌止め」ができない。このため、漁業被害対策は避難や早期出荷を呼びかけるだけで、抜本的な対策は手詰まり状態であり、頻発海域では度重なる経済的損失と不安定な将来展望のため廃業に追い込まれる生産漁業者も多い。さらには、加工・流通にたずさわる裾野産業従事者の深刻な雇用問題も引き起こし、地域の経済力低下・過疎化に拍車をかけている。

1990年代以降、*H. circularisquama* 以外にも、*Chattonella verruculosa* や *Karenia digitata* (= *Gyrodinium* sp. 伊万里型)、*K. longicanalis* (*Gyrodinium* sp. 忠武型)などの「新興赤潮生物」が近年突発的に赤潮を形成し、魚類等に多大な被害をもたらしている(山本、田中、1990; 馬場ら、1997; Yang *et al.*, 2001a; 2001b; 宮本ら、2001)。赤潮生物に限ら

ず、有毒渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* あるいは *Alexandrium tamiyavanichii*による貝類毒化も1990年代に入って頻発に発生するようになった(西岡ら、1993; 馬場ら、1995; Takatani *et al.*, 1998; 小谷、坂本、1998; Matsuyama *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2002)。このように、*H. circularisquama* を中心に、これまでほとんど知られていなかった新興赤潮生物の出現による漁業被害の発生はきわめて深刻な問題である。こうした新興赤潮生物による被害は、日本以外の国々でも近年問題となっている(Smayda, 1990; Rosenberg *et al.*, 1988; Burkholder *et al.*, 1992)。アメリカ東岸では、1980年代後半から小型のハプト藻 *Aureococcus anophagefferens*による赤潮(いわゆる brown tide)が頻発し、ホタテガイやムラサキガイの養殖業が壊滅的な被害を受けている(Shumway, 1990; Bricelj and Lonsdale, 1997)。さらに、東部海岸では新属新種の渦鞭毛藻 *Pfesteria piscicida*の赤潮が発生するようになり、発生海域に生息するほとんどすべての水生生物が死滅するという(Burkholder *et*



Fig. 4. Photographs of dead shellfish species during *Heterocapsa circularisquama* red tide. 1: Kochi News Paper reported a red tide and associated catastrophic death of farming manila clam *Ruditapes philippinarum* in Uranouchi Bay, 1988. 2-3: Dead pearl oyster *Pinctada fucata martensii* in Ago Bay, 1992. 4-5: Dead shellfish: mussel *Mytilus galloprovincialis*, razor clam *Solen strictus*, manila clam *R. philippinarum* etc. due to red tide of *H. circularisquama* (Fukuoka Bay, 1989, photograph is provided by Y. Tanaka) in Fukuoka Bay, 1989. 6: Dead manila clam in Hiroshima Bay, 1998. 7: Dead mussels *M. galloprovincialis* in Hiroshima Bay, 1998.

al., 1992)。本種は24型もの生活史を有していて、一部は動物組織内に zoospore の状態で寄生するなど (Burkholder *et al.*, 1995), これまでの常識を大きく覆すような赤潮生物である。また、1980年代後半からヨーロッパにおいて発生しているハプト藻 *Chrysochromulina polylepis* の赤潮では、魚類、貝類、植物プランクトン、および大型海藻が直接被害を受け、餌不足で免疫力が低下したアザラシがウィルスに感染して大量に斃死するという現象まで引き起こしている (Osterhaus, 1988; Osterhaus and Vedder, 1988; Kennedy *et al.*, 1988; Eis, 1989)。

1988年以降日本沿岸で大発生し、二枚貝養殖業に甚大な被害を及ぼしてきた *H. circularisquama* の赤潮発生と環境要因との関連を現場調査に基づいて明らかにする「発生機構の解明」については既に水産総合研究センター研究報告7号に としてとりまとめた (松山, 2003)。一方、なぜ本種の赤潮により貝類だけが選択的に漁業被害を受けるのかは依然不明である。*H. circularisquama* 赤潮による最初の漁業被害が生じて既に13年が経過し、現場海域において *H. circularisquama* 赤潮の被害防止技術の開発が緊急に求められているが、系統だった調査・研究はほとんど行われていないのが現状である。

以上述べてきた背景から、本論文は *H. circularisquama* の赤潮について、特に二枚貝類に対する毒性発現機構を、生化学的・細胞生理学的観点から明らかにする「毒性発現機構の解明」に重点をおいて実施した研究結果をとりまとめたもので、全6章から構成されている。これまで述べてきた第1章に続き、第2章では西日本海域における *H. circularisquama* 赤潮の発生状況と漁業被害の状況を概説し、研究を取り巻く背景を明らかにすることとした。第3章においては、赤潮発生期の現場における貝の斃死状況を英虞湾と広島湾を中心に、天然の赤潮藻体を用いて解析し、赤潮が貝に対する影響を様々な観点から検証した。第4章では、現場における貝の斃死状況に基づいて、培養株を使った暴露実験を行い、海域における二枚貝の斃死が室内実験でも再現できるか、またどのような環境項目が毒性に影響を及ぼすかについて考察した。さらに第5章では生化学的・細胞生理学的観点から *H. circularisquama* 自身が有すると考えられる毒性物質の性状解析や、貝の生理状態に及ぼす影響を評価し、二枚貝の斃死機構を解明することで被害防止策の開発に資する知見を得ることとした。第6章では、以上のような成

果を総括すると同時に、*H. circularisquama* による漁業被害防止技術の確立についても論じた。

## 第2章 *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の発生および貝類に対する漁業被害の概要

### 第1節 本邦における *H. circularisquama* の赤潮発生状況および貝類斃死事例

*H. circularisquama* は1995年に新種として記載された新しい赤潮生物である。本種の赤潮とそれによる漁業被害についてまとまった資料が存在しないことから、ここでは本邦における *H. circularisquama* 赤潮の発生状況および漁業被害の現状を、既存の資料等を基に整理した。また、漁業被害の特徴についても既存の赤潮種と比較検討した。

#### 材料および方法

*H. circularisquama* 赤潮発生による漁業被害の状況については、水産庁漁場資源課、瀬戸内海漁業調整事務所および九州漁業調整事務所がそれぞれとりまとめている資料を基に、既報の文献、各県水産試験場や漁業協同組合等の関係機関から直接提供いただいた資料も加えてとりまとめた。とりまとめは基本的にそれぞれの海域、内湾、入り江(浦)単位で整理したが、海洋学的に不可分な場合(例えば、福岡県から大分県にかけての豊前海など)は同一海域としてまとめて整理した。とりまとめは2000年12月までの資料を用いた。なお、*H. circularisquama* が新種として報告される以前の種査定については、松山(2003)を参考に精査した。

#### 結 果

Fig. 5およびTable 1に本邦における *H. circularisquama* の発生状況を示す。現存する資料等から、これまでのところ1988年9月に高知県浦ノ内湾における赤潮発生が本邦における *H. circularisquama* 発生の第一例であると判断された。この1988年の浦ノ内湾における赤潮で、本邦第一例の漁業被害が発生している(吉松ら, 1990<sup>\*1</sup>; 高岡高等学校, 1988)。被害を受けたのはアサリで、推定150トンの斃死が認められている(村田, 私信)。1988年の赤潮は9月上旬の湾外水の差し込み現象(宗景ら, 1991)の直後に *H. circulari-*

\*1 吉松定昭, 松本紀男, 田中義興, 山本千裕, 村田 宏, 森山貴光, 本城凡夫, 1990: 漁業被害を伴う新しい赤潮形成種(ラフィド藻第1種と渦鞭毛藻第1種)について, 平成2年度日本水産学会春季大会講要, p.158.

*squama* 赤潮が発生している。このため、漁業被害が赤潮による直接の漁業被害なのか、差し込み現象による湾奥底層の貧酸素水塊の湧昇による酸欠の影響なのか区別することは困難である。ただアサリ漁場のように潮間帯にまで貧酸素水塊の影響が及ぶことは希であると判断されるので、基本的には*H. circularisquama*による漁業被害と判断するのが妥当であろう。1988年以前については、1930年代の論文で*Heterocapsa* sp.によってアコヤガイが大量斃死したという記載があるものの、詳細な資料が入手できなかったため*H. circularisquama*であったかどうか断定することはできなかった。

*H. circularisquama*は小型で形態的には沿岸域に普遍的に分布している*Scrippsiella trochoidea* (Stein) Loeblich に酷似しているため、仮に1988年以前に存在していても見逃されてきた可能性も考えられる。しかし、1960年以降精力的に取り組みられてきた本邦産鞭毛藻の分類において全く記載されてこなかったこと、また、小型有殻渦鞭毛藻による赤潮とそれに伴う貝類の大量斃死が1988年以前にはほとんど報告されていないことを考慮すると、*H. circularisquama*は近年になって急速に台頭してきた生物であると考えられる。

また、有毒渦鞭毛藻*Alexandrium*属では、同じ属の中で有毒な種と無毒な種が混在していることが知られ

ている(例えば, Higman *et al.*, 2001)。 *H. circularisquama* 以外の*Heterocapsa* 属の毒性については現在の所不明である。ただし、第4～5章で述べるように、本邦沿岸で冬期に発生する*H. triquetra* Steinについては貝類に対して全く害作用を有していない。また、*H. circularisquama*の赤潮海域には、時折他種*Heterocapsa*属(*H. lanceolata* Iwataki and Fukuyo, *H. horiguchii* Iwataki, Takayama and Matsuoka, *H. rotundata* (Lohmann) Loeblichと類推される種)が出現することが知られている(Iwataki *et al.*, 2002a, 松山, 2003)。前2種については、広島湾で発生したブルーム海水と培養株を用いた予備的な試験で、アサリやムラサキガイに対する毒性が無いことを確認している(松山, 未発表)。 *H. circularisquama*に最も形態的に類似していると言われる*H. illdefina* Herman et Sweeney (Horiguchi, 1995)の本邦における分布や貝類に対する毒性については全く不明である。いずれにしても*Heterocapsa*属は小型で分類の指標となる殻板が薄く観察が容易でないこと、鱗片や細胞内構造など透過型電子顕微鏡を用いた査定が必要なことから、分類学的査定が遅れた状態にある。従って、詳細については今後さらに検討が必要である。

次にTable 2に*H. circularisquama*の赤潮による漁業被害の一覧を示す。漁業被害は全16件発生しており、

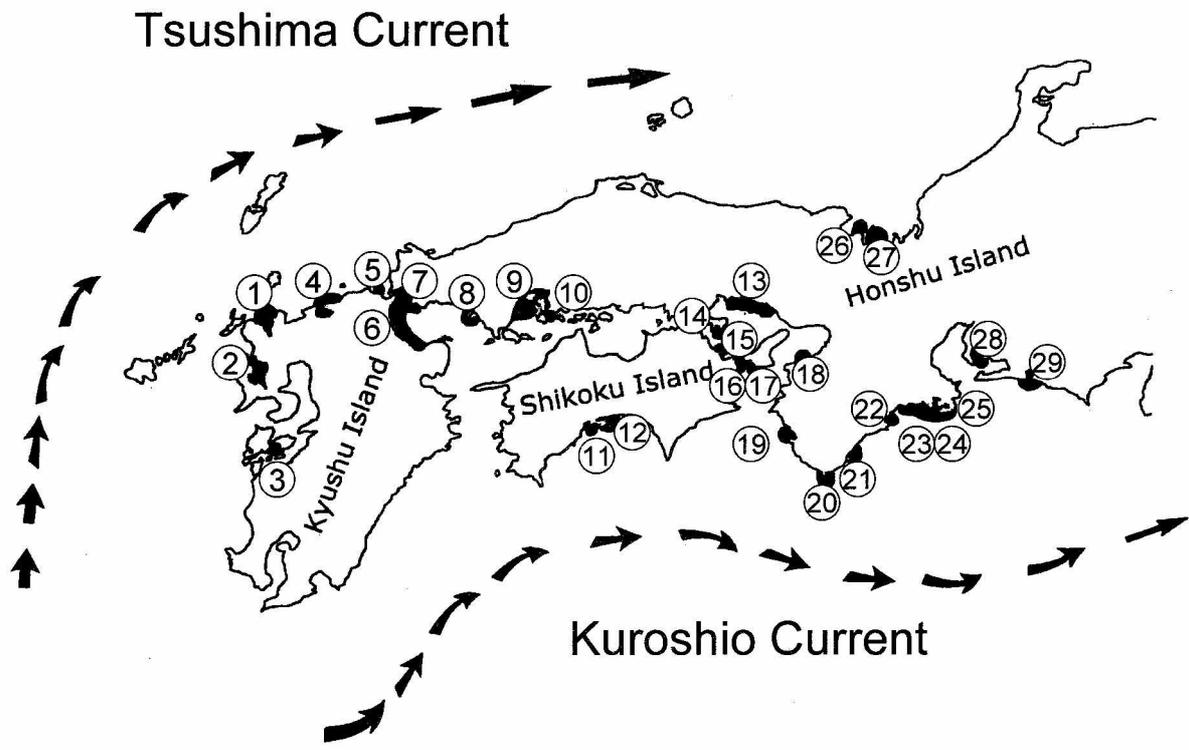


Fig. 5. Occurrences of *Heterocapsa circularisquama* in the western Japan. Numbers in the map are referred to Table 2

Table 1. Record of *Heterocapsa circularisquama* blooms in western Japan

No.	Location	Prefecture	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
1	Imari Bay	Saga	-	-	-	?	-	-	-	?	-	-	-	61	310
2	Omura Bay	Nagasaki	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	2,884	3
3	Kusu-ura Bay	Kumamoto	-	-	-	-	-	-	250,000	60	-	-	-	-	-
4	Fukuoka Bay	Fukuoka	-	26,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	113	186
5	Wakinoura Port	Fukuoka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,180	-
6	Buzen Sea	Fukuoka, Oita	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,000	7,000	1,000	600
7	Suo-nada	Yamaguchi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,930	36,000	1	1
8	Kasado Bay	Yamaguchi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
9	Hiroshima Bay	Hiroshima	-	-	-	-	-	-	-	9,000	0.009	51,200	30,000	1,000	-
10	Okunouchi Bay	Hiroshima	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,000	2,500	3,000	-
11	Nomi Bay	Kochi	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
12	Uranouchi Bay	Kochi	8,820	-	-	-	-	-	-	3	-	2,360	5	5,320	72
13	Harima-nada	Hyogo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
14	Uchinoumi	Kagawa	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	0	31	335
15	Harima-nada	Kagawa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Uchinoumi	Tokushima	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	3,300	1	-
17	Fukura Bay	Hyogo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,920	-
18	Osaka Bay	Osaka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Tanabe Bay	Wakayama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	224
20	Kushimoto Port	Wakayama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
21	Urakami Inlet	Wakayama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34
22	Hiketa Bay	Mie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
23	Aso Inlet	Mie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	630	20
24	Gokasyo Bay	Mie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	260	-
25	Ago Bay	Mie	-	-	-	-	87,420	980	55,800	5,000	20,000	3,850	0.01	3,860	3,056
26	Maizuru Bay	Kyoto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	990	-	-
27	Obama Bay	Fukui	-	-	-	-	-	-	-	-	-	79,200	4,588	612	35
28	Chita Bay	Aichi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,000
29	Lake Hamana	Shizuoka	-	-	-	-	-	9,950	-	-	-	-	-	-	-

The data represent maximum cell density (cells/mL) during the bloom periods and denotes the associated fisheries damage

被害はすべて二枚貝と巻貝類で占められている。ハマチやマダイといった魚類,あるいはエビやカニなどの甲殻類の被害は全く報告されていない。貝類養殖の場合,正確な生産量や自然斃死率の取り扱いが難しく,被害額が正式に算出された例は少なく,ほとんどが不

明として取り扱われている。しかし,斃死率と養殖規模から推定した過去の被害総額は,アコヤガイで30~50億円,マガキで40~50億円,アサリで数億円規模にのぼると推定された。1972年以降, *Chattonella* 属による被害総額が200億円前後, *Karenia mikimotoi* に

**Table 2.** Records of shellfish species damage due to *Heterocapsa circularisquama* red tide in western Japan

Date	Shellfish species affected	Notes	Occasion	Reference
1988	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1560 ton losses	Uranouchi Bay	Yamamoto and Tanaka (1990)
1989	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Mactra chinensis</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Solen strictus</i>	mass mortality	Fukuoka Bay	
1992	<i>Pinctada fucata</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Chlamys nobilis</i>	30-90% mortalities loss of > 18 million individuals mass mortality	Ago Bay	Matsuyama <i>et al.</i> (1995)
1993	<i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Crassostrea gigas</i>	50-90% decrease of harvest mass mortalities	Lake Hamana	
1994	<i>Pinctada fucata</i>	40-90% mortalities in areas with extensive assemblages	Ago Bay	Matsuyama <i>et al.</i> (1996)
1994	<i>Pinctada fucata</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Solen strictus</i> <i>Mactra veneriformis</i> <i>Musculista senhousia</i> <i>Anomalocardia aquamosus</i> <i>Dosinorbis japonica</i> <i>Glossaulax didyma</i>	mean 65.4% mortality in 2 years old individuals mean 69.5% mortality, 100 ton losses mass mortality	Kusu-ura Bay	Yoshida and Miyamoto (1995)
1995	<i>Pinctada fucata</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i>	5-36% mortality 36-68% mortality, 610 ton losses > 70% mortality, 210 ton losses 10-55% mortality	Ago Bay Hiroshima Bay	Matsuyama <i>et al.</i> (1997)
1996	<i>Pinctada fucata</i>	mass mortality losses of 1.5million individuals	Ago Bay	
1997	<i>Pinctada fucata</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Sulculus diversicolors</i>	mass mortality mass mortality in spat and adult 75% mortality in assemblage area mortality in natural population	Obama Bay Hiroshima Bay	
	<i>Ruditapes philippinarum</i>	210 ton losses	Buzen Sea	Etoh <i>et al.</i> (1997)
	<i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Mactra veneriformis</i>	50% decrease of spat yield considerable mortality	Suo-nada	
1998	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Atrina pectinata</i>	30-98% mortality ca. 5,000 ton losses 50-90% mortality considerable mortality	Hiroshima Bay Suo-nada	
1999	<i>Haliotis discus</i>	5,100 individuals dead	Wakinoura Port	

The data sets were obtained from Fishery Regulation Office, Fisheries Agency of Japan

よる被害総額が100億円前後といわれているだけに、*H. circularisquama* による漁業被害はこれらと並び甚大であることがわかる。生産単価や養殖規模でみると貝類は魚類よりもかなり低いことを考慮すれば、貝類養殖業だけで100億円近い漁業被害というのは当該生産業者にとっては深刻である。

被害を受けた二枚貝は全12種、巻貝は全4種に及ぶ。西日本海域で養殖対象種となっているアコヤガイ、アサリ、マガキは常に被害を受けており、非養殖対象種であるムラサキガイも常に斃死が確認されている (Fig. 4 参照)。

*H. circularisquama* 赤潮によって被害を受けた二枚貝は、軟体部が消失して殻だけの状態になったものがほとんどである。アサリやマテガイなどは干潟表層に突出した状態で斃死するため、殻が潮汐によって波打ち際に寄せられて集積する (Fig. 3 参照)。*H. circularisquama* 赤潮によって大量斃死が起これば、腐敗した軟体部が海底に沈降して底質を悪化させるだけでなく、残存した殻の処理に多大な労力と費用を要する。従って、養殖業者にとっては養殖生物の損失という直接被害だけでなく、漁場悪化や事後処理にかかる費用等が大変な負担となるため、翌年以降の操業にも影響を及ぼすことが多く、場合によっては廃業に追い込まれる業者も多い。また、赤潮発生に伴う風評被害も深刻である。特に、情報伝達者のミスリーディングや消費者の誤解 (貝毒との混同) のため、赤潮発生直後に水産物の一時的な買い控え、流通段階での価格下落やそれに便乗した仲買人による「買ったたき」が生じることも多い。また、需要の低下や価格下落等は加工など裾野産業従事者の雇用問題に直結するため、地方での零細な産業形態が多い貝類養殖業では、地域の経済力の地盤沈下に拍車をかけることにもなる。通常こうした風評被害やそれに伴う流通・加工段階での経済的損失は統計学上算出されることは少ない。しかし、赤潮の影響を受けていない商品についてもその影響が波及すること、影響が被害を受けた年以降も継続する危険性があることを考慮すると、生産現場における直接被害以上に深刻であることが多い。こうした影響も含めると *H. circularisquama* による被害は広範囲でかつ甚大なものとなっている。

## 第2節 *H. circularisquama* 以外の生物を原因とする赤潮による貝類斃死事例

### 1. 国内における貝類斃死事例

一般的に赤潮が水生動物に及ぼす影響についての報告は1960年代以降がほとんどで、それ以前の記録は非常

に少ない (岡市, 1995)。資料として記録が残っているものでは西川 (1901) および西川 (1903) が英虞湾で発生した赤潮がアコヤガイに及ぼす影響を報告している。前者は渦鞭毛藻 *Gonyaulax polygramma* Stein の赤潮を記録したもので、赤潮による斃死は酸欠が硫化水素の影響であろうと述べている。後者は *Gymnodinium* 属の一種であるとしているが、形態学的な記載 (25 μm前後で細胞が背腹に扁平) と、尾田 (1935) の論文中での引用状況から判断し、*Karenia mikimotoi* (Miyake et Kominami ex Oda) Hansen であったと推察される。この時の赤潮海水を用いてアコヤガイの斃死試験を行った結果、44時間で半数の個体が斃死したと述べられている。尾田 (1935) も昭和9年に英虞湾や五ヶ所湾において大規模に発生した *K. mikimotoi* の赤潮で、シンジュガイ (アコヤガイ) が大量に斃死したと述べている。

Table 3 に1970年以降、*H. circularisquama* 以外の生物による赤潮発生時に貝類が斃死した記録を示した。本邦沿岸で発生する赤潮被害のほとんどが養殖魚類に集中しているが (Honjo, 1994)、詳細に調べると貝類の斃死事例も報告されている。その中で圧倒的に多いのがやはり渦鞭毛藻 *K. mikimotoi* による貝類の斃死事例である (Fig. 6)。本種の赤潮海水が貝類に及ぼす影響については上述の西川 (1903) や尾田 (1935) に既に述べられている。とくに後者の観察は詳細で、細胞密度が3,000 cells/mLを超える期間がしばらく続くとアコヤガイの3割が斃死したこと、*K. mikimotoi* の赤潮の後に発生した渦鞭毛藻 *Polykrikos kofoidii* Chatton の赤潮ではプランクトンの腐敗による水質悪化が顕著であったにも拘わらずアコヤガイの斃死が発生しなかったことなどから、*K. mikimotoi* によるアコヤガイの斃死は酸素欠乏や水質悪化でなく *K. mikimotoi* 自身が有する毒性に由来すると結論を導いている。

本種が幅広く認知されるようになった1965年以降においては、沢田、和田 (1983)、和歌山県 (1986) などの予備的な試験結果が報告されている。これらの報告によれば、高密度の条件において貝類の斃死が引き起こされることが観察されている。特にアワビやトコブシなど巻貝が本種の暴露によって短時間に斃死することが指摘されている (沢田、和田, 1983; 和歌山県, 1986; Matsuyama *et al.*, 1997)。また、天然海域から採取された *K. mikimotoi* の赤潮海水は、ムラサキガイやマガキのろ水率を顕著に低下させる (Matsuyama *et al.*, 1998b; Matsuyama *et al.*, 1999b) さらに、*K. mikimotoi* の培養細胞を30,000 cells/mLの密度でマガキの浮遊幼生 (受精後20時間) に暴露す

**Table 3. (1/2)** Records of damage to shellfish species (bivalves and gastropods) due to red tides associated with harmful algae in western Japan (1973 - 1986)

Date	Shellfish species affected	Notes	Occasion	Causative taxa
1973	<i>Meretrix lusoria</i>	6 ton losses	Fuku-ura Bay	<i>Karenia mikimotoi</i>
1975	<i>Crassostrea gigas</i>	30% losses (deoxygenation)	Hiroshima Bay	<i>Prorocentrum</i>
1976	<i>Haliotis discus</i> <i>Sulculus diversicolor</i> <i>Turbo (Batillus) cornutus</i>	12 ton losses	Wakayama Coast	<i>Karenia mikimotoi</i> <i>Prorocentrum</i> <i>Ceratium furca</i> <i>Polykrikos</i>
1977	<i>Pinctada fucata</i>	3 million individuals dead	Tanabe Bay	<i>Karenia mikimotoi</i>
1979	<i>Ruditapes philippinarum</i>	3,416 ton losses	Buzen Sea	<i>Karenia mikimotoi</i>
1980	<i>Haliotis discus</i> <i>Turbo (Batillus) cornutus</i> <i>Sulculus diversicolor</i> <i>Chlamys nobilis</i>	1,192 kg losses 265 kg losses 64 kg losses 60 kg losses	Katsu-ura Coast	<i>Karenia mikimotoi</i>
1981	<i>Sulculus diversicolor</i> <i>Haliotis discus</i>	95.8.kg losses 25.4 kg losses	Nyuzu Bay	<i>Karenia mikimotoi</i> <i>Heterosigma akashiwo</i> <i>Prorocentrum</i> <i>small flagellates</i>
	<i>Sulculus diversicolor</i>	2,000 individuals dead	Asai Bay	<i>Karenia mikimotoi</i>
1982	<i>Haliotis discus</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Fulvia mutica</i>	11.3 ton losses 219.2 ton losses 18.5 ton losses	Buzen Sea	<i>Karenia mikimotoi</i>
1983	<i>Ruditapes philippinarum</i>	2 ton losses	Nyuzu Bay	<i>Prorocentrum</i>
1984	<i>Pinctada fucata</i> <i>Chlamys nobilis</i> <i>Sulculus diversicolor</i> <i>Haliotis discus</i>	6.6 million individuals dead 3.1 million individuals dead 10,710 individuals dead 7.4 ton losses	Kumano Nada	<i>Karenia mikimotoi</i>
1985	<i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Turbo (Batillus) cornutus</i> <i>Sulculus diversicolor</i> <i>Haliotis discus</i> <i>Fulvia mutica</i> <i>Meretrix lusoria</i>	1,550 ton losses } 3,720 ton losses	Suo Nada	<i>Karenia mikimotoi</i>
	<i>Haliotis discus</i> <i>Turbo (Batillus) cornutus</i> <i>Sulculus diversicolor</i>	} mass mortality	Moji Port	<i>Karenia mikimotoi</i>
	<i>Haliotis discus</i> <i>Turbo (Batillus) cornutus</i>	mass mortality "	Kariya Bay	<i>Karenia mikimotoi</i>
1986	<i>Pinctada fucata</i> <i>Haliotis discus</i> <i>Sulculus diversicolor</i> <i>Turbo (Batillus) cornutus</i>	2.7 ton losses 200 kg losses mass mortality "	Bungo Channel	<i>Karenia mikimotoi</i>

The data sets were obtained from Fishery Regulation Office, Fisheries Agency of Japan

**Table 3. (2/2)** Records of damage to shellfish species (bivalves and gastropods) due to red tides associated with harmful algae in western Japan (1973 - 1986)

Date	Shellfish species affected	Notes	Occasion	Causative taxa
1988	<i>Turbo (Batillus) cornutus</i>	500 kg losses	Tachibana Bay	<i>Karenia mikimotoi</i>
	<i>Turbo (Batillus) cornutus</i> <i>Haliotis discus</i>	1 ton losses 227 individuals dead		
1989	<i>Haliotis discus</i> <i>Turbo (Batillus) cornutus</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Solen strictus</i>	13.4 ton losses 10.9 ton losses 6.7 ton losses 900 kg losses	Beppu Bay	<i>Karenia mikimotoi</i>
	<i>Scapharca broughtonii</i>	mass mortality	Yatsushiro Sea	<i>Karenia mikimotoi</i>
1990	<i>Crassostrea gigas</i>	mass mortality	Buzen Sea	<i>Ceratium furca</i>
1991	<i>Pinctada fucata</i>	22,220 individuals dead	Tsukumi Bay	<i>Noctiluca scintillans</i>
1992	<i>Haliotis discus</i>	mass mortality	Fukuoka Bay	<i>Karenia mikimotoi</i>
	<i>Pinctada fucata</i> <i>Chlamys nobilis</i>	2.9 ton losses 676 kg losses	Uwa Sea	<i>Gonyaulax polygramma</i>
1995	<i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Haliotis discus</i> <i>Turbo (Batillus) cornutus</i>	} mass mortality	Harima Nada	<i>Karenia mikimotoi</i>
	<i>Turbo (Batillus) cornutus</i> <i>Sulculus diversicolor</i>		mass mortality "	Yoshimi Port
	<i>Haliotis discus</i>	mass mortality	Hagi Coast	<i>Heterosigma akashiwo</i>
1996	<i>Turbo (Batillus) cornutus</i> <i>Haliotis discus</i>	30 kg losses 14 kg losses	Iki Island	<i>Noctiluca scintillans</i>
	<i>Haliotis discus</i>	80% mortality	Usuki Bay	<i>Karenia mikimotoi</i>

The data sets were obtained from Fishery Regulation Office, Fisheries Agency of Japan

るとほとんどすべてが斃死するなど (Matsuyama *et al.*, 2001b), 明らかに貝類に対する毒性が認められる。ただ *K. mikimotoi* は主に魚類斃死を引き起こす種類として知られており (Honjo, 1994a, 1994b), この点が *H. circularisquama* による漁業被害と最も異なる点である。この他, *K. mikimotoi* の赤潮においては, 浜名湖でのカキの大量斃死 (花井ら, 1991), 豊前海でのアサリやハマグリ的大量斃死 (水産庁瀬戸内海漁業調整事務所, 1986; 福岡県豊前水産試験場, 1989) などが発生しており, 貝類への毒性について示唆されていたが, まとまった研究例は少ない。本種の天然細胞の貝類に対する毒性については, 沢田, 和田 (1983), 和歌山県, 1986, Matsuyama *et al.* (1998a), Matsuyama *et al.* (1998b), Matsuyama *et al.* (1999b) および Matsuyama *et al.* (2001) において確認されている。

## 2. 国外における貝類斃死事例

また, 本邦以外の海域で貝類を斃死させる赤潮として報告されているのは渦鞭毛藻 *Gymnodinium aureolum* Hurburt (= *Gyrodinium aureolum* または *Gymnodinium cf. nagasakiense*) である。*G. aureolum* の赤潮は1960年代以降, フランスからノルウェーにかけての大西洋沿岸とアメリカ東海岸で頻繁に発生してきた (Tangen, 1977; Mahony *et al.*, 1990), 本種の赤潮では, ホタテガイやムラサキガイが斃死することが報告されている (Shumway, 1990 および Landsberg, 2002 参照)。実際に現場の赤潮海水あるいは培養株を用いた試験でも二枚貝に対する毒性が認められている (Widdows *et al.*, 1979; Smolovitz and Shumway, 1997)。本種は本邦に分布する *K. mikimotoi* と分類学的に近いことが以前から指摘されていたが (Tangen, 1977; Taylor, 1985; Partensky *et*

al., 1988), 1990年代までは基本的に別種であるという認識が行き渡っていた (Partensky *et al.*, 1988; Nagasaki *et al.*, 1991; Suzuki and Ishimaru, 1992)。

Matsuyama *et al.* (1998b) は広島湾で発生した *K. mikimotoi* の赤潮海水を用いてムラサキガイ *Mytilus galloprovincialis* のろ水率低下と細胞密度との関係を詳細に調べた。その結果、ろ水率の低下は細胞密度が200 cells/mLあたりから始まり、有意な低下は500 cells/mL以上で確認された。18,700 cells/mLの赤潮海水から調製されたろ過液 (フィルターはGF/F) では、ムラサキガイのろ水量低下は観察されなかった。一方、Widdows *et al.* (1979) によれば、イギリス沿岸で発生した *G. aureolum* の赤潮海水を使ってムラサキガイのろ水率を測定すると、本種の細胞密度が200 cells/mL以下の密度や赤潮海水のろ過液には全く影響が認められないものの、細胞密度が500 cells/mLを越えると顕著なるろ水率の阻害が認められている。また、影響を受けたムラサキガイには中腸腺の傷害が認められたという (Widdows *et al.*, 1979)。

Widdows *et al.* (1979) の結果は広島湾で発生した *K. mikimotoi* の赤潮海水で得られた結果と酷似していたことから、Matsuyama *et al.* (1998b) は両者のムラサキガイに対する毒性発現は同じような機構で引き起こされていると考えられ、毒性学的観点から見ても両種の相同性が高いことを報告した。

最近になって、形態学的、分子生物学的、生化学的精査の結果、ヨーロッパ沿岸で従来から *Gymnodinium aureolum* として記載されてきた種が本邦沿岸で赤潮を形成する *K. mikimotoi* と同一種であることが示された (Hansen *et al.*, 2000)。従って、両者の相同性が分類学的観点と漁業被害の特徴の両面から一致したことになる。日本で1935年に最初に記載された *K. mikimotoi* は、実に65年間の紆余曲折を経て、ヨーロッパ、東アジア、南半球まで分布する凡世界種であることがここで結論付けられた (Hansen *et al.*, 2000)。しかし、ヨーロッパで発生してきた *K. mikimotoi* は四半世紀に亘って *G. aureolum* (= *Gyrodinium aureolum* または *Gymnodinium cf. nagasakiense*) として種々の論文

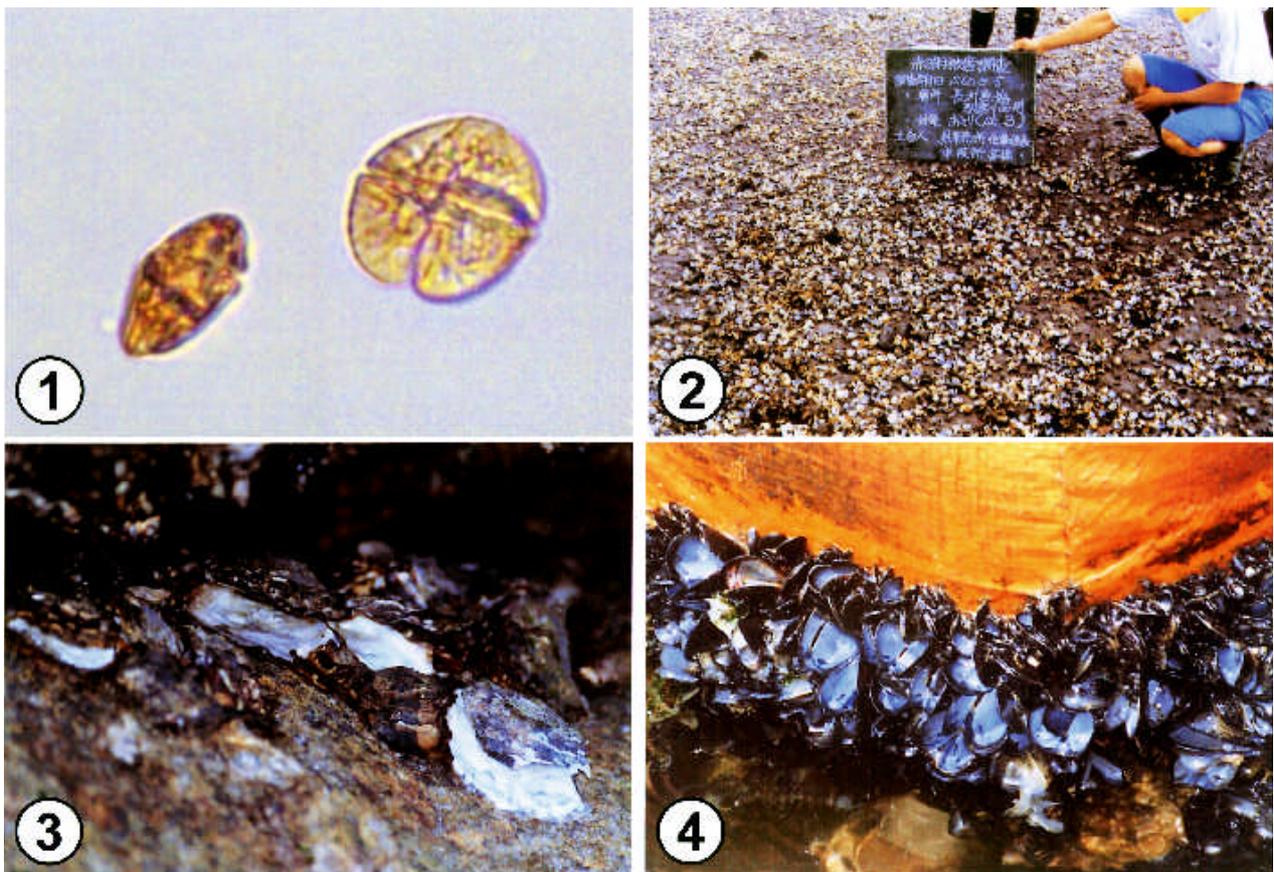


Fig. 6. Photomicrograph of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* and associated shellfish death in relation to massive red tide. 1: Photomicrograph. 2: Dead manila clam *Ruditapes philippinarum* during the red tide occurred in Buzen sea, western Seto Inland Sea, 1985 (see Table 3). 3: Dead Pacific oyster *Crassostrea gigas* during *K. mikimotoi* red tide (Hiroshima Bay, 2002). 4: Dead blue mussel *Mytilus galloprovincialis* during *K. mikimotoi* red tide (Hiroshima Bay, 2002).

に記載されてきたため、もはや過去の文献を個別に精査してどれが現在の*K. mikimotoi*に相当するのか追跡するのが困難である。ただ、フランスからノルウェーにかけての大西洋岸で観察されてきた*G. aureolum*赤潮は、貝類や養殖サケなどの斃死を伴うことから(Tangen 1977)、大部分が*K. mikimotoi*であったと考えて差し支えないだろう。既にHansen *et al.* (2000)の結果を受けて*G. mikimotoi*を論文中で*K. mikimotoi*と表記した論文(本論文も含む)が発表されるようになってきているが、両者を別種とすることを支持した過去の論文(例えば、Nagasaki *et al.*, 1991; Suzuki and Ishimaru, 1992)で提示されたデータの正当性についてきちんとした再検証を行って確認する必要はある。なお*Gymnodinium aureolum*自体は別に存在し、アメリカ東海岸で時折赤潮を形成してきたものが原記載種であるという(Hansen *et al.*, 2000)、この原記載種についても、貝類に悪影響を及ぼすことが報告されている(Geinig and Campbell, 1992; Smolowitz and Shumway, 1997)。

その他に貝類に被害を及ぼす生物としては黄金藻の一種*Aureococcus anophagefferens*が報告され、その毒性についても比較的詳細に調べられている(Gainey and Shumway, 1991; Bricelj and Lonsdale, 1997; Bricelj *et al.*, 2001)。*H. circularisquama*の貝類に及ぼす毒性とこれらの生物の毒性との比較検討は第4章以降で検討する。

最後に、バルト海の堆積物中の化石の解析から、1億3千万年前に二枚貝の一種*Neomiodon angulata*が一時的に大量斃死しており、その堆積層から渦鞭毛藻の一種*Sentusidium pelionense*のシストが多量に検出されることから、本種によるブルームで貝類が斃死したものと考えられている(Noe-Nygaard, 1987)。現在両者とも絶滅種であり、実際の毒性については調べることができないが、おそらく渦鞭毛藻のブルームと貝類斃死は太古から繰り返して発生していたに違いない。

### 第3章 現場における*Heterocapsa circularisquama*赤潮が二枚貝に及ぼす影響

第1および2章でも述べたとおり、*H. circularisquama*による赤潮の最大の特徴は、漁業被害が二枚貝や巻貝などの特定の軟体動物に集中するという点である。従来種、特に西日本で多く発生する*Chattonella*属、*Heterosigma akashiwo*あるいは*Karenia mikimotoi*を原因とする赤潮では、漁業被害は主に養殖魚類に集中的に発生してきた(Honjo, 1994)。これらの赤潮が発生すると、赤潮生物によって鰓などの呼

吸器系に対する直接的な傷害が生じるだけでなく、赤潮生物自身による夜間の呼吸量増大や死滅過程での急激な酸素消費も引き起こされるため、直接的・間接的に酸素欠乏の状態に陥りやすくなる。一般的に魚類は貝類などに比して運動能が高いため酸素要求量が多く、鰓の傷害が引き起こされるとわずかな酸素濃度の低下であっても被害を受けやすい(岡市, 1997; Ishimatsu *et al.*, 1996a)。

従来型の赤潮においても二枚貝などの漁業被害は報告されているが、その頻度は魚類に比して極めて少ない。過去の二枚貝などの漁業被害は、赤潮生物の毒性による直接的な作用というよりも、大規模な貧酸素水塊や硫化水素の発生など二次的な要因によって引き起こされている(西川, 1901; 塩川ら, 1966; 小泉ら, 1996)。赤潮生物のほとんどを占める微細藻類は、二枚貝にとって餌料となるため、一般的に二枚貝は赤潮に対する耐性が強いと考えられてきた。しかしながら、*H. circularisquama*の赤潮では、これまでの赤潮で頻繁に報告されてきた魚類の斃死は全く観察されず、二枚貝などの養殖貝が大量に斃死している。例えば、魚類養殖場で発生した*H. circularisquama*赤潮の場合、養殖魚に斃死や苦悶、さらには摂餌能の低下といった状況はほとんど認められない。逆に、筏に付着しているムラサキイガイなどが死滅・脱落するため、魚類養殖漁業者は「網やブイの掃除をする手間が省けた、こんな赤潮なら何回でも出て欲しい」といって喜んでいるという逸話もある。

本章では*H. circularisquama*の赤潮によって二枚貝類がどのような機構で斃死しているのかを調べるにあたり、まず現場における赤潮発生と斃死等に関する疫学的調査を実施した。これらの結果と環境要因から、貝類斃死に関わる要因の抽出を試みた。

### 第1節 英虞湾におけるアコヤガイ斃死状況と環境要因

英虞湾は枝湾が水路のように湾奥部まで侵入し、奥行きに比べて湾口が狭く、しかも湾内と比べ湾口部の水深が浅いため、海水交換がきわめて悪い閉鎖性水域である(Fig. 7)。また、底質はヘドロで厚く覆われているため、成層期には貧酸素水塊が発達する(中西ら, 2001)。このように底質悪化と海水停滞が激しいため、周辺海域と比較しても、古くから赤潮が頻発する海域として知られていた。西川(1901)および西川(1903)は本湾で*Gonyaulax polygramma*や*Karenia mikimotoi*の赤潮が発生し、アコヤガイの大量斃死を引き起こしたと報告している。1930年代には度重なる

*K. mikimotoi*の赤潮の被害を防ぐため、駆除剤として硫酸銅を漁場に散布して一定の防除効果を得たという(尾田, 1935)。1984年にも、熊野灘一帯で発生した *K. mikimotoi*の広域赤潮と赤潮崩壊時の貧酸素水塊の発達のため、アコヤガイに甚大な被害を及ぼした

(水産庁ら, 1986)。このように、英虞湾におけるアコヤガイ養殖は、*K. mikimotoi*等を原因とする赤潮や貧酸素によって甚大な影響を被ってきた。

松山ら(1995), Matsuyama *et al.*(1996)および松山(2003)でも述べられたように、三重県の英虞湾に

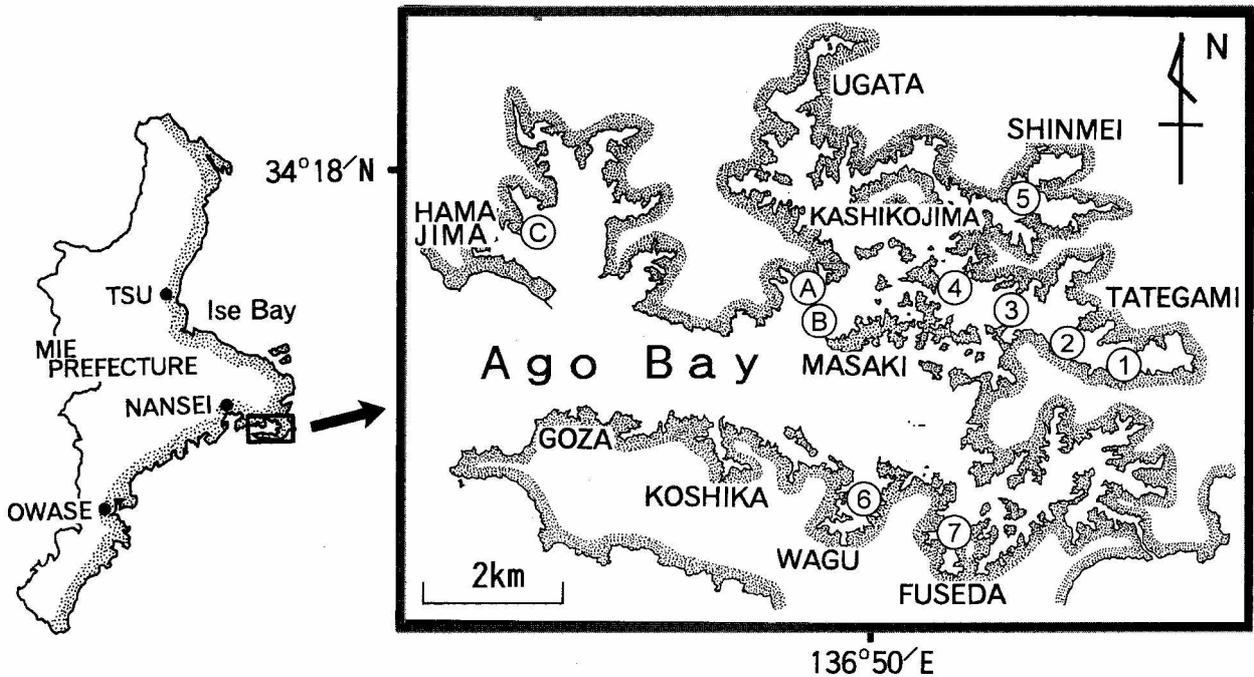


Fig. 7. Locations of sampling stations in Ago Bay



Fig. 8. The pearl oyster farming at Station B, in Ago Bay

おいては、1992年および1994年の両年に*H. circularisquama*の大規模な赤潮赤潮が観察された。本湾はFig. 8で示したように、湾内の至る所でアコヤガイの養殖が行われており、過去に発生した*H. circularisquama*赤潮によって甚大な漁業被害を被ってきた。本節では、大規模赤潮発生年であった両年のアコヤガイ*Pinctada fucata martensii*の被害状況について調査するとともに、アコヤガイ斃死時の環境要因について精査し、貝類斃死と赤潮との因果関係を明らかにする。

#### 材料および方法

1992年のアコヤガイの斃死状況は、三重県真珠養殖漁業協同組合連合会と各漁業協同組合の行った聞き取り調査の一部をとりまとめた。一般的に真珠層形成用に核 (piece) を挿入された「手術貝」は生理的に傷害を受けているため、非赤潮発生時においてもかなりの斃死が認められる。今回は手術前の「母貝」の斃死率に注目してとりまとめを行った。

1992年はFig. 7に示した英虞湾中央部における2定点 (Stns. Aおよび2) において、ミキモト真珠研究所の協力を得て赤潮発生期間中のアコヤガイの状態を観察した。また、同じ時期に赤潮非発生海域の五ヶ所湾 (南勢町) に垂下されていたアコヤガイの軟体部の状態と比較することにより、斃死過程の特徴を調べた。1994年度は三重県水産技術センター (当時) の全面的な協力を得て、Stns. 1 (立神浦) およびC (浜島浦) において約40個体のアコヤガイ母貝 (2年) を懸垂し、斃死率と*H. circularisquama*細胞密度の推移、水温、塩分、溶存酸素濃度 (DO) といった環境要因についても調査した。

#### 結 果

1992年度の場合、赤潮は8月中旬から9月上旬にかけてと、10月下旬から11月下旬にかけての2回観察された。漁業被害は主に夏期に発生し、湾内で養殖されているアコヤガイが大量斃死した。夏期赤潮収束後、暫定的にとりまとめられたアコヤガイ母貝の斃死率と同じ海域で赤潮の最盛期に観察された平均細胞密度との関係をFig. 9に示す。最も斃死率が高かったのは湾南東部で40~60%、湾北部でも30~35%であった。これを調査時に観察された*H. circularisquama*の最高細胞密度と比較すると、明らかに細胞密度の高い海域で斃死率も高くなっていった。データとしては示していないが、核を挿入された手術貝の斃死率は母貝を大きく上回り、英虞湾の真珠養殖業に甚大な漁業被害をもた

らした。

Stns. Aと1におけるアコヤガイの観察結果をTable 4に示した。赤潮発生時にアコヤガイに最初に観察された症状は閉殻であった。特に11月以降の出現時は餌料となる珪藻 (主に*Chaetoceros* spp.) が主要優占種 (1,000 cells/mL以上) であるにも拘わらず、*H. circularisquama* が50~200 cells/mLの密度で混在していただけで閉殻が顕著に観察された。そのため、赤潮時の貝には消化管の内容物がほとんどなく、摂餌活動を停止していた。閉殻状態が続くと、外套膜周辺に付着しているグリコーゲン組織の減少、中腸腺の乳褐色化 (Fig. 10)、麻痺状態 (閉殻したまま刺激に対して鈍い反応しか認められない状態) などの症状が観察されるようになり、麻痺状態にまで陥った個体のほとんどは斃死した。麻痺状態から斃死直後の個体を解剖すると外套膜縁辺部が大きく萎縮しているのが特徴的である。これらの症状は赤潮初期から顕著で、赤潮状態が続くにつれ、斃死個体も増えていった。

次に環境要因との関わりについて述べる。夏期赤潮発生時は、*H. circularisquama*が高密度で分布していた5m層において酸素濃度が180%を越えるなど過飽和であった (Fig. 11)。赤潮末期の9月上旬に底層に酸素濃度20%以下の貧酸素水塊が出現したが、アコヤガイの養殖水深である2m層まで達することはなかった。また、アコヤガイの斃死は貧酸素水塊の出現より1週間以上前に既に始まっていた。秋期赤潮発生時も、*H. circularisquama*が高密度で分布していた2m層では酸素濃度は過飽和であり、底層にも十分に酸素は存在していた。アコヤガイの斃死が見られた期間の水温は18~28℃、塩分は28~33psuの範囲にあった。

次に1994年の赤潮時に2海域で得られたデータをFig. 12に示す。1994年度の場合、赤潮は7月中旬から9月上旬にかけて観察された。*H. circularisquama*の細胞密度とその増減傾向は、定点間によって大きく異なっていた。Stn. 2では懸垂後3日間で約50%もの個体が斃死した。この時期アコヤガイが懸垂されていた5m水深の溶存酸素濃度を見ると、飽和度で40~60% (3~5 mg/L) であった。いずれの定点でも*H. circularisquama*の細胞密度が急激に増え、4,000~6,000 cells/mLに達するとアコヤガイの斃死率は急激に増えた。

両年の赤潮期間中、アコヤガイの他に、ムラサキイガイ、マガキ、ヒオウギガイなどにも斃死が認められたが、英虞湾で唯一のハマチ養殖場に被害が見られず、天然魚の斃死も報告されていない。また、甲殻類の斃死に関する報告もなかった。

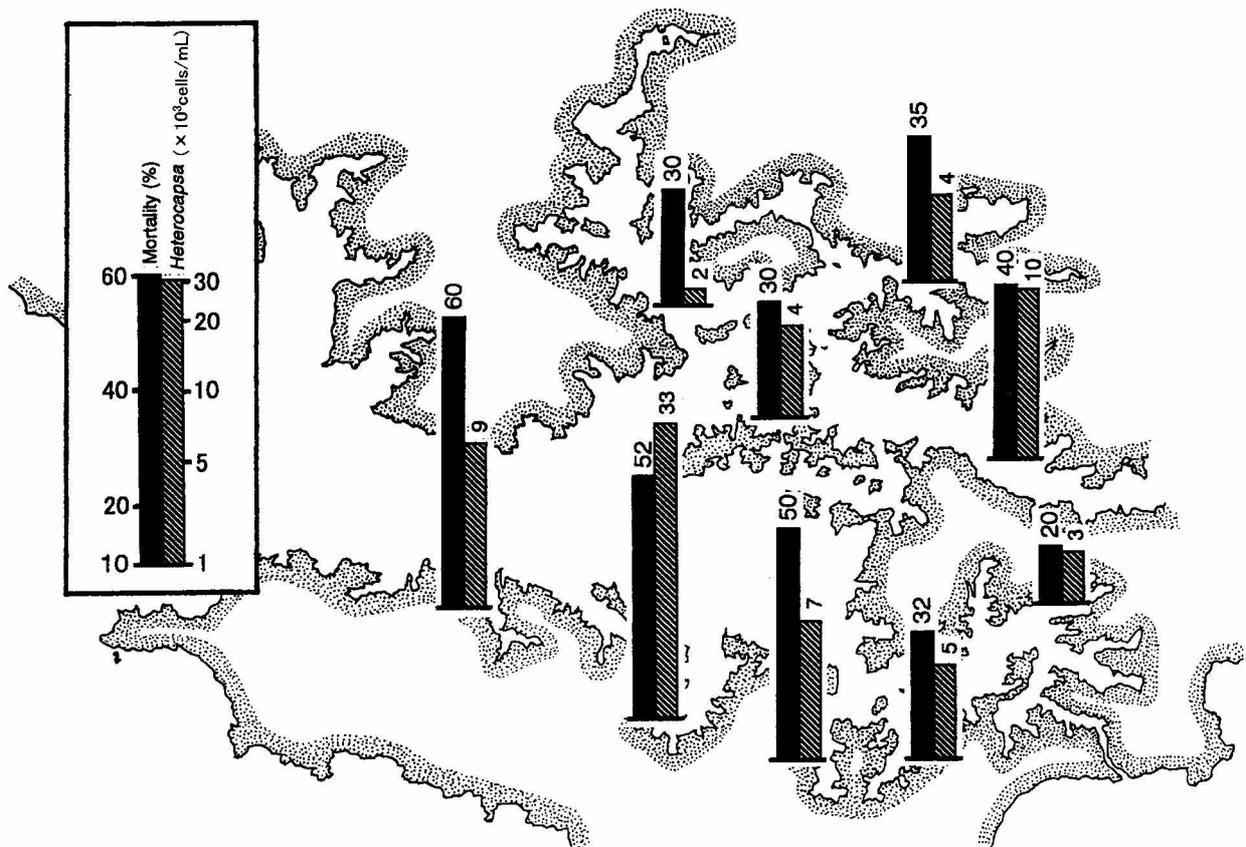


Fig. 9. Mortality of pearl oyster *Pinctada fucata martensii* after the summer red tide and mean *Heterocapsa circularisquama* cell density (20-28 August, 1992)

Table 4. Behavior and symptoms of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii* during the bloom periods of *Heterocapsa circularisquama* in Ago Bay, 1992

Symptoms	<i>Heterocapsa circularisquama</i> cells/mL
Valve closure	50 ~ 200
Clapping	50 ~ 200
Decreases of cardiac activity	> 1000
Decreases of glycogen branch	> 200 ~ 1000
Shell growth suspension	> 200 ~ 1000
Gut discoloration (dark brown to orange)	> 1000 ~ 2000
Shrinkage of mantle edge	> 1000 ~ 2000
Paralysis	> 1000 ~ 2000
Death	> 2000

考 察

赤潮発生に伴う過去のアコヤガイの大量斃死は、赤潮終期に発生する貧酸素や硫化水素等により引き起こされたことが知られている。西川(1901)は英虞湾で発生した *Gonyaulax polygramma* 赤潮時にアコヤガ

イが大量斃死したのは、貧酸素とそれに伴う硫化水素の発生であると指摘している。同湾では現在にいたるまで底質の悪化による恒常的な貧酸素水塊の発生が認められており、枝湾によってはアコヤガイの生残等に大きな影響を及ぼしている(中西ら, 2001)。英虞湾に限らず、赤潮時に行われたその後の研究でも、赤潮発

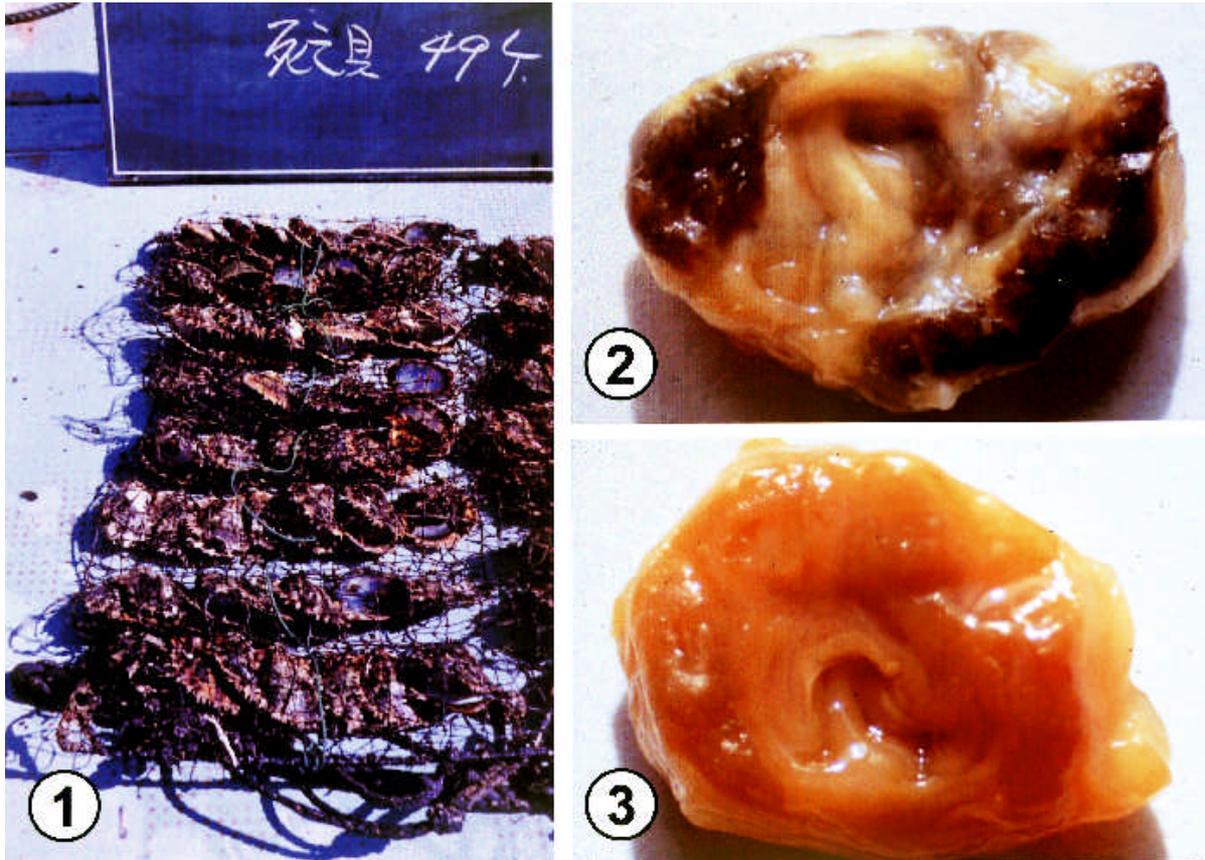


Fig. 10. Photographs of pearl oyster *Pinctada fucata martensii* affected by *Heterocapsa circularisquama* in 1992. 1: Dead pearl oysters. 2: Individual cultured at site without red tide. 3: Individual cultured at site with red tide.

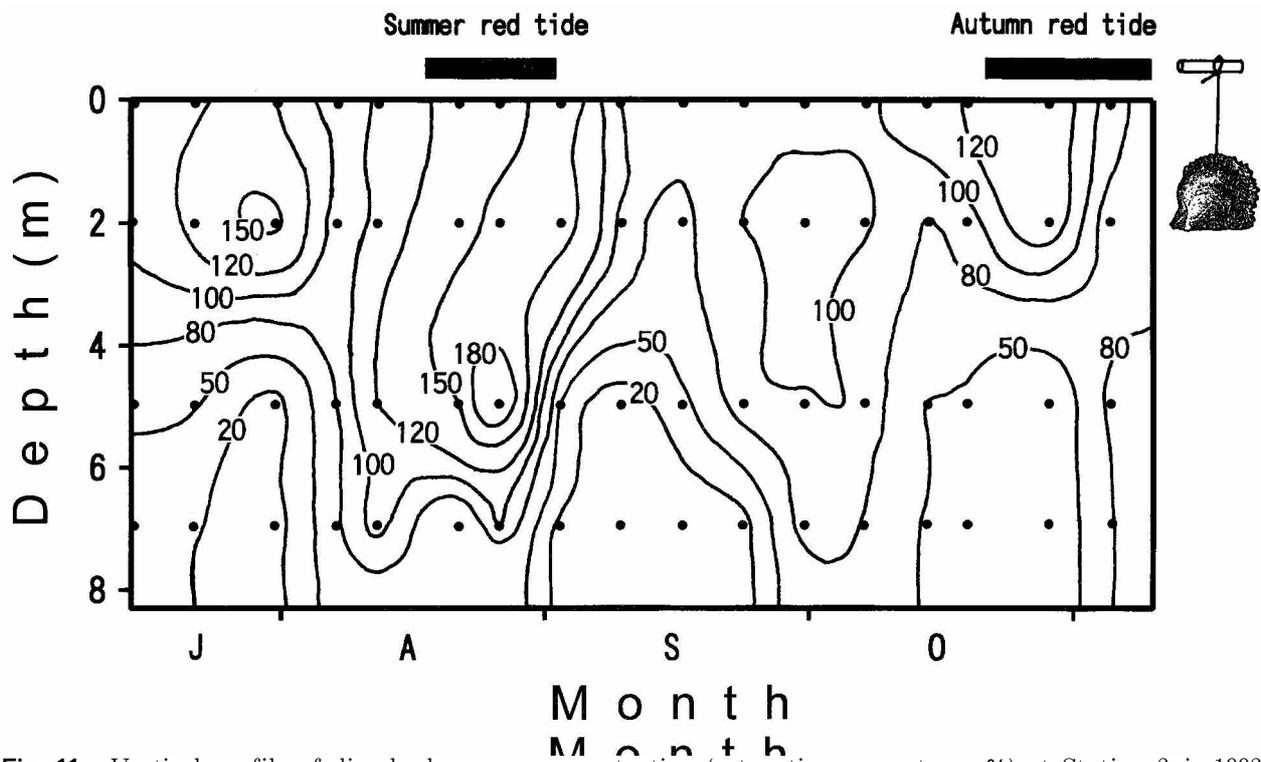


Fig. 11. Vertical profile of dissolved oxygen concentration (saturation percentage, %) at Station 2, in 1992. Pearl oyster cages were suspended at 1 ~ 2 m depth.

生時に二枚貝が大量斃死した時には、ほとんど貧酸素水塊の発達と同時に観察されており(西川, 1901; 岡村, 1916; 塩川ら, 1966; Park, 1982; 小泉ら, 1996), 被害を受けた生物も魚類から甲殻類に至るまで広く及んでいる。しかし、今回日単位の詳細な現場観察に基づく、アコヤガイなどの二枚貝の斃死が顕著な時期に貧酸素化現象は見られないか、あっても養殖水深である水深5m以浅までは達していなかった。むしろ、表層から水深5m付近までの酸素濃度は局部的に180%を越えるなど過飽和であった。1992年9月上旬の夏期赤潮消滅後に底層で貧酸素水塊が観察されたが、この時にはすでに多くのアコヤガイが斃死していた。

1994年度は赤潮盛期に飽和度で40~60% (3~6 mg/L) と酸素濃度が低く推移したが、通常貝類の斃

死は酸素濃度が2~3.5mg/L以下になって始まると言われることから(Theede *et al.*, 1969; 中西, 1982; 玉井, 1993), 少なくとも酸素濃度は生存に大きな影響を及ぼすほど低下していなかったと思われる。むしろ酸素濃度が同じように推移していたにも拘わらず、定点間での斃死率の推移状況が大きく異なっていた点は特筆される。*H. circularisquama*の細胞密度が4,000~6,000 cells/mLを越えると顕著な斃死が認められた点を考えると、酸素濃度よりは*H. circularisquama*の細胞密度の方が直接影響していた考えられる。

Nagai *et al.* (2000)は1994年に英虞湾で発生した*H. circularisquama*の赤潮海水を用いて、アコヤガイ成貝の暴露実験を実施した。実験には健全な母貝を用い、採取した赤潮海水とともにパンライト水槽に収容し、曝気を施しながら24時間の暴露実験を実施している。この条件下では、貧酸素などの影響は排除されている。これによると、アコヤガイの斃死は2,000 cells/mLを超えると認められ始め、24時間で半数の個体が斃死する密度はおよそ6,600 cells/mLであり、10,000 cells/mLを超えるとほとんどの個体が斃死した。斃死した個体は先に述べたように実際の漁場で斃死した個体同様、軟体部の萎縮が顕著であり、本種の天然個体群がアコヤガイに対して急性毒性を示すことを明らかにした。

また、秋期赤潮の前期や後期においては、珪藻類などの他種プランクトンが優占し、*H. circularisquama*の細胞密度は低く推移していたにも拘わらず、閉殻など拒否反応が継続的に観察された。珪藻群落に低密度で*H. circularisquama*が混在していても、アコヤガイはこれを認識し、閉殻などの拒否反応を示したことは注目される。

いずれにしても、赤潮発生期間に観察されたアコヤガイの拒否反応や斃死は、酸素欠乏の影響よりも、*H. circularisquama*が直接アコヤガイに対し、何等かの生理障害を与えたためであると考えられる。

また、先にも述べたが、被害を受けた水産物は二枚貝全般に集中していたが、魚類や甲殻類の斃死は全く認められなかった。このことも、同湾における1992年と1994年の大規模赤潮と貧酸素や硫化水素との因果関係を認めがたい理由の一つである。博多湾、楠浦湾において過去に*H. circularisquama*による赤潮が発生しているが、被害を受けたのは二枚貝と巻貝のみで、魚類への被害は報告されていない(山本, 田中, 1990; 吉田, 宮本, 1995)。魚類養殖のように酸素要求度が高い生物を狭い生け簀の中で高密度飼育するとなると、わずかな酸素濃度の低下でも養殖生物は敏感に反応する。こうした生物が赤潮によって影響を受けず、比較的赤潮や貧酸素状況に耐性のある二枚貝が選択的に斃死し

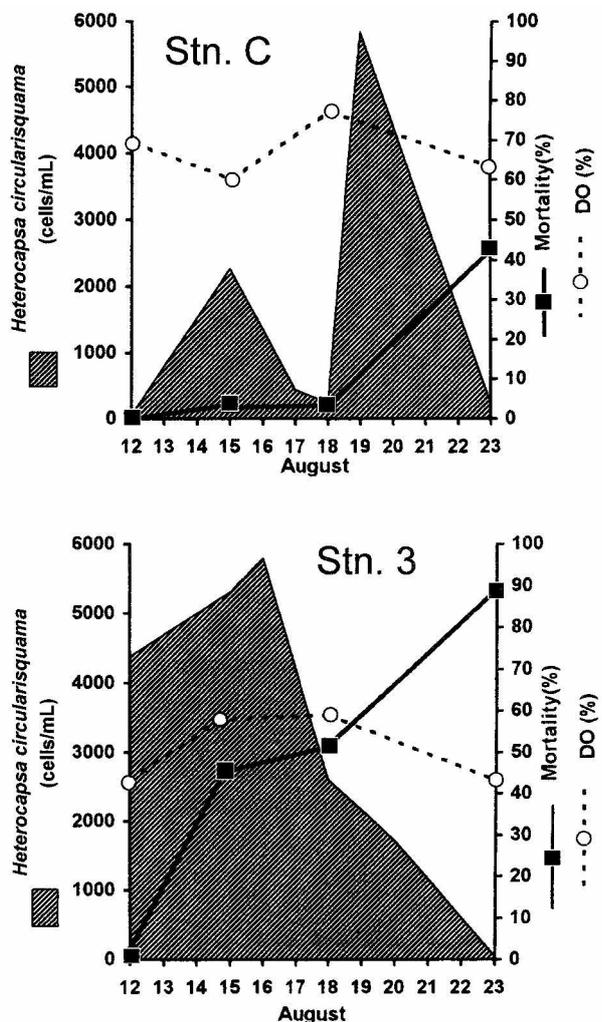


Fig. 12. Mortality changes of pearl oysters in relation to cell density of *Heterocapsa circularisquama* in 1994. Upper is monitored at Station C. Lower is at Station 3. Forty individuals of caged pearl oyster were cultured at each station.

ていたことを考慮すると、*H. circularisquama* は二枚貝に対し直接かつ特異的に影響を与える渦鞭毛藻である可能性が考えられる。

一般的に赤潮などの現場観察は数日から1週間単位で行われることが多いが、赤潮の発生や貧酸素水塊の発生は日単位で急激に進行することから、通常のリテラリングであっても変化を正確に捉えることは必ずしも容易ではない。魚類など斃死が数分単位で進行し、かつ給餌養殖のためほぼ毎日漁場に出かけて魚の様子を観察する養殖業の場合、当該生物の変化(運動性、餌料すう向性、斃死個体の有無など)を日単位で捉えることも可能であるが、無給餌で粗放的な養殖形態である貝類養殖は毎日漁場に出かけることはむしろ希である。また、二枚貝等の斃死は閉殻筋が弛緩して完全に殻を空けた状態にならないと気がつかないが、実際に閉殻筋が弛緩して完全に斃死するには貧酸素による斃死であっても少なくとも数日を要する。これらの結果として、二枚貝養殖業では赤潮生物の毒性と貝類の生理的影響について判断することが難しく、結果として「貧酸素の影響で斃死した」と片づけられてしまうことが多い。第2章でも述べたように、*K. mikimotoi* は*H. circularisquama* と同様に貝類に悪影響を及ぼすが、過去の貝類斃死は貧酸素の影響であると言われていた(例えば、塩川ら、1966)。しかし、最近の研究では*K. mikimotoi* は貝類に対して特異的な毒性を有していることが明らかとなった(Matsuyama *et al.*, 2001)。この点、海洋観測機器や生理学的実験装置の乏しい時代に、毎日の詳細な現場観察に基づき、*K. mikimotoi* の赤潮によるアコヤガイ斃死は貧酸素や水質悪化ではなく、プランクトン自身が有する特異的な毒性であると結論を導いた尾田(1935)の観察は特筆に値する。

英虞湾でのアコヤガイ斃死状況から次の4点が判明した。

1. 現場におけるアコヤガイの斃死時期と貧酸素水塊の影響に関して、直接的な因果関連は認められなかった。
2. アコヤガイの斃死は*H. circularisquama* の細胞密度と密接に関連しており、細胞密度が4,000~6,000 cells/mLを越えると急激に斃死率が高くなった。
3. 斃死したアコヤガイは拒食や衰弱によるものと思われる生理的障害、あるいは何らかの要因による組織傷害が数多く認められた。
4. *H. circularisquama* が50~200 cells/mL存在すると、アコヤガイの摂餌活動は餌料となる珪藻の細胞密度には関係なく阻害された。

## 第2節 広島湾における二枚貝斃死状況と環境要因

広島湾は瀬戸内海西部に位置した閉鎖性の強い内湾で(Fig. 13)、瀬戸内海でも大阪湾に次いで富栄養化が進行し貧酸素や赤潮の発生が多い海域である(木村, 1999)。Fig. 14に示したように、本湾では太田川河口を中心にカキ養殖が大規模かつ集約的に行われ(詳細はKorringa, 1976参照)、全国市場の5~6割のカキがこの湾で生産されている。

広島湾では1969年に本邦で初めて*Chattonella antiqua* の赤潮が発生し(木村ら, 1973)、その後も*Heterosigma akashiwo*や*Karenia mikimotoi* を主体とする赤潮が毎年発生している(高山, 1986)。この湾では1995年と1998年に*H. circularisquama* の大規模な赤潮が発生して甚大な漁業被害をもたらした(松山ら, 1997; 松山, 2003)。いずれの発生年も大野瀬戸を中心に*H. circularisquama* 赤潮の発生に関する海洋学的調査を実施すると同時に、二枚貝等の斃死状況や赤潮海水を使った暴露実験を同時並行に実施した。

### 材料および方法

#### 現場海域における3種二枚貝の斃死状況

1995年はFig. 13に示したStn. 1付近で養殖されていた1年生マガキ*Crassostrea gigas* (殻高 $87 \pm 22$ mm)を11月14日に採取して提灯カゴに収容し(Fig. 15参照)、Stn. 1(赤潮発生域)およびStn. 5(赤潮非発生域)に懸垂して斃死状況を観察した。懸垂水深は0, 2, 5, 8mでStn. 1では各水深30個体ずつ、Stn. 5では22個体ずつを実験に供した。調査は広島県農林水産事務所(当時)と大野町役場の全面的な協力で行われたものである。また、ムラサキガイ*Mytilus galloprovincialis* については、赤潮発生直後である11月13日に、Stn. 1付近のブイ等に付着していた天然個体(94個体、殻高 $30.0 \pm 5.2$ mm)を網目サイズ2mmのナイロンネットに収容し、そのまま表層に懸垂した。

1998年の赤潮時には、殻高 $54.2 \pm 11.2$ mmのアコヤガイ稚貝を網目サイズ8mmのナイロンネットに収容し、Stn. 1の水深2mに懸垂した。いずれの年度もほぼ毎日*H. circularisquama* の細胞密度と貝の斃死状況等について調査した。また、Stn. 1付近を中心に現場の目視調査も同時並行して行った。

#### 赤潮海水を用いた暴露実験

現場から採水した赤潮海水が二枚貝に及ぼす影響を確認するために次の実験を行った。1995年11月13日に、Stn. 4で採水した赤潮海水(2,500 cells/mL)を、網

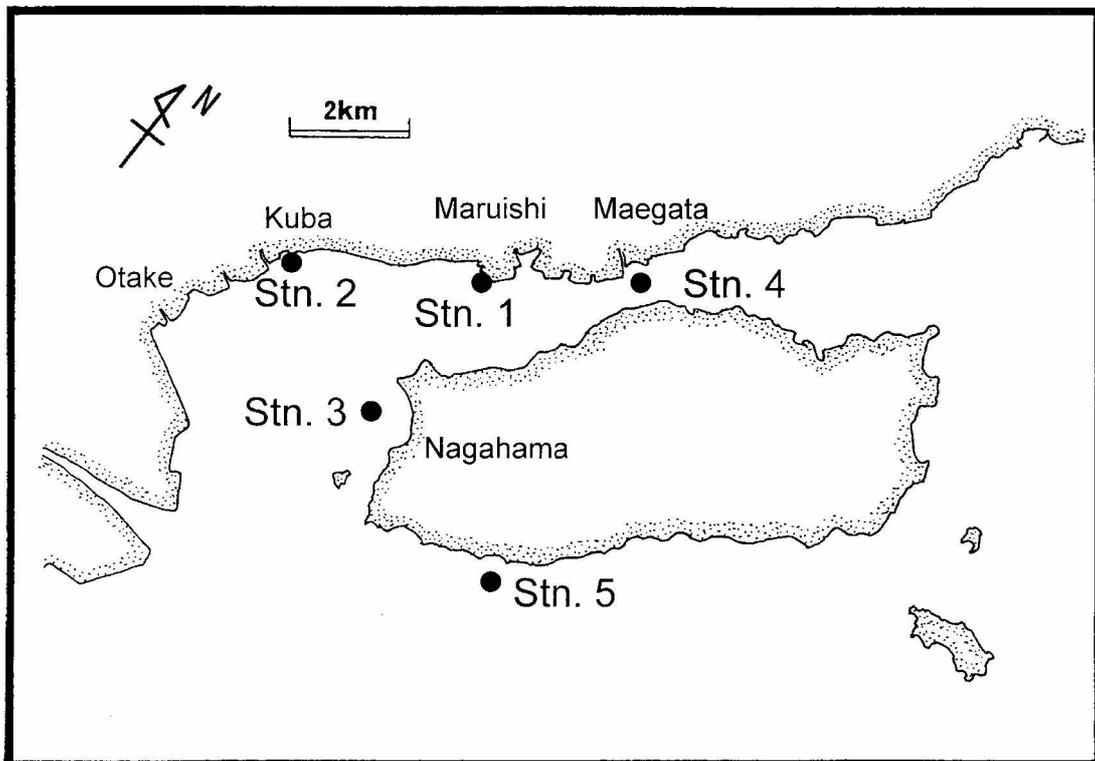
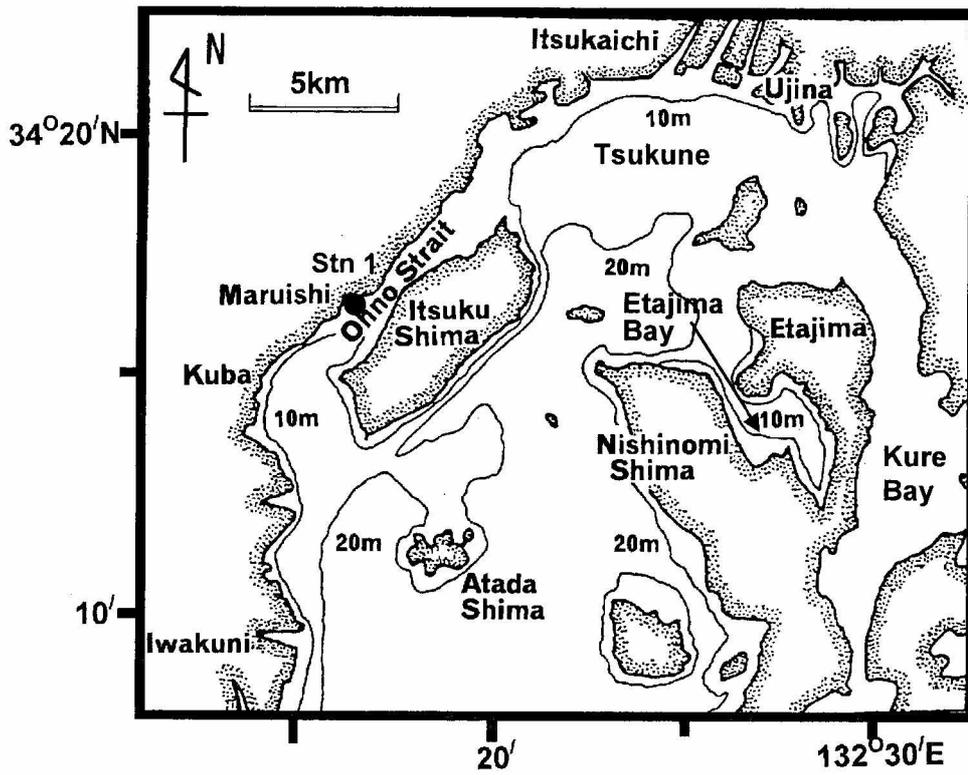


Fig. 13. Location of Hiroshima Bay (upper) and sampled stations in the Ohno Strait (lower)



Fig. 14. The oyster farming around the Etajima station, Hiroshima Bay

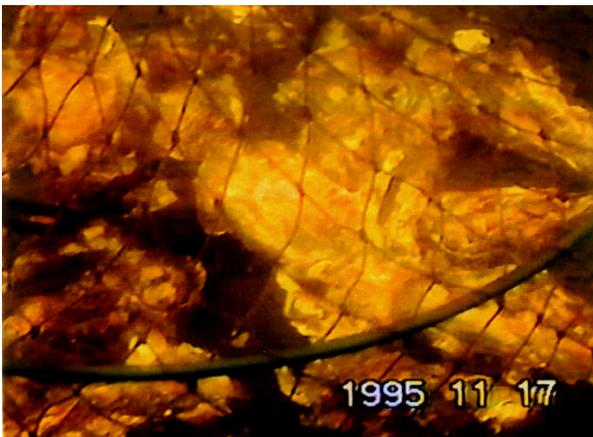


Fig. 15. Close-up of the oyster assemblages placed in an experimental basket at Station 1 during red tide periods, in 1995

目サイズ75  $\mu\text{m}$ のナイロンネットを用いて捕食生物などを除いた後、10  $\mu\text{m}$ のオムニポアフィルター（直径47mm，ミリポアー社製）を装着したろ過器で、*H. circularisquama*を重力下で濃縮した。この試水を一晚22のインキュベーター中に静置した後、細胞密度を11,200 cells/mLに調整した。この赤潮海水200mL中に殻高27.5mmと30.8mmのマガキ2個体（赤潮非発生時にStn. 1付近で採捕し、所内ろ過海水中で1ヵ月間維持していた天然個体）を収容して観察を行った。曝

気は*H. circularisquama*の細胞を破壊するので行わなかった。25時間後に一度同じ濃度で同じ容量の赤潮海水と交換した。

また、赤潮発生前の1995年10月中旬にStn. 1付近で採捕され、実験室で*Isochrysis galbana*や*Skeletonema costatum*を給餌して飼育されていた殻高 $2.3 \pm 0.3\text{mm}$ のムラサキガイ稚貝を、1個体ずつ12穴のマイクロプレート（直径23mm）に収容し、前述の赤潮海水（10,000 cells/mLに調整）を5 mL/個体ずつ加えて観察を行った（ $n=20$ ）。4日目まで、毎日同様の細胞密度に調整した実験海水と交換し、暴露実験を実施した。なお、試験海水の交換時に干出を受けると正常な個体は速やかに閉殻する。一方、干出時に閉殻せず、大きく開殻したままの状態の個体について、1個体ずつ外套膜縁辺部をピンセットで強く刺激し、ゆるやかに閉殻する個体を「麻痺個体」、閉殻筋が完全に弛緩し閉殻など正常な応答を全く示すことができなくなった個体を「斃死個体」として取り扱った。毎日斃死個体数を集計し、生残率を求めた。また、暴露12時間目の最初の換水の時に、容器壁面に足糸で付着している個体を計数し、足糸形成率を求めた。

赤潮海水が二枚貝の摂餌活動に及ぼす影響

11月13日にStn. 4から赤潮海水（3,700 cells/mL）を採水し、ガラスフィルター（GF/F）でろ過後、十

分に曝気を施したろ過海水で *H. circularisquama* が 1,000 cells/mL の密度になるように希釈した。この海水が、マガキ (殻高  $22.9 \pm 2.6$  mm,  $n=3$ ) とムラサキイガイ (殻高  $10.9 \pm 0.5$  mm,  $n=5$ ) に及ぼす影響をろ水率 (語彙の定義と測定方法については第4章に詳述) を指標にして調べた。方法は Matsuyama and Uchida (1997) に従った。対照区の貝のろ水量は二枚貝に無害な渦鞭毛藻 *Heterocapsa triquetra* を、ろ過海水に対して 1,000 cells/mL の濃度になるように接種して測定した。また、赤潮海水のろ過の影響を調べるため、グラスファイバーフィルター (GF/F, Whatman社製, 孔径 ca.  $0.7 \mu\text{m}$ ) でろ過した現場海水 (3,700 cells/mL) に *H. triquetra* を同様の濃度になるよう接種してろ水量を測定した。また11月24日に Stn. 1 で採水された赤潮海水 (Table 5) を希釈し、*H. circularisquama* の初期密度とろ水率との関係を調べた。

#### 赤潮による貝類斃死状況の観察

Stn. 1 から南西方向に約 5 km 離れた Stn. 2 (大竹市玖波町の玖波漁港内) では、1995年の赤潮期間中に *H. circularisquama* が 3,500 ~ 9,000 cells/mL と最も高い細胞密度で確認された海域である。11月21日の干潮時に漁港内外に生息している天然二枚貝類の状況について観察を行った。その他に、赤潮の発生、貝の斃死状況等に関する地元の関係各漁協の組合員などからの聞き取り調査資料も参考にして、各データの解析を行った。

### 結 果

#### 現場海域における3種二枚貝の斃死状況

Stn. 1 における赤潮海水中でのマガキ *Crassostrea gigas* の懸垂試験の結果を Fig. 16 と Table 6 に示す。

**Table 5.** Cell densities of phytoplankton species collected at Station 1 on 24 November

	cells/mL	%
<i>Skeletonema costatum</i>	91	7.5
<i>Nitzschia</i> spp.	2	0.2
<i>Eucampia zodiacus</i>	8	0.7
<i>Thalassiosira</i> spp.	15	1.2
<i>Thalassionema</i> sp.	29	2.4
<i>Leptocylindrus danicus</i>	1	0.1
<i>Pleurosigma</i> sp.	5	0.4
<i>Prorocentrum triestinum</i>	2	0.2
<i>Cryptomonas</i> sp.	90	7.4
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	975	80.0

Sample was directly used for measurement of clearance rate of oyster and mussel

11月14日から12月15日までの累計斃死率は、水深 0 m 層で 30.0% (11月27日まで、それ以後は試験貝を収容したカゴが盗難によって紛失したため集計不能)、2 m 層で 36.7%、5 m 層で 20.0%、そして 8 m 層で 6.7% で、各層の平均では 19% であった (Table 5)。このように、斃死率は *H. circularisquama* の細胞密度が高く推移した 0 ~ 2 m 層で顕著であった。この期間の *H. circularisquama* の細胞密度は、各層平均で 239 ~ 1,588 cells/mL、水温は 15 ~ 17 の範囲にあった。一方で、赤潮がほぼ終息した12月15日から、翌年 (1996年) の 4月25日までの累計斃死率は、各層とも 3.3% に留まった (Table 6)。*H. circularisquama* がほとんど観察されなかった Stn. 4 では、11月14日から11月30日までの累計斃死率は、0 m 層で 6.7%、5 m 層および 8 m では 0% で、全層の平均値は 3% であった。Stn. 1 付近の天然マガキの場合、斃死は11月19日まではほとんど認められなかったが、赤潮発生から 1 週間程経過した 21 日頃から急に斃死個体が目立つようになった (Fig. 17)。Stn. 1 における懸垂試験とは別に、Stn. 1 近くの沿岸部の護岸に付着している天然マガキの斃死個体を採取し調査した結果、最近になって斃死したと思われる個体 (軟体部が残存していたり殻内部が付着物にほとんど覆われていない個体) の割合は11月30日の段階で約 30% であった。Stn. 1 付近の養殖筏の潜水調査時に撮影された映像を Fig. 18 に示す。赤潮発生直後である 11月17日は現場海水が褐色に着色していたが、まだ斃死個体はあまり観察されなかった。赤潮発生後からおよそ 2 週間目にあたる 11月27日には同じ地点でもかなりの斃死個体が観察され、養殖カキも 17 ~ 27 日の間に急激な斃死が進行したことが伺えた。

Stn. 1 におけるムラサキイガイの場合、0 m 層での累計斃死率は 9.5% であり (Fig. 17)、マガキと比較すると低い値であった。さらに、ロープや浮き桟橋等に付着している天然個体にも、マガキ程の目立った斃死は観察されなかった。浮き桟橋における採取調査では、新規に斃死したと思われる斃死個体の割合は12月10日の段階で 7% 以下であった。11月21日に Stn. 2 (玖波漁港内) で観察した状況を Fig. 19 に示す。なお、この時の漁港内は Stn. 1 周辺と比較すると著しく濃厚な赤潮状態で、表層水を計数した結果、3,700 cells/mL の *H. circularisquama* が認められた。ロープやブイに付着している天然マガキやムラサキイガイはかなりの被害を受けていた。斃死貝は腐敗臭がひどく、外套膜と閉殻筋を若干残したもから、まだ軟体部の大部分が残っているものまで様々であった。特に軟体部が残存しているなど比較的最近になって斃死したと判断される個体の場合、外套膜縁辺部が異常に萎縮している個体が多く観察された

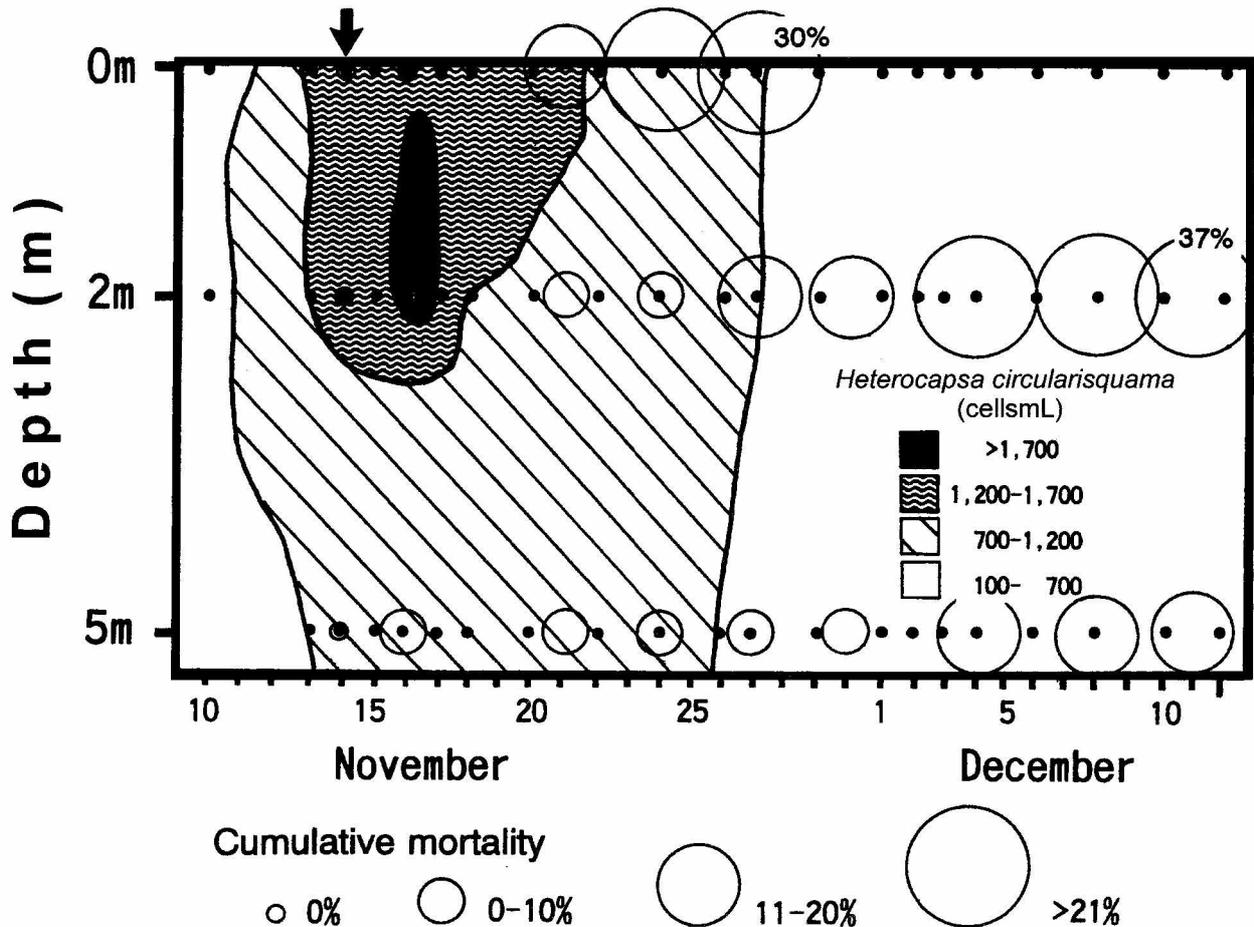


Fig. 16. Temporal changes in the vertical distribution of *Heterocapsa circularisquama* cell density, and associated mortality of adult oysters at Station 1. Arrow denotes the start of the suspension of oysters (see Fig. 15) in the water column on 14 November.

Table 6. Comparison of mortalities (%) of 1-year old oysters<sup>1</sup> between the red tide and a non-red tide area

Mortality at Stn.1 (red tide area)			
Depth(m)	14 Nov.-15 Dec. (31 days) <sup>2</sup>	15 Dec.-25 Apr.(132 days) <sup>3</sup>	
0	(>30.0) <sup>4</sup>	- <sup>3</sup>	
2	36.7	3.3	
5	20.0	3.3	
8	13.3	3.3	
Mortality at Stn.5 (non-red tide area)			
Depth(m)	16 Nov.-15 Dec.(25 days) <sup>2</sup>	15 Dec.-25 Apr.(136 days) <sup>3</sup>	
0	9.1	0	
2	4.6	0	
5	0	0	
8	0	0	

<sup>1</sup> The oysters used in this study was maintained near the Station 1 until 14 Nov.

<sup>2</sup> Red tide period

<sup>3</sup> Non-Red tide period

Oysters were consistently suspended at the same depth from the red tide period

<sup>4</sup> Caged oysters suspended at 0 m were lost

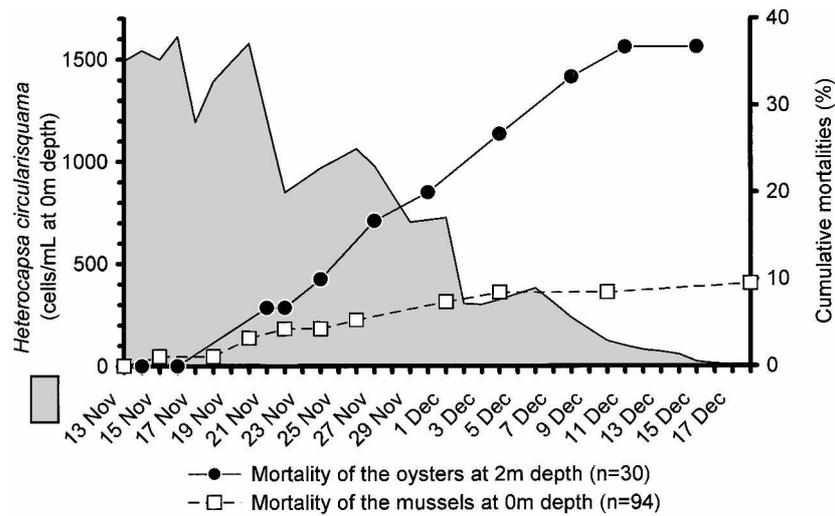


Fig. 17. Changes of *Heterocapsa circularisquama* cell density, and associated mortality of adult oysters and mussels at Station 1

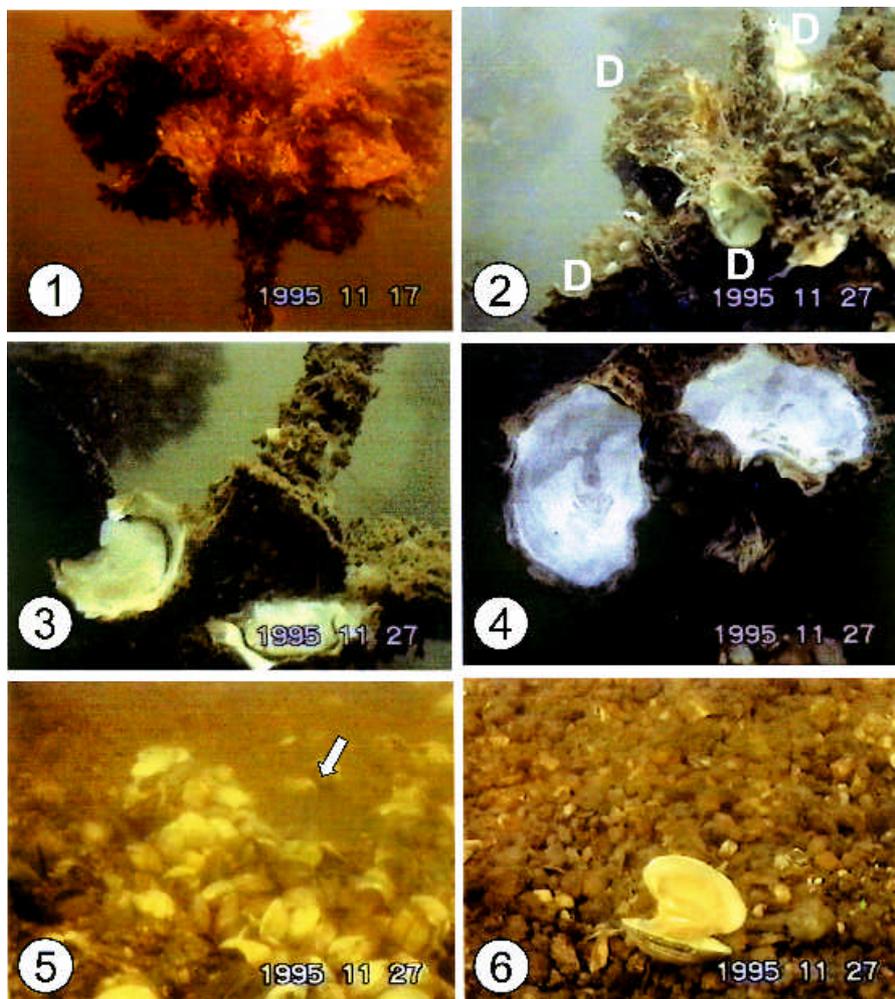


Fig. 18. Field observations on shellfish farming ground during *Heterocapsa circularisquama* red tide period occurred in 1995, Hiroshima Bay. Pictures (captured from VTR) was provided by Dr. Usuki H. (FIES). 1: Close-up of the oyster assemblages which farmed at Station 1. Reddish brown discoloration was due to *H. circularisquama* red tide (ca. 1,000cells/mL of *H. circularisquama*). 2-4: Dead oysters (D) at Station 1 (2 weeks after the occurrence of red tide). 5-6: Dead manila clams *Ruditapes philippinarum* observed at Station 4. Arrow denote live juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*.

(Fig. 19- )。漁港内での杵取り調査の結果、マガキは90%以上の斃死、ムラサキイガイでは30%程度の斃死で、Stn. 1 付近よりも斃死率が明らかに高かった。

赤潮海域では二枚貝以外の水産生物（カニなどの甲殻類、ホヤ類やフジツボなどの付着生物）の被害は全く観察されなかった。Stn. 2 付近の漁港内外においては赤潮のため赤褐色に海面が着色しているにも拘わらず、天然のマサバの群が回遊し、周辺では多数の遊漁者が釣りを行っていた。Fig. 19の ~ にStn. 4にあるアサリ漁場の潜水調査時の映像を示す。アサリ漁場でも斃死が顕著に見られ、11月27日の段階ではまだ軟体部を残した状態で干潟の上に突出して斃死している個体も多く見られた。これを狙ってか、クロダイの幼魚が干潟付近を多数遊泳しているのが目撃された。

次に1998年に広島湾において発生した赤潮の発生期間中、アコヤガイ稚貝をStn. 1 に懸垂して斃死率の推移を調べた結果をFig. 20に示す。赤潮期間中の*H. circularisquama* 細胞密度は1,000~5,000 cells/mLの範囲にあった。*H. circularisquama* が100 cells/mL以下で推移している期間の斃死率は3%以下で推移していたが、細胞密度が3,000 cells/mLを越え始めた8月25日

以降から顕著な斃死が始まり、9月13日には累計で61%の個体が斃死した。ほとんどのアコヤガイは8月25日以降堅く閉殻したままとなり、その後徐々に開殻したまま刺激に対する応答が非常に鈍い「麻痺状態」に陥った個体の割合が増えた。麻痺状態にまで陥った個体のほとんどが数日後に斃死した。斃死した個体はいずれも軟体部が著しく萎縮すると共に、中腸腺の退色が著しかった。

同じ時期にStn. 1 付近の潮間帯、ブイ、ロープなどに付着している天然マガキとムラサキイガイの杵取り調査を実施した結果、マガキの斃死率は51%、ムラサキイガイは89%の斃死率であった。このほかにも潮間帯に生息しているホトトギスガイやマガキなどの大量斃死も観察された（Fig. 4 ~ 参照）。しかしながら、最も赤潮が高密度に発生している海域であっても、クサフグやイシガニなどは通常と何ら変わらなく活動しており、斃死したアサリを狙って干潟に飛来してきたコサギにも何ら悪影響は認められなかった（Fig. 21参照）。

#### 赤潮海水を用いた暴露実験

1995年11月13日に、Stn. 4で採水した赤潮海水を濃縮し、これを用いてマガキの暴露実験を行った結果を

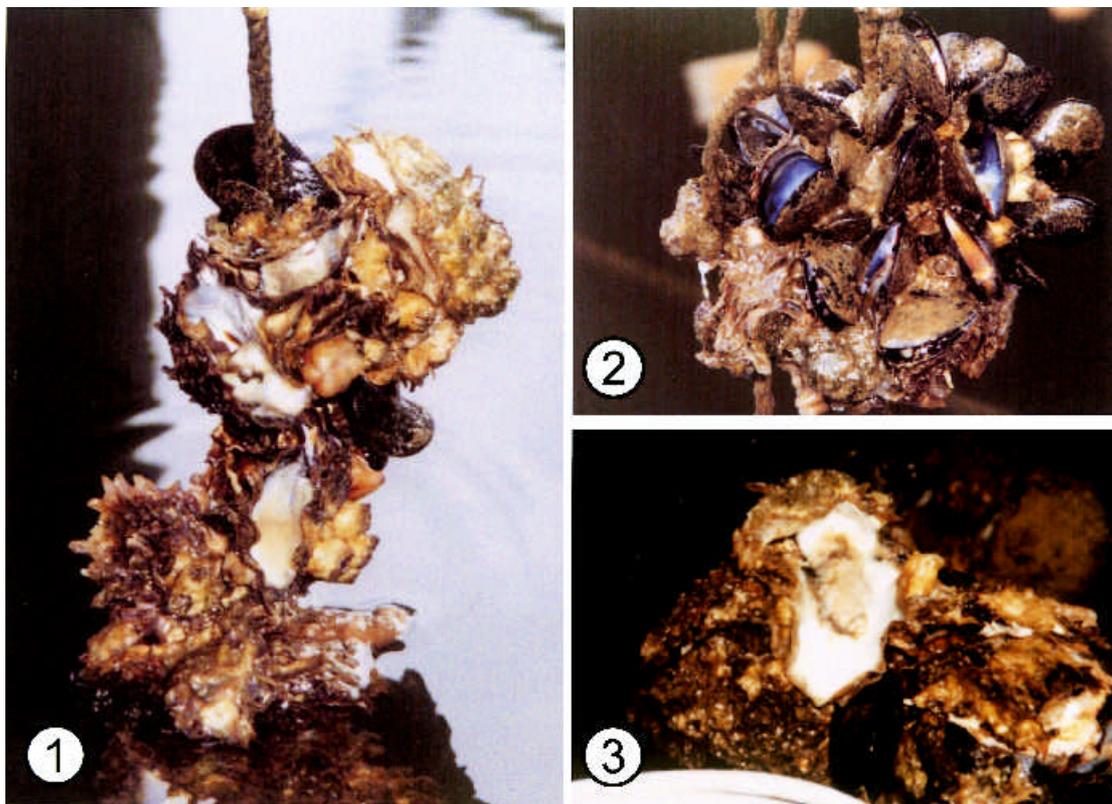


Fig. 19. Photographs of dead bivalves due to *Heterocapsa circularisquama* red tide at Station 2. 1: Dead natural oysters (death/total=9/12). 2: Dead natural mussels (death/total=12/22). Several dead individuals with remaining their mantles and adductor muscles. 3: Dead natural oysters which might be killed within a few day, showing notable mantle shrinkage.

Table 7 に示す。赤潮海水 (11,200 cells/mL) に収容されたマガキは、異物が混入した時に、それらを排除しようとして繰り返す開閉運動 (clapping) をすぐに開始した。閉殻する瞬間に殻内から水流が勢よく吹き出す、この中にヒモ状の粘質物が含まれ、顕微鏡下で観察すると球形化した *H. circularisquama* の細胞が無数に包み込まれていた。clapping は実験開始直後

に 5 ~ 10 回/分程度の頻度であるが、徐々に回数は減少しながらも 10 時間以上続いた。実験に供した 2 個体とも 25 時間後までは閉殻の状態になり、その後麻痺状態 (大きく開殻したままの状態、外套膜などをピンセットで強く刺激するとゆっくりと殻を閉じ始める状態) に陥り、それぞれ 48 時間および 60 時間後に閉殻筋が弛緩して応答を示さなくなり、完全に斃死した。斃

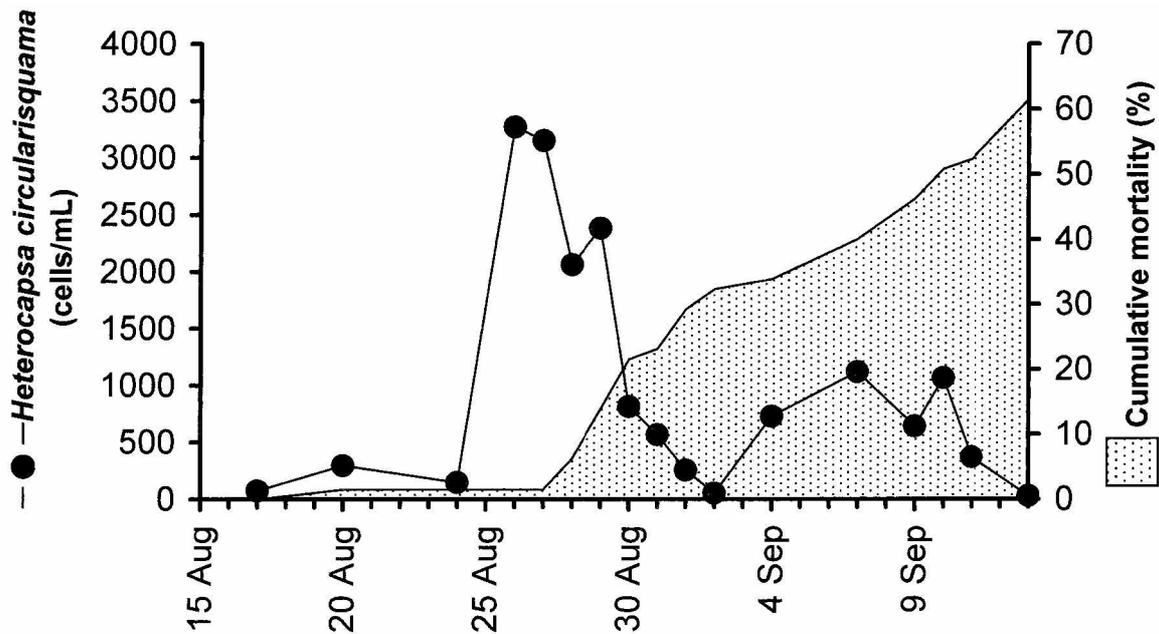


Fig. 20. Temporal changes of *Heterocapsa circularisquama* cell density (closed circle with solid line) and associated mortality of pearl oyster spat (Shell height =  $54.2 \pm 11.2$  mm [SD]) at Station 1 in Hiroshima Bay, 1998

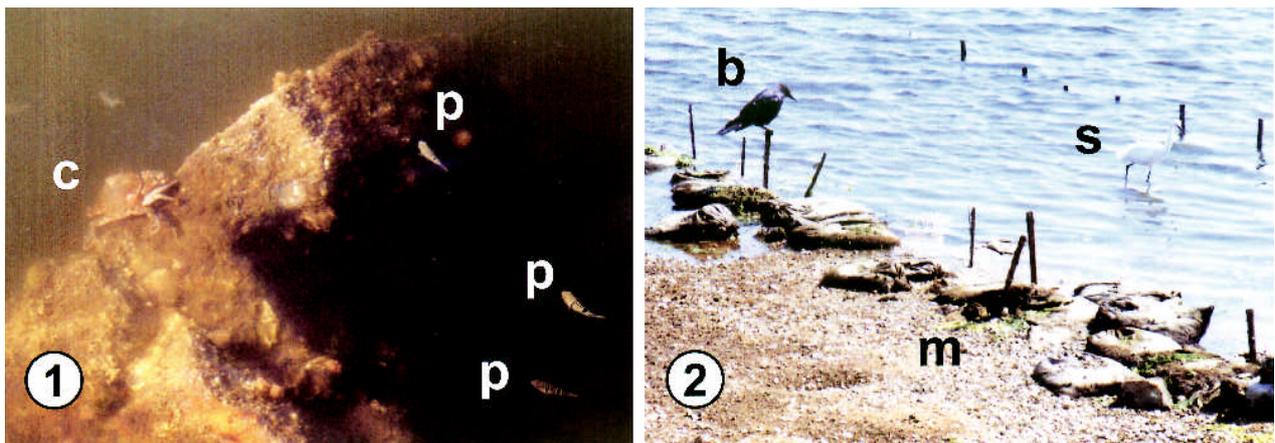


Fig. 21. Photographs of marine animals in the *Heterocapsa circularisquama* red tide site in Hiroshima Bay, 1998.

1: Rocky shore which are covered by *H. circularisquama* red tide (3,150 cells/mL). No killing of marine animals was observed during the course of *H. circularisquama* red tide except for bivalve molluscs. c; Shore swimming crab *Charybdis japonica*, p; Puffer *Takifugu niphobles*.

2: Manila clam farming ground after the red tide episode. Some birds pecked the dead manila clam but any negative effects was not observed. m; dead manila clam, b; Carrion crow *Corvus corone*, s; Little egret *Egretta garzetta*

死したマガキは外套膜周辺部が収縮していた。暴露実験中に *H. circularisquama* の細胞密度は減少することはなく、排糞活動も全く観察されなかったことから、ほとんどマガキに摂取されていないと判断された。

一方、ムラサキイガイ稚貝の場合、現場の赤潮海水を濃縮して *H. circularisquama* の細胞密度がおおよそ 10,000 cells/mL になるよう調整した海水で暴露実験を行った結果を Fig. 22 に示す。 *H. circularisquama* の天然藻体に暴露されたムラサキイガイは、足系の形成が阻害され、3 日後の生残率は 45%、4 日後は 15% まで低下した。

#### 赤潮海水が二枚貝の摂餌活動に及ぼす影響

11月13日に採水した *H. circularisquama* の赤潮海水 (1,000 cells/mL に調整) を用いてマガキおよびムラサキイガイのろ水率を測定した。その結果を Fig. 23 に示す。 *H. circularisquama* に暴露されたマガキは対照区の 1.5% まで、ムラサキイガイは対照区の 8.8% までの水率が減少することが判明した。マガキの場合、実験中 (30 分間) に継続的に閉殻することはなかったが、暴露実験時同様、激しく殻を開閉させる clapping 行動が頻繁に観察された。ムラサキイガイも外套膜縁辺部を小刻みに収縮させる行動が観察された。一方、グラスフィルター (GF/F) でろ過した赤潮海水ろ液では、マガキおよびムラサキイガイのいずれも、ろ水率の低下は全く認められず、 *H. circularisquama* の細胞が存在する状態で観察される拒否行動も全く観察されなかった。さらに、 *H. circularisquama* 天然個体群の初期細胞密度とムラサキイガイろ水率との関連を調べた結果を Fig. 24 に示す。 *H. circularisquama* がおおよそ 50 cells/mL の密度で存在するところろ水率は対照区の 1/2 になり、100 cells/mL 以上ではろ水率がほぼ停止した状態となった。

#### 考 察

1995年の Stn. 1 におけるマガキの懸垂試験の結果、赤潮発生直後に斃死率が上昇したことは明らかである。しかも、斃死率は *H. circularisquama* が高密度に分布していた 0 ~ 2 m 層にかけて最も高く推移し、底層では低い斃死率に留まっていた。すなわち、英虞湾におけるアコヤガイの観察同様、 *H. circularisquama* の出現とマガキの斃死は密接に関連していた。同様な傾向はムラサキイガイでも認められており、いずれの二枚貝類も *H. circularisquama* の細胞密度が高くなれば斃死率も高くなる傾向にあった。マガキにおいて、斃死率が底層において低く、表層で高かったことは、この

期間の斃死が貧酸素水塊や硫化水素の影響ではなかったことを示すと言える。1998年に発生した赤潮期間中実施したアコヤガイの懸垂試験においても、 *H. circularisquama* の細胞密度と斃死率の上昇は密接に関連していると同時に、実際に観察されたアコヤガイの症状は第 2 節で明らかにしたように、英虞湾で観察された症状とほとんどすべて一致していた。以上のことから、 *H. circularisquama* の赤潮に伴う二枚貝の斃死は、英虞湾だけに限定されるものではなく、広島湾でもほぼ同じ傾向を示していたと判断され、本種の二枚貝に対する特異的な毒性は *H. circularisquama* 自身によって引き起こされていることは明らかである。

細胞密度と斃死との関係を詳しく述べる。広島湾での観察によれば、二枚貝の斃死は *H. circularisquama* の細胞密度が概ね 1,000 cells/mL を超えると発生するようである。一方で、細胞密度が 100 cells/mL を下回ると斃死率の上昇は停止し、以後は目立った斃死は観察されなくなった。3 種の二枚貝を比較すると、1995年の場合、マガキは Stn. 1 および Stn. 2 のいずれの地点においても、ムラサキイガイを大きく上回る斃死率を記録した。この結果から、マガキはムラサキイガイと比べてより低密度の *H. circularisquama* で斃死すると言える。1995年の広島湾における観察結果から推察すると、 *H. circularisquama* の細胞密度が 1,000 ~ 3,000 cells/mL でマガキの顕著な斃死が始まると推察された。

1995年のムラサキイガイの場合、Stn. 1 (1,000 ~ 3,000 cells/mL) での斃死率は 9.5% と低かったものの、細胞密度が 3,500 ~ 9,000 cells/mL と比較的高く推移した Stn. 2 での斃死率は 30% に及んでいた (天然個体の観察結果)。さらに室内実験 (10,000 cells/mL) では 4 日間で 85% もの個体が斃死した。室内実験に供した個体は小型の稚貝であること、また、暴露実験時の温度が 22 と現場よりかなり高かったことから、赤潮現場で得られた結果と同一に論じることはできない。しかし、Stn. 1 で得られたムラサキイガイの低い斃死率は、 *H. circularisquama* の細胞密度が急激な斃死を引き起こす細胞密度にまで至っていなかったためであろうと考えられる。

前節における英虞湾での観察においても、 *H. circularisquama* 細胞密度が 1,000 ~ 2,000 cells/mL ではアコヤガイの顕著な斃死は起こらないが、4,000 ~ 6,000 cells/mL に至ると急激な斃死が観察されている。同様の結果は培養細胞を用いた室内実験でも確認されている (Nagai *et al.*, 1996)。1995年の広島湾における赤潮の場合、Stn. 3 を除けば、細胞密度は 1,000 ~ 3,000 cells/mL の範囲で推移しており、大部分の海域では 4,000 cells/mL を越えることはなかった。こうした

ことから、ムラサキガイの顕著な斃死は、アコヤガイと同様に、*H. circularisquama* の細胞密度が4,000~6,000 cells/mLで始まると考えられる。

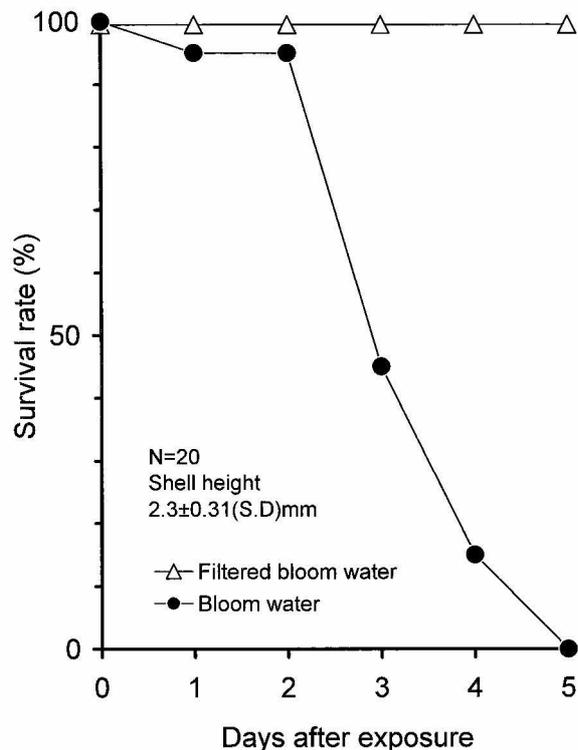
本章第1節で述べたとおり、*H. circularisquama* の影響は斃死だけでなく、低密度であっても閉殻、

clapping、拒食などの生理的傷害を引き起こすことが示唆された。これらは広島湾から得られた*H. circularisquama* の天然細胞を用いた生物検定でも明らかとなった。まず、天然の*H. circularisquama* を用いてマガキに対する暴露実験を行った結果、clappingや外

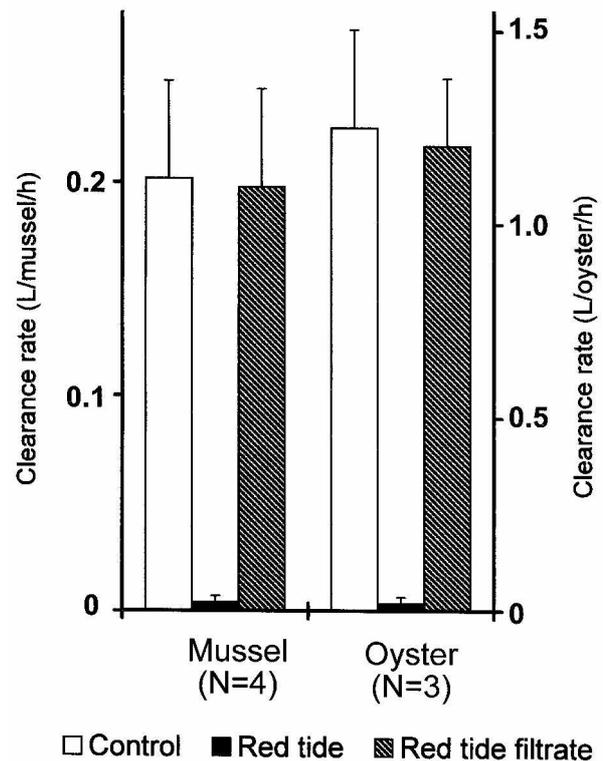
**Table 7.** Effect of red tide seawater of *Heterocapsa circularisquama* (11,200 cells/mL) on the survival of the 1-year old oysters

Time(h)	Shell height	
	27.5mm	30.8mm
1	clapping	clapping
12	valve closure	valve closure
24	paralysis	valve closure
48	death	paralysis
60	-	death

Water temperature was 20 . Aeration was not conducted. *H. circularisquama* medium was replenished once at 25h.



**Fig. 22.** Changes in the survival rate of juvenile mussel exposed to high cell densities (10,000cells/mL) of natural *Heterocapsa circularisquama* cells. Water temperature was 20 , aeration was not conducted *H. circularisquama* medium was replenished once at 25h



**Fig. 23.** Clearance rates of the blue mussel, *Mytilus galloprovincialis* (shell height  $10.9 \pm 0.5$  [mean  $\pm$  SD] mm, N=12) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (shell height  $22.9 \pm 2.6$  mm, N=9) exposed to *Heterocapsa circularisquama* red tide. Cell density in red-tide (solid bars) water was 1,000cells/mL. Filtrate (shaded bars) was prepared from red-tide water (3,700cells/mL) and used in the experiment within 30 min. Vertical bars show standard deviations.

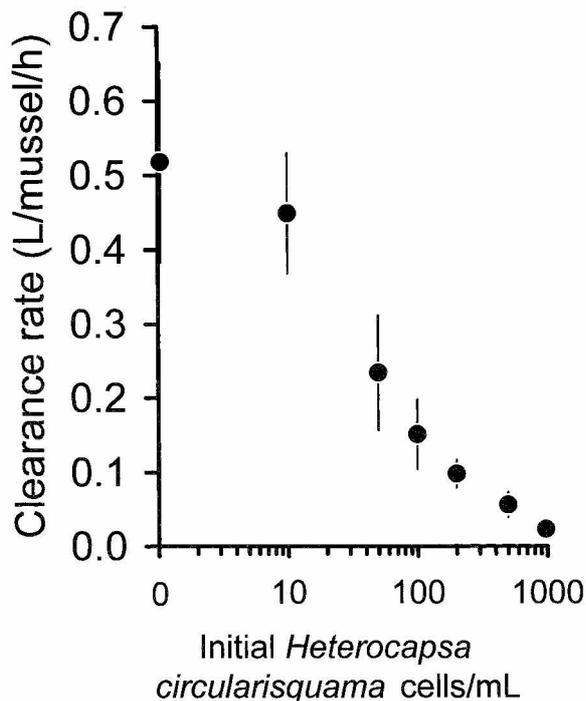


Fig. 24. Mean clearance rates of the adult blue mussel exposed to various cell densities of natural *Heterocapsa circularisquama* cells. Bars denote standard deviations.

套膜の収縮を引き起こしながら、60時間以内に斃死した。*H. circularisquama* 細胞密度は実験中ほとんど変わらなかったことから、貝に摂食されているとは考えられなかった。これを裏付けるように、*H. circularisquama* の細胞密度が1,000 cells/mLにおけるマガキおよびムラサキガイのろ水量は、対照区の10%以下にまで低下し、同時にclappingや外套膜の収縮などの顕著な拒否反応も認められた。さらに*H. circularisquama* の天然細胞を使ってムラサキガイに対するろ水量と細胞密度の関係を調べた結果、ろ水量の低下は20~50 cells/mL付近から始まることがわかった。これは、英虞湾における観察時に、*H. circularisquama* が50~200 cells/mLを越えるとアコヤガイに対して閉殻等の異常反応が観察されたこととよく一致する。このように、*H. circularisquama* の場合、斃死が起こらない低密度であっても、ろ水活動などを顕著に阻害することが示唆された。ろ過性捕食者である二枚貝類は、鰓上の繊毛運動によって引き起こされるろ水活動を絶え間なく行うことで、摂餌と酸素補給を行っている (Jørgensen, 1990)。従って、継続的なろ水活動の低下は、摂餌能力や酸素の取り込みを著しく阻害するので、貝の生理状態に悪影響を及ぼすことが十分に考えられる。従って、斃死が引き起こされる密度以下であっても、貝の生理状態は悪化する可能性が考えられる。

広島湾での貝類斃死状況から次の4点が判明した。

1. マガキの斃死は*H. circularisquama* の細胞密度と密接に関連しており、細胞密度が高く推移した期間、海域、水深において最も斃死率が高かった。
2. 斃死した貝には、英虞湾で観察されたアコヤガイ同様に拒食や衰弱によるものと思われる生理的障害が認められた。
3. 現場から得られた*H. circularisquama* の天然細胞を用いてマガキとムラサキガイに対する暴露実験を行った結果、*H. circularisquama* の細胞は明らかに致死的作用を示すことが判明した。
4. *H. circularisquama* はマガキとムラサキガイのろ水量を顕著に阻害した。この作用はろ過された赤潮海水では認められなかった。ムラサキガイの場合、*H. circularisquama* が50 cells/mL存在すると、ムラサキガイの摂餌活動は対照区の半分まで抑制された。

以上両湾における現場調査結果から、*H. circularisquama* が二枚貝に及ぼす影響は次のように結論づけられる。すなわち、*H. circularisquama* の赤潮発生期に、二枚貝の斃死と貧酸素との因果関係は十分に見い出せなかった。*H. circularisquama* は二枚貝類に対して著しい致死的作用を及ぼすが、魚類、甲殻類などには斃死や異常行動は全く認められなかった。二枚貝に対しては、細胞密度が4,000~6,000 cells/mL (マガキでは1,000~3,000 cells/mL) を越えて赤潮状態に達すると、それらの生理作用に直接悪影響を与えて斃死等を引き起こす。また、着色が認められない50~200 cells/mLといった低密度であっても、拒否反応を引き起こしたりろ水量を顕著に低下させるなど生理的な悪影響を及ぼす。しかしながら、こうした作用は赤潮海水をろ過すると全く認められなかったことから、細胞外に何らかの毒性物質を活発に分泌している可能性は低いと判断された。

現場海域で発生した赤潮生物が、二枚貝に及ぼす影響について調べた例は非常に少ない。第2章でも述べたとおり、日本やヨーロッパ沿岸で赤潮を引き起こし、魚介類の大量斃死を引き起こす原因生物として *Karenia mikimotoi* (*Gyrodinium aureolum*, *G. cf. aureolum*, *G. cf. nagasakiense*, *G. mikimotoi* として記載されてきた) が知られている (Tangen, 1977; Shumway, 1990; Honjo, 1994; Hansen *et al.*, 2000; Landsberg, 2002)。本種の赤潮では、魚類以外にも、ムラサキガイやホタテガイなどの斃死が観察されている (Shumway, 1990; Smolovitz and Shumway, 1997; Matsuyama *et al.*, 1998; Landsberg, 2002)。*K. mikimotoi* の赤潮海水を使ってムラサキガイのろ水量を測定すると、本種の細胞密度が200 cells/mL以下

の密度や赤潮海水のろ過液には全く影響が認められないものの、細胞密度が500 cells/mLを越えると顕著なる水率の阻害が認められている (Widdows *et al.*, 1979; Matsuyama *et al.*, 1998)。また、影響を受けたムラサキイガイには中腸腺の傷害が認められたという (Widdows *et al.*, 1979)。H. circularisquamaも中腸腺の傷害(退色)やろ水率の低下が認められることから、K. mikimotoiで観察された症状に類似していると言える。しかしながら、K. mikimotoiは二枚貝だけでなく魚類なども幅広く斃死させること (Tangen, 1977; Honjo, 1994)、貝のろ水率を低下させる細胞密度がH. circularisquamaの10倍近く高いことを考えると、斃死や生理傷害が全く同一の機構で引き起こされているとは判断できなかった。

以上、現場海域における調査の結果から、H. circularisquamaが二枚貝に特異的な毒性を示すことが示唆された。しかしながら、現場における調査においては、様々な他種生物が混在し、かつ水温、塩分、栄養塩といった環境が連続的に変化する非正常状況下で得られたものであり、これらの結果からH. circularisquamaが二枚貝を斃死させる特異的な作用を有していると断定するのは困難である。天然細胞を使った暴露実験においては上述のような環境変化が排除されており、斃死との因果関係をより明確にすることができたが、H. circularisquama以外の植物プランクトンも少なからず混在するため、これらの影響を完全に排除することは困難である。従って、H. circularisquamaが有すると考えられる毒性を証明するためには、H. circularisquamaのクローン培養株を使った室内実験を行う必要がある。

#### 第4章 Heterocapsa circularisquama培養株を用いた二枚貝類等への影響評価

##### 第1節 各種二枚貝の生残・ろ水率に及ぼすH. circularisquamaの影響

前章で述べたとおり、現場における二枚貝への影響は貧酸素の影響というより、H. circularisquama自身が有する毒性に由来することが示唆された。しかしながら、現場における調査は海水流動や水質などの物理化学的な環境が刻々と変化する非正常状況下で得られたもので、しかも現場の試料にはH. circularisquama以外の他種プランクトンが少なからず混在しているため、H. circularisquamaによる直接の影響以外の二次的な要因を完全には排除できない。またH. circularisquama個体群自身も遺伝的に多様な群集で

構成されていると考えられることから、必ずしも再現性のある結果であるとは断言できない。H. circularisquamaの二枚貝に対する直接的作用を詳細に解析するためには、個体間の差異が非常に少ないH. circularisquamaと二枚貝が1対1の関係になるよう単純化された系で解析する必要がある。そこで、本章ではH. circularisquamaのクローン培養株を用いて室内で各種二枚貝に対する暴露実験とろ水率の測定等を行い、現場において観察された斃死状況やろ水率の低下などの生理作用の変化を証明するため室内実験を試みた。

#### 材料および方法

英虞湾から送られてきた赤潮海水中から、マイクロピペット洗浄法によりクローン培養株を作成した。マイクロピペットは、パスツールピペットの先端から40~60mm付近をガスバーナーで溶解させ、両端をすばやく引き延ばして作成された内径50~100 $\mu$ m程度のものを用いた。0.5~1.0mL程度の赤潮海水を予め紫外線を60秒以上照射して殺菌されたSedgewick-Rafter chamber上に展開し、倒立顕微鏡下で活発に遊泳するH. circularisquamaを同定しながら作成したピペットで素早く拾い上げた。0.1 $\mu$ mのシリンジフィルターでろ過滅菌された海水(現場海水に改変SWM3培地を約10%含ませたもの)を、8穴のイムノプロットング用スライドガラス(紫外線照射済)にそれぞれ1~2滴展開し、この海水中に分離されたH. circularisquama細胞を収容・再分離を4~6回繰り返すことで、新しい溶液へ順次移していった。この分離・洗浄の過程で、目的外の微細藻類を完全に排除した。最終的に洗浄された1細胞は、洗浄に用いた海水と同様なものを5mLずつ予め培養用試験管(外径18mm, TB-2800, 栄研器材社製)に分注し、75°Cで1時間加熱することにより制菌、室温まで冷却されたものに直接接種し、22 $\pm$ 1, 150 $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s, 12hL: 12hD明暗周期で培養した。接種10日目以降試験管内で増殖してきたH. circularisquamaの培養液の一部を分取し、再度顕微鏡下で形態や遊泳行動の特徴等からH. circularisquamaであるかどうかを確認した後、株番号を付して継代培養用の株とした。

暴露実験にはH. circularisquamaのクローン培養株(HA9201もしくはHA9402)を用いた。培養には、珪酸塩とCu<sup>2+</sup>を添加せず、ビタミンの添加量を規定量の1/50とした改変SWM3培地を使用した(Table 8参照)。培養条件は22 $\pm$ 1, 120 $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s, 12hL: 12hD明暗周期で、125mLの培地を含む250mL容の三角フラスコに元株を接種して実施した。接種後10~18日後の

対数増殖後期の細胞を適宜ろ過海水で希釈し、実験に使用した。

1. *H. circularisquama* が各種二枚貝に与える致死活性  
 暴露実験にはいずれも稚貝を用いた。広島湾から、マガキ *Crassostrea gigas* (殻高 $5.4 \pm 2.2$ mm), アサリ *Ruditapes philippinarum* (殻幅 $6.2 \pm 1.2$ mm), ムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* (殻高 $2.7 \pm 0.28$ mm), ホトトギスガイ *Musclista senhousia* (殻高 $13.3 \pm 1.2$ mm) の天然個体を採取し、ろ過海水中で2~4週間, *Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Heterocapsa triquetra*などを混合給餌しながら予備飼育を行った。アコヤガイ *Pinctada fucata martensii* (殻高 $19.9 \pm 2.2$ mm) はミキモト真珠研究所から譲り受けた稚貝(人工採苗)を同様に予備飼育して実験に用いた。この期間中足糸を十分に分泌したり、指で刺激すると速やかに閉殻動作を行う健全な個体を選抜して実験に用いた。

*H. circularisquama* の細胞密度を0~10,000 cells/mLの各段階に、曝気を十分に施したろ過海水(塩分31~33psu)で希釈して調整し、暴露実験に用いた。実験には一度洗浄された6穴のマイクロプレート(住友ベークライト社製)に稚貝を1個体ずつ収容し、これ

に *H. circularisquama* を含む試験海水を15mL添加してそのまま22時間、暗所で静置した。ホトトギスガイとアコヤガイはマイクロプレートに収容するにはサイズが大きかったため、100mL容のプラスチック製ビーカーに収容して試験を行った。この場合、試験海水の容量は30mLである。マガキの稚貝の場合、ホタテガイのコレクターに付着したままの状態でも1個体ずつ分離することができなかつたため、500mLの試験海水が入ったプラスチック製ビーカー中に、12個体の稚貝が付着した状態のコレクター片をそのまま収容して実験を行った。ろ過海水のみの区を対照区とした。いずれの実験区も、毎日朝9時および夜20時に、同じ細胞密度に調整され、予め十分に曝気を施した新鮮なものと交換した(対照区は海水のみの交換)。暴露実験中は適宜マルチプレートを直接倒立顕微鏡下で観察し、*H. circularisquama* が球形化していないかどうか確認した。供試貝の粘液放出などで *H. circularisquama* の球形化が著しい場合は、1日2回の換水にこだわらず適宜新鮮な *H. circularisquama* 懸濁液と交換した。試験海水の交換時に貝の生死を判別して集計した。生死の判別は開殻した状態の個体の外套膜をステンレス製のピンセットで強く刺激し、閉殻運動が見られるかどうかで判断した。

**Table 8.** Composition of modified SWM3 medium used for the exposure experiments of *Heterocapsa circularisquama*

Chemicals	Concentration
KNO <sub>3</sub>	170mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	15.6mg
EDTA-Na	11.2mg
Fe-EDTA	0.84mg
Mn-EDTA	6.9mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.24mg
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	17.3 μg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12.4mg
Thiamine-HCl	0.5 μg
Nicotinic acid	2.5 μg
Ca-Pantothenate	2.5 μg
p-Aminobenzoic acid	0.25 μg
Biotine	0.025 μg
Inositol	125 μg
Thymine	75 μg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.025 μg
Folic acid	0.05 μg
Tris	0.5g
Filtered seawater	1000mL

Autoclaved for 5 min

## 2. *H. circularisquama* がマガキの殻運動に及ぼす影響

マガキのclapping運動(激しい殻の開閉運動)に及ぼす *H. circularisquama* の影響を調べるため、広島湾から採取された殻高 $113 \pm 28$ mmのマガキを3L容ビーカーに収容し、2.5Lのろ過海水を満たした。これに、*H. circularisquama* を1~5,000 cells/mLの密度になるように接種し、マガキのclapping運動を目視で観察した。観察は10分間行い、この間に開閉した回数を記録した。実験は低密度から始め、実験と実験の間には、貝の餌料となる *Isochrysis galbana* を含む海水と交換し、1時間正常な状態で馴致させた後に再びろ過海水と交換し、次の実験に取りかかった。実験時の水温は14~17°Cの範囲にあった。

## 3. *H. circularisquama* がムラサキイガイの足糸形成に及ぼす影響

ムラサキイガイの足糸形成に及ぼす *H. circularisquama* の影響を調べるため、広島湾から採取した殻高 $4.9 \pm 0.58$ mmの稚貝を6穴の組織培養用マルチプレートに収容し、これに15mLの *H. circularisquama* を含む試験海水(200~30,000 cells/mL)を加えてそのまま暗所に静置した。暴露12時間後にプレート壁面に足

糸で付着している個体の割合を計数した。足糸の形成率は、正確には各個体が産生した足糸の本数を数えるべきであるが、今回は1本でも形成して壁面に付着していれば形成されたと見なして集計した。対照区は改変SWM3培地を15%含有させたろ過海水で行った。

#### 4. H. circularisquamaが各種二枚貝のろ水率に及ぼす影響

ろ水率の測定は、稚貝と同様広島湾から採取された天然個体群（アコヤガイのみミキモト真珠研究所より譲り受けた）を予備飼育し、指による刺激により速やかに堅く閉殻する健全な個体を選抜して行った。方法はMatsuyama and Uchida (1997) に準じて行った。なお、ここで言うろ水率 (Filtration rate) とは、プランクトンの保有色素であるクロロフィルの自家蛍光（青色励起光に対する赤色の蛍光）を細胞密度の指標とみなし間接的に測定されたものである (Brand and Guillard, 1981)。従って、正確には餌料除去率 (Clearance rate) のことである (詳細は大森, 池田, 1976参照)。体内に取り込んだ海水量とそこから除去される餌料の密度とは相関があっても、鰓によって捕捉されるプランクトンの割合は必ずしも100%とは限らない (Jørgensen, 1990)。従って、厳密にはろ水率は餌料除去率を鰓における捕捉率で除した値を示す。しかしながら、予備試験の結果、対照として用いた微細藻類 (*I. galbana* や *H. triquetra*) が貝により捕捉される割合は90%以上であり、また、与えられた *H. circularisquama* は偽糞として再び実験海水中に放出されて再懸濁することがほとんどないと判断されたことから、以後は餌料除去率をろ水率として扱うこととした。

餌料密度は二枚貝のろ水率に少なからず影響を及ぼすため (Ali, 1970; Schulte, 1975; Winter, 1978), 実験時の餌料密度は統一した。すなわち、改変SWM3培地で培養された *I. galbana* を、クロロフィルa換算でおよそ20  $\mu\text{g/L}$ 前後になるように曝気を施したろ過海水で希釈・調整した。 *H. circularisquama* をこの調整海水で細胞密度が0~500 cells/mLになるように希釈し、ただちにろ水率の測定を行った。全体のクロロフィルaに占める *H. circularisquama* の割合は常に5%以下であった。対照区には *I. galbana* のみを与えて測定した。二枚貝は改変SWM3の培地成分であるフリーのEDTAに対して敏感で、希釈の段階で培地の割合が概ね30%を超えると閉殻したり、ろ水率を低下させる個体が見られる。従って、希釈の過程で培養液の混入量 (キャリアオーバー) は常に試験海水総量の15%以内に留まるよう注意を払った。

供試貝をろ過海水が満たされた100mL容の半透明ブ

ラスチック製ビーカーにろ過海水と共に収容し、一晚静置して飢餓状態においた。翌日新鮮海水で軽く洗浄後、試験海水を50~80mL添加して実験を行った。対照区の試験 (*I. galbana*のみ) を実施後、同じ個体で *H. circularisquama* 含有試験液を供試するという手順で実施した。 *H. circularisquama* の摂餌試験を一度でも行った供試貝はストレスを受けたものと見なし、以後の試験には使用しなかった。実験当日の最初の第1回目の測定 (対照区) は馴致とみなし、参考値として記録するものの、測定結果からは除外した。従って、対照区を2回 (安定しない場合は3回以上のこともある) 繰り返し実施した後、 *H. circularisquama* 試験液を使った本実験を1回だけ行った。試験海水を収容後 (この段階で供試貝は干出を受けた直後なの閉殻している)、直ちに試験海水を4~5mL採取してTurner design社製の蛍光光度計 (Model 101) を用いて *in vivo* 蛍光値の測定を行った ( $F_0$ )。蛍光値の測定に用いた海水は再び元の容器に戻した。そして容器の側面から貝の状態を注意深く、しかし照明の陰などに入ったり不用意な音を立てて供試貝にストレスを与えないよう細心の注意を払って観察し、貝が試験海水中で最初に開殻した瞬間を0時間とし、10~30分後に適宜試験海水を4~5mL採取し、再び蛍光値を測定した ( $F_t$ )。ほとんどの場合、供試貝は試験海水を収容後数分以内に開殻するが、10分以上経過しても開殻しない個体が居た場合 (特にマガキ) は実験対象から除外した。実験中偽糞や糞が認められた場合は、パスツールピペットを用いてこれらを除去した後に蛍光値の測定を行った。ろ水率はCoughlax (1969) の示した式に準じて計算した。すなわち、

$$FR = \ln(F_0/F_t) \cdot M/t$$

ここで、FRはろ水率 (L/individual/h)、 $F_0$  は実験開始時の試水の *in vivo* 蛍光値、 $F_t$  は t 時間後の試水の蛍光値、Mは試水の量 (L)、t は実験時間 (h) である。実験中はろ水活動を低下させないために、曝気や攪拌などの操作は行わなかった。実験中は試験貝自身によるろ水活動のため、容器内部の細胞密度はほぼ均一に攪拌されていた。また、予備試験では、実験中の酸素濃度は3 mg/Lを下回ることは無かったので、ろ水活動に影響を及ぼすほど酸素濃度が低くなることはない判断された。実験は殻高が整った5個体以上を同じ条件下で実施して平均値と標準偏差を求めた。

#### 5. H. circularisquama以外の他種鞭毛藻類がろ水率に及ぼす影響

*H. circularisquama* と形態的に酷似している渦鞭毛藻類をムラサキガイに暴露し、どのような影響が見

られるのが調べた。広島湾から *H. triquetra* と *Scrippsiella trochoidea* をピペット洗浄法により分離し、*H. circularisquama* と同様に改変SWM 3 培地で

培養した。*H. circularisquama*, *H. triquetra*, *S. trochoidea* の 3 種の渦鞭毛藻を初期密度 8,000 cells/mL になるよう、予め曝気された過海水で調製し(この実験では *I. galbana* は含まない)、生物検定に用いた。対照区には *I. galbana* (80,000 cells/mL) のみを同様に調製して用いた。

先に述べたように、これらの試験の過程で、細胞密度の変化を *in vivo* 蛍光値で代用したが、細胞密度と蛍光値の間には Fig. 25 に示したように強い正の相関関係が見られることを予め確認してある。

結 果

1. *H. circularisquama* が各種二枚貝に与える致死活性  
 英虞湾産培養株を用いて暴露実験を行った結果を Fig. 26 に示す。なお、暴露実験中の *H. circularisquama* の細胞密度の変化は、100 cells/mL の実験区で初期密度の 11~79%、それ以外の実験区では初期密度の 60~134% の範囲にあった。いずれの貝においても、暴露密度が高くなるほど、生残率は低下した。顕著な斃死が観察される細胞密度は貝の種類により異なったが、概ね 5,000~10,000 cells/mL 以上で多くなっていた。マガキとホトトギスガイでは、1,000 cells/mL の暴露においても生残率がそれぞれ 60% および 0% まで低下したことから、外の 3 種と比較して耐性が低いことが伺われた。また暴露開始後 2 日目を経過したところから斃死が顕著になっていた。すべての実験区において、対照区の斃死は全く認められなかった。

*H. circularisquama* に暴露された二枚貝は、いずれも特徴的な症状を示した。アコヤガイおよびマガキで

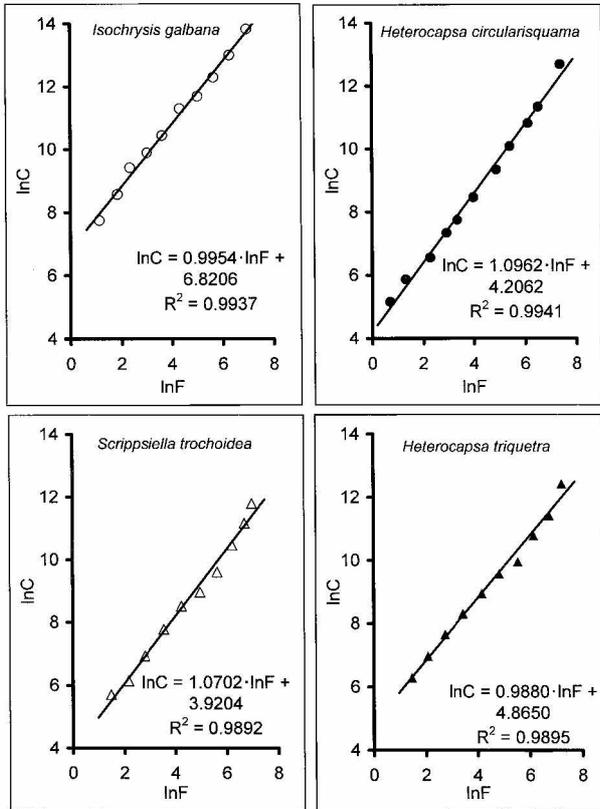


Fig. 25. Correlations between natural logarithm of cell densities (C; cells/mL) and natural logarithm of *in vivo* fluorescence (F; relative units) for the 4 microalgal species used in this study

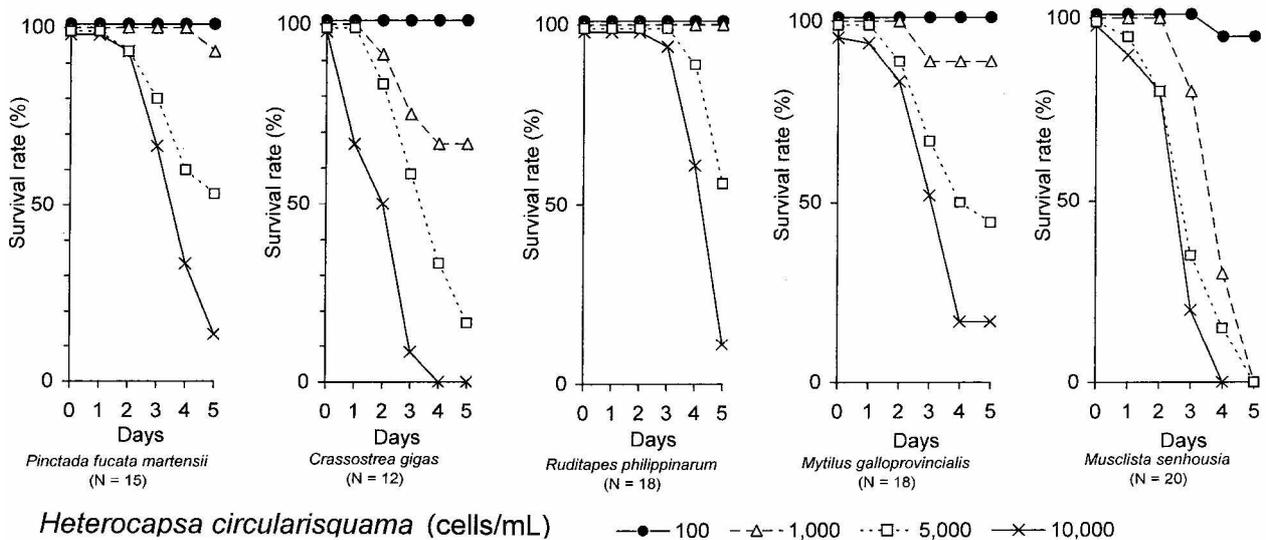


Fig. 26. Effects of *Heterocapsa circularisquama* on the survival of five bivalve molluscs

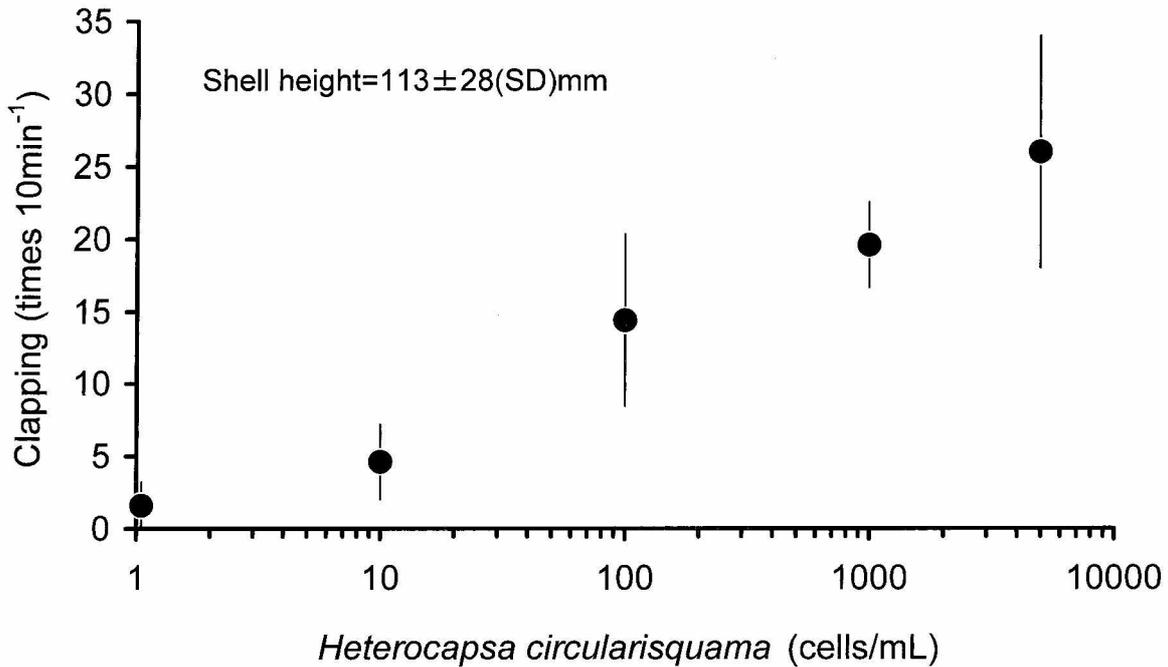


Fig. 27. Effects of *Heterocapsa circularisquama* cells density on the adductor muscle activity (clapping behavior) of *Crassostrea gigas*

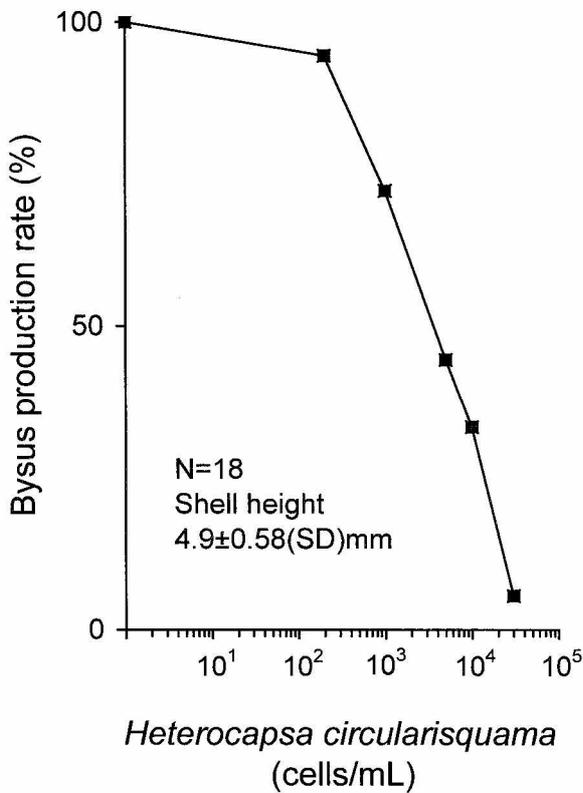


Fig. 28. Effects of *Heterocapsa circularisquama* cells density on the byssus production rate of *Mytilus galloprovincialis*

は、暴露直後から激しい殻の開閉運動を短期間に引き起こすclappingという現象が頻繁に観察され、アサリでは出水管を閉じ、入水管から激しく水流を逆流させるvomitingという現象が観察された。さらに、アコヤガイ、ムラサキガイ、およびホトトギスガイでは、顕著な足糸形成阻害が観察された。外套膜の収縮と閉殻はすべての種類に共通して観察された。こうした作用は数時間～1日程度継続し、やがて継続的な閉殻状態に陥った。閉殻は1日～数日間継続するが、やがて大きく開殻したままの状態になり、ピンセットで外套膜を強く刺激することで緩やかに閉殻する麻痺状態に陥る。麻痺状態に陥った1～2日後にはほとんどの個体が斃死した。斃死個体に顕著な外傷は認められないものの、鰓や外套膜周辺の粘液分泌が激しく、*H. circularisquama*の凝集した細胞が付着している個体も多かった。アコヤガイやアサリでは斃死した個体の中腸腺の色調は暗褐色からオレンジ色へと顕著に薄くなっていた。

2. *H. circularisquama*がマガキの殻運動に及ぼす影響

*H. circularisquama*の細胞密度とマガキのclappingとの関係をFig. 27に示す。通常、マガキは開殻した状態で外套膜縁辺部を伸張し、ろ水活動を行っているが、*H. circularisquama*を含む海水を取り込むと、入水側や出水側の外套膜が小刻みに収縮するなど異常な動き

を示す。こうした動作がしばらく観察されると、やがて出水側に形成されている外套膜孔を緩やかに閉鎖した状態でゆっくりと大きく開殻し、そして急激かつ力強く閉殻することにより、体内に取り込まれた海水を入水側からジェット流のように吐き出す。こうした clapping 行動はすべての試験区で観察された。1 cell/mL では 2 回/10min と低い回数であるが、細胞密度の増加とともに頻度が高くなり、100 cells/mL で 14 回/10 min、5,000 cells/mL では 22 回/10min まで増加した。

### 3. *H. circularisquama* がムラサキイガイの足糸形成に及ぼす影響

*H. circularisquama* の細胞密度とムラサキイガイの足糸形成率との関係を Fig. 28 に示す。ろ過海水ではすべての個体が 5 ~ 13 本の足糸を分泌してマルチプレートの壁面に強固に付着していた。100 cells/mL においても 95% の個体が付着していたが、1,000 cells/mL を越えるあたりから足糸の形成率が減少し始め、5,000 cells/mL では 45%、30,000 cells/mL では 5% まで減少した。付着していない個体の多くは閉殻して容器底部に横たわっていた。

### 4. *H. circularisquama* が各種二枚貝のろ水率に及ぼす影響

5 種類の二枚貝類のろ水率と *H. circularisquama* の初期細胞密度との関係を Fig. 29 に示す。いずれの二枚貝も *H. circularisquama* の細胞密度が 20 cells/mL を越えるあたりからろ水率の低下が見られ、すべての種

類において、50 cells/mL ではろ水率が対照区の半分以下になった。200 cells/mL で 20% 以下にまで減少した。マガキは他の 4 種と比較すると極めて敏感で、2 cells/mL の暴露において既に対照区に対して有意に低く、10 cells/mL ではほとんどろ水活動が停止した。ろ水率の減少が見られる試験区では、いずれの貝類も外套膜や水管の収縮、clapping、vomiting などの異常行動が観察された。偽糞の排泄は全く観察されなかった。

### 5. *H. circularisquama* 以外の他種鞭毛藻類がろ水率に及ぼす影響

*H. circularisquama* を 8,000 cells/mL の細胞密度で暴露した場合、ムラサキイガイのろ水率はほとんど停止した状態であったが、Fig. 30 にも示したように *H. triquetra* および *S. trochoidea* のろ水率は対照として用いた *I. galbana* とほぼ同じであった。また、*H. circularisquama* の暴露において観察された外套膜の収縮や閉殻などの作用は全く観察されなかった。

## 考 察

*H. circularisquama* は供試した 5 種の二枚貝すべてに対して致死的作用を示した。生残率の低下は 1,000 ~ 10,000 cells/mL の細胞密度で顕著に認められた。*H. circularisquama* に暴露された二枚貝は外套膜の収縮、clapping、閉殻、粘液の過剰分泌や中腸腺の退色など現場赤潮海域で頻りに観察された拒否反応と全く同じ症状を呈していた。また、暴露実験中、試水中の *H.*

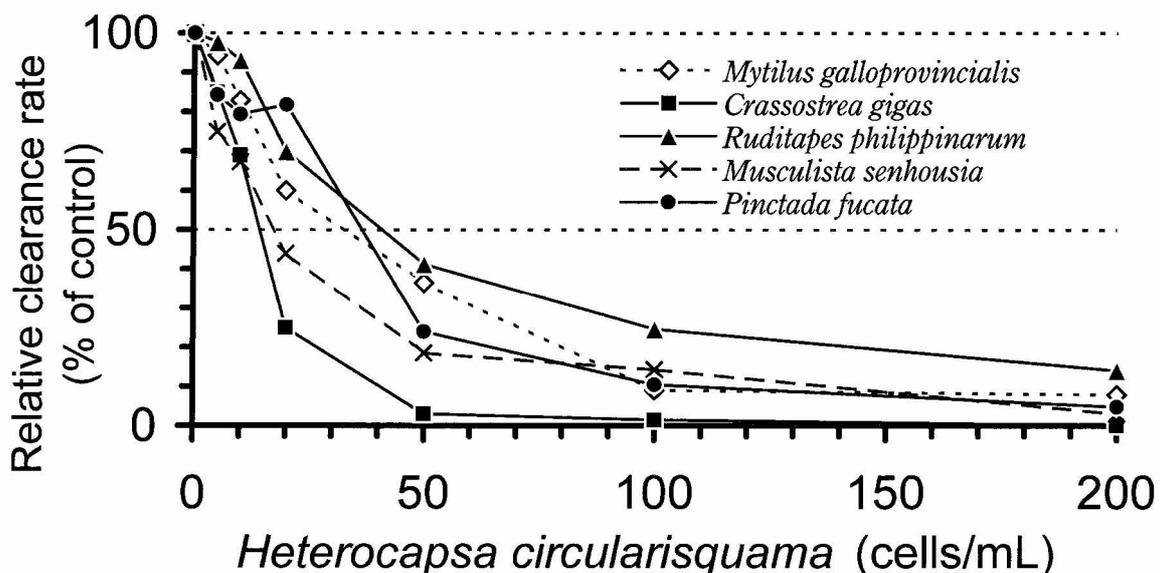


Fig. 29. Changes of the relative clearance rate (Control = 100) of five different species of bivalve molluscs exposed to *Heterocapsa circularisquama*

*circularisquama* の細胞密度は100 cells/mLなど低密度暴露区を除いてほとんど低下せず、むしろ5~30%増加していたことから、貝は*H. circularisquama* を全く摂食していなかったと考えられる。Nagai *et al.* (1996) は、*H. circularisquama* のクローン株を用いてアコヤガイ稚貝の暴露実験を行っている。アコヤガイ稚貝は*H. circularisquama* の細胞密度が5,000~10,000 cells/mLを越えると48時間以内に半数の個体が斃死した。斃死した稚貝は外套膜や鰓の異常な収縮、閉殻、心拍停止などの症状を示していた。今回の実験でもアコヤガイは5,000 cells/mL以上で顕著に斃死したことから、Nagai *et al.* (1996) の知見とよく一致する。

さらに、二枚貝のろ水率は*H. circularisquama* の細胞密度が20~50 cells/mLを越えると顕著に低下することが判明した。こうした作用は形態的に酷似した*H. triquetra*や*S. trochoidea*といった他種渦鞭毛藻を、同じ条件下で暴露しても全く観察されず、*H. circularisquama* に特異的な作用であることも明らかとなった。以上の結果から、現場海域で問題となっている二枚貝の異常な生理活動の変化や斃死は、*H. circularisquama* が有する特異的な毒性により直接引き起こされていると結論づけられる。

今回は西日本海域で主に養殖されている(あるいは

天然海域に優占している)5種類の二枚貝について詳細に調べたが、現場ではシオヤガイ、カガミガイ、バカガイ、ヒオウギガイ、タイラギなど各種の二枚貝に被害が及んでいる(Table 3参照)。また、予備的な試験では、ホタテガイをピーカーに収容して*H. circularisquama* の培養液を添加するとホタテガイは激しく開閉を繰り返して殻内から水流をジェットのように吹き出し、たちまちピーカーから飛び出してしまった。従って、*H. circularisquama* は二枚貝全般に強く毒性を示すものと思われる。

本邦の代表的な赤潮生物である*Chattonella* 属では、魚類に対する影響について多くの知見がある(Okaichi, 1989; Honjo, 1994)。 *Chattonella antiqua* は魚類の鰓組織を破壊し、これによって影響を受けた魚類は酸素の補給が困難になり、やがて窒息死するものと考えられている(Shimada *et al.*, 1993; Okaichi, 1989; Ishimatsu *et al.*, 1990; Honjo, 1994; Ishimatsu *et al.*, 1996a)。この鰓を破壊する物質として、高度不飽和脂肪酸(西尾, 1982; Okaichi, 1989)、活性酸素(Shimada *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1994; Oda *et al.*, 1992; Ishimatsu *et al.*, 1996b; Kim *et al.*, 2000a)、神経毒(Onoue *et al.*, 1990; Endo *et al.*, 1991)等が提唱されているが、詳細については依然不明である。*H. circularisquama* の暴露においても、二枚貝の

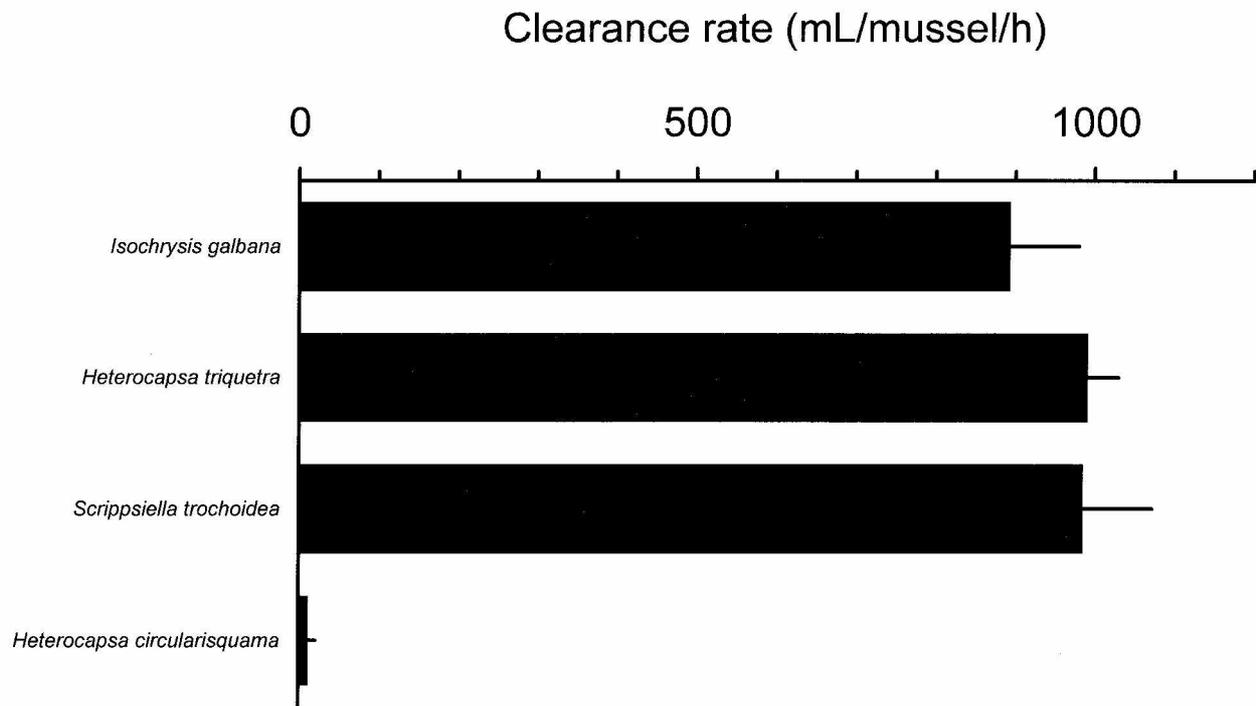


Fig. 30. Clearance rate (L/mussel/h) of *Mytilus galloprovincialis* exposed to four different species of microalgae. Cell densities are 80,000cells/mL for *Isochrysis galbana* (control) and 8,000cells/mL for other species. Bars show  $\pm$ SD.

鰓組織は著しい粘膜に覆われていること、その鰓上には多量の *H. circularisquama* が付着していることから、窒息死の可能性も考えられる。しかしながら、今回実験で用いたムラサキイガイは、魚類とは異なり、嫌気的条件下に非常に強いことで知られている（平井，林，1986）。過去の試験によれば、ムラサキイガイは無酸素状態におかれても20日間生き続けるという（平井，林，1986）。これは、二枚貝が低酸素の条件下におかれると嫌気的な代謝経路に切り替えて生残を可能にしているためであると考えられている（平井，林，1986）。しかしながら，10,000 cells/mL以上の *H. circularisquama* に暴露されたムラサキイガイは，数日から1週間程度でほとんど死滅してしまうことから，斃死の直接の原因を窒息・酸欠死であると断定することは困難である。

また，ろ水率を低下させる要因として物理学的な作用が指摘されている。すなわち，二枚貝のろ水率は餌料密度とともに上昇し，ある一定濃度で飽和した後は逆に減少すると言われている（例えばSchulte, 1975）。今回の実験においては，初期密度を20  $\mu\text{g/L}$ 前後に統一しているので高餌料密度による影響は少ないと考えられる。実際に，*H. circularisquama* と形態的に酷似した他種渦鞭毛藻は同じ密度であってもムラサキイガイに順調に摂食されており，何ら悪影響は認められないこと，ろ水活動の減少は20~100 cells/mLという赤潮密度の1/100においても認められることから，物理的な窒息によって悪影響を受けているとは考えられなかった。従って，いずれの場合も *H. circularisquama* の特異的な毒性作用によって引き起こされていると判断するのが妥当である。

二枚貝の摂餌応答は粒子のサイズ，密度，形状，種類（無機物あるいは有機物）など物理化学的な性状によって支配されていると言われている（Ali, 1970; Schulte, 1975; Winter, 1978）。植物プランクトンについても，基本的にはサイズや形状が摂餌応答によってのみ影響すると考えられてきた。ところが最近になって，二枚貝は複数種の植物プランクトンが混在した中から特定のサイズのものを選択的に摂食したり（Shumway *et al.*, 1985），形態が同じでもそれらの化学的な性状を認識して取舍選択する高度な能力が備わっていることが明らかとなった（Shumway and Cucci, 1987; Ward *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1997）。今回実験に用いた二枚貝類はいずれも通常の餌料である *Isochrysis galbana* に低い割合で *H. circularisquama* が混在していても，それを認識してろ水量を低下させていたことから，何らかの化学的機構で *H. circularisquama* の毒性物質を認識できているものと判断される。

## 第2節 環境要因が *H. circularisquama* の致死活性に及ぼす影響

前節で *H. circularisquama* の培養細胞が天然細胞同様に二枚貝に対して致死活性等を示すことを明らかにした。室内実験で得られた細胞密度と貝の斃死率との関係は，現場で出現していた *H. circularisquama* の細胞密度と斃死率の推移状況に非常に類似しており，斃死が *H. circularisquama* によって直接引き起こされていると判断された。また，ろ水率の低下やclappingなどの作用も，おおむね50~200 cells/mL以上で観察されたことから，現場での観察とよく一致する。さらに，*H. circularisquama* に形態的に酷似している他種渦鞭毛藻ではろ水率の低下など顕著な阻害活性が認められなかったことから，二枚貝の斃死や拒否反応は，*H. circularisquama* 自身が有する特異的な毒性によって引き起こされていたことは明らかである。

ところで，*Alexandrium* 属などの有毒渦鞭毛藻では，水温，塩分，栄養塩濃度あるいはそれらの比によって細胞内の毒含量や毒組成が変化することが知られている（White, 1978; Boyer *et al.*, 1987; Ogata *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1990; Usup *et al.*, 1994; Cembella, 1998; Lippemeier *et al.*, 2003）。従って，室内実験で得られた結果を基に，現場における貝の斃死を推察する上では，*H. circularisquama* の二枚貝に対する毒性が環境要因，特に水温，塩分，栄養塩濃度などによってどの程度影響を受けるのか見極める必要がある。そこで，*H. circularisquama* を異なった条件下で培養し，これを使って暴露実験を行うことにより，環境要因が本種の毒性に及ぼす影響を調べた。

## 方 法

### 1. 水温の影響

実験には1994年に英虞湾から分離された *H. circularisquama* (HA9402) を用いた。*H. circularisquama* (HA9402) を15, 20, 25 の各温度で1ヵ月以上，改変SWM3培地で培養（120  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 12hL: 12hD明暗周期）して馴致させ，対数期後期の細胞を十分に曝気したろ過海水（31psu）で10,000 cells/mLの密度になるように調整し，暴露実験に用いた。実験に用いた貝は，1996年10月に広島湾で採捕したムラサキイガイ稚貝（殻高 $2.75 \pm 0.41\text{mm}$ ）で，1996年10月30日に広島湾で採取し，それぞれ15, 20, 25 の水温で3週間，微細藻類（*Isochrysis galbana* および *Skeletonema costatum*）を1日おきに給餌しなが

ら予備飼育したものを実験に用いた。稚貝を予め洗浄された12穴のマイクロプレートに1個体ずつ収容し、これに*H. circularisquama* 試験水を5 mL毎に添加してそれぞれ15, 20, 25 の水温で実験を行った。*H. circularisquama* の試験海水は毎日、各水温で培養された株を用いて同じ細胞密度に調整されたものと交換した。試験海水の交換時に貝の生死を判別して集計した。生死の判別は開殻した状態の個体の外套膜をステンレス製のピンセットで数回強く刺激し、閉殻運動が見られるかどうかで判断した。

## 2. 塩分

実験には1994年に英虞湾から分離された*H. circularisquama* (HA9402)を用いた。*H. circularisquama* をそれぞれ28, 30, 32, 34psuの塩分に調製した改変SWM3培地(希釈は超純水,ピュリックL,オルガノ社製)で1ヵ月以上,22, 120  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 12hL: 12hD明暗周期で培養して馴致させ、定常前期の細胞を同じ塩分濃度で十分に曝気したる過海水で10,000 cells/mLの密度になるように調整し、暴露実験に用いた。なお、培養期間中の自然蒸発による塩分濃度の上昇を補正するため、*H. circularisquama* の培養フラスコの全重量を2日毎に計量し、減少分と同重量の滅菌超純水を培養液に添加した。実験に用いた貝は1996年10月に広島湾で採捕したムラサキガイ稚貝(殻高 $4.50 \pm 0.47\text{mm}$ )で、1996年10月30日に広島湾で採取し、各塩分濃度で3週間予備飼育したものを実験に用いた。実験中の水温は22~23 の範囲にあった。稚貝を12穴のマイクロプレートに1個体ずつ収容し、これに*H. circularisquama* 試験水を5 mLずつ添加して22 の水温で実験を行った。*H. circularisquama* 試験水は毎日、各塩分濃度で培養された株を用いて同じ細胞密度に調整されたものと交換し、生死の判別はピンセットによる刺激で判別した。

## 3. 栄養塩濃度

実験には1994年に英虞湾から分離された*H. circularisquama* (HA9402)を用いた。*H. circularisquama* を窒素(N)・リン(P)無制限培地(N=1000  $\mu\text{M}$ , P=66.65  $\mu\text{M}$ , N:P=15), 窒素濃度制限培地(N=200  $\mu\text{M}$ , P=50  $\mu\text{M}$ , N:P=4), リン濃度制限培地(N=1000  $\mu\text{M}$ , P=10  $\mu\text{M}$ , N:P=100)でバッチ培養を行った(22, 120  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 12hL: 12hD明暗周期)。窒素およびリンの十分濃度添加培地はいずれの成分も欠乏状態にならないよう、対数増殖期後期から毎日培養総量の1/5にあたる量を抜き取り、同量の新鮮培地を補充した。

*H. circularisquama* は細胞外の栄養塩が欠乏し、さらに細胞内に蓄積している栄養塩も消費して完全な栄養塩欠乏状態に陥ると増殖が停止する。さらに、細胞が全体的に細長かつ大きくなる(Yamaguchi *et al.*, 2001)と同時に、色調も淡い褐色から暗黒褐色へと変化する。また、直進運動距離が短くなり、本種に特有なキツキ運動の頻度が著しく高くなる。従って、増殖が停止し、かつ上述のような栄養塩欠乏状態に特有な細胞形態と遊泳行動を示すようになった段階で、それぞれ窒素欠乏(N欠), リン欠乏(P欠)に達したと判断して実験を開始した。実験開始時の培養液中のN, P濃度を確認するため、一部を0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、栄養塩分析に供した。

N欠, P欠状態に達した細胞は、超純水で希釈された土佐湾沖の黒潮表層水(塩分30.3psu, N=0.21  $\mu\text{M}$ , P=0.08  $\mu\text{M}$ )で10,000 cells/mLの密度になるように調整し、暴露実験に用いた。実験に用いた貝はムラサキガイ稚貝(殻高 $2.96 \pm 0.25\text{mm}$ )で、1996年12月20日に広島湾で採捕し、それぞれ21 の水温で2ヵ月間予備飼育したものを6穴のマイクロプレートに1個体ずつ収容し、これに*H. circularisquama* 試験水を10 mLずつ添加して22~23 の水温で実験を行った。試験期間中に二枚貝から排泄される窒素・リンの濃度を最小限にするため、実験には上述のN, Pをほとんど含まない黒潮海水に稚貝を2日間浸潤して体内の排泄物を可能な限り取いた後に暴露実験に供した。

## 結 果

### 1. 水温の影響

3段階の異なる水温条件下で培養された*H. circularisquama* を用いて行ったムラサキガイの暴露実験結果をFig. 31に示す。15 および20 の試験区では実験開始後3日目以降から斃死が観察され始め、実験終了時の7日目における生残率はそれぞれ80%および75%であった。一方、25 の実験区では実験開始後2日目で既に生残率は80%まで低下し、実験終了時である7日目の生残率は35%まで低下した。従って、ムラサキガイの斃死は明らかに水温上昇と共に高くなる傾向が認められた。

### 2. 塩分の影響

5段階の異なる塩分条件下で培養された*H. circularisquama* を用いて行ったムラサキガイの暴露実験結果をFig. 32に示す。28と30psuの実験を除いて、実験開始後2日目以降から斃死が観察された。28~30psuの範囲では生残率を示す曲線は他の塩分濃度での実験

結果と異なり、実験終了時の6日目における生残率はいずれも80%にとどまった。全体的に見てムラサキイガイの生残率は塩分濃度の上昇と共に低下する傾向にあり、実験終了時の生残率は32psuで55%、34psuで25%まで低下した。

### 3. 窒素, リン制限の影響

Fig. 33に暴露実験に用いた*H. circularisquama*の増殖曲線を示す。N制限およびP制限培養のいずれも培養開始後11日目にほとんど増殖が停止し、13日目には栄養塩欠乏細胞に特有な形態と遊泳行動を示すようになった。従って、暴露実験は培養開始後14日目以降の細胞を用いて実施した。なお、この時、培養液中に残存していた栄養塩濃度は、N制限培地で $N = 0.37 \mu M$ 、P制限培地で $P = 0.09 \mu M$ であった。また暴露後1日目から2日目にかけて、暴露実験中の培養器内での*H. circularisquama*の増加量を調べたところ、NP無制限区で23%、N制限実験区で11%、P制限実験区で4%であった。

3区分の異なる栄養塩濃度で培養された*H. circularisquama*を用いて行ったムラサキイガイの暴露実験結果

をFig. 34に示す。NP無制限細胞では実験開始後2日目以降から斃死が見られ始め、7日目の実験終了時における生残率は56%まで低下した (Fig. 34)。一方、N欠培養細胞を用いて行った実験区では、斃死は少ない割合でしか観察されず、実験終了時においても生残率は94.4%を維持していた。P欠培養細胞を用いて行った実験区では、生残率のカーブはNP無制限区をやや上回る勢いで低下し、実験終了時の生残率は44%まで低下した。従って、*H. circularisquama*の毒性は、N欠細胞で著しく低下し、P欠細胞ではNP無制限細胞と同じかそれ以上の毒性を示すことが判明した。

### 考 察

*H. circularisquama*の毒性が水温、塩分、栄養塩濃度のいずれによっても大きく影響を受けることが明らかとなった。このことは、環境要因が時々刻々と変化する非定常な現場海域において、*H. circularisquama*の毒性自身もそれに応じて変化していることを示すものである。今回の結果から判断すると、*H. circularisquama*がムラサキイガイを斃死させる能力は、高水温、高塩分、

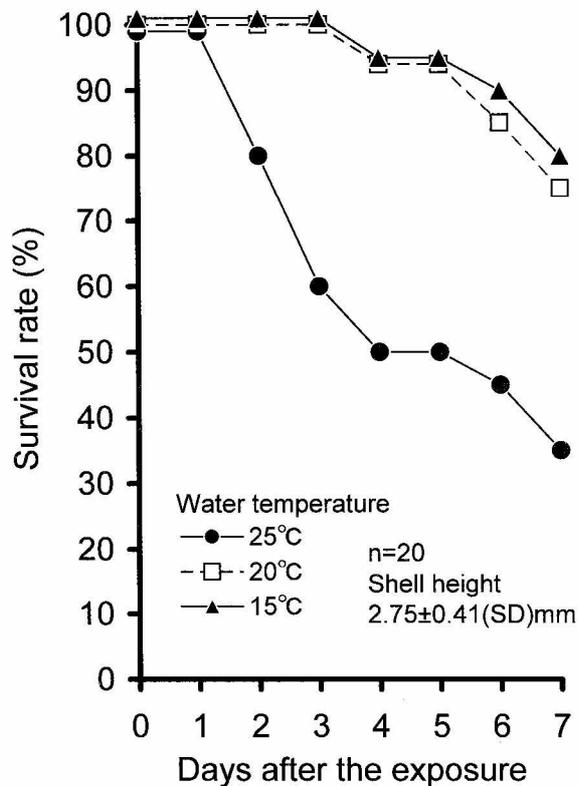


Fig. 31. Effects of *Heterocapsa circularisquama* exposure (10,000cells/mL) on survival of *Mytilus galloprovincialis* spat (shell height:  $4.50 \pm 0.47$ mm) under three different water temperature conditions

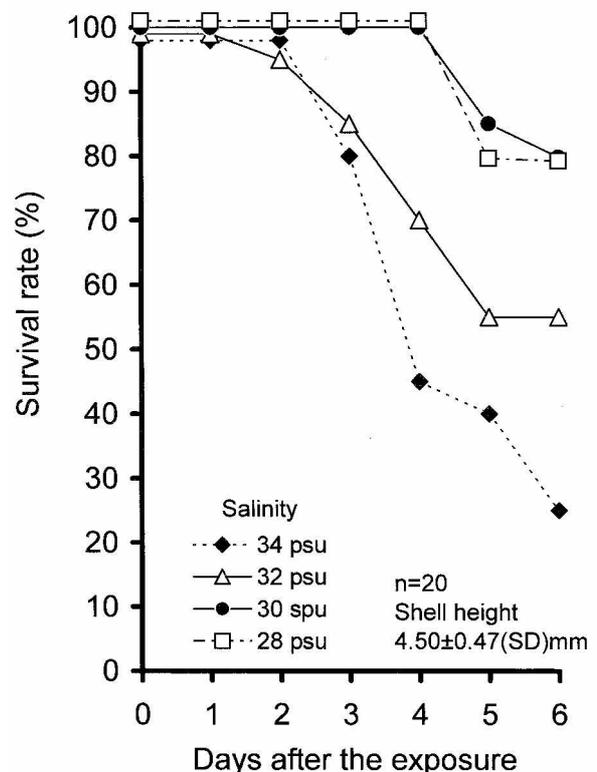


Fig. 32. Effects of *Heterocapsa circularisquama* exposure (10,000cells/mL) on survival of *Mytilus galloprovincialis* spat (shell height:  $4.50 \pm 0.47$ mm) under four different salinity conditions

P欠環境下において高く、低水温、低塩分、N欠環境下では著しく低いことが判明した。各項目別で見ると、ムラサキガイの生残率は水温の違いにより最大3.25倍、塩分の違いにより3.75倍、栄養塩濃度の違いにより10倍の開きが生じる可能性があることが示唆される。今回の実験では明らかにすることができなかったが、これらの組み合わせによってはさらに生残率に大きな違いが生じる可能性も十分に考えられる。

*Chattonella* 属 *Karenia mikimotoi*、*Cochlodinium* 属、*Heterosigma akashiwo* などでは水温、塩分、光強度などの環境要因と魚毒性との因果関係については全く調べられていない。一方、有毒渦鞭毛藻などでは、細胞内に保持している毒が、水温、塩分、光強度、栄養塩濃度などの環境条件によって大きく変動することが多数報告されている (White, 1978; Ogata *et al.*, 1987; Boyer *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1990; Usup *et al.*, 1994; Flynn *et al.*, 1996; Cembella, 1998; Parkhill and Cembella, 1999; Taroncher-Oldenburg *et al.*, 1999; Hwang and Lu, 2000; Lippemeier *et al.*, 2003)。一般的に有毒プランクトンの細胞内毒は分裂の際に娘細胞に分配されるため希釈を受ける (Singh *et al.*, 1982; Ogata *et al.*, 1987; Boyer *et al.*, 1987; Parkhill and Cembella, 1999; Hang and Lu, 2000; Lippemeier *et al.*, 2003)。従っ

て、至適増殖速度帯では増殖速度は高いものの、細胞内毒量は低く、低水温側では増殖速度が低下するが、細胞あたりの毒量が増えると言われている (例えば, Ogata *et al.*, 1987)。 *H. circularisquama* の場合は至適増殖水温は27.5~32.5°Cの高水温で増殖が活発である (松山, 2003)。今回設定した3段階の水温の中では最も高温側でかつ増殖至適水温に近い25°Cにおいて毒性が高く、それより水温が低下すると毒性は低下したことから、有毒プランクトンなどで知られているパターンとは異なるようである。また、塩分については、高塩分側で毒量が高くなることが報告されているが (White, 1978)、 *H. circularisquama* についても同様の結果が得られた。いずれにしても、松山 (2003) で明らかになったように、 *H. circularisquama* の赤潮は夏期のような高温・高塩分環境下で発生する。これを裏付けるように、室内実験においても *H. circularisquama* は高温・高塩分領域において最も活発に増殖することが明らかなので (Yamaguchi *et al.*, 1997; 松山, 2003)、 *H. circularisquama* がムラサキガイを斃死させる能力は、本種が活発に増殖する水温・塩

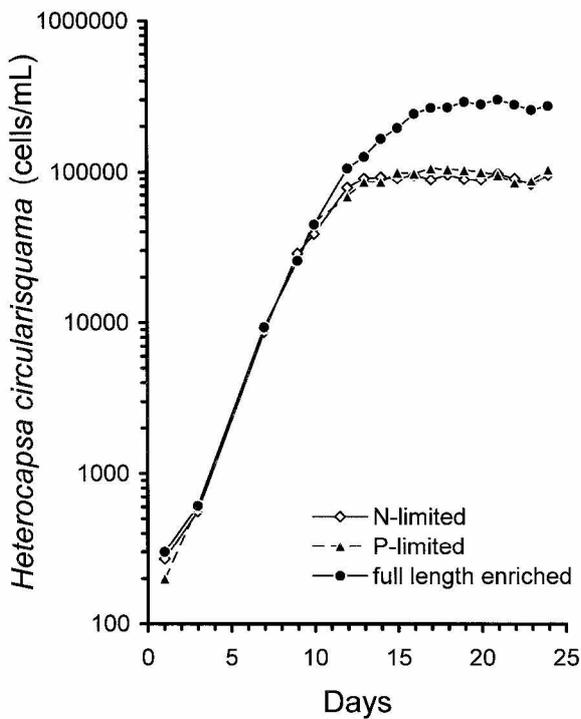


Fig. 33. Growth curve of nitrogen or phosphorus limited culture of *Heterocapsa circularisquama* used in exposure experiments

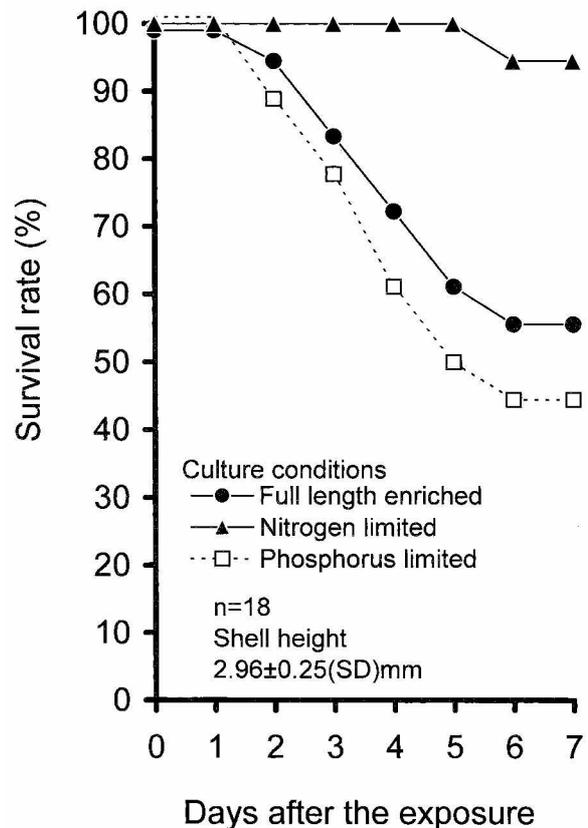


Fig. 34. Effects of nitrogen- and phosphorus-limited cells exposure of *Heterocapsa circularisquama* (10,000cells/mL) on survival of *Mytilus galloprovincialis* spat (shell height: 2.96 ± 0.25mm)

分領域と密接に関連していると言える。

また、赤潮のように原因生物が着色を伴う程度まで高密度に増殖した場合は、水中の栄養物質を急速に消費し、窒素やリンなど栄養塩が枯渇することが知られている。実際に1995年の英虞湾や広島湾における*H. circularisquama*赤潮の盛期に無機態のリンが枯渇し、1998年の広島湾の赤潮では無機態の窒素が枯渇していた(松山ら, 1997; 松山, 2003)。今回の結果は、赤潮生物が増殖して海水中の窒素やリンを消費していく過程で、窒素制限状態に陥るのか、リン制限状態に陥るのかによって二枚貝に対する毒性が著しく変わってくることを明示している。1995年の広島湾では水温が13~17と比較的低温環境下で発生していたにも関わらず、マガキやアサリに大きな漁業被害が生じたが、この時の広島湾海域は*H. circularisquama*の毒性がほとんど低下しないリン制限状態におかれていた(松山, 2003; 第4章参照)。植物プランクトンの窒素・リンの利用割合はいずれの種においてもほぼRedfield比(N:P=16:1)に近い値をとるので、赤潮発生直前に予め海域の窒素およびリンの濃度を把握しておくことで、本種が高密度な赤潮状態に陥った時に窒素もしくはリンのいずれかが制限状態に先に達するか否かをある程度予測できる。これは将来起こりうる*H. circularisquama*赤潮の毒性が高いか低いかを推定するのに非常に有効であろう。今回の試験でリン制限条件下で*H. circularisquama*の毒性は非制限条件下と同じか高くなる傾向が伺えた。有毒渦鞭毛藻*Alexandrium*においてもリン制限は細胞内毒量の顕著な増加を引き起こすこと(Boyer *et al.*, 1987; Bechemin *et al.*, 1999; John and Flynn, 2000; Lippemeier *et al.*, 2003)、ハプト藻である*Chrysochromulina polylepis*や*Prymnesium parvum*では魚毒性やアレロパシー作用が高まることが知られている(Edvardsen *et al.*, 1990; Granéli and Johansson, 2003)。山本ら(1999)や松山(2003)で示されたように、陸域からのリンの選択的削減は沿岸域のN:P比を著しく上昇させてレッドフィールド比から乖離させ、その結果として低リン環境に適応した渦鞭毛藻の優占を引き起こす危険性が既に知られている。今回の結果は、こうしたリン制限環境が渦鞭毛藻群集へのプランクトン相の遷移を引き起こすのみならず、そこに存在する渦鞭毛藻自体の毒性も高める危険性があることを示したもので、沿岸域での赤潮・貝毒発生や漁業被害を考える上では過看できない問題である。

ところで、水温と塩分の実験においては、各実験区における生残率の差異が、それぞれの環境条件下で*H. circularisquama*自身が産生していると考えられる毒

性物質の量が異なることに起因するのか、単に実験に使用したムラサキガイ自身の異なる環境条件下における耐性の違いに起因するのか区別することが困難である。魚類の毒性試験においても、水温や塩分など物理化学的条件が異なると有害物質に対する魚毒性の評価が大きく変わってくるのが指摘されている(田端, 1993; 古田ら, 2002)。特に種々の環境要因の中でも水温が上昇すると基礎代謝に回すエネルギーが増大するため、強いストレスが与えられた環境下では生残率が低くなることは十分に考えられる(Theede *et al.*, 1969)。今回実験に用いたムラサキガイ(*M. galloprovincialis*)の場合、一般的に増殖や生残に好適な水温帯は15~20とされており(Lutz and Kennish, 1992)、25~30では生残率の低下など高温による影響が見られるという(Hrs-Brenko and Calabrese, 1969)。従って、水温については、ムラサキガイ自身の高温側における耐性の低さも考慮しなければならない(ただし、過去のムラサキガイに関する知見には、北方種である*Mytilus edulis*と地中海産の*Mytilus galloprovincialis*が混同されているため厳密な比較はできないが)。しかしながら、予備試験において、15と25で培養された*H. circularisquama*を用いて、同じ22で予備飼育されたムラサキガイに対して暴露実験を行った場合でも、やはり25で培養された方が低い生残率を示すことを確認している(未発表)。今回実験に用いたムラサキガイの場合、予備飼育中の斃死個体数は各水温および塩分段階においてほとんど認められなかったことから、発生した斃死個体の差異のかなりの部分が、*H. circularisquama*の毒性の違いに起因していると考えの方が妥当であろう。塩分に関し、既報の知見によればムラサキガイは低塩分より高塩分を好むことが知られているので(例えば、Shurova, 2001)、34psuの実験区での低い生残率を単にムラサキガイの高塩分側でのストレス耐性の低さで説明することは困難である。いずれにしても、現場における貝の斃死を予測する上では、単に細胞密度のみならず、水温、塩分、栄養塩濃度といった海況や水質データも考慮に入れておく必要がある。

なお、こうした環境要因による毒性の違いの他に、有害・有毒な渦鞭毛藻の毒性が、天然個体群で高く培養個体群では著しく低い値を示すことが報告されている(Kodama *et al.*, 1982; Singh *et al.*, 1982; White, 1986; 山口県内海水産試験場, 1988; Cembella, 1998; 坂本ら, 1998)。さらに現場で出現している細胞の毒性が刻々と変化する事例なども知られている(Suzuki *et al.*, 1997; Hoshiai *et al.*, 1997; Ichimi *et al.*, 2002)。培養個体群で毒性が低い理由が、プランクトン自体の

生理特性に由来するのか、高濃度の栄養塩存在下でのバッチ培養という自然界では想定されない条件下で導かれる人為的なものなのか、それとも単に個々の実験者の培養技術が未熟なためにプランクトン自体にストレスが与えられ、結果として毒性が低くなっているのか判断することは難しい。一部の研究者は暴露試験用の*H. circularisquama*を大量培養するため、大型フラスコによる通気培養や振盪培養を試みているが、これではプランクトンにストレスが与えられて本来の毒性を維持することは困難であると判断されるので避けるべきである。また、正規のSWM3培地(Chen *et al.*, 1969; 伊藤, 今井, 1987)のようにビタミンなどの有機物が過剰に含まれる培地で無菌ではない微細藻類を培養すると、バクテリアやカビの異常繁殖が認められる。これもまた*H. circularisquama*の毒性に少なからず影響を及ぼす可能性がある。さらに、今回のような小規模な暴露試験においては、組織培養用マルチプレートなどの使用が効果的であるが(例えば, Lovko *et al.*, 2003), 市販の組織培養用マルチプレートは強い静電気を帯びているため、こうした容器に*H. circularisquama*の懸濁液を直接加えると静電気によるストレスで球形化し、結果として毒性の過小評価を引き起こす。このように生物検定は種々の人為的要素が入り込む余地が大きいため、本実験の前に予備試験を徹底的に検討し、目的とする手法を地道に確立していく作業が必要不可欠である。第4章における天然個体群を用いた水率や暴露実験の結果と、本章における結果を比較する限り、同じ産地から分離された*H. circularisquama*の貝に対する毒性は環境条件が同じであれば天然個体群と培養個体群でほとんど変わらないことが示唆された。同様の結果はNagai *et al.* (2000)が行ったアコヤガイの試験結果でも指摘されており、本研究の実験条件においては、*H. circularisquama*の毒性は培養個体群であってもほとんど低下せず、培養株を用いて得られた結果を基に現場における貝の斃死を推定することは十分に可能であると考えられる。

### 第3節 *H. circularisquama*の毒性の地域間比較

前節で*H. circularisquama*の毒性は水温、塩分、栄養塩濃度などの環境要因によって影響を受けることが明らかとなった。しかしながら、有毒渦鞭毛藻*Alexandrium*属や*Gymnodinium catenatum*などにおいては、同一種内で有毒なものや無毒なものが存在したり、培養株が分離された地域によって毒含量や組成が大きく異なっていることが知られており、これはそれぞれの海域における優占個体群の遺伝的差異を反

映しているためであると考えられている(Oshima *et al.*, 1982; Maranda *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1992; Oshima *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994; Higman *et al.*, 2001)。本節では分離された海域によって*H. circularisquama*の毒性にこうした差が生じるのかどうかを調べるために、各海域から*H. circularisquama*を分離培養し、同じ培養条件下において毒性がどの程度異なるか調べた。

### 方 法

1993~1995年にかけて英虞湾、五ヶ所湾、浦ノ内湾、広島湾、伊万里湾で発生した赤潮海水中から、マイクロピペット洗浄法により*H. circularisquama*のクローン培養株(HA9401, HG9402, HU9434, HH95S201, HI9417)を得た。これを改変SWM3培地(塩分32psu)で22℃, 12hL: 12hD, 100 μmol photons/m<sup>2</sup>/sの条件下で培養した。接種後10日目の定常期前期の細胞を予め十分に曝気されたろ過海水で10,000 cells/mLの密度になるように希釈し、暴露実験に用いた。また、同じ産地から分離された株間の差異を調べるため、1995年11月に広島湾から同時に分離され、別々に培養された3株(HH95N2401, HH95N2403, HH95N2404)を使って暴露実験を行った。実験条件は、水温24℃, 塩分34 psu, 細胞密度12,000 cells/mLである。*H. circularisquama*の試験海水は毎日、同じ細胞密度に調整されたものと交換した。試験海水の交換時に貝の生死を判別して集計した。生死の判別は開殻した状態の個体の外套膜をステンレス製のピンセットで数回強く刺激し、閉殻運動が見られるかどうかで判断した。

いずれの暴露実験もムラサキイガイ稚貝を用いた。5海域から得られた5株の暴露実験には1995年10月18日に広島湾で採取された稚貝を、広島湾産3株の暴露実験には1996年11月に採取された殻高5.64 ± 0.75(SD) mmの稚貝を用いた。前者は20℃の水温で2週間、後者は1週間、いずれも微細藻類(*I. galbana*および*S. costatum*)を1日おきに給餌しながら予備飼育したものを実験に用いた。稚貝を12穴のマイクロプレートに1個体ずつ収容し、試験液を5 mLずつ添加して22℃の水温で実験を行った。

### 結 果

Fig. 35に広島湾で発生した赤潮海水中から同時に分離され、別々に培養された3株を使って暴露実験を行った結果を示す。いずれの実験区もほぼ同様な毒性を示したことから、同じ産地で同時期に分離された株間の

毒性は、培養および暴露条件が全く同じであればほとんど差がないものと判断された。

次に、各海域から分離された *H. circularisquama* を使って行った暴露実験結果を Fig. 36 に示す。 *H. circularisquama* の毒性には顕著な地域差が見られた。英虞湾産および浦ノ内湾産は試験終了時の生残率がそれぞれ27%および31%と低く推移した。しかしながら、広島湾と伊万里湾の株はそれぞれ76%および88%と高い生残率に留まった。最も毒性が高い英虞湾株と毒性の低い伊万里湾株との間には、実験終了時の生残率で約60%もの較差が生じていた。

### 考 察

同じ産地から別々に分離・培養された3株を用い、全く同じ環境条件下で暴露実験を行っても、生残率に大きな開きは生じなかった。このことは、少なくとも培養条件が同じであれば、同一海域に発生した *H. circularisquama* の毒性は基本的に同じような傾向を示すと判断された。しかしながら、異なった海域から分離された株間の毒性には、生残率で最大60%もの毒性の違いを示した。麻痺性貝毒の原因となる有毒渦鞭

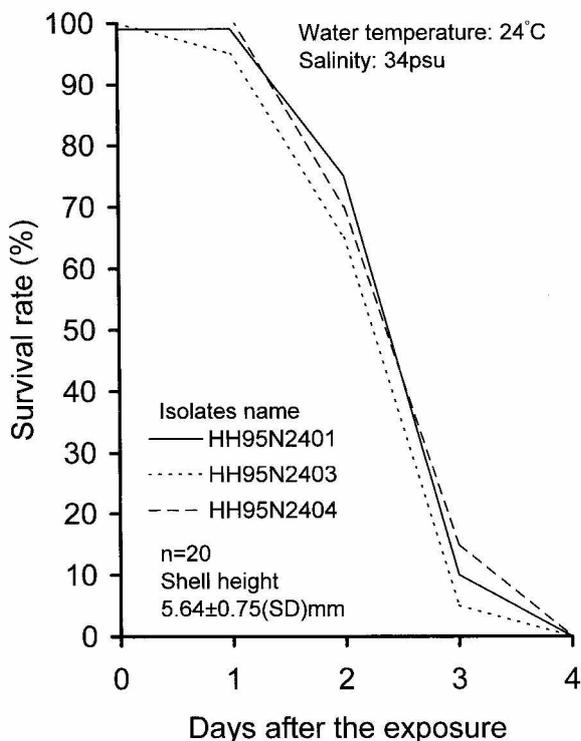


Fig. 35. Effects of three isolates of *Heterocapsa circularisquama* exposure (10,000cells/mL) obtained from a bloom water occurred in Hiroshima Bay, 1995, on survival of *Mytilus galloprovincialis* spat (shell height:  $4.81 \pm 0.43$ mm)

毛藻 *Alexandrium* 属や *Gymnodinium catenatum* においても、産地によって毒含量や毒組成に大きな違いがあることがわかっており、それらの違いを指標として、実際に原因生物の産地間の比較が行われている (Oshima *et al.*, 1982; Maranda *et al.*, 1985; Cembella *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1992; Oshima *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1990; Holmes *et al.*, 2002; Ichimi *et al.*, 2002)。広島湾の株を用いて調べた限りでは、同一海域で発生している *H. circularisquama* の個体群内の毒性はほぼ均一であることを考慮すると、産地間の毒性の違いは、各海域の *H. circularisquama* の毒性に先天的に差異があると考えるのが妥当である。ただ同一産地内での毒性の変異幅は広島湾から得られた3株だけの結果から判断したもので、すべての産地から得られた複数株で確認したわけではない。統計学的精査に耐えるためには、それぞれの産地から得られた数十株以上、できれば100株以上の結果で判断すべきである。ただし、これは実験設定を行う上で物理的な負担が極めて大きく困難であると判断されるが、将来的な課題としたい。

ここでさらに重要な点として、前述のクローン株を用いた試験で明らかになったように、 *H. circularisquama* の毒性は例えクローン株であっても、水温および塩分によっても大きく影響を受けることから、各

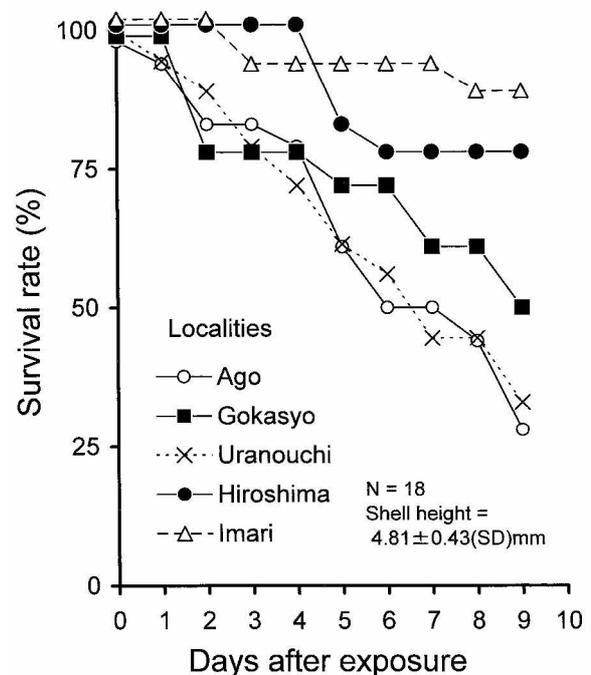


Fig. 36. Effects of five isolates of *Heterocapsa circularisquama* exposure (10,000cells/mL) obtained from five different bloom water occurred at each location, on survival of *Mytilus galloprovincialis* spat (shell height:  $2.75 \pm 0.41$ mm)

海域に優占している*H. circularisquama* 個体群の水温と塩分に対する生理的応答が異なる場合には、同じ実験条件下においても毒性に差異が生じる可能性がある。しかし、最近になって、上記の5海域から分離された*H. circularisquama* の水温および塩分に対する増殖応答は基本的にすべて同じであることが明らかにされた(山口, 1998)。すなわち、いずれの海域から分離された*H. circularisquama* も水温30℃, 塩分25~30psuで最も増殖が活発で、それより低温、低塩分になると増殖は鈍化する(山口, 1998)。こうした点を考慮すると、今回得られた試験の結果は、それぞれの海域に優占している*H. circularisquama* 個体群の生理的差異というより、それぞれの個体群が有している毒性が先天的に異なるためであると判断される。今回伊万里湾産の*H. circularisquama* の毒性が著しく低い値を示したが、実際に伊万里湾における本種の赤潮では、アコヤガイなどの二枚貝に漁業被害が発生していない(第2章 Table 1~2 参照)。

## 第2および3節の要約

*H. circularisquama* の致死活性に及ぼす環境要因を調べた結果、次の3点が明らかになった。

1. *H. circularisquama* の毒性(ムラサキイガイの致死活性)は高温と高塩分の各条件下で最も高く、低温と低塩分の条件下では著しく低下する。
2. *H. circularisquama* の毒性は窒素欠乏条件下では著しく低下するが、リン欠乏条件下ではNP無塩制限下と同じかやや高くなる。
3. *H. circularisquama* の毒性は同一海域内における差異はほとんど認められないが、海域が異なると最大60%もの較差が認められた。

なお、*H. circularisquama* が二枚貝を斃死させる毒性がどのような機構によって制御されているか、あるいは毒性物質の性状については、第5章において詳細に検討することとする。

## 第4節 *H. circularisquama* が各種海産生物等に及ぼす影響

上述のように、*H. circularisquama* が二枚貝全般の生理作用に影響を与え、その作用は環境要因によっても左右されることを明らかにした。現場海域において、斃死は二枚貝に集中しているが、*H. circularisquama* 赤潮の他種生物への潜在的影響を把握しておくことは重要である。特に、本種赤潮が頻発する西日本海域では、養殖の対象となる水産生物の種類は二枚貝以外にも多種類に及んでいる。また現場海域では養殖魚介類

のみならず、天然の魚介類も*H. circularisquama* の赤潮にさらされている。赤潮が天然資源に及ぼす影響は古くから指摘されており(岡村, 1916)、その影響も赤潮終息以降何年間にも渡って禍根を残す場合が多い(Southgate *et al.*, 1984; Gjøæter *et al.*, 2000)。また、生物多様性の維持、生態系の保全という観点から非養殖対象種への影響も懸念される。さらに、明らかに乳類に対して害作用を及ぼす毒性物質を産生するプランクトンの場合、その毒成分が食物連鎖を通じてより高次の生物に転送され、いわゆる貝毒とよばれる現象を引き起こし、食品衛生上の問題を引き起こすことも知られている。

*H. circularisquama* の赤潮は、二枚貝の斃死にとどまらず、上述のような様々な潜在的問題を含んでいるが、これまでのところ、養殖されている二枚貝以外に本種が及ぼす影響についてはほとんど知られていない。本節では、二枚貝以外の水産生物に与える影響を調べ、他生物への潜在的な影響について検討した。

## 材料および方法

英虞湾産の*H. circularisquama* を改変SWM3培地で、22℃, 60~120  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 14hL: 10hD明暗周期で大量培養を行った。20Lのバンライト水槽に培養液を15L加えて培養を行い、最終収量は最大65,000 cells/mLを得た。この定常期の細胞を魚類、その他水産生物の暴露実験に用いた。その他の暴露実験は、適宜三角フラスコを用い、22℃, 120  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 12hL: 12hD明暗周期で培養された*H. circularisquama* の細胞を希釈して行った。実験終了後の暴露海水は、少量の場合は100倍容の塩化ベンザルコニウム溶液(商品名オスパン)を、大量の場合は固形の塩素剤(ジクロロイソシアヌル酸)を加えて殺滅後、大量の水道水とともに廃棄した。

### 1. 魚類

マダイ(体長165.2 $\pm$ 15.4mm)、メバル(体長78.3 $\pm$ 6.6mm)、ヒラメ(体長144.5 $\pm$ 10.2mm)、アミメハギ(体長48.2 $\pm$ 4.4mm)を購入もしくは天然個体を広島湾で採捕し、実験に供した。実験には定常期前期まで培養された*H. circularisquama* (HA9201)を用いて行った。暴露密度は、マダイが3,000 cells/mL、メバルが52,600 cells/mL、ヒラメが58,440 cells/mL、アミメハギが100,000 cells/mLであった。5L容の*H. circularisquama* を含む試験海水に1~3個体の魚類を収容し、1L/minの曝気を施しながら5~10時間後まで観察を行った。実験中試験海水の交換は行わなかった。水温は22.5~23.4℃の範囲にあった。

また、天然の赤潮海水の影響を調べるため、1997年9月に江田島湾（広島湾）で発生した *H. circularisquama* の赤潮海水（細胞密度58,000 cells/mL）を約20L採水し、これにヒラメ幼魚（体長 $152.4 \pm 12.5$ mm）3匹を収容し、曝気を（3 L/min）を施しながら10時間観察を行った。なお、実験中の水温、塩分、pHはそれぞれ22~24、31.6psu、8.0~8.2の範囲にあった。

また、細胞の魚類に対する影響を調べるため、培養された *H. circularisquama* 細胞を遠心分離（3,000rpm, 10min）で集藻し、 $10^6$  cellsを滅菌生理食塩水に懸濁した後、マダイ腹腔内に直接投与して生残に及ぼす影響を調べた。

## 2. 巻貝

愛媛県採苗センターより譲渡されたクロアワビ *Haliotis discus*（殻幅 $10.3 \pm 1.1$ mm）とトコブシ *Sulculus diversicolor*（殻幅 $15.2 \pm 1.2$ mm）の稚貝を、シャーレに1個体収容し、これに22で培養された *H. circularisquama* の試験海水を1,000, 10,000, 100,000 cells/mLの各濃度に調整して20mLずつ添加し、そのまま蓋をして48時間観察した。温度は約23に保った。壁面から剥離し、足筋肉をピンセットで刺激しても反応が見られない個体を斃死個体として扱った。

## 3. 甲殻類

広島湾から採取された天然のイシガニ、アナジャコ、ヨコエビ、ワレカラに対して *H. circularisquama* を20,000~50,000 cells/mLの細胞密度で暴露し、3日間観察を行った。

## 4. ホヤ

広島湾から採取されたエボヤ4個体（体重5~12g）を1L容のビーカーに収容し、25,000 cells/mLに調製された *H. circularisquama* の試験海水750mLを加えて5日間観察した。試験液は毎日同様の細胞密度に調整されたものと交換した。

## 5. その他水産生物

広島湾から採取されたタテジマフジツボ、マヒトデ、パフンウニを10L容のプラスチックバケツに収容し、25,000~44,000 cells/mLに調製された *H. circularisquama* の試験海水5Lを加えて3日間観察した。

## 6. プランクトン

広島湾から採取されたカイアシ類の *Acartia* sp. に対して100,000 cells/mLの細胞密度で *H. circularisquama* を10日間暴露した。また、同様に広島湾から採取されたミズクラゲのエフィラ幼生に対し、*H. circularisquama* を20,000 cells/mLの密度で暴露し、5日間観察を行った。本邦で頻繁に赤潮を形成するラフィド藻2種（*Chattonella antiqua* および *Heterosigma akashiwo*）、渦鞭毛藻5種（*Alexandrium catenella*,

*Cochlodinium polykrikoides*, *Gymnodinium catenatum*, *Karenia mikimotoi* および *Prorocentrum dentatum*）および珪藻2種（*Skeletonema costatum* および *Chaetoceros didymum*）を9,200~42,000 cells/mLの密度に希釈して予め洗浄された6穴のマウクロプレートに分注し、これに *H. circularisquama* を20,000 cells/mL前後になるよう添加しておよそ6時間、倒立顕微鏡下で両者の状態を観察した。

## 7. マウス

定常期前期まで培養された *H. circularisquama* を遠心分離（3,000rpm, 5min）し、ペレット状になった細胞を滅菌生理食塩水に懸濁し、約 $10^6$  cells相当の細胞をそれぞれ5匹のマウスの腹腔内に投与し、5日間観察を行った。実験は濱口昌己博士の全面的な協力の下で行った。

## 結 果

### 1. 魚類

供試したすべての魚類に斃死や苦悶等は全く観察されなかった。腹腔内に *H. circularisquama* の細胞を投与されたマダイにも、斃死や苦悶といった作用は全く観察されなかった。

### 2. 巻貝

Table 9に暴露実験結果を示す。クロアワビは *H. circularisquama* の暴露によって48時間以内にほとんどすべての個体が斃死した。トコブシも *H. circularisquama* の暴露によって大半が斃死した。 *H. circularisquama* を暴露されたクロアワビとトコブシは、いずれもが触角の萎縮、足筋肉のねじれ、逃避行動などの異常行動が数分以内に観察され、5時間程度で仰向けになり、ピンセットによる刺激に対する応答が鈍くなる「麻痺状態」に陥った。このことから、 *H. circularisquama* は巻貝に対しても強い致死的作用を及ぼすことが判明した。

### 3. 甲殻類

供試したすべての個体で少なくとも3日間は斃死や苦悶、逃避行動といった異常な反応は全く認められなかった。

### 4. ホヤ

20,000 cells/mLの暴露においても斃死は認められなかったが、アサリで観察されるように、入水管から水流を勢よく逆流させる噴出活動（vomitting）が頻繁に観察された。

### 5. その他水産生物

タテジマフジツボ、マヒトデ、パフンウニのいずれにも斃死や苦悶、あるいは異常行動等は全く観察されなかった。

6. プランクトン

*Acartia* sp.は100,000 cells/mLの暴露においても斃死や異常行動は認められなかった。暴露直後から排糞活動も確認されたことから、摂餌活動を行っていたと推察された。クラゲのエフィラは5日間の暴露においても斃死は観察されなかったが、Fig. 37に示したように、暴露直後から触腕の継続的な収縮が観察された。この触腕の収縮は試験海水を新鮮なものと交換して*H. circularisquama*の細胞を取り除くと速やかに元の状態に戻った。このことから、*H. circularisquama*によって少なからず影響を受けるものと考えられた。

*C. antiqua*, *H. akashiwo* および *K. mikimotoi* は *H. circularisquama* 暴露直後から運動性を失い(鞭毛の切断が顕著)、徐々に球形化後ほとんどが溶藻した。*G. catenatum* は10,000 cells/mLの暴露で約50%の個体が溶藻して消失していた。*C. polykrikoides* については一部溶藻した細胞も散見されたが、ほとんどが活発に遊泳し、むしろ*H. circularisquama*の球形化(一時性シスト)が顕著であった。*C. didymum*の暴露においても*H. circularisquama*の球形化が著しかった。*A. catenella*, *P. dentatum* および *S. costatum*の暴露ではいずれも活発に遊泳しており顕著な影響は認めら

れなかった。

7. マウス

マウスの腹腔内に*H. circularisquama*を投与後2日間、マウスに異常は認められなかった。しかしながら、3日目に1匹、5日目に1匹が眠るように死亡した。死亡したマウスの組織に目立った異常は認められなかったが、解剖して内臓を組織検査した結果、細菌による感染症が死亡の主原因であると判断された。

考 察

様々な海洋生物やマウスに対する影響を調べた結果、影響を受ける生物と受けない生物に二分されることがわかった。特に影響を受けるのは二枚貝と巻貝で、*H. circularisquama*の細胞密度が1,000~10,000 cells/mLを越えると斃死する。ホヤやクラゲにおいても斃死こそ認められないが、ろ水率の低下や触腕の収縮など悪影響が見られた。*H. circularisquama*同様夏期の日本沿岸で赤潮を形成する鞭毛藻も影響を受けることが判明した。一方で、魚類、甲殻類(*Acartia*含む)、マウスには全く影響が認められなかった。従って、*H. circularisquama*の赤潮において、魚類養殖業は貧酸

Table 9. Effects of *Heterocapsa circularisquama* exposure on the survival and physiological conditions of two gastropod species

<i>Heterocapsa circularisquama</i> cells/mL	<i>Haliotis discus</i>		<i>Sulculus diversicolor</i>	
	24h	48h	24h	48h
10 <sup>5</sup>	DD	DD	DD	DD
10 <sup>4</sup>	DD	DD	DD	DD
10 <sup>3</sup>	AD	PD	AP	AD
Filtered seawater	AA	AA	AA	AA
Modified SWM3 medium	AA	AD	AA	AA

A: alive, P: paralysis, D: Dead

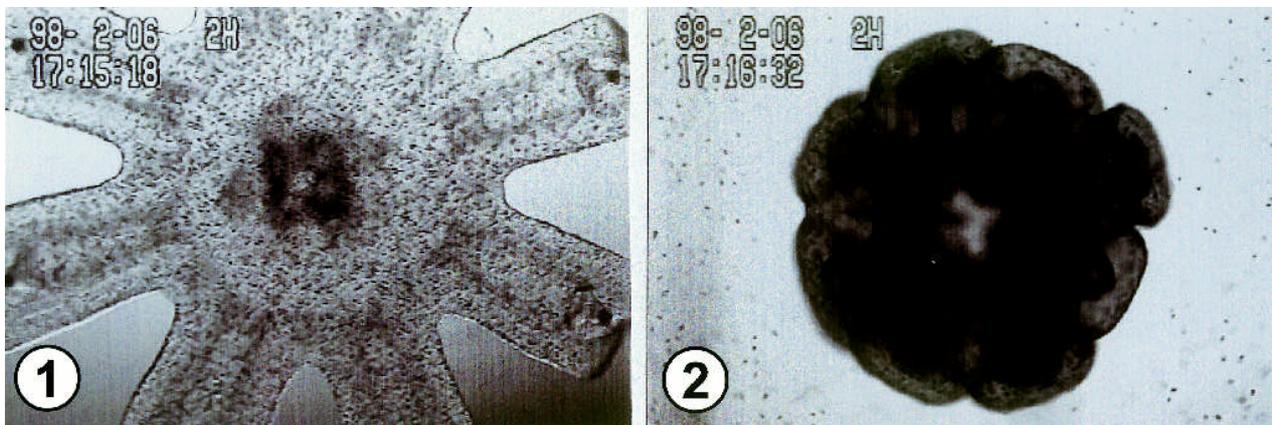


Fig. 37. Micrographs of a ephila stage of jellyfish. 1: In filtered seawater, 2: Tentacle was tightly contracted within several seconds in which exposed to 20,000 cells/mL of *Heterocapsa circularisquama*.

素など副次的に発生する水質悪化を除けば、基本的に何ら影響を受けない。また、マウスに対する急性毒性も認められないことから、貝毒発生の可能性も低い。実際に広島湾で発生した赤潮時に広島県がマガキ、アサリに対して自主的に行ったマウス検査でも、麻痺性・下痢性を始め致死的作用は全く検出されていない。

今回、*H. circularisquama* が二枚貝以外に巻貝に強い致死的作用を示すことが判明した。実験に供したクロアワビもトコブシも水産養殖場重要な種類で、赤潮発生による漁業被害が大変に懸念される。現場における*H. circularisquama* 赤潮ではサザエも被害を受けたことが報告されていることから (Table 2 参照), 巻貝全般について十分な注意が必要である。巻貝は二枚貝よりもより短時間で斃死することが今回の結果から推察されたことから、避難などの対策は赤潮発生前に完了させておく必要がある。

過去の知見によれば、*Chattonella* は魚類および甲殻類に対して (Honjo, 1994), *Karenia mikimotoi* や *Gymnodinium aureolum* は魚介類全般に対して (Shumway, 1990; Honjo, 1994; Lansberg, 2002), *Chrysochromulina polylepis* は魚介類全般、大型海藻、微生物に対して (Gjøæter *et al.*, 2000) 致死的作用を示すことが知られている。すなわち、ほとんどの有害赤潮生物は様々な海洋生物に幅広く影響を及ぼし、特定の生物群に特異的に影響を与える事例はほとんど知られていない。このことから、*H. circularisquama* は二枚貝および巻貝等に及ぼす特異的な作用を有する非常に珍しい種類であるといえよう。

Table 10 に *H. circularisquama* を各種生物に暴露もしくは投与した結果を一覧として示す。*H. circularisquama* によって影響を受ける生物は二枚貝を中心に、ホヤ、クラゲなどのろ過食性生物が多い。これ以外にも、繊毛虫や他種渦鞭毛藻が *H. circularisquama* によって悪影響を受けることが既に知られている (Uchida *et al.*, 1995; Kamiyama and Arima, 1997; Kim *et al.*, 2000b; Uchida *et al.*, 1999)。実際に赤潮生物であるラフィド藻 2 種と渦鞭毛藻 2 種が *H. circularisquama* の暴露によって致死的な影響を受けることが改めて明らかとなった。これら影響を受ける生物はいずれも *H. circularisquama* の最大の捕食者、あるいは栄養競合者であることを考慮すると、*H. circularisquama* の特異的な毒性は、現場海域で *H. circularisquama* が他種生物の捕食を免れたり競合者を排除するうえで重要な役割を果たしていると考えられ、これにより生態学的に有意な立場を獲得し、赤潮状態まで増殖することを可能にしていると考えられる (Kamiyama and Arima, 1997; Kim *et al.*, 2000b; Uchida *et al.*, 1999)。

なお、最近になって *H. circularisquama* の細胞内に共生している細菌類を分子生物学的に解析した結果、グラム陰性桿菌の一種である *Legionella* 属細菌が優占していたことが報告された (Maki and Imai, 2001)。*Legionella* 属は自然界に普遍的に分布する細菌であり、アメーバや細菌捕食性原生動物の食胞中に寄生して増殖する特徴を有している。ところが、本種が多量に繁殖した状態の水滴やその飛沫を吸引した人間が肺炎

**Table 10.** Effects of *Heterocapsa circularisquama* on various animals

Animals	cells/mL	Symptoms
Bivalves	10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup>	Feeding inhibition etc.
Gastropods	10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup>	Unusual locomotion
Solitary ascidians	> 10 <sup>3</sup>	Feeding inhibition
Jellyfish	> 10 <sup>3</sup>	Tentacle contraction
Protozoa <sup>a)</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	Feeding inhibition
Dinoflagellates	> 10 <sup>3</sup>	Death by cell contact
Mouse	> 10 <sup>6</sup> <sup>b)</sup>	-
Finfish	> 10 <sup>6</sup>	-
Crab	> 10 <sup>4</sup>	-
Lobster, shrimp	> 10 <sup>4</sup>	-
Star fish	> 10 <sup>4</sup>	-
Copepods	> 10 <sup>4</sup>	-
Diatoms	> 10 <sup>4</sup>	-

- : Not affected

a) Species-specific

b) Intraperitoneal injection

などにかかることが多く、特に高齢者や子供など免疫力が弱い人は重度の症状を呈することもあり、過去に死亡例も多数報告されている (Ching and Meyer, 1987)。H. circularisquama の細胞内に共生している Legionella 属細菌がヒトに対して病原性を有しているのかどうか現段階では不明である。過去に H. circularisquama 赤潮発生時に肺炎などの症状が発生した事例は報告されていないことから、病原性については現段階では確認できない。ただフロリダで発生する Karenia breve の赤潮では、赤潮海域からもたらされるエアロゾルなどで、目や喉の炎症を引き起こすことが古くから知られている。公衆衛生上の観点から、今後 H. circularisquama の細胞内に共生する Legionella 属細菌の疫学的調査が必要であろう。

## 第5章 Heterocapsa circularisquamaの毒性物質の性状

### 第1節 Heterocapsa circularisquamaの毒性の生化学的解明

第4章までの研究の結果から、H. circularisquama が二枚貝に及ぼす害作用は、環境水の貧酸素化現象による窒息死や高密度の粒子にさらされることによる鰓等の物理的な閉塞ではなく、H. circularisquama 細胞自身が有する毒性に起因すること、またそれらは環境要因や産地によって大きく異なることを明らかにした。H. circularisquama の毒性は二枚貝と巻貝において顕著であるが、その他の水産生物、魚類、甲殻類等にはほとんど影響を及ぼさない。さらにいくつかの渦鞭毛藻類が産生し、食物連鎖を通じて我々人間などのほ乳類に影響を及ぼす麻痺性貝毒や下痢性貝毒成分などの "phycotoxin" も検出されない。このことから、H. circularisquama の毒性は、特定の生物群にのみ影響を与えるなど種特異性が高いと言える。

赤潮生物が水産生物に与える影響としては、魚類を中心とした研究例がいくつか知られている。しかしながら、赤潮生物が魚類以外の生物、たとえば貝類や甲殻類などに及ぼす作用については知見が乏しい。赤潮生物が水産生物に及ぼす影響、特にその生理学的・生化学的な機作について明らかにすることは、新たな被害防止策の開発などに道を拓くものである。しかしながら、実際には赤潮による水産生物の斃死機構が生理学的・生化学的観点にたって明らかになった例は非常に少ない。我が国を中心として活発に調査・研究がなされてきた Chattonella antiqua の魚毒性についても、不飽和脂肪酸説、活性酸素説、神経毒説などが提唱さ

れており、いまだ明確な斃死機構は提示されていないと言われている (Honjo, 1995)。貝類の斃死についても、原因物質の検索など生化学的側面から検証された例は、Aureococcus anophagefferens が二枚貝に及ぼす研究例があるのみである (Gainey and Shumway, 1991)。魚介類の斃死を引き起こし比較的精力的に研究されている渦鞭毛藻 Karenia mikimotoi に関しても、ほとんどの知見は現象的な記述に留まっている (Shumway, 1990; Honjo, 1994; Gentin, 1998)。

本章では、H. circularisquama の二枚貝等に示す特異的な毒性は、細胞自身が有する何等かの毒性物質に由来すると仮定し、生理学的・生化学的観点からの解明を試みた。

### 第1項 H. circularisquamaの毒性物質抽出の試み

H. circularisquama の毒性物質の性状を解析するためには原因物質の抽出・精製を行い、生化学的解析を試みる必要がある。本節ではまず最初に生理活性物質の抽出に用いられる溶媒抽出について試みた。

#### 材料および方法

実験には、1994年に英虞湾から分離された H. circularisquama のクローン株 (HA9401, 強毒株) を用いた。培養には改変SWM3培地を用い、水温22℃、塩分32psu, 12hL: 12hD, 100 μmol photons/m<sup>2</sup>/sの条件下で培養を行い、対数増殖後期に達した細胞を用いた。細胞を3,000rpm, 10minで回収し、ペレットを、1) クロロホルム: メタノール (2: 1, V/V), 2) 80% メタノール, 3) アセトン, 4) n-ヘキサン, 5) 0.5N-酢酸, 6) 水の6種の溶媒に浸潤し、氷冷下で1分間超音波破碎した。破碎物を再び3,000rpm, 10分間で遠心分離して上清を得た。この上清の一部をナス型フラスコに移し、40℃に加温しながらロータリーエバポレーターで乾固させた。乾固物を少量のDMSOに溶解して遮光性のガラスバイアルに入れ、窒素ガスで空隙を置換した後、生物検定まで -20℃以下で密封保存した。

毒性はムラサキガイ稚貝の行動やろ水率を指標として評価した。それぞれの抽出物を元細胞換算でおよそ25,000~30,000 cells/mL相当になるよう、トリス緩衝液でpH 8.0に調整したろ過水に添加した。まず第一に、この溶液にムラサキガイを入れて、H. circularisquama を暴露した時に特有な、外套膜の収縮や閉殻等を観察した。観察はおよそ30分間行った。引き続き、各抽出物を添加した時のろ水率の変化も調べた。その際に、ムラサキガイに無害な鞭毛藻 Heterocapsa triquetra を初期密度が約5,000 cells/mL

になるように接種してろ水量の測定に供した。この場合、粗抽出物にはクロロフィルやクロロフィル分解物など強い蛍光を発する物質が含まれ、*in vivo* クロロフィル法による *H. triquetra* 細胞密度の測定が困難である。従って、細胞密度の測定は顕微鏡下で *H. triquetra* の細胞密度を直接計数し、この減少幅から計算を行った。

### 結果および考察

各種溶媒抽出物のムラサキガイに対する毒性試験の結果を Table 11 に示す。今回 6 種の溶媒で抽出操作を行ったが、いずれの粗抽出物中にも、貝の外套膜の収縮や閉殻を引き起こしたり、ろ水量を有意に低下させるような毒性は全く認められなかった。クロロホルム: メタノール (2: 1, V/V) と水の各実験で得られた粗抽出物をそれぞれ 10 倍量 (300,000 cells/mL 相当) 添加しても、ムラサキガイの外套膜の収縮などの作用はほとんど認められなかった。従って、*H. circularisquama* の毒性物質はこれらの溶媒では抽出できないと判断された。

多くの有毒藻類の場合、毒性物質は細胞内に含まれており、これらは溶媒による抽出によって精製可能である。たとえば *Karenia breve* が産生する brevetoxin や *Gambierdiscus toxicus* が産生する cigatoxin はエーテルやヘキサンなどの極性の低い溶媒で、*Dinophysis* 属が産生する okadaic acid や dinophysistoxin 等はメタノールやエタノールで、最も極性が高い saxitoxin 群は 0.5N-酢酸溶液で活性を十分保持したまま抽出が可能である。従って、*H. circularisquama* の毒性物質はこれら既存の低分子化合物とはかなり性質が異なると考えられた。

### 第 2 項 抽出操作法による *H. circularisquama* の毒性変化

前述のとおり、通常の溶媒抽出法では *H. circularisquama*

**Table 11.** Toxicity in cell extracts of *Heterocapsa circularisquama*

Extraction solvent	Toxicity
1) Chloroform: methanol	-
2) 80% methanol	-
3) Acetone	-
4) Hexane	-
5) 0.5M-Acetic acids	-
6) Water	-

- ; negative

*squama* の毒性物質を抽出することはできなかった。ほとんどの生理活性物質 (特に低分子化合物) は上述の 6 つの溶媒を用いればいずれかで抽出可能なことを考えると、毒性が見いだせなかった理由は、毒性物質が不安定であるか遠心分離の過程で細胞外に分泌されたかいずれかの原因が想定される。そこで、抽出方法によって毒性がどのように変化するか、また細胞外に分泌されているのか否かについて調べた。

### 材料および方法

実験には、第 1 項と同じく 1994 年に英虞湾から分離された *H. circularisquama* のクローン株を用いた。培養には改変 SWM 3 培地を用い、水温 22℃、塩分 32psu、12hL: 12hD、100 μmol photons/m<sup>2</sup>/s の条件下で培養を行い、対数増殖後期の細胞を生物検定に用いた。処理法としては次の 5 つである。

#### 1) 培養液のろ液 (孔径 1 μm のろ過処理)

100,000 cells/mL の細胞密度に調整された *H. circularisquama* の培養液をガラスフィルター (GF/C、孔径約 1 μm) で減圧ろ過し、このろ過液に無害な渦鞭毛藻 *Heterocapsa triquetra* を 8,000 cells/mL になるように接種してろ水量の測定を行った。なお、ろ過から生物検定の開始までに要した時間はおよそ 30 分である。対照区には通常のろ過海水に *H. triquetra* の細胞密度を同様に調製して測定を行った。

#### 2) 培養液のろ過液 (孔径 0.45 μm)

ムラサキガイの成貝 (殻長 20~30mm) とマガキの成貝 (殻幅 15~20mm) を 200mL のろ過海水中に 2 個体ずつ収容し、これに 24,000 cells/mL の細胞密度に達した *H. circularisquama* 培養液の約 10mL を 0.45 μm のシリジフィルターでろ過後、ただちに滴下して外套膜や閉殻運動に及ぼす影響を目視で観察した。本実験においてろ水量の測定は行わなかった。

#### 3) 加熱処理した細胞

120,000 cells/mL の細胞密度の *H. circularisquama* の培養液 10mL をガラス製試験管に収容し、80℃ の熱湯中で 5 分間振盪した。これを流水中で冷却した後、ろ過海水で細胞密度が 8,000 cells/mL 相当になるように希釈して生物検定に用いた。

#### 4) 超音波処理した細胞

120,000 cells/mL の細胞密度の *H. circularisquama* の培養液 5 mL を 50mL 容のプラスチック製遠沈管に収容し、超音波破砕機で 1 分間細胞を破砕した。これをろ過海水で細胞密度が 8,000 cells/mL 相当になるように希釈して生物検定に用いた。

5) 遠心分離した細胞

120,000 cells/mLの細胞密度の*H. circularisquama*の培養液 5 mLを15mL容のプラスチック製遠沈管に収容し, 3,000rpm, 5分間遠心分離した。このペレットをろ過海水で細胞密度が8,000 cells/mL相当になるように希釈して生物検定に用いた。

1)を除くいずれの実験区も, 第4章第1節の方法に準じてムラサキガイのろ水率を測定することで毒性変化を評価した。希釈に用いたろ過海水は曝気を十分に行ったものを用いた。ムラサキガイは広島湾で採捕した成貝(殻高18~30mm)を, 流水下で餌料として*Skeletonema costatum*や*Isochrysis galbana*を混合給餌しながら予備飼育した。実験前日に足糸を十分に分泌し, しかも外部からの物理的な刺激ですみやかに閉殻する健全な個体を選抜した。そして, *I. galbana*を用いて予備的にろ水率を測定し, 殻高から推定される範囲のろ水量を示す個体を実験に用いた。実験にはいずれも5個体を用い, 平均値と標準偏差からt検定を行って有意差を判定した。

結 果

1) 培養液のろ過液(孔径1μm)

100,000 cells/mLまで増殖した*H. circularisquama*培養液のろ過液によるろ水量は対照区の80%であった(Table 12)。しかし, 検定の結果対照区との間に有意な差は認められなかった。

2) 培養液のろ過液(孔径0.45μm)

*H. circularisquama*培養液の0.45μmろ過液をムラサキガイに添加すると, 外套膜の萎縮や弱い閉殻運動など*H. circularisquama*を暴露された時に特有の拒否反応を示した。こうした作用は30秒から1分間継続したが, それ以降は全く認められなくなった。

3) 加熱処理した細胞

80で5分間加熱処理された*H. circularisquama*細胞の毒性は対照区の108%であり, 有意な差は認められ

なかった(Table 12)。加熱された細胞は破裂していないものの, すべて球形化していた。

4) 超音波処理した細胞

ろ水率は対照区の53%であり, 有意に低かった(Table 12)。しかしながら, 未処理の細胞では50 cells/mLでろ水率が半減することを考慮すると, 毒性は未処理の細胞の1/160に相当し, 著しく低い効果であった。処理後の細胞はおよそ80%が球形化していた。

5) 遠心分離した細胞

ろ水率は対照区の92%で, 対照区との有意な差は認められなかった(Table 12)。処理後の細胞はすべて球形化していた。

考 察

ムラサキガイのろ水量を指標とした生物検定では, *H. circularisquama*が約50 cells/mLの密度で存在していれば毒性の検出は可能である。しかし, 今回の実験において2,000倍の密度の*H. circularisquama*の培養ろ過液でも有意な差が認められなかったことから, *H. circularisquama*はムラサキガイに毒性を及ぼすような物質を常時細胞外に分泌していないことが明らかとなった。また, 加熱処理, 超音波処理, 遠心分離など, *H. circularisquama*の細胞にダメージを与えると毒性の大半が失活することも明らかになった。例えば, 遠心分離した*H. circularisquama*の細胞は, ほとんど破裂していないものの, 細胞最外膜, 鎧板, 鞭毛などの細胞表層の構造が破壊されて球形化している。こうした細胞に毒性が認められないということは, *H. circularisquama*の細胞内に毒性物質は存在していないか, 物理化学的処理において細胞外に放出して残存していないかのいずれかである。

*H. circularisquama*の培養液を0.45μmでろ過して直ちにムラサキガイやアサリに添加すると, 短い時間ではあるものの, *H. circularisquama*に暴露されたときに特有の拒否反応を示したことから, 原因物質は

**Table 12.** Clearance rates (mL/mussel/h) of *Mytilus galloprovincialis* exposed to physically treated *Heterocapsa circularisquama* cells (8,000cells/mL)

Treatment	Clearance rate	% of Control	t-test
Control	1,112 ± 266	-	-
Untreated	3 ± 1	0.27	p < 0.005
1) Filtrate	892 ± 170	80	ns
3) Heat shocked	1,205 ± 440	108	ns
4) Sonication	590 ± 218	53	p < 0.05
5) Centrifugation	1,026 ± 231	92	ns

Control: *Isochrysis galbana*, 80,000cells/mL. ns: not significant (p > 0.05).

る過の際に細胞外に放出されているものの、最長でも1分間程度しか海水中で活性を示さないなど、きわめて寿命の短い物質であると判断された。一方で、遠心分離した細胞をそのままろ過海水中で放置するとほとんどの細胞が2～5時間以降に元の遊泳細胞に変化するが、この細胞は再びムラサキイガイのろ水活動を顕著に阻害するなど毒性の復活が認められた。こうしたことから、*H. circularisquama*の毒性物質は、細胞外膜、鞭毛、鎧板などに局在しているが、抽出操作により海水中に放出されて失活するが、細胞表面の構造が再構築する段階ですみやかに再合成されるものと考えられる。以上の物理化学的性状を模式図にしたのがFig. 38である。

ところで、*H. circularisquama*の細胞外構造物の中に鱗片がある。本種の鱗片は $0.2\mu\text{m}$ 程度の長さを持つ棘を有し、しかも細胞表面に無数に付着していることから、これらが鰓の繊毛運動などに物理的障害を与えている可能性も考えられた。しかし、 $0.2\mu\text{m}$ 程度の大きさでは鰓の繊毛を傷つけるには小さすぎ、しかも有機質のため物理的に脆弱であると考えられるため、ある種の大型珪藻で知られているような物理的傷害 (Yang and Albright, 1992; Yang and Albright, 1992; Albright *et al.*, 1993) を引き起こすとは考えにくい。*H. circularisquama*とほとんど同じような構造の鱗片を有する*Heterocapsa triquetra*が貝に対して全く影響を及ぼさないことから、鱗片が直接影響しているとは判断されない。また、鱗片よりはるかに長大で頑丈な棘を有する珪藻*Chaetoceros* spp.は二枚

貝の餌料として用いられるなど貝類に対して悪影響を及ぼさないことから、物理的な作用ではなく何らかの特異な化学物質が毒性に関与していると考えるのが妥当である。

貝毒の原因となる有毒生物のほとんどすべては、細胞内に有毒物質を含有しており、これらの成分は溶媒によって容易に抽出できる。しかしながら、*H. circularisquama*の二枚貝に対する毒性物質は溶媒によって抽出されないだけでなく、抽出操作中にほとんどが細胞外に放出され、しかも容易に失活する性質を有していた。渦鞭毛藻の産生する有毒物質の中で、こうした不安定な性質を有する物質が報告された例は少ない。魚毒性の強いラフィド藻*Chattonella antiqua*細胞を死滅させるのに超音波照射が有効であり、破碎された細胞には魚毒性は見いだされないという (高山, 1973; 松里, 小林, 1974)。その後の研究で、*C. antiqua*の魚毒性の主要因であると考えられる活性酸素産生能は細胞表面に局在している、形態的に整った遊泳細胞でないと活性を維持しないことが報告されている (Tanaka *et al.*, 1994)。そこで、*H. circularisquama*の毒性物質が活性酸素種によって引き起こされている可能性も考えられた。しかし、予備的な試験の結果、*H. circularisquama*の培養細胞に活性酸素産生能力は認められなかった (小田, 私信)。また活性酸素産生種に共通して観察される魚毒性は第3～4章で述べたように本種には全く認められていない。

*Chattonella*属や*Karenia mikimotoi*においては、魚毒性を引き起こす物質の一つとして脂質関連物質が報告されている (Okaichi, 1989; 西尾, 1982; Arzul *et al.*, 1995; Gentien, 1998)。Matsuyama and Suzukuni (1997)は*H. circularisquama*と貝類に対する毒性を全く有していない*H. triquetra*との間の遊離脂肪酸の含量と組成を比較検討したところ、いずれも両者間で明瞭な違いが認められないこと、毒性が比較的高いといわれる $C_{18} \sim C_{22}$ の高度不飽和脂肪酸 (Okaichi, 1989; 西尾, 1982; Arzul *et al.*, 1995)の割合は他の魚毒性の高いラフィド藻類よりも低く、無害な珪藻よりもさらに低いことから (Suzuki and Matsuyama, 1996)、これらの物質が貝類斃死と関連している可能性はほとんど無いと報告している。

その後いくつかの研究グループが*H. circularisquama*の溶血活性について詳細な研究を実施している。まずOda *et al.* (2001)は*H. circularisquama*の100%エタノール抽出液にヒツジ赤血球に対する特異的な溶血活性を見だし、その性状について詳しく調べている。溶血活性は抽出物の添加濃度に依存して作用する。溶血は遅効性で、いわゆるレセプターやチャン

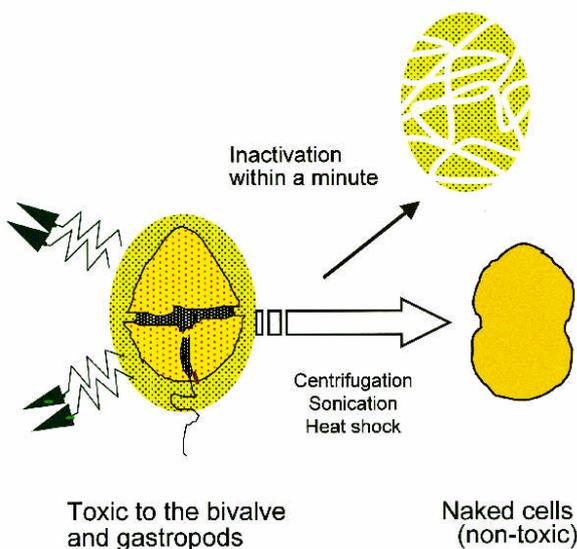


Fig. 38. Schematic illustration of *Heterocapsa circularisquama* toxicity in their cells when physically treated by centrifugation, sonication, and heat shock

ネル毒とよく似た特性を示す。この活性フラクションはシオミズツボワムシやマガキ未受精卵にも毒性を示すなど、*H. circularisquama*の培養細胞を用いた生物検定結果とも良く一致する。さらの抽出した成分の溶血活性は、光の照射で強く誘導されるという (Sato *et al.*, 2002)。同様に調製された*H. triquetra*の抽出物に溶血活性は認められない。さらに、溶血活性は分離された*H. circularisquama*の産地により異なり、二枚貝に対する培養細胞を用いた暴露実験結果得られた毒性と良く一致する (Kim *et al.*, 2002)。一方で、エタノール抽出液に見いだされる溶血活性とは別に、遠心分離の過程で上清中に放出される画分にも強い溶血活性が認められる (Oda *et al.*, 2002)。この成分の活性はエタノール抽出液画分の毒性よりもさらに強く、*H. circularisquama*の二枚貝に対する毒性の主要な成分であると判断されるものの、非常に不安定ですぐに失活する性質を有している (Oda *et al.*, 2002)。この不安定な成分の化学的性状については検討中であるという。

一方、別の研究グループは、*H. circularisquama*の培養細胞のメタノール抽出液に溶血活性を見だし、その主要な成分として糖脂質であるジガラクトシル・ジアシルグリセロールを同定した (Hiraga *et al.*, 2002)。この抽出物はマガキの心臓にも毒性を示すという (Hiraga *et al.*, 2002)。ほぼ同様な結果は東北大学のグループによっても最近報告されている (本間ら, 2003)<sup>1</sup>。極性の低い脂肪酸に親水性の糖が結合したこれらの成分は構造的に界面活性剤とよく似ており、この性質が脂質の二重膜に対する攻撃性を高めて溶血活性を示しているものと推察される。しかしながら、類似の成分は無害な*Scrippsiella trochoidea*や (Oshima *et al.*, 1994)、ヨーロッパ産*Gyrodinium aureolum* (後に*K. mikimotoi*と同定された)にも含まれることが分かっている (Yasumoto *et al.*, 1990; Parrish *et al.*, 1998)。さらに、ほぼ同様な成分が褐藻からも見いだされ、それらはアワビに対する摂餌誘因作用があること (Sakata and Ina, 1985) が示されている。ジガラクトシル・ジアシルグリセロールは葉緑体のチラコイド膜の成分でもあり、上述のように植物や藻類には普遍的に含まれる成分でもある。従って、これらの関連物質が*H. circularisquama*の二枚貝に対する特異的な毒性の主要成分であると断定することはとうていできない。

以上のことから、*H. circularisquama*の毒性物質は非常に不安定で、既存の手法で*H. circularisquama*の毒性物質を直接的に分離・精製して生化学的性状を解析することが困難であることが判明した。このため、

毒性を失活させることなく原因物質を精製する手法を開発する必要がある。

ちなみに、遠心分離で球形化した細胞を100,000 cells/individual/dayの割合でムラサキイガイに1ヵ月間投与したところ、*H. circularisquama*の細胞は貝に活発に摂食され、斃死等も全く観察されず、殻の縁辺部の成長も観察された (未発表)。従って、細胞表層をかく乱されて毒性が失われた細胞は二枚貝にとって単なる餌料でしかない。このことは、*H. circularisquama*の毒性を失わせて漁業被害を回避する上で重要な知見となろう。

### 第3項 *H. circularisquama*の毒性物質の効率的抽出法の検討

*H. circularisquama*の毒性物質はろ過等により一旦は細胞外に放出されるものの、すみやかに失活する性質を有していた。原因物質は細胞表層に局在していることから、何らかの方法で細胞表層の構造を維持したまま抽出し、活性を有した状態で原因物質を抽出できるのではないかと仮定し、様々な薬剤を介在させた状態で抽出する手法を検討した。

#### 材料および方法

実験には、前項と同じく1994年に英虞湾から分離された*H. circularisquama*のクローン株 (HA9402)を用いた。培養には改変SWM3培地を用い、水温22℃、塩分31psu、12hL:12hD、100 μmol photons/m<sup>2</sup>/sの条件下で培養を行い、対数増殖後期の細胞をアッセイに用いた。処理法としては次の3つである。

#### 1) 界面活性剤

デカンテーションで濃縮した対数増殖後期の*H. circularisquama*細胞 (570,000 cells/mL)を、5 mL分取してプラスチック製スピッツ管に入れ、これに全14種類の界面活性剤 (同仁社製、octyl-glucoside, octyl-thiogluconate, sucrose monolaurate, heptyl-thiogluconate, sodium cholate, sucrose monocaprinate, deoxyl-maltoside, BIGCHAP, deoxy-BIGCHAP, CHAPS, CHAPSO, Digitonin, MEGA-8, MEGA-9)を最終濃度200mg/Lになるよう溶解して25℃で培養した。1時間後、細胞を遠心分離 (3,000rpm, 5分間)し、上清を*I. galbana*を含む海水で100倍容に希釈して直ちにムラサキイガイのろ水率を指標として生物検定に供した。

#### 2) アラビアゴム

ろ過海水にアラビアゴムを溶解させ、これを対数増

<sup>1</sup> 本間大樹, 佐々木佳穂里, 佐竹真幸, 吉松定昭, 2003: *Heterocapsa circularisquama*の溶藻成分. 平成15年度日本水産学会講要, P.257

殖後期の *H. circularisquama* 細胞 (240,000 cells/mL) に最終濃度100mg/Lになるように溶解した。この溶液を遠心分離し (3,000rpm, 10分間), 上清を *I. galbana* を含む海水で100倍容に希釈して直ちにムラサキイガイのろ水率を指標として生物検定に供した。

### 3) シクロデキストリン

ろ過海水に  $\alpha$ -シクロデキストリンを溶解させ、これを定常期前期の *H. circularisquama* 細胞 (240,000 cells/mL) に最終濃度100ppmになるように溶解した。これを遠心分離 (3,000rpm, 10分間) し、上清を *I. galbana* を含む海水で100倍容に希釈して直ちにムラサキイガイのろ水率を指標として生物検定に供した。

いずれの試験区も、ろ水率の阻害が見られた場合のみ、ブランク試験を実施し、最終的な生物検定時に混入してきた薬剤そのものが貝に及ぼす影響を除いて評価した。明らかに活性を有したまま抽出された場合は、温度、冷蔵・冷凍保存の可能性についても検討した。

## 結 果

Fig. 39に示すように、14種類の界面活性剤のうち、octyl-glucoside, octyl-thiogluconide, deoxy-BIGCHAPの3種の界面活性剤を存在させた状態で抽出操作を行った上清にムラサキイガイに対する毒性が認められた。この3種についてブランク試験を行ったところ、deoxy-BIGCHAPについては、生物検定時に混入してきた薬剤の濃度と同様に毒性が認められたことから、これについては混入した薬剤そのものの毒性であると判断し、実験対象から除いた。

最も強い毒性を維持していたoctyl-glucoside処理上清で再度生物検定を行った結果をFig. 40に示す。繰り返し試験においても明らかに上清に毒性が移行してい

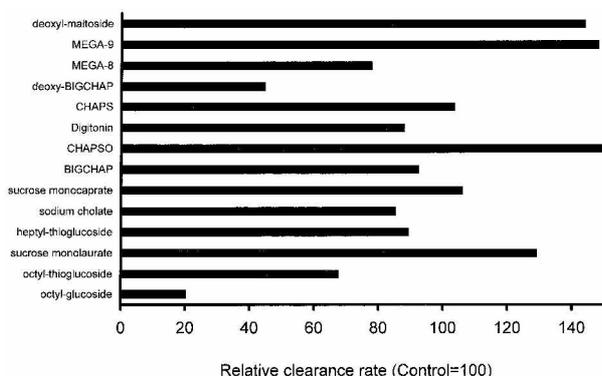


Fig. 39. Effect of various surfactants treatment on the toxicity of cell-free extracts which were obtained by centrifugation. Toxicity was determined by the clearance rate of *Mytilus galloprovincialis*. Control: *Isochrysis galbana*, 75,000cells/mL.

ることが明らかであり、octyl-glucosideを用いれば *H. circularisquama* の毒性物質の活性を保持したまま抽出できることが分かった。この上清を60℃で10分間、加熱処理を行うと毒性は速やかに失活することから、原因物質は熱変性の物質であることが推察された。

octyl-glucosideで抽出された毒性物質を冷蔵で保存した結果、抽出後6時間程度は活性を保持していたが、18時間後にはほとんど消失していた。冷凍保存でも活性は完全に消失した。

アラビアゴム、シクロデキストリンのいずれにおいても弱いながら活性を保持したまま原因物質が抽出できるが、その毒性は冷蔵で数時間程度しか保持できないことが明らかとなった。従って、毒性を保持したまま抽出することは可能であったが、いずれの薬剤でも長期保存やクロマトグラフィーによる精製は困難であることが判明した。

## 考 察

予備試験の結果から推察されたように、*H. circularisquama* の毒性物質は細胞表層に局在しており、遠心分離を行う過程で細胞表層から剥離していることが明らかとなった。この物質はoctyl-glucosideのように膜タンパク質の構造を損なわずに抽出する際に用いられる界面活性剤や膜構造やコロイドなどの保護剤の存在下で短いながらも活性を保持したまま抽出できることも明らかとなった。従って、*H. circularisquama* の毒性物質は、細胞表層に局在した状態で活性を維持して、強制的に剥離させたりして膜などの物理化学的性状が変化するとすみやかに失活するようである。また、この物質は60℃の加熱で失活することから、加熱に対して弱い性質であることも判明した。一方で、octyl-glucosideを使って抽出を行っても、毒性は冷蔵で1日程度しか維持できないことから、通常

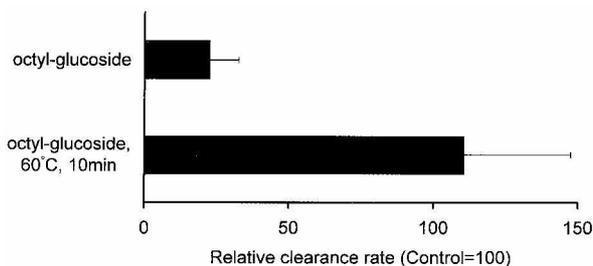


Fig. 40. Effects of heat stability on the toxicity of cell-free extracts from *Heterocapsa circularisquama* obtained by centrifugation under the presence of octyl-glucoside. Toxicity was determined by the clearance rate of *Mytilus galloprovincialis*.

のカラムクロマトグラフィーのような精製過程では簡単に失活してしまうものと判断された。これを克服するには、さらなる抽出条件の検討や、毒性物質の活性をより感度良く検出する手法の開発が必要であり、将来の課題である。

#### 第4項 間接的手法等によるH. circularisquamaの毒性物質の推定

これまでの結果、H. circularisquamaの毒性物質は通常の海水中ではきわめて不安定で、octyl-glucosideのような特殊な界面活性剤の存在下で抽出を行ってもわずかな活性を維持できる程度であった。従って、通常のカラムクロマトグラフ法による原因物質の抽出・精製は技術的に難しいと判断された。現段階では強い活性を保持した状態で抽出・精製ができないため、直接的に原因物質を同定するには従来の手法とは根本的に異なる分析手法の検討が必要であろう。

そこで、原因物質の生化学的性状を明らかにするもう一つの手段として、毒性を維持しているH. circularisquamaの遊泳細胞を種々の代謝阻害剤や薬剤等で直接処理し、貝類に対する毒性がどのように変化するか調べることで、原因物質を間接的に推定できないか検討した。

#### 材料および方法

実験には、前項と同じく1994年に英虞湾から分離されたH. circularisquamaのクローン株(HA9402)を用いた。培養には改変SWM3培地を用い、水温22℃、塩分31psu、12hL:12hD、100 μmol photons/m<sup>2</sup>/sの条件下で培養を行い、対数増殖後期の細胞を生物検定に用いた。処理法としては次の5つである。

##### 1) 界面活性剤の影響

デカンテーション操作により濃縮した対数増殖後期のH. circularisquama細胞(421,000 cells/mL)を5 mL分取してプラスチック製スピッツ管に入れ、これに全5種類の界面活性剤(和光純薬社製のドデシル硫酸ナトリウム[以後SDS]、デオキシコール酸ナトリウム[以後SDC]、トリエタノールアミン、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル[以後Triton X-100]、ポリオキシエチレンラウリルエーテル[以後Brij-35])をH. circularisquamaの遊泳率を阻害しない濃度範囲で添加し、25℃に保ったインキュベーター中で培養した。1時間後H. circularisquamaの毒性を、ムラサキガイのろ水率を指標として測定した。

##### 2) 化学薬品処理の影響

デカンテーション操作により濃縮した対数増殖後期のH. circularisquama細胞(349,000 cells/mL)を5 mL分取してプラスチック製スピッツ管に入れ、これに全5種類の化学基の切断剤(和光純薬社製のジチオトレイトール[以後DTT]、過よう素酸、EDTA、EGTA、水素化ホウ素ナトリウム[以後NaBH<sub>4</sub>])をH. circularisquamaの遊泳率を阻害しない濃度範囲で添加し、25℃に保ったインキュベーター中に静置した。2時間後H. circularisquamaの毒性を、ムラサキガイのろ水率を指標として測定した。

##### 3) 合成阻害剤の影響

デカンテーション操作により濃縮した対数増殖後期のH. circularisquama細胞(289,000 cells/mL)を、5 mL分取してプラスチック製スピッツ管に入れ、これに全5種類の合成阻害剤(和光純薬社製のシクロヘキシミド、ジピリジル、コルヒチン、シグマ社製のツニカマイシン)をH. circularisquamaの遊泳率を阻害しない濃度範囲で添加し、25℃で培養した。5時間後H. circularisquamaの毒性を、ムラサキガイのろ水率を指標として測定した。

##### 4) 酵素処理の影響

デカンテーション操作により濃縮した対数増殖後期のH. circularisquama細胞(331,000 cells/mL)を、5 mL分取してプラスチック製スピッツ管に入れ、これに全5種類の分解酵素(和光純薬社製のトリプシン、パパイン、リゾチーム、アミラーゼ、プロナーゼ)をH. circularisquamaの遊泳率を阻害しない濃度範囲で添加し、25℃で培養した。1時間後H. circularisquamaの毒性を、ムラサキガイのろ水率を指標として測定した。

いずれの実験区も、各々の薬剤で処理したH. circularisquamaの細胞を、約50,000 cells/mLのIsochrysis galbanaを含みかつ十分に曝気した海水で、初期細胞密度が270~290 cells/mLになるように希釈・調整し、ただちにろ水率測定に供した。ろ水率の測定条件等は前項と同じである。SDS処理区では、処理濃度とろ水率の関連も調べた。対照区はいずれも約50,000 cells/mLのI. galbanaのみを含む海水をムラサキガイに与えて測定した。いずれの実験区も4~6個体のムラサキガイを用い、それらの平均値と標準偏差からt検定を行い、対照区との有意差を判定した。

本章第2項の結果から、H. circularisquamaの毒性は物理的処理によって非遊泳細胞に変化するとほとんど失活する。もし、高濃度の薬剤処理によってH.

*circularisquama* の遊泳細胞が非遊泳細胞に変化した場合は、細胞表面に含まれると考えられる毒性物質が物理化学的に剥離して毒性が失活する。例えば代謝阻害剤などの場合、処理を行った薬剤の特異的な作用で *H. circularisquama* の毒性が失われたのか、それとも単に球形化したために毒性が失われたのか判別することができなくなる。従って、薬剤処理の影響を調べるためには、高濃度の薬剤処理によって非特異的に *H. circularisquama* の細胞が非遊泳細胞へと変化しない範囲内で生物検定を実施する必要がある。

Table 13に各薬剤による処理が *H. circularisquama* の遊泳率に及ぼす影響を予備的に調べた結果を示す。この結果に基づき、実際の処理に用いたすべての薬剤濃度は、*H. circularisquama* の遊泳率を阻害しない濃度（処理後も全細胞の90%以上が元の形態を維持してなおかつ遊泳している状態）を採用した。各種の合成阻害剤やプロナーゼ処理などの場合、遊泳はしているものの、その速度が顕著に低下する現象が認められた。この場合、基本的に遊泳速度が低下しても、細胞外の構造（形態）が通常の遊泳細胞とほぼ同じであると判断されたので遊泳細胞として取り扱った。

また、ほとんどの薬剤処理において、生物検定時に混入してくる濃度ではムラサキイガイのろ水量に影響

を及ぼさないことを予め確認したが、EDTAと界面活性剤の一種であるTriton X-100については、生物検定時に混入してくる微量濃度でも外套膜の収縮などの有害な作用が認められた。従って、これらの実験区のみ、対照区にも処理区と同様の濃度の薬剤を添加して比較検討した。

## 結 果

### 1) 界面活性剤の影響

Fig. 41に5種類の界面活性剤で処理を行った結果を示す。5種の各界面活性剤のうち、SDC, Triton X-100, 及びBrij-35の処理では毒性の有意な低下は認められなかった。しかしながら、SDSとトリエタノールアミンでは有意な ( $p < 0.0001$ ) 毒性の低下が認められた。いずれの処理区も対照区と有意差 ( $p > 0.05$ ) は認められなかったことから、*H. circularisquama* の毒性物質はこの2種の界面活性剤によって完全に失活するものと判断された。

Fig. 42に、SDS処理濃度と毒性との関係を調べた結果を示す。毒性はSDSの濃度の上昇に伴って低下し、30mg/Lでは半減、40~50mg/Lではほとんど消失した。SDSで処理した *H. circularisquama* の細胞を顕微鏡下

**Table 13.** Effects of various chemicals on the motility of *Heterocapsa circularisquama*

Chemicals	Im <sub>50</sub>	> 90%	Treated concentration
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	40 ~ 46mg/L	< 32mg/L	0 ~ 50mg/L
Sodium Deoxycholate (SDC)	50 ~ 80mg/L	< 20mg/L	17mg/L
Triethanolamine	55mM	< 42mM	22.7mM
Triton X-100	20mg/L	15.7mg/L	7.4mg/L
Brij-35	59mg/L	23mg/L	21mg/L
DTT	4 ~ 6mM	< 2mM	2mM
EDTA	120 ~ 160 μ M	< 89 μ M	96 μ M
EGTA	> 2.2mM	1.9mM	1.2mM
Periodic acid	140 ~ 180 μ M	< 10 <sup>7</sup> μ M	96 μ M
NaBH <sub>4</sub>	73 ~ 84 μ M	67 μ M	65 μ M
Cycloheximide	2 ~ 2.5mM	< 1.18mM	0.5mM
-Dipylygil	4.1mM	< 3.2mM	0.53mM
Colchicine	> 2.5mM	1.2mM	0.25mM
Tunicamysin	30 ~ 40 μ M	< 30 μ M	25 μ M
Trypsin	1.6 ~ 2.0 × 10 <sup>4</sup> units/L	1.1 × 10 <sup>4</sup> units/L	1.0 × 10 <sup>4</sup> units/L
Pronase	0.8 ~ 1.4 × 10 <sup>3</sup> units/L	2.4 × 10 <sup>2</sup> units/L	2.1 × 10 <sup>2</sup> units/L
Papain	0.35units/L	0.25units/L	0.2units/L
Amylase	4.9 × 10 <sup>2</sup> units/L	2.4 × 10 <sup>2</sup> units/L	0.8 × 10 <sup>2</sup> units/L
Lysozyme	4 × 10 <sup>7</sup> units/L	3.5 × 10 <sup>7</sup> units/L	2.0 × 10 <sup>7</sup> units/L

Each treatment was conducted at 25 for 1~5 hours

Im<sub>50</sub> means half inhibiting concentration of the *H. circularisquama* motility

で観察すると、遊泳速度は多少低下しているものの、細胞形態は通常の遊泳細胞と全く同じ状態を保っていた。にもかかわらず、毒性はほとんど失活しており、ムラサキイガイに活発に摂食されるようになっていた。

2) 化学薬品処理の影響

Fig. 43に示すように、糖鎖切断剤である過よう素酸処理で毒性が有意に ( $p=0.0077$ ) 低下した。しかしながら、対照区との有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことから、毒性は処理によってもやや残存するものと判断された。DTT, EDTA, EGTA, 及び $\text{NaBH}_4$ 処理では毒性の有意な低下は観察されなかった。

3) 合成阻害剤の影響

Fig. 44に5種類の合成阻害剤で処理を行った結果を示す。糖鎖合成阻害剤であるツニカマイシンとヒドロキシプリン合成阻害剤である、レジピリジルにおいて有意な ( $p=0.0101$ および $p=0.0027$ ) 毒性の低下が観察された。しかしながら、紡錘体毒であるコルヒチン処理では顕著な毒性の低下は観察されなかった。ただし、その後の試験でコルヒチン存在下で *H. circularisquama* は未処理の細胞と同様に増殖することが分かったので、細胞内に薬剤が取り込まれていないのではないかと考えられた。

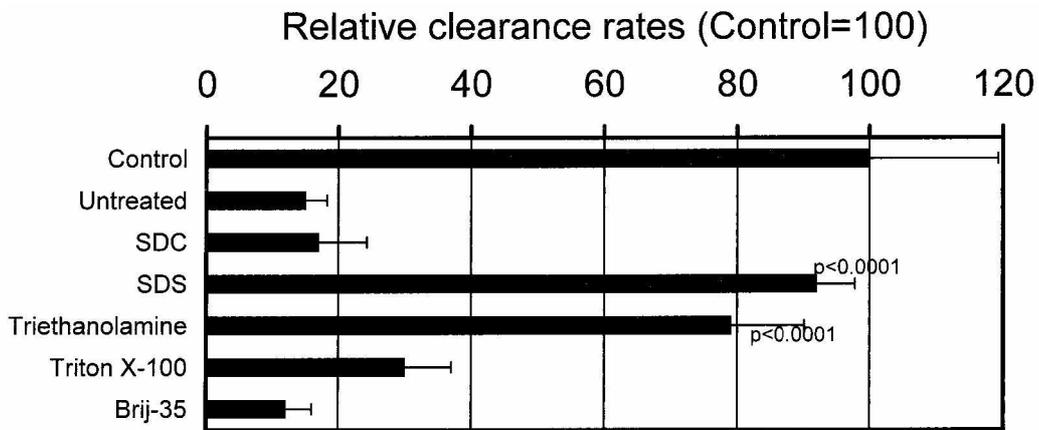


Fig. 41. Changes in relative clearance rates of *Mytilus galloprovincialis* exposed to pre-treated *Heterocapsa circularisquama* cells by various surfactants. Control: *Isochrysis galbana*, 80,000cells/mL. Initial cell density of *H. circularisquama* ranged from 260 to 290cells/mL. Bars show  $\pm$ SD.

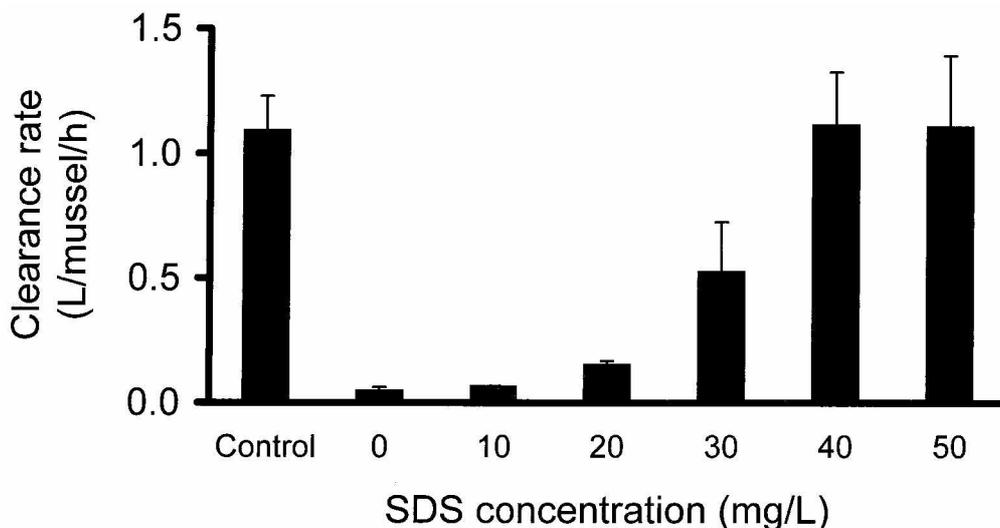


Fig. 42. Changes in clearance rates (L/mussel/h) exposed to *Heterocapsa circularisquama* (1,000 to 1,120cells/mL) pre-treated with various concentration of SDS. Bars show  $\pm$ SD.

## 4) 酵素処理の影響

5種類の酵素で処理を行った結果をFig. 45に示す。各種酵素で処理したところ、トリプシンで有意な ( $p < 0.0001$ ) 毒性の低下が観察された。対照区との間にも有意差 ( $p > 0.05$ ) は認められなかったことから、*H. circularisquama* の毒性物質はトリプシン処理により完全に失活するものと判断された。しかしながら、パパイン、リゾチーム、アミラーゼ、リパーゼ及びプロナーゼでは有意な毒性の低下は観察されなかった。

## 考 察

種々の薬剤処理の結果を総合すると、*H. circulari-*

*squama* のムラサキイガイに対する毒性は、タンパク質の変成作用の強い界面活性剤であるSDSとトリエタノールアミン、タンパク質をランダムに切断するトリプシン処理でほとんど失活することが判明した。この他にも、糖タンパク質などの合成阻害剤であるツニカマイシンや、 $\beta$ -ジピリジル、糖鎖の切断剤である過よう素酸処理でも毒性が有意に低下することから、*H. circularisquama* の毒性物質はタンパク質もしくは糖タンパク質様物質であると考えられる。これら薬剤で処理された*H. circularisquama* は、通常の細胞同様に90%以上の遊泳率を保ち、しかも細胞形態に全く変化が認められないにも拘わらず毒性がほとんど消失していたことから、毒性物質は明らかに細胞表層に局在し

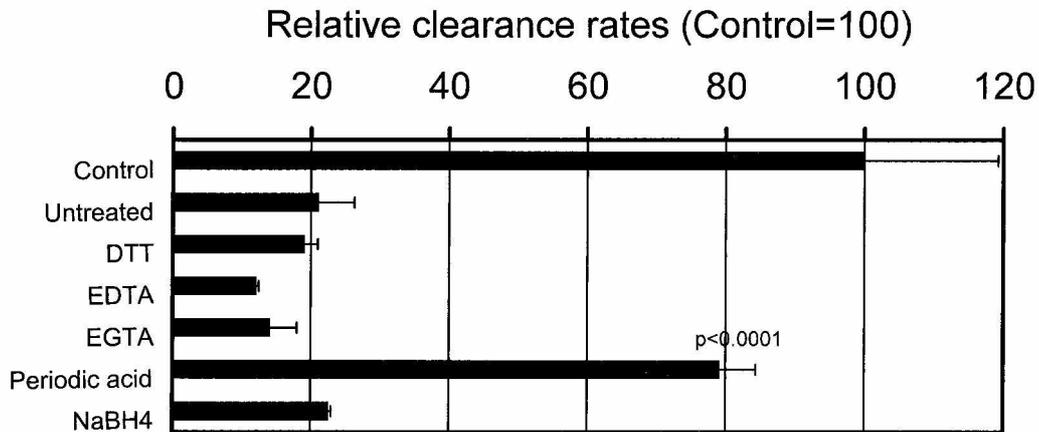


Fig. 43. Changes in relative clearance rates of *Mytilus galloprovincialis* exposed to pre-treated *Heterocapsa circularisquama* cells by various chemicals. Control: *Isochrysis galbana*, 80,000cells/mL. Initial cell density of *H. circularisquama* ranged from 260 to 290cells/mL. Bars show  $\pm$ SD.

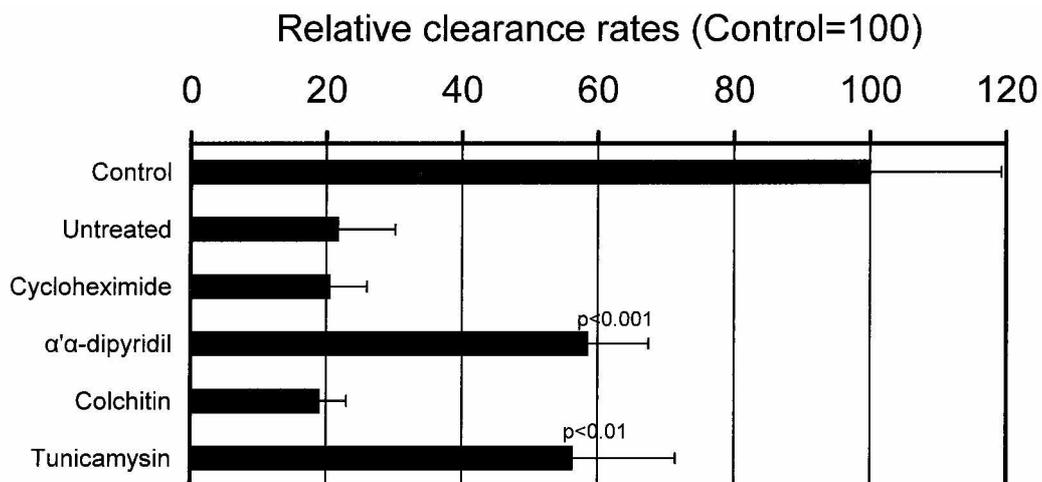


Fig. 44. Changes in relative clearance rates of *Mytilus galloprovincialis* exposed to pre-treated *Heterocapsa circularisquama* cells by various metabolism inhibitors. Control: *Isochrysis galbana*, 80,000cells/mL. Initial cell density of *H. circularisquama* ranged from 260 to 290cells/mL. Bars show  $\pm$ SD.



**Fig. 45.** Changes in relative clearance rates of *Mytilus galloprovincialis* exposed to pre-treated *Heterocapsa circularisquama* cells by various enzymes. Control: *Isochrysis galbana*, 80,000cells/mL. Initial cell density of *H. circularisquama* ranged from 260 to 290cells/mL. Bars show  $\pm$ SD.

ていると判断された。例えば、40mg/L前後のSDSで処理された*H. circularisquama*は、顕微鏡下では通常の遊泳細胞と同様に遊泳しているが、貝に対する毒性はほとんど失活しているために、1,000~3,180 cells/mLの濃度（第4章で述べたように斃死が始まる濃度）で暴露しても順調に貝に摂食され、生理的傷害は何ら認められなかった。未処理の細胞が50 cells/mLで貝のろ水活動を強力に阻害することを考慮すると、SDSの解毒作用はきわめて強い。また、数時間程度の代謝阻害剤処理で毒性が消失することを考えると、原因物質は常に合成・分解・放出などの活発な代謝が行われているものと推察された。

タンパク質は複雑な架橋構造を形成し、これらが少しでも変成を受けて構造変化を引き起こすと生化学的機能を失ってしまう。ところが、SS結合の切断剤であるDTTや、カルシウムや金属のキレート作用の強いEGTAやEDTAでは毒性がほとんど消失しないことから、細胞表面にあると考えられる糖タンパク質の活性部位や、細胞表面との結合部位には、SS結合や金属との架橋構造があまり関与していない判断される。植物プランクトンの細胞表面には松山（2003）で述べたようなアルカリフォスファターゼの他にも、種々のタンパク質分解酵素の存在が知られているが（Hooper and Hughes, 1992; Matsuda *et al.*, 1994; Berges and Falkowski, 1996; Stoecker and Gustafson, 2003）、これらの多くはEDTAやDTTなどで失活する性質を有している（Matsuda *et al.*, 1994; Berges and

Falkowski, 1996）。このことから、*H. circularisquama*の毒性物質の場合、これらの既知の酵素などとは性質が異なるものと推察された。

また、プロナーゼのようにトリプシン同様同じタンパク質分解酵素に対してはあまり毒性が低下しない現象も観察された。この原因として二つの理由が考えられた。一つ目は酵素処理温度が25℃、2時間と通常の処理温度より低くしかも時間が短かったため、十分な分解作用を示し得なかったことである。また、プロナーゼ自身は複数の酵素の混合物であるため、トリプシンなど*H. circularisquama*の毒性物質に対する分解作用の強い成分の濃度が相対的に低かったことも影響しているものと思われる。二つ目は、細胞表面にある糖タンパク質が脂質の二重膜もしくは糖鎖などでブロックされているため、高分子の酵素が毒性物質に直接触れて分解作用を示すことができなかったことも考えられる。一般的に細胞表面の糖鎖がタンパク質分解酵素などに対して抵抗性を示すことは知られている。これは、同じ界面活性剤処理でもSDSやトリエタノールアミンのように低分子で分子内に侵入しやすい界面活性剤ほど*H. circularisquama*の毒性を失わせる能力が高いこと、糖鎖の合成阻害剤で毒性が低減することからも伺える。以上の結果から、*H. circularisquama*の毒性物質は糖タンパク質の一種である可能性が推察された。

赤潮を引き起こす有害な植物プランクトンが二枚貝に及ぼす影響について国内の知見はほとんど見られな

いが、国外の文献では水率の低下、生育阻害あるいは生残率の低下などが報告されている (Ho and Zubkoff, 1979; Thain and Watts, 1987; Gaaney and Shumway, 1988; Tracey, 1988; Gallager *et al.*, 1989; Nielsen and Strømgren, 1991; Luckenbach *et al.*, 1993; Lesser and Shumway, 1993; Wikfors and Smolowitz, 1995; Smolowitz and Shumway, 1997; Bricelj and Lonsdale, 1997; Bricelj *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2001)。しかしながら、それらの現象を生化学的観点から考察した知見は非常に少ない。特に、植物プランクトンの細胞表面の物質と二枚貝との生理作用に関する知見は、黄金藻の一種 *Aureococcus anophagefferens* による赤潮 (通称 brown tide) に関する知見を除いてほとんど見当たらない。*A. anophagefferens* による赤潮では、現場海域に生息したり養殖されているムラサキガイやホタテガイに顕著な斃死が認められる (Tracey, 1988; Gallager *et al.*, 1989; Shumway, 1990; Bricelj and Lonsdale, 1997)。*A. anophagefferens* の赤潮海水が二枚貝に及ぼす影響について調べた結果では、毒性は赤潮のろ過液には認められず、細胞自身に保持されていることが示唆されていた (Tracey, 1988; Gallager *et al.*, 1989; Bricelj and Lonsdale, 1997)。その後 Gaaney and Shumway (1991) は *A. anophagefferens* が二枚貝の繊毛運動に及ぼす影響を室内実験で詳細に調べ、その結果 *A. anophagefferens* を暴露された二枚貝の繊毛運動は著しく阻害され、この現象は赤潮海水同様培養ろ過液などでは認められなかったという。また、繊毛運動の阻害は暴露後一定時間経過してから観察されること、毒性発現には *A. anophagefferens* 細胞と鰓が直接接触することが必要なこと、またアミラーゼ処理された細胞において阻害活性が強かったこと等から、貝が鰓上で *A. anophagefferens* を予備消化する過程で細胞表面にある多糖類が分解を受け、その結果ドーパミン様作用を有する物質が放出され、これが神経伝達に関わっているアセチルコリンを抑制するため繊毛運動が阻害されているのではないかと推察している。実際にドーパミンは二枚貝の鰓の繊毛運動を抑制することは広く知られている (Aiello, 1990; Fong *et al.*, 1990)。その後の本種の毒性物質については未解明のままであるが、いずれにしても貝類に対する毒性は細胞表面にあり、毒性発現には細胞と直接接触することが必要であることは認められている (Bricelj and Lonsdale, 1997)。

*H. circularisquama* の暴露においてもろ過液の低下など繊毛運動を阻害していると推定される現象が観察され、それらの作用は培養ろ過液に認められず、細胞との接触が必要である。このことは *A.*

*anophagefferens* の毒性発現機構と非常に類似していると言える。しかしながら、一方で筋肉の異常な収縮や clapping など、抑制と言うよりむしろ組織の著しい興奮状態を示す顕著な症状が観察されている。また、*A. anophagefferens* の毒性は暴露後 1 ~ 3 時間経過してから発現するなど「遅効性」であるということが指摘されている (Bricelj and Lonsdale, 1997)。*H. circularisquama* の場合、糖タンパク質のような高分子物質であると推定されること、しかも影響が秒単位で発現するなど「速効性」であることを加味すると、*A. anophagefferens* と同じように神経系に直接作用する低分子物質を分泌しているとは考えにくい。しかしながら、植物プランクトンの細胞表面に原因物質が含まれていて、これが鰓や外套膜などの組織に触れた段階で何らかの影響が生じるという点では両種間に共通項が多く、有害藻類が二枚貝に及ぼす機構を解明する上で重要な知見である。なお、*H. circularisquama* が *A. anophagefferens* のように神経伝達に影響する物質を直接産生しているかどうかは次節で詳細に述べる。

海産の有害鞭毛藻には、細胞表面に糖鎖-タンパク質複合体 glycocaryx の存在が知られているものの (Yokote and Honjo, 1985; Yokote *et al.*, 1985)、植物プランクトンの細胞表面に存在する糖タンパク質の機能と構造に関する知見は非常に少ない。淡水産の緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* は、環境が不適になると配偶子を形成して接合を行う。このとき、細胞表面にある糖タンパク質が個体間の認識等に深く関わっていることが明らかとなっている。この物質は分子量 35 万で、DTT や EDTA、トリプシンやサーモライシンで処理することにより活性が速やかに消失するという (Tamaki *et al.*, 1981; Saito and Matsuda, 1984; Matsuda *et al.*, 1994)。最近の研究で、こうした細胞表面の糖タンパク質は接合だけでなく、生理生態学的な観点からも重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。たとえば、ラフィド藻の一種 *Heterosigma akashiwo* の産生する glycocaryx は、赤潮など高密度な状態になると、現場海域で競合する珪藻類の細胞に付着して増殖を阻害するなど、一種のアレロパシー物質としても機能している (Honjo, 1993)。こうした作用は、競合者を積極的に排除して場を占有する上で重要な役割を果たしていると言える。また、glycocaryx は粒状態の鉄と錯化合物を形成して細胞内に容易に吸収されやすい形態に変換する作用も知られている (Yokote and Honjo, 1985; Okaichi *et al.*, 1989)。最近になって魚毒性を有する赤潮生物 *Chattonella marina* の glycocaryx が魚毒性発現に深く関わっていると同時に (Kim *et al.*, 2001)、それら

は魚の粘膜などに含まれる糖鎖によって促進されることが示された (Kim *et al.*, 2000a)。このように細胞表面の糖タンパク質は様々な生理生態学的機能を有しているだけでなく、生化学的に引き起こされる個体間認識を通じて水産生物にも大きな影響を及ぼしていることが明らかになりつつある。

*H. circularisquama* の細胞と直接接触して影響を受ける生物は二枚貝に留まらず、繊毛虫や他種渦鞭毛藻においても観察される (Uchida *et al.*, 1995; Kamiyama and Arima, 1997; Kim *et al.*, 2000b)。また接触応答は弱いながらも、ホヤやクラゲなども *H. circularisquama* によって影響を受ける (Table 10 参照)。これら影響を受ける生物はいずれも *H. circularisquama* の最大の捕食者、あるいは栄養競合者であることを考慮すると、*H. circularisquama* の細胞表面に存在すると考えられる糖タンパク質は、現場海域で *H. circularisquama* が他種生物の捕食を免れたり競合者を排除するうえで重要な役割を果たしていると考えられ、これにより生態学的に有意な立場を獲得し、赤潮状態まで増殖することを可能にしていると考えられる (Kamiyama and Arima, 1997; Kim *et al.*, 2000b)。

## 第2節 *H. circularisquama*による二枚貝斃死機構の解明

前節で *H. circularisquama* の細胞表面に局在していると考えられる不安定な糖タンパク質様物質が二枚貝に毒性を及ぼしていることを明らかにした。二枚貝が水活動を行っている最中に *H. circularisquama* の細胞が鰓や外套膜などに触れると、この細胞表面の糖タンパク質が何らかの作用を引き起こして水活動の低下や閉殻などの拒否反応を引き起こし、この拒否反応が連続すると二枚貝は生理状態を著しく悪化させながら最終的に斃死するものと考えられる。この間、二枚貝は *H. circularisquama* の細胞をほとんど消化吸収していないことから、傷害は接触のみによって引き起こされているものと考えられる。しかしながら、二枚貝が自らの個体よりはるかに微細な *H. circularisquama* の細胞と接触しただけで、なぜ致命的な傷害を受けるのかについては疑問点が多い。これを明らかにするためには、*H. circularisquama* の有する毒性物質の性状のみならず、これによって影響を受ける被生物側の生理状態の変化についても同時に把握する必要がある。

これまでの生物検定では、主に二枚貝の生残や水率を指標として行ってきた。すなわち、*H. circularisquama* の暴露によって引き起こされる個々の組織中の傷害を、生残や水率の変化という個体全体 (*in*

*vivo*) の生理的応答を指標として評価している。その一方で、貝の組織や細胞がどのような過程で傷害を受けているのかを確認するためには、可能な限り単純化された系、すなわち *in vitro* で解析することが必要である。この両者の結果を総合することで、斃死や水率の低下という現象がどのように引き起こされているのかを明らかにできると考えられる。そこで、本節では、二枚貝の組織や胚や幼生などの発生初期の個体に対して *H. circularisquama* を暴露し、どのような機構で傷害が発生しているのか調べることにした。

## 第1項 貝類組織を用いた生物検定

*H. circularisquama* を暴露した貝類で最初に観察される応答現象は外套膜や閉殻筋など筋肉組織の異常な収縮である。そこで、本実験には *H. circularisquama* が貝類から抽出した筋肉組織に及ぼす影響について検討した。

### 材料および方法

実験には2種類の貝から抽出した筋肉組織を用いた。ムラサキガイの足系前牽引筋と肉食性巻貝の一種であるアカニシの舌歯牽引筋を実体顕微鏡下で抽出し、抽出した筋肉の両端を糸を使ってストレインゲージに固定した。この筋肉を3 mLのリンゲル溶液中に浸し、ムラサキガイの場合20V, 3s, 10Hzの条件で10pulsesを、アカニシの場合20V, 3s, 0.2Hzの条件で5pulsesをそれぞれ10分おきに刺激を与え筋肉収縮力を測定した。実験は宗岡洋二郎博士 (前広島大学総合科学部教授) の全面的な協力の下で実施した。

対照区はろ過海水に浸潤して同様に測定を行った。実験区は *H. circularisquama* の培養液 (改変SWM 3培地)、*H. circularisquama* の冷エタノール抽出物、そして生きたままの *H. circularisquama* 細胞 (94,000 cells/mL) をそれぞれ生物検定に供した。

### 結 果

ムラサキガイ足系前牽引筋とアカニシ舌歯牽引筋に及ぼす *H. circularisquama* の影響をFig. 46に示す。*H. circularisquama* 暴露区のムラサキガイの足系前牽引筋はいずれの暴露においても電気刺激を与えない状態 (静止状態) では反応を示さず、電気パルスに対する筋肉の収縮力も対照区とほぼ同じで、抑制や亢進作用は認められなかった。

一方、巻貝の一種であるアカニシの歯舌牽引筋の場合、電気パルスを与えられた時に生じる筋収縮力自体

はムラサキイガイ同様、抑制も亢進作用も認められなかった。しかしながら、*H. circularisquama* を含む溶液に浸潤すると静止状態において、小刻みな収縮運動を繰り返すなどの異常反応が認められた。こうした作用は冷エタノール抽出物では全く認められなかった。異常な反応が認められた *H. circularisquama* の溶液を  $0.45 \mu\text{m}$  でろ過した液も同様に調べてみたが、影響は全く認められなかった。

#### 考 察

ムラサキイガイの足糸前牽引筋は純粋な筋肉組織で、筋収縮力を指標とした生物検定によく用いられる (Twarog, 1976; 松浦ら, 1986)。この筋肉組織の収縮力は、アセチルコリンやドーパミンなどのモノアミン、あるいは生理活性ペプチドによって強く影響を受ける

(Hidaka and Twarog, 1977; Hidaka *et al.*, 1977; Muneoka *et al.*, 1977; 松浦ら, 1986)。 *H. circularisquama* の暴露はムラサキイガイをはじめとした二枚貝の筋肉組織を異常に収縮させるが、今回の実験では摘出された筋組織そのものには直接作用しないことが明らかとなったことから、モノアミンや生理活性ペプチドを直接分泌していないか存在しても影響を及ぼさない位の低濃度であることが判明した。この結果は、*H. circularisquama* の原因物質が有機溶媒などに可溶性低分子物質ではなく、高分子で不安定な糖タンパク質であるという前節の結果を支持するものである。

一方で、アカニシの歯舌牽引筋において、電気刺激によって引き起こされる筋収縮力そのものには影響しないものの、静止状態の筋肉を小刻みに収縮させる興味ある結果が得られた。Fig. 47にムラサキイガイ足糸前牽引筋とアカニシ歯舌牽引筋の構造的な違いを図示

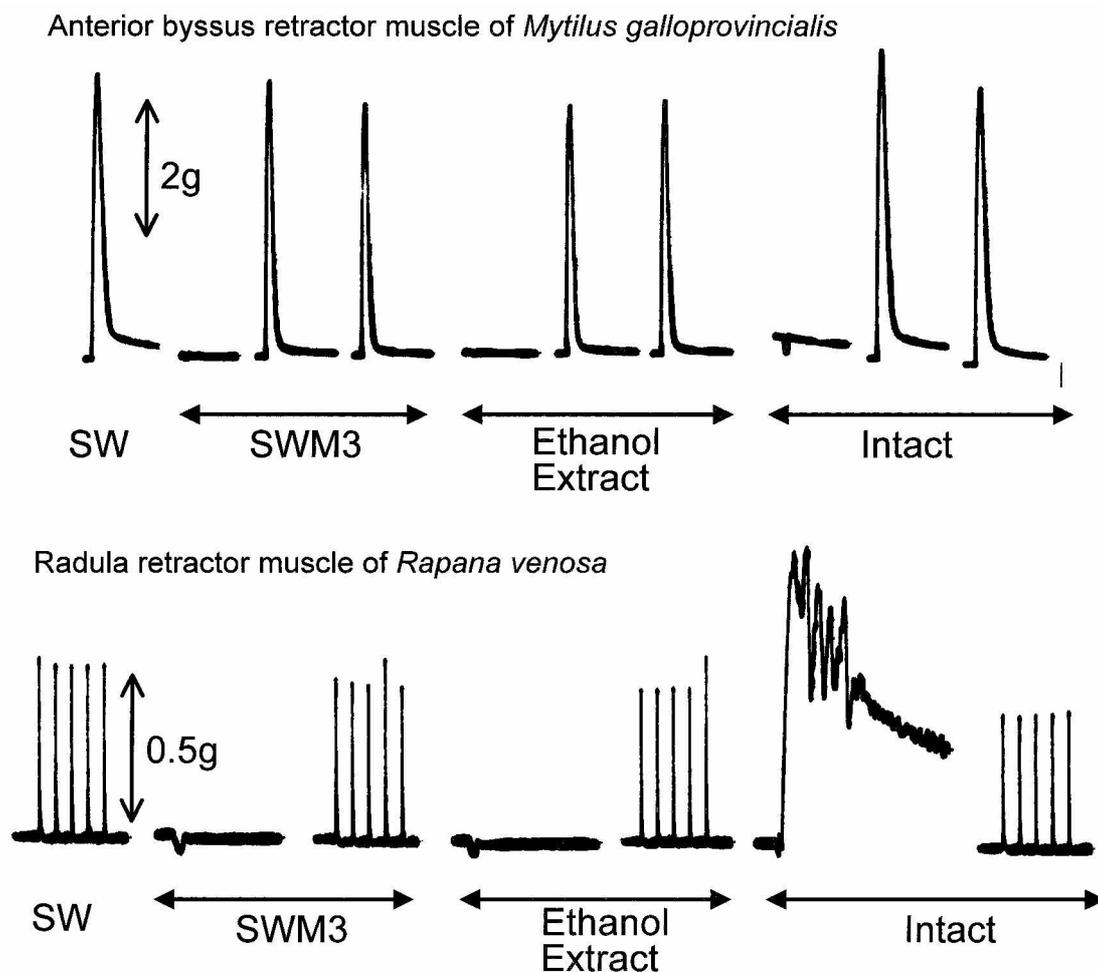


Fig. 46. Effects of *Heterocapsa circularisquama* on the shrinkage activities of isolated shellfish muscles obtained from the mussel *Mytilus galloprovincialis* (upper) and rapa whelk *Rapana venosa* (lower). SW: seawater, SWM3: culture medium.

Anterior byssus retracor muscle of *Mytilus galloprovincialis*

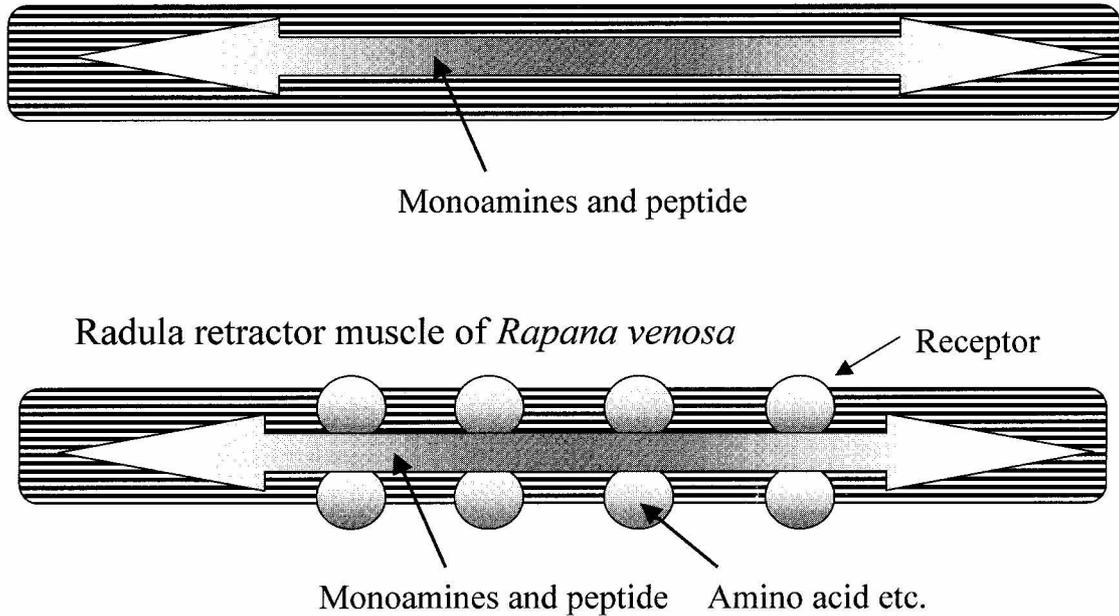


Fig. 47. Scheme of structural differences between two shellfish muscle used in the present study

した。ムラサキガイの足糸前牽引筋が純粋な筋肉組織で構成されているのに対し、アカニシ歯舌牽引筋の表面にはグルタミンレセプターをはじめとした種々のレセプター群が存在していると考えられており(宗岡, 1993), これらを介した情報伝達によって筋収縮が影響を受けることが分かっている。今回の結果は, *H. circularisquama* の毒性物質がモノアミンやペプチドなどのように筋肉組織に直接影響を及ぼすような物質ではなく, レセプターに刺激を与えることで間接的に筋収縮を引き起こす性質を有していることが想定された。以上のことから, *H. circularisquama* を暴露された二枚貝の筋組織の収縮などは, 鰓や外套膜上における接触によって受けた刺激が二次的なメッセンジャーを介して筋肉組織に到達し, 間接的に筋肉組織を収縮させているものと考えられた。

前項で *H. circularisquama* と *A. anophagefferens* の貝類に対する毒性について比較検討を行った。Gainey and Shumway (1991) は貝が鰓上で *A. anophagefferens* を予備消化する過程で細胞表面にある多糖類が分解を受け, その結果ドーパミン様作用を有する物質が放出され, これが神経伝達に関わっているアセチルコリンを抑制するため繊毛運動が阻害されているのではないかと推察している。その後, Bricelj

and Lonsdale (1997) は *A. anophagefferens* の毒性について再検討を行ったところ, 貝類に対する毒性は確かに細胞表面に存在し, 毒性発現には細胞と直接接触することが必要であることが判明した。さらに, Bricelj *et al.* (2001) は Gainey and Shumway (1991) が実験に使用した *A. anophagefferens* の株(1986年産)と新しくロングアイランド湾から分離・培養された株(1995年産)を用い, ムラサキガイのろ水量を指標として毒性試験を行った。その結果, 前者の毒性は後者に比べて著しく低く, 長い培養期間中に本来の強い毒性を失っていたことを明らかにした。また, 新しく分離された株では, 実際の赤潮試料で観察された短期間で著しいろ水量の減少(Tracey *et al.*, 1988)が認められ, しかもそうした作用は *I. galbana* との混合給餌においても低下せず, さらに偽糞の排出もほとんど認められなかった。その一方で Gainey and Shumway (1991) が指摘したような繊毛運動の低下は認められなかったという。このことから, Bricelj *et al.* (2001) は *A. anophagefferens* の二枚貝に対する毒性は *H. circularisquama* を用いた実験で認められた現象(Matsuyama *et al.*, 1997)と密接に関連しており, 両者の毒性発現機構は同じではないかと指摘している。*H. circularisquama* と *A. anophagefferens* の

いずれも二枚貝に強い毒性を示すことから、今後両者の毒性の相同性についてさらなる検討が必要であろう。いずれにしても、これまで述べてきたとおり、筋収縮など貝類側の応答の多くはアセチルコリン、ドーパミン、セロトニンといったモノアミンで制御されているという知見が極めて多く (Twarog, 1976; 松浦ら, 1986; Aiello, 1990; Fong *et al.*, 1990), 有害藻類と二枚貝との関連もこの学説をベースに論じられることが多い (例えば, Gainey and Shumway, 1991)。しかし, *H. circularisquama* や *A. anophagefferens* の毒性を考えると外的因子としてのモノアミンの直接的な関与の可能性は低いと考えられ、全く新しい機構で毒性が引き起こされている可能性が高いと考えられる。

## 第2項 二枚貝成体に対する影響の組織学的検討

前項で *H. circularisquama* の暴露によって閉殻や外套膜の異常収縮などの影響が見られるものの, *H. circularisquama* 自身は直接筋組織に影響を及ぼしている訳ではなく、レセプターなどを介して二次的に筋組織に影響を及ぼしていることが分かった。しかしながら, *H. circularisquama* の暴露によって貝類の斃死現象を考える上では、レセプターなどを介した二次的メッセンジャーによる生理的攪乱が具体的に個体斃死にどう関係しているのか詳細に検討することが重要である。そこで、暴露初期において、二枚貝の組織でどのような変化が生じているのか、組織学的な観察によって明らかにすることとした。

### 1. *H. circularisquama* を暴露されたマガキの組織変化

*H. circularisquama* を暴露されたマガキは第4章にも述べたように激しいclappingなどの症状を引き起こしながら完全に閉殻状態に陥り、そこから麻痺状態を経て最終的に閉殻筋が弛緩して斃死に至る。斃死に至る過程で組織の外見的变化を観察した結果を述べる。

#### 材料及び方法

広島湾から殻高  $65.2 \pm 13\text{mm}$  のマガキ *Crassostrea gigas* を3個体採取した。これを3L容のガラスビーカーに収容し、英虞湾産 *H. circularisquama* をろ過海水で最終濃度  $21,000 \text{ cells/mL}$  になるように希釈してマガキに暴露した。*H. circularisquama* を含む海水を2L添加し、暴露12時間後および25時間後に同様の細胞密度に調製された海水と交換した。暴露50時間後に全個体を取り出し、閉殻筋を慎重に切断して開殻させ、組織の状態について観察した。

## 結 果

暴露50時間目までに3個体のうち2個体は大きく開殻し、外套膜をピンセットで刺激するとゆっくりと閉殻する「麻痺」状態に陥っていた。もう1個体は堅く閉殻したままであった。組織の観察結果を以下に示す。

### 1) 鰓

麻痺状態にまで至ったマガキの鰓は全体的に過剰に分泌された粘液で表面がぬめっており、色調も健常なものが乳白色を示しているのに対し、暴露区はやや乳褐色を示していた。鰓は解剖時に極めて容易に亀裂を生じたり剥離したりするなど、組織としての張りもほとんどなかった。顕微鏡観察では鰓の繊毛運動は完全に停止してはいなかったが、対照区と比較して繊毛運動が停止したり潰れている箇所が著しく多かった。切り出した鰓の薄片をトリパンブルーを満したシャーレの中に浸すと、対照区の鰓は染色されることなく、ゆっくりと滑走する運動を示すが、*H. circularisquama* を暴露されたマガキの鰓はほとんど滑走することなく、鰓の表面も筋状に強く染色された。このことから、明らかに鰓組織が傷害を受けていた。

### 2) 外套膜

第3～4章での斃死個体の観察結果同様、外套膜縁辺部の収縮が著しかった。また外套膜は鰓同様に粘液が過剰に分泌されぬめっていた。ただし50時間後でもピンセットによる刺激に対する応答は3個体とも観察された。

### 3) 心臓

通常マガキは閉殻筋縁辺部を傷つけないように注意しながら開殻させると、心室部分が半透明に盛り上がり、心臓がゆっくりと力強く拍動しているのが観察できる。しかしながら、*H. circularisquama* を暴露されたマガキの心室部分はほとんど盛り上がることもなく、心臓拍動も全く観察されなかった。従って、この段階では外套膜の刺激による閉殻筋の収縮は認められるものの、心臓は完全に停止していた。

### 4) 中腸腺

暴露実験が5月とマガキの産卵期直前であったため、中腸腺組織は厚いグリコーゲンと生殖腺に取り囲まれていたため、外観から中腸腺の変化は観察できなかった。ナイフで軟体部を輪切りにして観察した限りでは、アコヤガイなどで観察される中腸腺の退色は明瞭ではなかった。

## 考 察

組織学的な知見では、傷害は基本的にH. circularisquamaとの接触が頻繁である鰓繊毛部位で顕著であった。鰓組織は厚い粘膜で覆われ、その繊毛運動も著しい傷害のため低調である。鰓における傷害が大きいという点では、魚毒性の高いChattonella antiquaなどに暴露された魚類の組織学的な所見（松里，小林，1974; Shimada *et al.*, 1983; Ishimatsu *et al.*, 1996a）と良く類似している。一方で、鰓だけでなく心臓における変化も著しかった。少なくとも暴露50時間目の段階で、マガキの心臓拍動は完全に停止していた。このことから、麻痺状態に陥った段階で摂餌やろ水活動による酸素の取り込みは大きく影響を受けており、さらに体内に栄養分や酸素を補給し、老廃物を排泄する循環機能も完全に停止していた。外套膜や閉殻筋の刺激応答は見られるものの、麻痺状態まで陥った個体はその後正常海水中に戻しても回復することなく斃死することがほとんどである。これまでの暴露実験では、ピンセットなどによる刺激応答が完全に観察されなくなった段階で「斃死」と判断してきたが、少なくともマガキの場合、実際には麻痺状態に陥った段階で心臓拍動は停止して回復不能な状態に陥っており、個体としてはほとんど斃死していることは明らかであった。

Nagai *et al.* (1996)はアコヤガイ稚貝を用いてH. circularisquamaの暴露実験を行った。その過程で、アコヤガイの鰓がH. circularisquamaと接触した数秒後には激しく萎縮し、その後心臓拍動が、暴露後早くも3分間、遅くとも数十分の間に完全に停止する現象を観察している。この試験においても、外套膜の刺激に対する閉殻筋の応答が無くなる、すなわち斃死したと判断された状態に達するには暴露後24~48時間を必要としている。マガキにおいて調べることはできなかったが、この鰓の傷害や心臓拍動の停止はアコヤガイ同様かなり初期の段階で発生しているものと推察される。従って、二枚貝の心肺機能である鰓や心臓の傷害が、個体の斃死に密接に関係していることは明らかである。

H. circularisquama以外の赤潮生物が二枚貝へ及ぼす影響を調べた文献では、生残率の低下（Ho and Zubkoff, 1979; Shumway *et al.*, 1985; Thain and Watts, 1987; Tracey, 1988; Gainey and Shumway, 1988; Gallager *et al.*, 1989; Luckenbach *et al.*, 1993; Lesser and Shumway, 1993; Yan *et al.*, 2001）、ろ水活動の障害（Tracey, 1988; Gainey and Shumway, 1988; Gallager *et al.*, 1989; Luckenbach *et al.*, 1993; Lesser and Shumway, 1993）、殻の成長低下（Nielsen and Strömngren, 1991）など現象論的な記載

が多い。心臓拍動については、Gainey and Shumway (1988)において、Alexandrium tamarenseの暴露で心臓拍動の異常が報告されているが、そのメカニズムは不明である。

鰓は二枚貝の摂餌や呼吸を考える上でもっとも基本的な組織であり、実際に二枚貝は鰓が体表面を占める面積が脊椎動物よりも著しく大きい生物群である。しかし有害赤潮生物の影響を調べた過去の報告では、ろ水率という指標で鰓の機能低下を論じたものは多いが（Widdows *et al.*, 1979; Matsuyama *et al.*, 1998; Gainey and Shumway, 1991）、鰓組織そのものの変化を直接観察した例は以外にも見られない。ろ水率で評価する場合は、それが二枚貝自体が能動的に繊毛運動を低下させているのか、それも物理化学的傷害によって二次的に機能が低下しているのか判断することは困難である。前章でH. circularisquamaを30分間暴露されたムラサキイガイのろ水率の回復過程を示したが、外液を新鮮なIsochrysis galbanaと交換しても80分後まではろ水率の有意な低下が観察され続けた。このことから、H. circularisquamaによる鰓の傷害は例え短時間の暴露であっても不可逆的な影響を受けていると判断された。

## 2. H. circularisquamaを暴露されたアサリの組織変化

アサリの暴露実験についても既に第4章で報告した。アサリは暴露実験に用いた5種の二枚貝の中ではH. circularisquamaに対する耐性が最も高い種ではあるものの、本種の赤潮時には幅広く大量斃死現象が観察されている（Fig. 4 および ~ を参照）。H. circularisquamaを暴露されたアサリ組織の変化について以下に述べる。

## 材料及び方法

実験に用いたH. circularisquamaは英虞湾の表層海水から分離したクローン株である。これを改変SWM3培地で培養し、暴露実験に用いた。暴露実験には千葉県産アサリ3個体（殻幅 $42.2 \pm 1.6$ mm）を用いた。100mLのろ過海水が入った500mL容ビーカーにアサリを15分間収容し、水管を伸張した状態のアサリにH. circularisquamaの培養液を400mL添加した（最終濃度を $15,758$  cells/mL）。およそ5分間暴露後、ただちに解剖後、鰓、水管、中腸腺、心臓を摘出し、前処理まで10%ホルマリン溶液中で固定して保存した。対照区はろ過海水中に同様に静置していた個体を用いた。それぞれの組織試料は、Suzuki (1992)に従って試料

を調製し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1010, 日本電子社製) を用いて観察した。電子顕微鏡観察については鈴木伸洋博士の全面的な協力の下で行われた。

これとは別にさらに2個体を同じ条件で暴露実験を続け、30時間後に麻痺状態に陥った段階で閉殻筋を切断し、軟体部の状態について観察した。

#### 結果および考察

*H. circularisquama* を暴露されたアサリは直ちに水管を激しく萎縮させた (Fig. 48)。また、出水管を完全に閉じた後、入水管から激しく水流を逆流させる "vomiting" を繰り返すなど激しい拒否反応が見られた。*H. circularisquama* の暴露区の場合、摘出された心臓は対照区と比較すると明らかに萎縮していた。その他の組織 (鰓, 水管, 外套膜, 中腸腺) の外観は、暴露5分間では特に異常は認められなかった。また、30時間の暴露で麻痺状態に陥った個体では、水管がかなり粘液放出のためか組織としての張りがほとんど無くなっていた。またアコヤガイで観察されるのと同様に、中腸腺の退色 (暗褐色から乳褐色) が著しかった。外套膜の収縮は顕著ではなかった。

組織学的な所見によると、暴露5分間で最も組織の変化が大きかったのは心臓であった。心臓組織の観察結果をFig. 49に示す。*H. circularisquama* を暴露されていないアサリの心筋細胞は、太い心筋細胞に挟まれるように、多数のミトコンドリアの集合体やグリコーゲンの沈着が観察される。しかし、*H. circularisquama* を暴露されたアサリ心筋では、心筋細胞自体が細くなっていること、ミトコンドリアの内膜であるクリステが崩壊して空洞化したり、これが進行した場合はミトコンドリア集合体自体が完全に崩壊して心筋組織内に空洞化が生じるなど、わずか5分間の暴露においても、心臓組織、特にミトコンドリアの壊死が著しく進行していることが判明した。このため、心筋細胞の浮腫を症徴とした組織変成が認められた。これは観察した3個体すべてに共通した症状であった。

こうした症状が著しい部位には、電子密度の高い10~15 $\mu$ m前後の粒子が所々に認められた (Fig. 49)。これをより詳細に観察すると、電子密度の高いコア (核?) と、それを取り巻く盤状の層状構造物 (チコライド膜と思われる)、断面が9本の外部繊維と中心部の2本の繊維 (いわゆる9+2構造) から成る鞭毛様物体が観察されるなど、明らかに鞭毛藻と思われる特徴を有していた。実験には*H. circularisquama* の単一培養液を用いていることから、組織内に観察された粒子は*H. circularisquama* の細胞であると推察される。

これらの症状から、*H. circularisquama* を暴露されたアサリの心臓はミトコンドリアの破壊による組織破壊の結果、細胞内呼吸障害に陥り、心筋が硬塞してやがて心臓停止に至るものと思われる (心筋梗塞)。この破壊は何らかの理由で心臓内に直接侵入してきた*H. circularisquama* により、さらに助長されているものと思われた。こうした心臓停止は血流の移動を停止させ、組織への栄養分と酸素の供給を遮断する。これにより、それぞれの組織の段階的な壊死が進行し、最終的に個体の死へと導かれている可能性が考えられる。

有害プランクトンが二枚貝に及ぼす影響について、組織学的に調べられた事例は少ない。ヨーロッパ沿岸で発生し、魚介類に被害を及ぼす *Karenia mikimotoi* (論文中では *Gyrodinium aureolum*) の場合、500

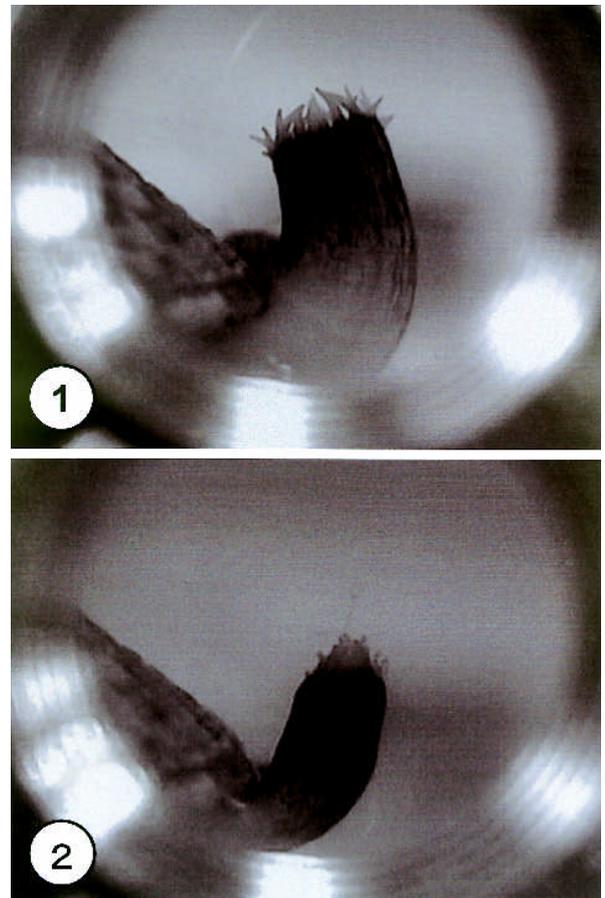


Fig. 48. Close-up of inhalant siphon of adult Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to *Heterocapsa circularisquama*. 1: A normally extending siphon in filtered seawater, 2: Similar individual when exposed to 210 cells/mL of *Heterocapsa circularisquama*. The exhalant siphon was completely closed and frequently showing vomiting behaviors.

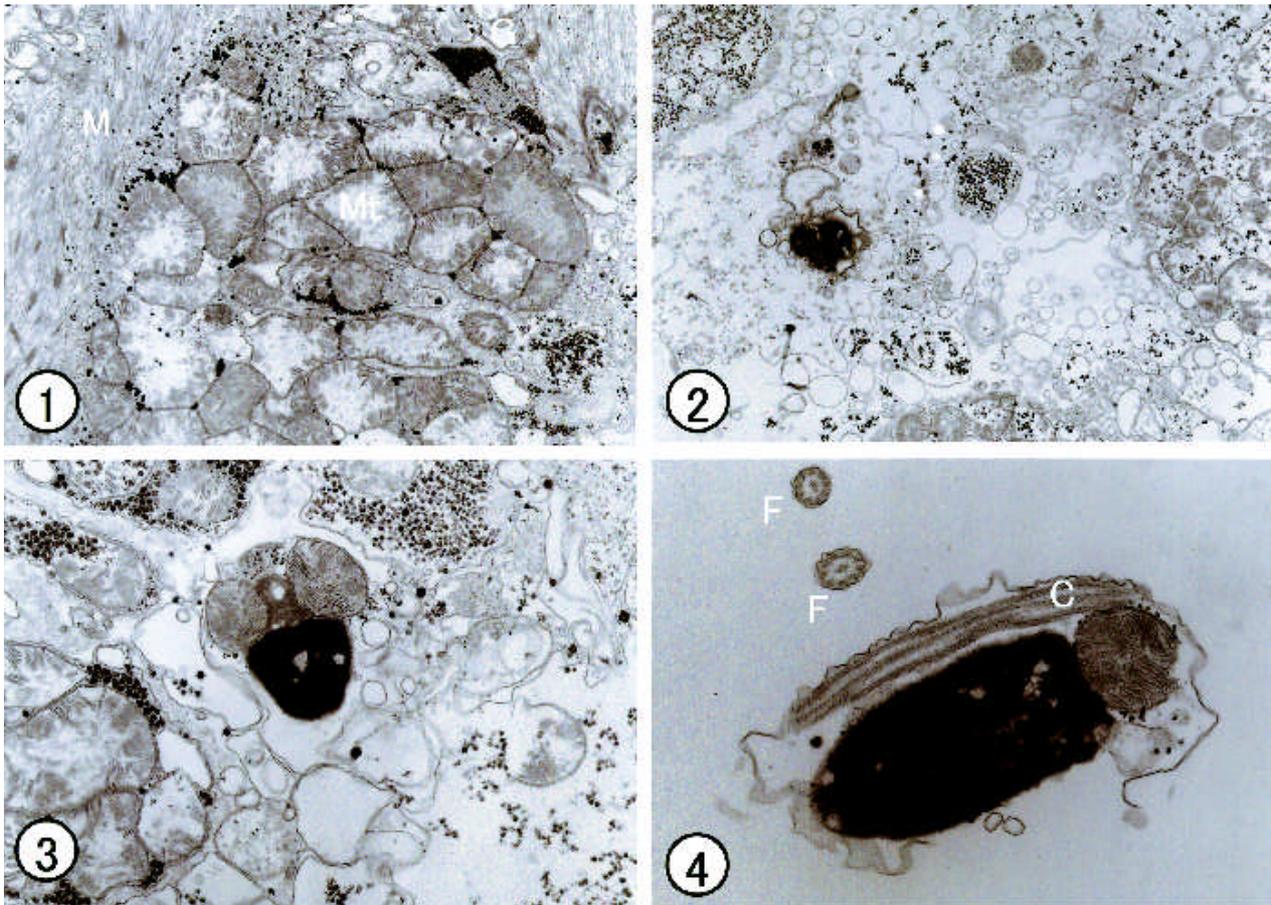


Fig. 49. TEM observation on heart of the manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to *Heterocapsa circularisquama* (15,758cells/mL) 1: Control (M: muscle, Mt: mitcondrion), 2-3: Affected specimen showed a marked destruction of the mitcondrion and muscle fiber. 4: An unidentified particle whchi observed around affected site of manila clam ( $\times 14,280$ ). Flagerium (F: 9+2) and chloroplast-like material (c) surrounding the high dense core which thought to be an invaded cell of *Heterocapsa circularisquama*.

cells/mL以上の暴露によって、ムラサキガイの中腸腺に傷害が認められるという (Widdows *et al.*, 1979)、最近同様の知見が培養株を用いた実験によっても報告されている (Smolowitz and Shumway, 1997<sup>2</sup>)。

また、*Procoentrum minimum*も弱いながら西洋カキ *Crassostrea virginica*の稚貝に傷害を与えることが知られている (Wikfors and Smolowitz 1995)。この場合は、*P. minimum*が細胞内に有しているPAS好染色性顆粒 "autolysosome" (= 酸性分解酵素の集合体) が捕食・消化の過程でカキの中腸腺組織内に蓄積し、これによって組織の壊死などの症状が引き起こされているという (Wikfors and Smolowitz, 1995)。いずれにしても、過去の有害赤潮生物によって引き起こさ

れる傷害は中腸腺に集中しているようである。麻痺性貝毒の原因となる *Alexandrium tamarense* の暴露においては、貝の心拍数の異常等が認められているが (Gainey and Shumway, 1987)、これにより貝が斃死するかどうかは不明である。いずれにしても、今回のように組織破壊を伴う心臓停止による急性傷害の知見はない。アコヤガイ、マガキおよびアサリのいずれも暴露初期における心臓拍動の停止、あるいは心臓組織の壊死が観察されたことから、二枚貝の個体死を考えるうえで、この「心筋梗塞」が決定的な致死的要因となっていることは明らかである。もちろん、先に述べたように鰓組織の破壊も個体死を考える場合考慮に入れられるべきである。ただし、アコヤガイを用いた予

\*<sup>2</sup> Widdows *et al* (1979) および Smolowitz and Shumway (1997) のいずれも論文の中では *Gyrodinium aureolum* Hulburt として記載されているが、前者は *Karenia mikimotoi* (Miyake et Kominami ex Oda) Hansen & Moestrup、後者は *G. aureolum* の原記載種であり、実験に用いられた種類は異なる。なお *Gyrodinium aureolum* Hulburt の学名は、Hansen *et al* (2000) によって、*Gymnodinium aureolum* (Hulburt) Hansen へと再記載されている。

備的な試験では、鰓組織の破壊はラフィド藻 *Chattonella antiqua* 暴露区の二枚貝の方が *H. circularisquama* 暴露区よりも著しかった（永井，私信）。しかしながら，*C. antiqua* 暴露区では鰓組織の破壊（繊毛の脱落等）が進行していても，生残率低下は少なくとも4日間は観察されない（永井，私信）。このことは，仮に鰓の傷害が発生して餌料や酸素の取り込みが低下しても，二枚貝はグリコーゲンを蓄積したりして嫌気的環境に耐える能力が元々高いため（平井，林，1986），短期的にはこれ乗り越えることが可能であると判断される。*H. circularisquama* 暴露による24時間という短期間での個体死は，やはり「心筋梗塞」の影響が大きいものと判断される。

### 第3項 二枚貝幼生を用いた生物検定

貝類の筋肉組織を用いた試験の結果，毒性物質は神経伝達系に直接作用するのではなく，レセプター等を接触応答によって刺激することで二次的な生理的傷害を引き起こしている可能性が示唆された。筋肉組織の収縮や繊毛運動の異常を伴う症状は，*H. circularisquama* との接触によって何らかの傷害を受けた組織から，二次的に刺激が伝わって引き起こされていると考えられる。また，*H. circularisquama* の暴露によって鰓組織が傷害を受けるだけでなく，心臓組織が極めて短期間に壊死を引き起こし，心筋梗塞を引き起こして個体の主たる致死的要因になっていることも明らかとなった。しかしながら，*H. circularisquama* の暴露によって鰓や心臓で引き起こされる傷害が，どのようなメカニズムで発生するのかについては必ずしも明らかにすることができなかった。

最後に本項では，細胞生理学的観点から毒性発現機構を解明するため，*H. circularisquama* が組織や神経伝達系のほとんど発達していない二枚貝の初期発生期に及ぼす影響について調べ，毒性発現機構の詳細について明らかにすることを目的とした。

### 材料および方法

1997年2～11月にかけて，広島湾から各種二枚貝（ムラサキイガイ，マガキおよびアサリ）の成熟個体を採取した。ムラサキイガイおよびアサリにおいては，昇温操作による刺激で産卵・放精を誘発させ，卵と精子を別個に採取した。一方，マガキにおいては，生殖腺を直接切開して卵と精子をそれぞれ採取した。採取後の未受精卵と精子，およびそれらを人工的に受精させることに得られた受精卵，胚およびトロコフォア幼生等を以下に述べるように適宜生物検定に供試し，影

響を評価した。

#### 1) 未受精卵および精子に及ぼす影響

本実験にはマガキの精子と卵を用いた。卵をろ過海水（31～32psu）でおよそ100eggs/mLの密度になるように希釈し，この4mLを6穴のマイクロプレートに収容した。これに *H. circularisquama* を100～20,000 cells/mLの細胞密度になるように添加し，形態変化を経時的に観察した。精子も同様にろ過海水で希釈し，直ちに *H. circularisquama* を暴露して運動性の有無について調べた。また，20,000 cells/mLの *H. circularisquama* に20分間暴露した精子を3μmのヌクレポアフィルターでろ過し，*H. circularisquama* と精子を分別後，*H. circularisquama* に暴露された精子を未受精卵に媒精させ，受精率を調べた。受精率は受精後の卵割の有無で判断した。対照区はろ過海水で同様に希釈された精子を用いた。精子の初期密度は両者ほぼ同じ程度に調整した。本実験は薄浩則博士の全面的な協力の下で行った。

#### 2) 胚に及ぼす影響

本実験にはマガキの胚を用いた。受精後1～2時間経過し，2～8細胞にまで卵割が進行した胚をろ過海水（31～32psu）でおよそ100embryos/mLの密度になるように希釈し，この4mLを6穴のマイクロプレートに収容した。これに *H. circularisquama* を100～20,000 cells/mLの細胞密度になるよう添加し，形態や発生に及ぼす影響を経時的に調べた。

#### 3) 幼生に及ぼす影響

本実験にはムラサキイガイ，マガキおよびアサリの幼生を用いた。受精後14～18時間後のトロコフォア幼生をろ過海水（31～32psu）でおよそ100individuals/mLの密度になるように希釈し，この4mLを6穴のマイクロプレートに収容した。これに *H. circularisquama* を100～20,000 cells/mLの細胞密度になるよう添加し，形態や発生に及ぼす影響を調べた。

#### 4) 幼生のカルシウム濃度の変化

本実験にはアサリ幼生を用いた。80,000 cells/mLの *H. circularisquama* によって影響を受けた幼生の細胞内Ca<sup>2+</sup>の変化を明らかにするため，細胞をカルシウムイムノフォアであるFura-2 AM（Fig. 50参照，和光純薬）で染色し，30分後落射蛍光顕微鏡下で観察を行った。

これらの実験はすべてバクテリアの影響を最小限にするため，試験海水にペニシリン・ストレプトマイシ

ン混液を添加して行った (Walne, 1974)。初期発生中の温度変化は異常形態や発生率の低下を引き起こすので (加戸, 平野, 1979), 実験中の温度は $22 \pm 1.5$  に保った。実験中容器の振盪は行わなかった。

結 果

1) 未受精卵および精子に及ぼす影響

Fig. 51に*H. circularisquama*の細胞密度とマガキの卵外皮崩壊率との関係を示す。未受精卵は少なくとも20時間は形態変化が認められなかった。また、改変SWM3培養液を22%の濃度で添加しても変化は認められなかった。しかしながら、*H. circularisquama*の細胞密度が500 cells/mLを越えると卵外皮が剥離した細胞の割合が増加し、2,000 cells/mLを越えると急激に剥離細胞が増加した。10,000 cells/mL以上の濃度ではほとんどすべての個体が卵外皮剥離を引き起こしていた。細胞密度20,000 cells/mLの*H. circularisquama*培養液を $0.45 \mu\text{m}$ でろ過した溶液ではこうした作用は全く観察されなかった。

次に精子の遊泳率および受精能に及ぼす影響についてTable 14に示す。対照区および*H. circularisquama*を20,000 cells/mLで暴露したいずれの実験区においても、遊泳率は90%以上を示しており、精子の遊泳率への影響は特に認められなかった。同様に*H. circularisquama*に暴露した精子を使って受精率を調べた結果、対照区の受精率は93%で、*H. circularisquama*暴露区では86%であったが、統計学的に有意な差は認められなかった。

Fig. 52に*H. circularisquama*に暴露された未受精卵の変化を示す。*H. circularisquama*に暴露された卵は、卵外皮の一部が異常に膨張して細胞質から遊離し、その後亀裂が入り、卵から剥離した。暴露後およそ15

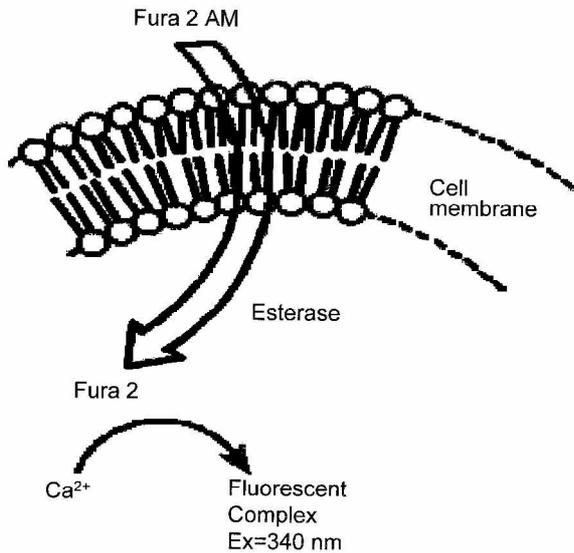


Fig. 50. Structure and flow of fluorescent complex for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  probe of Fura 2 AM. (1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester)

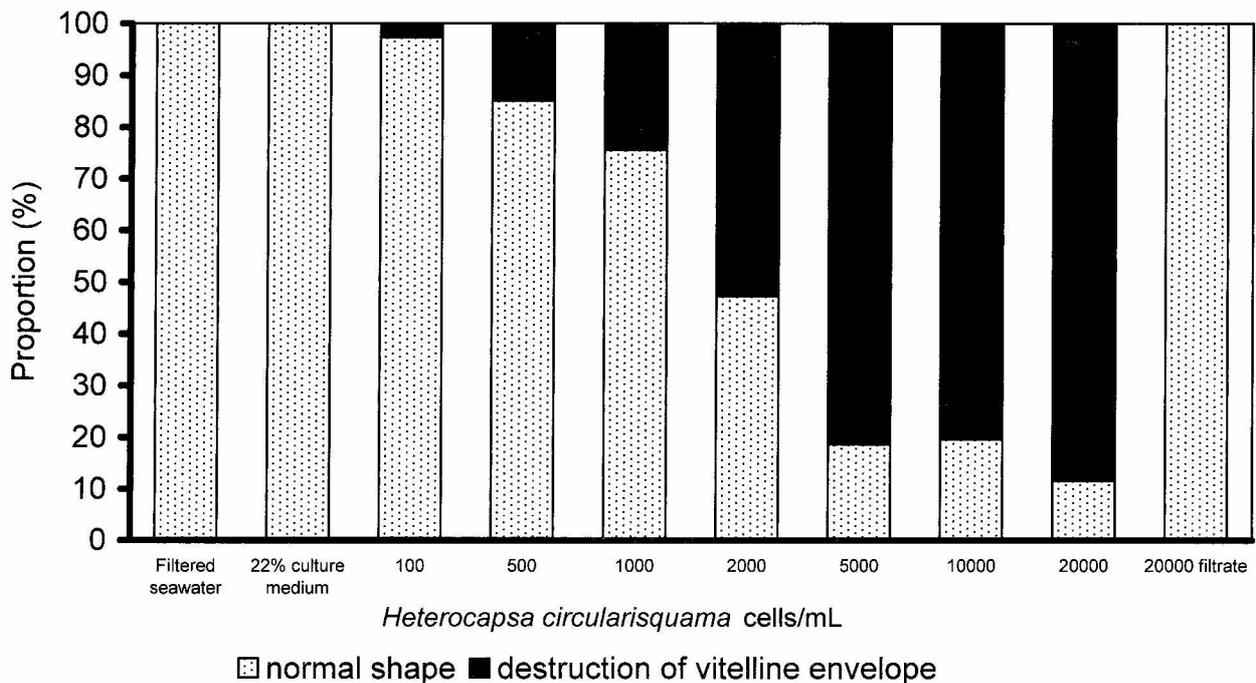


Fig. 51. Effects of *Heterocapsa circularisquama* exposure (2 hours) on the non-fertilized eggs of *Crassostrea gigas*

**Table 14.** Effects of *Heterocapsa circularisquama* exposure on motility and fertilization ability of the oyster *Crassostrea gigas* sperm

	Motility	Fertilization ability (%)
Control	++	93.3
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	++	86.1

～30分程度で遊離から剥離の過程が進行した。ムラサキイガイの場合、卵外皮の剥離とほぼ同時期に、受精時に観察される極体の放出も観察された。卵外皮が剥離した細胞は著しい形態異常を引き起こし、その後浸透圧に耐えきれず、数時間後には細胞が崩壊に至った (Fig. 52)。

## 2) 胚に及ぼす影響

Fig. 53に*H. circularisquama*の細胞密度とマガキの胚の生残率、形態異常個体出現率との関係を示す。対照区では87%の個体が順調に卵割してトロコフォア幼生まで発生した。また、培養液の成分が及ぼす影響を調べるため改変SWM 3 培養液を22%の濃度で添加しても対照区との間に差は認められなかったことから、培養液の成分は発生に影響を及ぼしていないと判断された。しかしながら、*H. circularisquama*の細胞密度が5,000 cells/mLを越えると未受精卵と同じように細胞表層膜の剥離細胞の割合が増加し、1,000 cells/mLを越えると急激に剥離細胞が増加した。10,000 cells/mL以上の濃度ではほとんどすべての個体が膜の剥離を引き起こしていた。こうした個体はトロコフォア幼生に発生することはなく、多くは死滅した。細胞密度20,000 cells/mLの*H. circularisquama*培養液を0.45 μmでろ過した溶液ではこうした作用は全く観察されなかった。

また、*H. circularisquama*と形態的に類似した*Heterocapsa triquetra*や*Scrippsiella trochoidea*は20,000 cells/mLの暴露においても胚の発生に全く影響を及ぼさなかった (Fig. 54)。

Fig. 55に*H. circularisquama*に暴露された二枚貝胚の変化を示す。*H. circularisquama*に暴露された胚は、最初に細胞最外層の外皮が剥離した後、やがて卵割中の胚の分割面が遊離し始めて、かなりの個体が分断化したり、アメーバー状に変形したりした (Fig. 55、および )。これらの過程は、暴露後およそ30分～数時間程度で観察された。この間、胚の卵割はほとんど停止した状態であった。分断化された胚やアメーバー状になった胚は浸透圧に耐えきれずにやがて崩壊した。

## 3) 幼生に及ぼす影響

Fig. 56に*H. circularisquama*の細胞密度とマガキ

のトロコフォア幼生の生残率および変態成功率との関係を示す。対照区では85%の個体が10時間以内にトロコフォア幼生からD型幼生まで発生した。また、改変SWM 3 培養液を22%の濃度で添加しても83%の個体がD型幼生まで発生した。しかしながら、*H. circularisquama*の細胞密度が1,000～5,000 cells/mLを越えると生残率および変態率のいずれもが減少し、5,000～10,000 cells/mL以上の濃度ではほとんどすべての個体が10時間以内に斃死した。細胞密度20,000 cells/mLの*H. circularisquama*培養液を0.45 μmでろ過した溶液ではこうした作用は全く観察されなかった。

Fig. 57に*H. circularisquama*に暴露されたムラサキイガイのトロコフォア幼生の変化を示した。*H. circularisquama*に暴露されたトロコフォア幼生は、*H. circularisquama*の細胞との接触を繰り返すたびに繊毛の一部が潰れて徐々に遊泳能力が著しく阻害される。暴露後30～数時間を経過するとほとんどの繊毛が潰れ、損傷を受けた部位を中心に断片化した細胞片や細胞質が細胞外に突出した状態が頻繁に見られるようになる。同時におびただしい量の粘液が分泌され、培養器の底部に沈降して他の個体と絡まったり凝集する個体が多く観察された。影響をうけた個体のほとんどは徐々に破裂して死滅していった。*H. circularisquama*の影響を免れ、D型幼生にまで発生した個体は遊泳行動をほとんど示さないものの、殻内部での繊毛活動は活発で、少なくとも数日間以上は生存し続けた。

## 4) 幼生のカルシウム濃度の変化

Fig. 58に*H. circularisquama*によって影響を受けたアサリのトロコフォア幼生をFura-2 AMで染色し、落射蛍光顕微鏡で観察した結果を示す。通常の海水中の健全な個体、あるいは*H. circularisquama*によって影響を受けず、まだ十分な運動性を示している幼生 (Fig. 58の右側の個体) は、Fura-2 AM存在下でもほとんど蛍光を発しなかった。このことから、健全な個体内部のカルシウム濃度は比較的低濃度に維持されているものと考えられる。しかしながら、*H. circularisquama*の暴露によって影響を受け、繊毛や細胞膜が損傷を受けたアサリの幼生は、Fura-2 AMによって強く染色された (Fig. 58の左側の個体及び

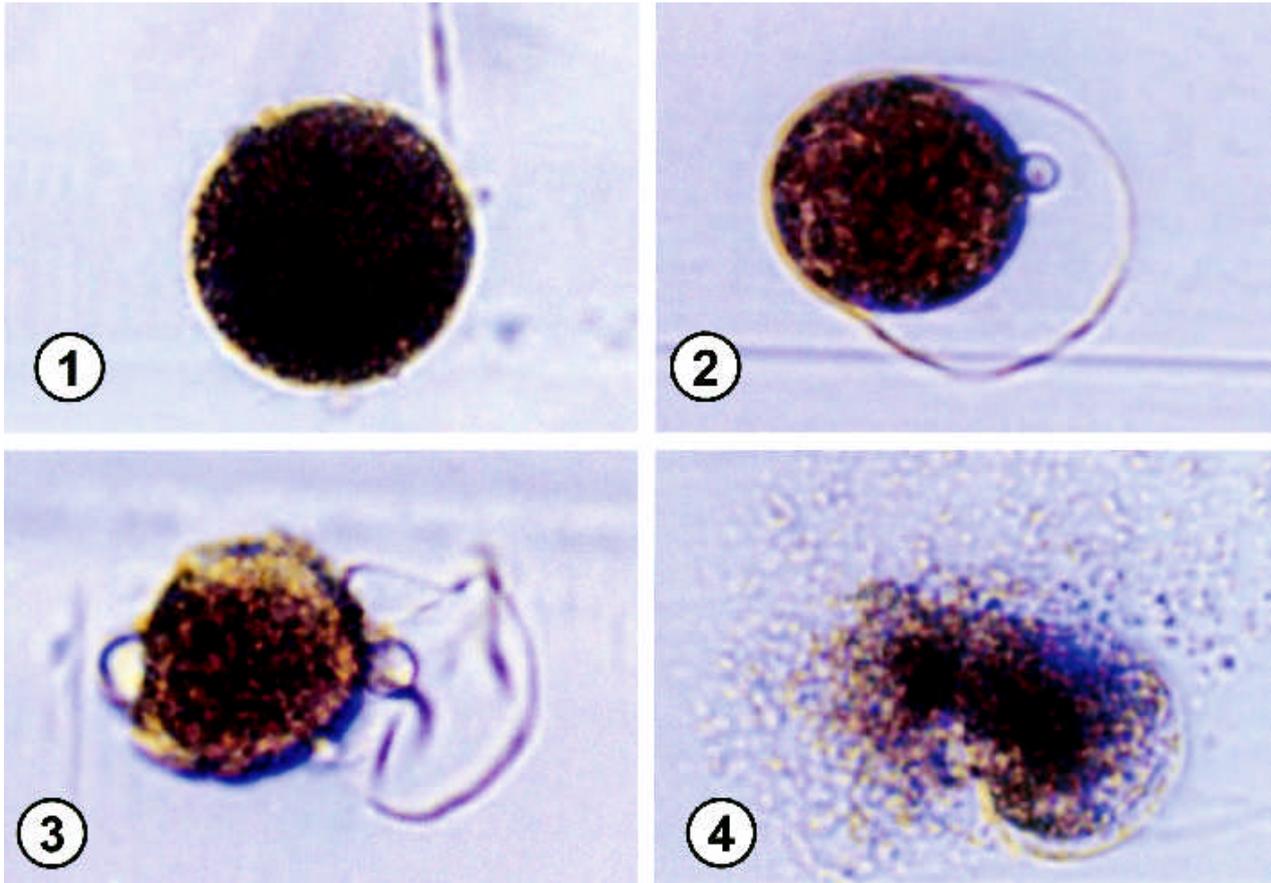


Fig. 52. Microscopic observations on the non-fertilized eggs of *Mytilus galloprovincialis* exposed to 20,000cells/mL of *Heterocapsa circularisquama*. 1: Control eggs in seawater. 2-3: Affected eggs showing notable destruction of vitelline envelope (30 minutes to 3 hours). 4: Affected eggs resulted in lysis (3 hours).

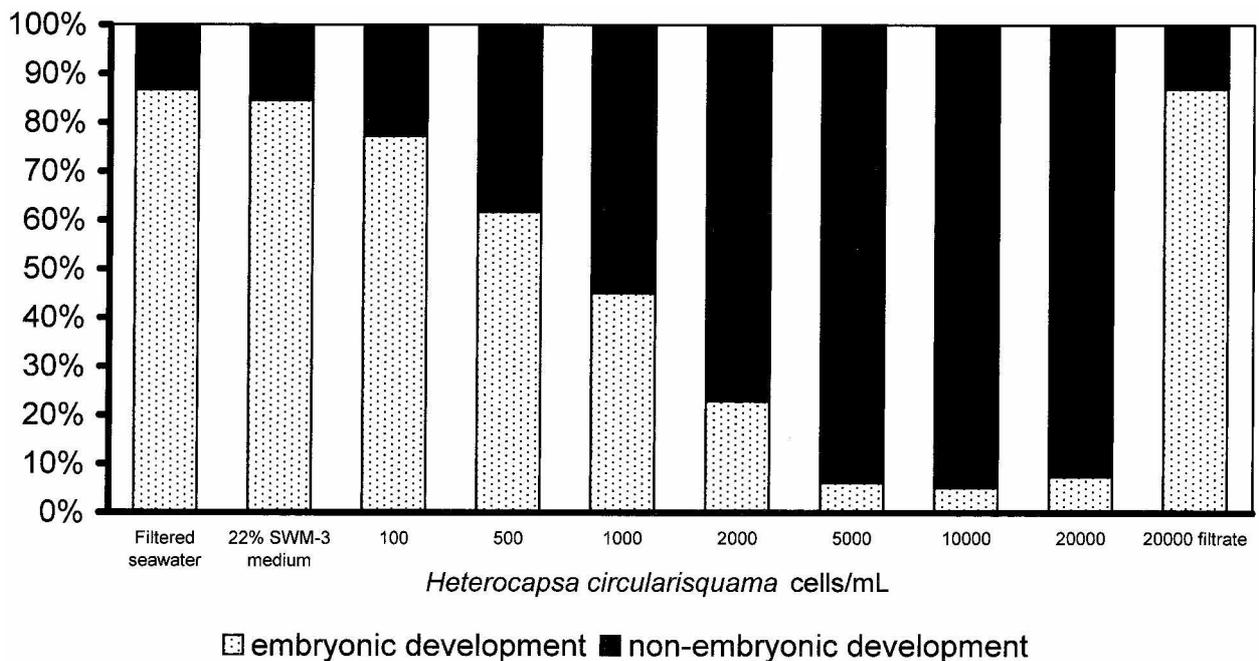


Fig. 53. Effects of *Heterocapsa circularisquama* exposure (2 hours) on *Crassostrea gigas* embryos

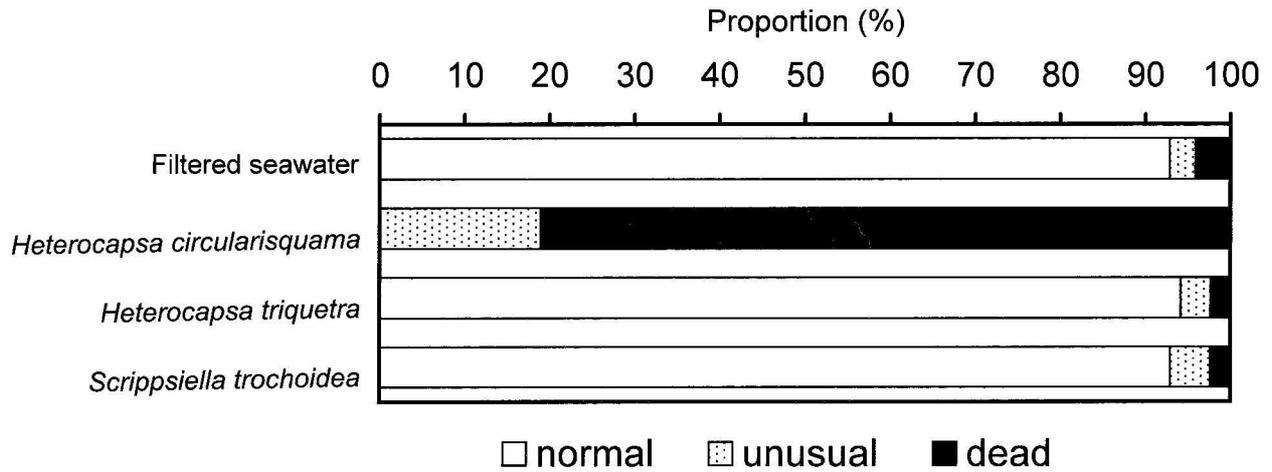


Fig. 54. Effects of *Heterocapsa circularisquama*, *H. triquetra* and *Scrippsiella trochoidea* exposure (4 hours) on *Crassostrea gigas* embryos. Cell density was 20,000cells/mL in each experiment.

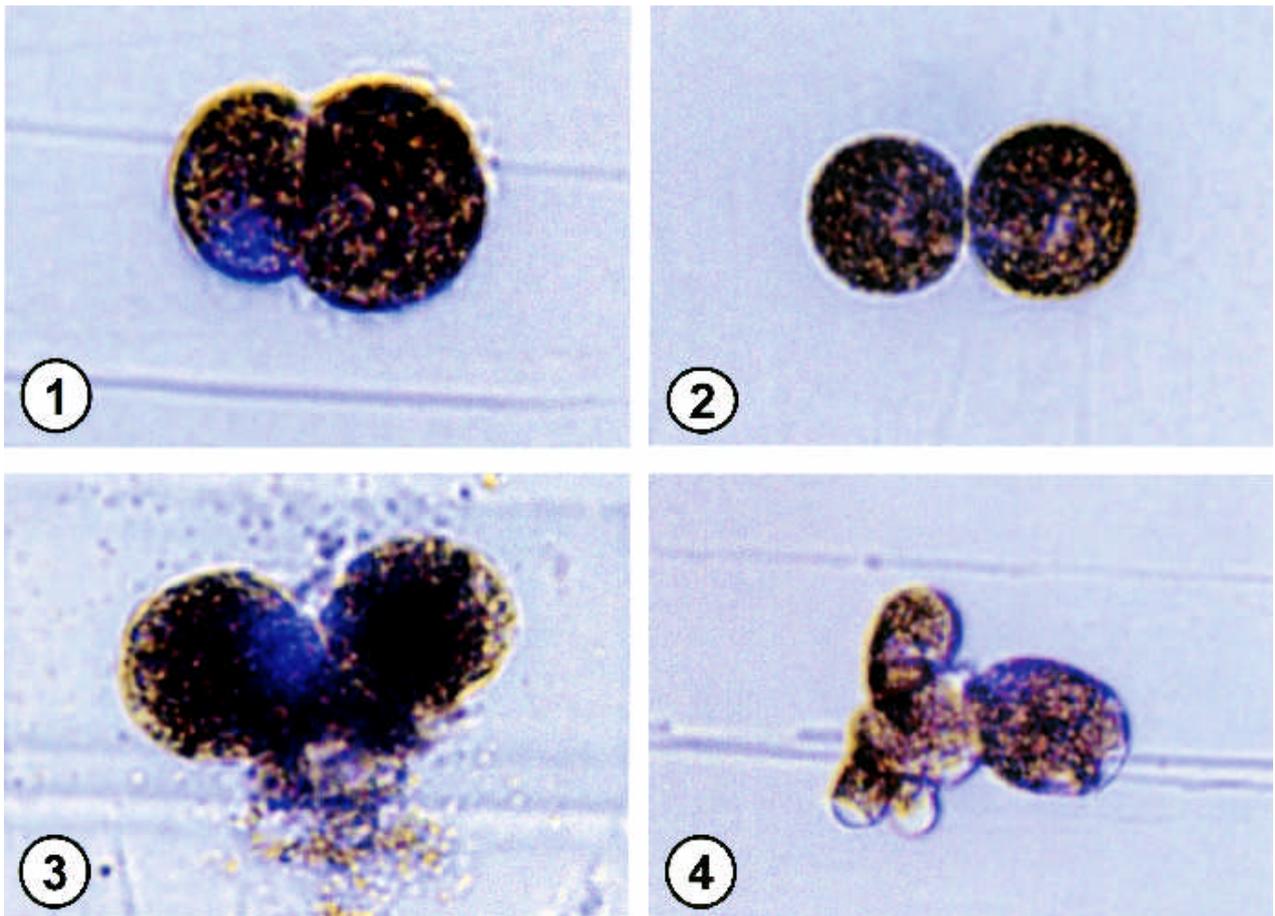


Fig. 55. Microscopic observations on the *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas* embryos exposed to 20,000cells/mL of *Heterocapsa circularisquama*. 1: Affected *M. galloprovincialis* embryo (2 cells). 2-3: Affected *M. galloprovincialis* embryo showing destruction of vitelline envelope and concurrent cell lysis (30 minutes to 3 hours). 4: Affected *C. gigas* embryo resulted in pieces (2 hours).

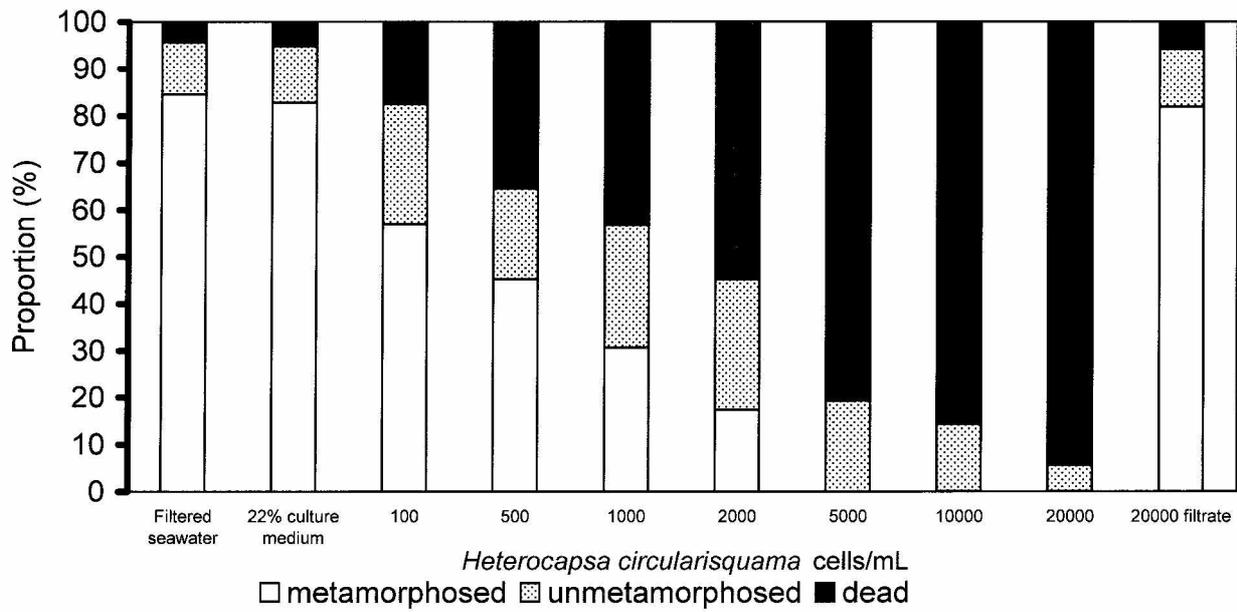


Fig. 56. Effects of *Heterocapsa circularisquama* exposure (2 hours) on trochophore stage of *Crassostrea gigas*

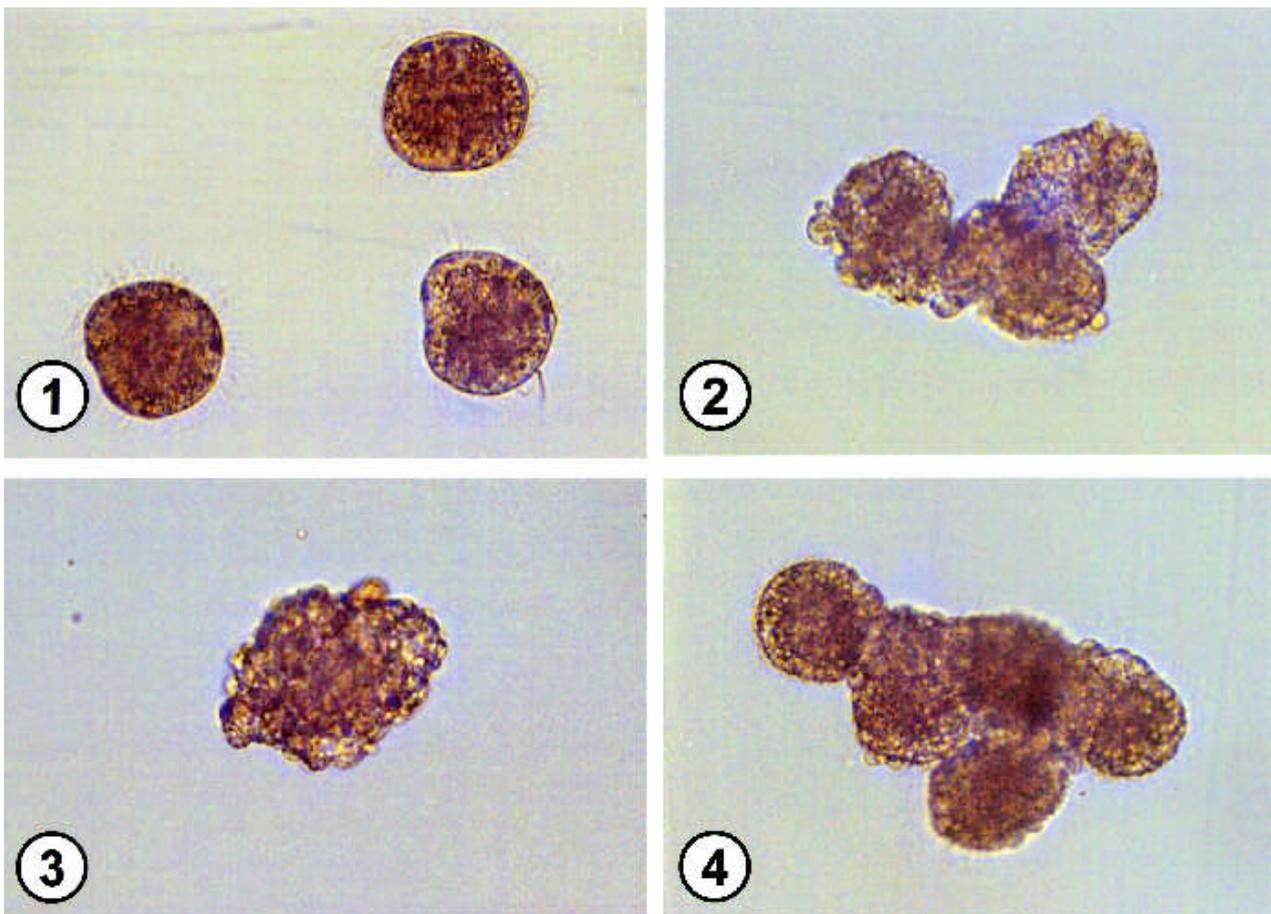


Fig. 57. Effects of *Heterocapsa circularisquama* on trochophore stage of *Mytilus galloprovincialis*. 1: Control individuals. 2-4: Affected individuals, showing cilia crush, notable discharge of the cytoplasm, and mass mucus production. 4: Individual which already lost the motility sometimes aggregated each other.

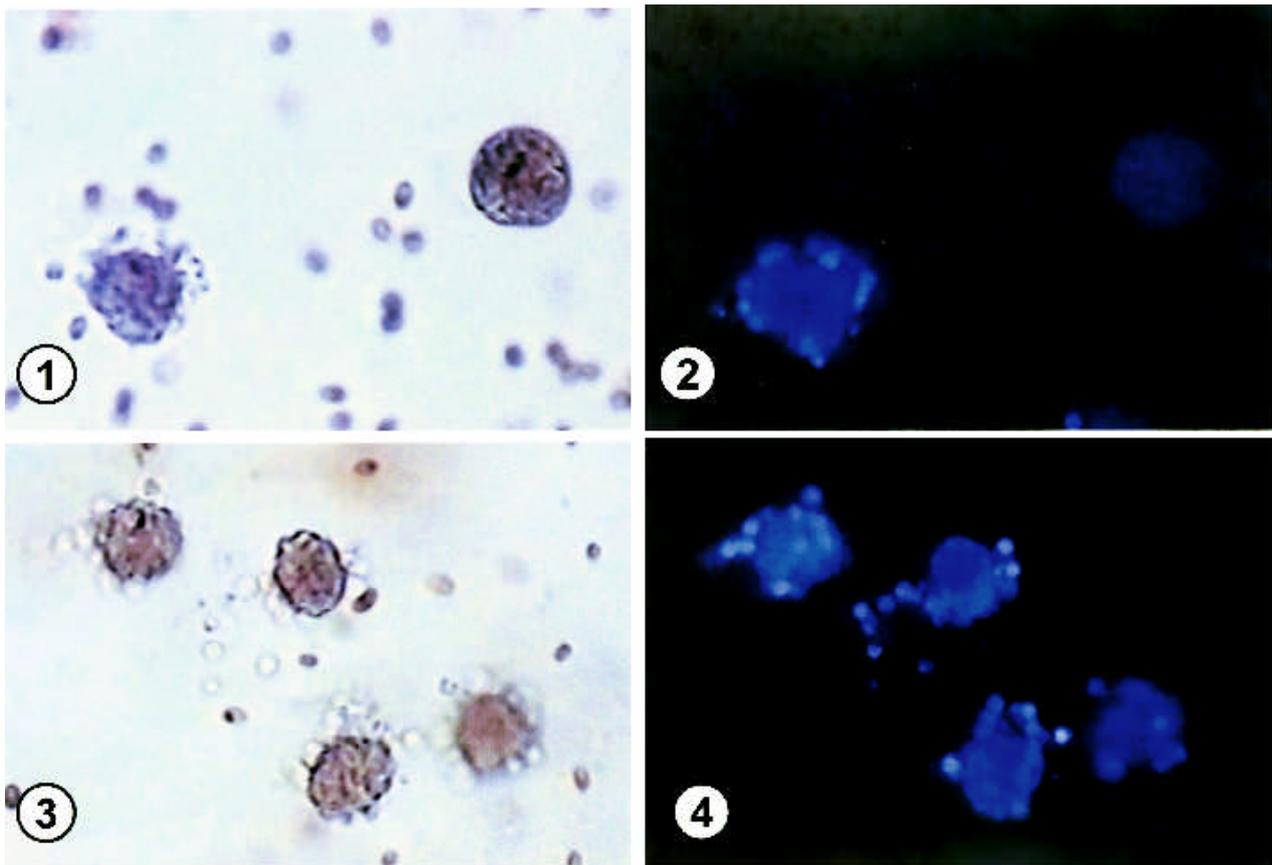
影響を受けた個体の蛍光がいずれも顆粒状に分布していることから、損傷を受け幼生外部に飛び出した細胞破片の部位ほど細胞内カルシウム濃度が著しく増加しているものと判断された。健全な個体ではFura-2 AMによる染色はほとんど認められないこと、損傷を受けた細胞でも細胞の外に突出した顆粒ほどカルシウム濃度が高まっていることから、その由来は海水中などから不可逆的に流入したものであると考えられた。

### 考 察

*H. circularisquama* の暴露によって、未受精卵、胚、トロコフォア幼生のいずれもが致死的作用を受けることが判明した。こうした致死的作用はマガキの場合、*H. circularisquama* の細胞密度が1,000 cells/mL以上、ムラサキガイやアサリでは5,000 cells/mL以上で認められたが、これは成貝や稚貝の急激な斃死が始まる

細胞密度と全く同じであった。まだ消化器官や神経系の組織が未発達な状態においても成貝と同様な致死的作用が見られた。今回の結果は、二枚貝が *H. circularisquama* の細胞を消化吸収し、細胞内に含まれる毒性物質が蓄積して細胞毒性を示すという従来の毒性発現機構とは全く異なることを改めて示している。同様に、*H. circularisquama* の培養ろ過液も、成貝での実験と同様に何らの影響も確認されなかったことから、細胞外に分泌された物質による毒性発現機構も考えられない。前述したように、*H. circularisquama* の毒性は、標的となる生物の組織や細胞に直接接触することで初めて発現すると結論づけられる。これは *H. circularisquama* が他種鞭毛藻に影響を与える時のメカニズム (Uchida *et al.*, 1993; Uchida, 2001) と基本的に同じであると判断される。

今回の実験で注目すべきことは、生物学的に未発達な状態にある未受精卵が *H. circularisquama* との接触



**Fig. 58.** Fluorescent microscopic observations on trochophore stage of *Ruditapes philippinarum* affected by *Heterocapsa circularisquama*. 1: Left individual is affected by *Heterocapsa circularisquama*, showing numerous discharged cytoplasm and mass mucus production. Right individual still remains normal shape (less fluorescence). 2: The same individual under the blue light excitation, stained with intracellular calcium probe Fura-2 AM (final concentration: 1.7  $\mu$ M). 3: Aggregated individuals affected by *Heterocapsa circularisquama*. 4: The same individuals under the blue light excitation, stained with intracellular calcium probe Fura-2 AM.

によって卵外皮 (vitelline envelope) 破壊や細胞崩壊を引き起こされるのに対して、精子は高密度の *H. circularisquama* に暴露されても遊泳率や受精率に何ら影響を受けなかった点である。加えてムラサキイガイでは、受精の時に観察される極体放出現象まで観察された。卵外皮は非常に均一な糖タンパク質によって構成され、受精の際に精子との結合や侵入に重要な役割を演じている (星, 1992)。こうした一連の作用は同一種の精子と卵の間で種特異的に進行する。*H. circularisquama* の暴露により、非常に純粋な糖タンパク質から成る未受精卵外皮を接触によってのみ破壊し、同時に卵の方は受精時に特有な極体放出現象が観察されること、前述でレセプターを有するアカシの筋肉組織を特異的に収縮させることなどを考慮すると、*H. circularisquama* の毒性物質と考えられる糖タンパク質は、二枚貝の細胞表層に含まれると考えられる膜やレセプターを標的とした分解酵素のような物質ではないかと推定される。

多くの軟体動物では、精子が受精する段階で卵外皮に結合し、侵入のために様々な分解酵素を働かせていると言われている。ホヤなどの場合はある種のグリコシダーゼが関与していることが明らかにされているが、*H. circularisquama* によって影響を受ける二枚貝や巻貝の卵に対する精子の外皮分解因子 (vitelline envelope lysin) はこれまでほとんど明らかにされてこなかった。近年、巻貝の一種であるアワビの卵外皮分解因子として高分子のタンパク質が単離され、これが非酵素的に関与していることが明らかとなった (Lewis *et al.*, 1982; Vacquier *et al.*, 1990; Swanson and Vacquier, 1997)。貝類の卵外皮を破壊する *H. circularisquama* の糖タンパク質が、精子が受精する時に関与している高分子のタンパク質 (あるいは酵素) と同じかどうかを現段階では論議できないが、卵外皮を特異的に破壊し、しかも受精のシグナルである極体放出現象まで観察されることから、*H. circularisquama* が受精と同じような機構で貝類に影響を与えている可能性も否定できない。もちろん、卵外皮を破壊させる機構と鰓や心臓組織を崩壊させる機構が同一であるのか否かは今後の課題である。

このように、*H. circularisquama* の細胞表層に存在する糖タンパク質分子は、二枚貝卵、胚、および幼生などの細胞表層に普遍的に含まれる膜やレセプター等の糖タンパク質分子を特異的に攻撃・破壊し、その結果として二枚貝の細胞内に多量のカルシウムイオンが流入することにより、著しい生理傷害を与えている機構が想定される。遊離のカルシウムイオンは動物組織の中には極微量含まれているに過ぎないが、筋肉の収

縮や神経伝達など、生物の生理状態をコントロールするのに重要な役割を果たしており、多量のカルシウムイオンが細胞内に流入すると、これらのコントロール機能が損なわれ、逆に強い細胞毒として働くことが知られている (小島, 1992)。*H. circularisquama* に暴露された二枚貝は心拍異常や心臓停止を引き起こすが (Nagai *et al.*, 1996)、ヒトの場合においても心臓組織内で遊離のカルシウムイオン濃度が異常に増加すると心臓麻痺を引き起こす。このように、細胞や組織内部の異常なカルシウム濃度の増加は急性毒性を引き起こすことがある。二枚貝を使った過去の試験においても、例えば、高密度の *Cochlodinium heterobatum* の細胞に暴露された西洋カキ *Crassostrea virginica* の幼生は、細胞内カルシウムイオン濃度が増加して生残等に悪影響を受けていることが報告されている (Ho and Zubkoff, 1979)。*H. circularisquama* に暴露された際に、細胞表層が破壊され、細胞外から多量のカルシウムイオンが細胞内に流入ような状況におかれると、二枚貝の生理状態は著しく悪化するのは明らかである。成貝で見られる水率の低下、外套膜の収縮、閉殻、clapping、および心拍異常はいずれも筋肉や繊毛のような運動組織に関与している。これら組織でのカルシウムイオンの増加が二次的メッセンジャーとして働き、種々の代謝異常を引き起こしている可能性が示唆される。*H. circularisquama* が存在し続ける限りこうした生理的攪乱が繰り返され、二枚貝は組織や細胞のコントロール機能を失い、最終的に死亡している可能性が考えられた。カルシウムの流入が非特異的な細胞膜の破壊の結果引き起こされるのか、あるいはイオンの能動的な輸送に関わるレセプターやチャンネル部位の特異的破壊によって引き起こされるのかについては必ずしも明らかにすることはできなかったが、先に述べたように卵外皮を特異的に破壊することなどを考慮すると、二枚貝のレセプターなどを特異的に破壊しているものと推察される。

以上、*H. circularisquama* が貝類に与える影響について生化学的および生理学的観点から考察した。これらの結果を取りまとめ、*H. circularisquama* が貝類に対して致死的作用を及ぼす「毒性発現機構」を概観したものが Fig. 59 である。なお、個々の部位における毒性発現機構については、今後も生化学的あるいは分子生物学的な精査を加えて行く必要がある。

## 第6章 *H. circularisquama* 赤潮の被害防止

前節で述べたように、実際の海域で発生した赤潮を除去したり撃退することは膨大な労力と費用を浪費す

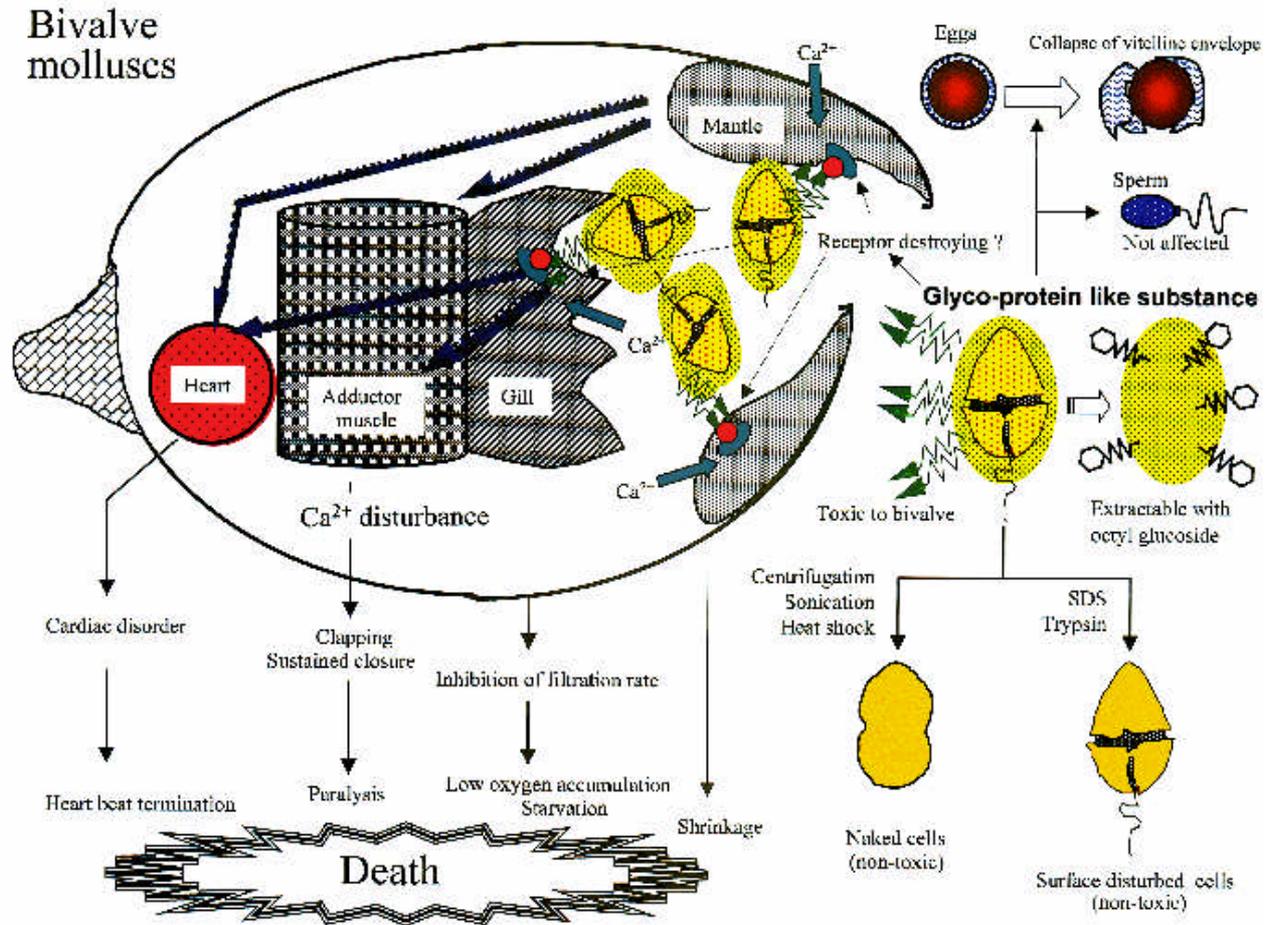


Fig. 59. Schematic diagram of occurrence and mechanism of *Heterocapsa circularisquama* toxicity on the physiology of bivalve molluscs

るだけでなく、場合によっては生態系に悪影響を及ぼす危険性もあるため（例えば、硫酸銅や粘土散布など）、零細な養殖業者に広く受け入れられるような簡便で低コストな手法の確立は困難と言える。従って、*H. circularisquama* の赤潮から漁業被害を防止するには、第1節で述べたような的確な予察体制の整備と迅速かつ効率的な避難を核とした対策が最も望ましい。しかしながら、現実には予察が確実に行われたとしても、魚類養殖などで被害防除策の柱となる「餌止め」は二枚貝には通用しない（元々無給餌養殖であるため）。また筏の移動などの漁場変更も、現在の貝類養殖規模が莫大であるため、すべての養殖貝を赤潮が発生する危険性の低い海域に避難させることさえも、労力的・費用的に困難なことが多い。現実には *H. circularisquama* 赤潮が発生し、なおかつ漁業被害が避けられないことが予め分かっているにもかかわらず、避難などの対策を講じることができないという漁業者もかなり多い。例えば、広大な干潟で地播き式で養殖されているアサリなどは避難そのものが不可能である。この場合の被害低減策は早期

出荷のみであるが、それさえも過剰出荷、品質低下あるいは風評被害などによる売上げ不振と価格下落のため思うような利益を確保することは困難である。

すなわち、*H. circularisquama* の赤潮による漁業被害を防止するには、魚毒性の高い従来種の赤潮生物と異なり、予察より防除の方に軸足を移して対応する必要性が高い。しかしながら、現在の技術水準では、*H. circularisquama* をすべて海域から除去することは非常に困難であることから、直接除去以外の方法によって *H. circularisquama* の毒性を可能な限り低減し、被害を防止する方法が望まれていると言える。現段階では有効な方策は見あたらないが、第4章および5章において、*H. circularisquama* の毒性物質の性状について基礎的な知見が得られていることから、こうした基礎的知見を応用し、将来の技術的進展によって、より現実的な被害防止策の糸口がつかめる可能性も残されている。本項では、種々の物理化学的処理や生理生態学的措置を講ずることにより、*H. circularisquama* 赤潮の防除策開発に繋がる基礎的知見が得られないか様々

な検討を行った。

### 第1節 H. circularisquamaの物理化学的処理による被害防除

#### 第1項 SDS処理によるH. circularisquama毒性低減

現在までのところ、薬剤の散布による赤潮防除法で実際に行われたものとしては、硫酸銅（尾田, 1935）、過酸化水素（村田ら, 1989; 宮崎ら, 1990; 村田ら, 1991）、粘土（Shirota, 1989）などがあり、実験室レベルではアクリルノール（鹿児島県, 1993）、タンパク質凝集剤（丸山ら, 1998）、界面活性剤（Ono *et al.*, 1998）、ミズクラゲ自己溶解液（半田ら, 1998）などが有効であると報告されている。第5章で述べたように、H. circularisquamaの毒性は界面活性剤の一種であるSDSによって著しく失活する。このSDS処理によって二枚貝への傷害を取り除くことができるか検討してみた。

#### 材料および方法

実験には、1994年に英虞湾から分離されたH. circularisquamaのクローン株（HA9401）を用いた。培養には改変SWM3培地を用い、水温22℃、塩分32psu、12hL:12hD、100 μmol photons/m<sup>2</sup>/sの条件下で培養を行い、対数増殖後期の細胞を生物検定に用いた。

まず、ムラサキガイの致死的作用に及ぼすSDSの添加効果を検討した。実験には1995年6月29日に広島湾から採取され、室内でIsochrysis galbanaとSkeletonema costatumを給餌しながら予備飼育された稚貝（4.90 ± 0.58[SD]mm）を用いた。培養されたH. circularisquamaの細胞を、予め曝気されたる過海水（塩分31psu）で最終密度が0~30,000 cells/mLの密度になるように希釈した。40mg/L以上のSDSが存在するとH. circularisquamaの毒性はほとんど失活し、ムラサキガイに摂食されることが第5章の結果から明らかにされている。止水系の暴露試験では細胞密度の変化に対して十分な注意が必要である。今回は実験中のH. circularisquamaの細胞密度がムラサキガイによる摂食によって減少しないよう、SDSの添加濃度を毒性が失われる濃度の十分の一である4 mg/Lに統一して行った。実験には6穴の組織培養用プレート（住友ベークライト社製）に稚貝を1個体ずつ全18個体收容し、これにH. circularisquamaを含む海水を12 mL添加してそのまま22℃で静置した。ろ過海水のみの区を対照区とした。試験海水は一日2回、同じ細胞密度に調整され、SDSを同様に溶解させたものと交換した。試験海水の交換時に貝の生死を判別して集計した。生

死の判別は開殻した状態の個体の外套膜をステンレス製のピンセットで数回強く刺激し、閉殻運動が見られるかどうかで判断した。最初の12時間暴露時に、それぞれの個体の培養器壁面に対する足糸形成の有無についても調べた。

次に、広島湾で実際に発生したH. circularisquamaの赤潮に対してSDSの処理を行い、毒性がどの程度の処理で失活するか検討した。1995年11月に広島湾西部の大野瀬戸で発生した赤潮海水（975 cells/mL）を目合30 μmのナイロンメッシュでろ過して動物プランクトンなどを除去した。この赤潮海水900mLをオムニポアフィルター（孔径10 μm）を装着したろ過器を用いて約9倍に濃縮した（板倉ら, 1990）。濃縮された赤潮海水は500mL容のエルマイヤーフラスコに収容し、22 ± 1℃で一晩静置して遊泳細胞に回復するのを待った。翌日ほとんどのH. circularisquamaが遊泳細胞に回復していることを確認した後、12 mLの赤潮海水を6穴の組織培養用プレートに収容し、これにSDSをそれぞれ10, 20, 30, 40, 50mg/Lになるように添加し、25 ± 1℃で約3時間静置して処理を行った。処理後H. circularisquamaの赤潮海水は、細胞密度が最終的に270 cells/mLになるように、予め曝気を施しかつ無害な鞭毛藻Heterocapsa triquetraを700 cells/mL含んだ海水で希釈して生物検定に供した。なお、毒性はムラサキガイのろ水率を指標として評価した。ろ水率の測定は第4章の方法に準じて行った。生物検定は異なる個体で3回を行い、有意差はt検定で判断した。

#### 結果および考察

H. circularisquamaの細胞密度と生残率の推移をFig. 60に示した。SDSを添加しない実験区では、H. circularisquamaの細胞密度の増加とともに生残率が低下していた。4日間の暴露による生残率は、それぞれ30,000 cells/mLの実験区で0%、10,000 cells/mLの実験区で17%、5,000 cells/mLの実験区で50%、1,000 cells/mLの実験区では89%であった。0および200 cells/mLの実験区で斃死は観察されなかった。SDSを添加した実験区の場合も、H. circularisquamaの細胞密度の増加とともに生残率が低下していたが、それらは未添加区よりも高く、それぞれ30,000 cells/mLの実験区で6%、10,000 cells/mLの実験区で72%、5,000 cells/mLの実験区で83%であった。0~1,000 cells/mLの実験区では斃死は観察されなかった。このように、SDSの添加はムラサキガイの生残率を顕著に向上させる作用があり、10,000 cells/mLの実験区と比較すると生残率の違いは55%にも達していた。Fig. 61に

暴露実験初期に調べた足糸形成率の結果を示す。SDSの作用は足糸の形成率にも影響を及ぼしており、SDS添加区では、未添加区より6~61%も形成率が改善されていた。このことから、低濃度のSDS添加であっても、*H. circularisquama*の致死的作用を改善したり足糸形成率を改善させる働きが認められることが判明した。

次に実際の現場の*H. circularisquama*赤潮に対するSDSの添加効果を調べた結果をFig. 62に示す。まず処理後生物検定試験へ持ち込まれるSDSがムラサキガイのろ水活動に及ぼす影響を調べるために設定したブランク試験では、明瞭なる水率の低下は認められなかった。このブランク試験へ持ち込まれるSDS濃度は、50 mg/Lの処理区から持ち込まれるSDS濃度に相当することから、今回試験した範囲では持ち込まれたSDSによるろ水活動の低下はないものと判断される。図から判断すると、*H. circularisquama*の毒性はSDSによる処理濃度が30mg/Lを越えるあたりから低下し、40mg/L以上では対照区との有意差が見られず、毒性の大半は失活した。この結果は第5章で述べた培養株を用いた試験結果とほぼ一致することから、実際の天然個体群に対してもSDS処理による毒性低減効果が十分に発揮されていると判断された。

赤潮生物は界面活性剤に対して感受性が高いため、これを利用した赤潮防除策がいくつか検討されている(Ono *et al.*, 1998)。今回用いたSDSは、市販の合成洗剤等に広く含まれる成分である。タンパク質をポリペプチド鎖に乖離させる作用があるため、電気泳動などにおける試薬としても使われている。工業的に大量

生産されており、しかも安価であることから、低コストの処理剤としては有望であろう。しかし、SDSは人工合成物のためやや難分解性であり、しかも魚毒性が強い物質で(例えば、富山, 1974)、海洋汚染防止法における指定物質扱いとなっていることから、実際の海域に多量に散布するには環境や生態系の保全の観点から困難である。しかしながら、陸上で養殖貝を一時的に蓄養したりあるいは種苗生産現場で取水海水に混入してくる*H. circularisquama*の毒性を低減する場合や、種苗の移送を行う際の処理剤として限定的に使用する場合は応用可能かもしれない。

## 第2項 遠心力負荷法による*H. circularisquama*の毒性除去

薬剤を用いた赤潮防除法は簡便で必要な時に応じて限定的に使用できるため、材料費と散布方法次第ではコストの面で優れているものの、環境や生態系に対する影響が大きいため、開放系である実際の海域で使用することは困難である。一方、*H. circularisquama*の毒性は二枚貝や巻貝に特有で、魚類養殖業に対しては影響がない。また、*H. circularisquama*が有する二枚貝に対する毒性物質は細胞表面に局在している、これは超音波や遠心分離などの物理的処理を行うと速やかに失活する性質がある(第5章参照)。この細胞表層が攪乱されて毒性が無くなった細胞は貝に順調に摂食されるなど餌料としての効果もある。*H. circularisquama*の場合、赤潮防除対象産業のほとんどが二枚貝養殖業であることを考慮すると、現場の*H. circularisquama*個体群に対して何らかの物理的処理を施して

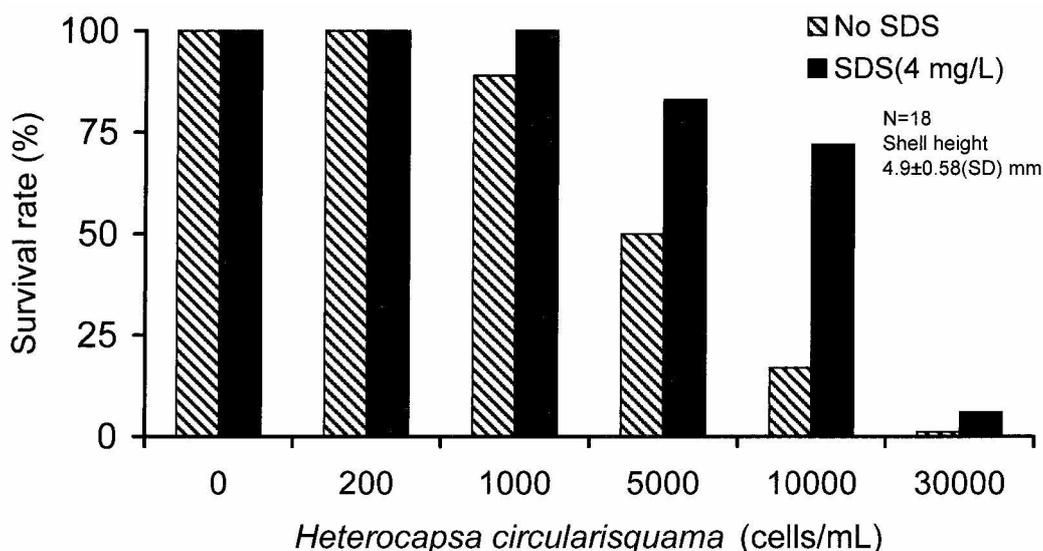


Fig. 60. Effect of SDS addition (final concentration: 4 mg/L) on survival of *Mytilus galloprovincialis* exposed to *Heterocapsa circularisquama*

細胞表層の毒性を失活させれば，処理後の*H. circularisquama*細胞は貝に対して致死的活性を示さず，徐々に貝類に摂食されて減少するであろう。すなわち物理的処理を施されて毒性を失った*H. circularisquama*細胞は，二枚貝にとってただの餌料にしか過ぎない。そこで，多量にしかも効率的に*H. circularisquama*の細胞に対して物理的衝撃を与える手法のひとつとして，遠心力負荷による方法の検討を行った。

材料および方法

実験には，1995年に広島湾から分離された*H. circularisquama*のクローン株を用いた。培養には改変SWM3培地を用い，1L容のガラス製平底フラスコで*H. circularisquama*の大量培養を行った。水温22℃，塩分30psu，12hL: 12hD，100 μmol photons/m<sup>2</sup>/sの

条件下で培養を行い，対数増殖後期の細胞を生物検定に用いた。

今回の実験では，比較的低コストでしかも大量に海水処理を行える点を考慮した結果，ラバル式固相分離法を*H. circularisquama*の毒性低減処理器として応用する方法を検討した。実験には，Fig. 63に示したラバルセパレーター（モデルIL-0050，日本ラバル社製）を用いた。処理装置は，外径61mm，高さ510mmの円筒状容器であり，上部に海水供給用の配管を有し，円筒状容器の蓋部に排出用の配管を有し，底部内部に案内板を有している。円筒状容器の接線方向から海水を供給することにより，海水が円筒状容器の内面にぶつかり，その後円筒状容器の内周面に沿うように流れることにより，海水に遠心力が付与される。遠心力を付与されながら下降した海水は案内板に衝突し，反転して円筒状容器の中央を上昇し，蓋部の排出用の配管から

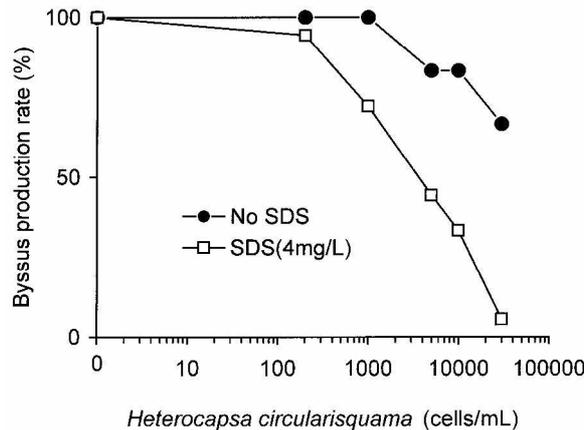


Fig. 61. Effect of SDS addition on byssus production of the mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to various cell densities of *Heterocapsa circularisquama*

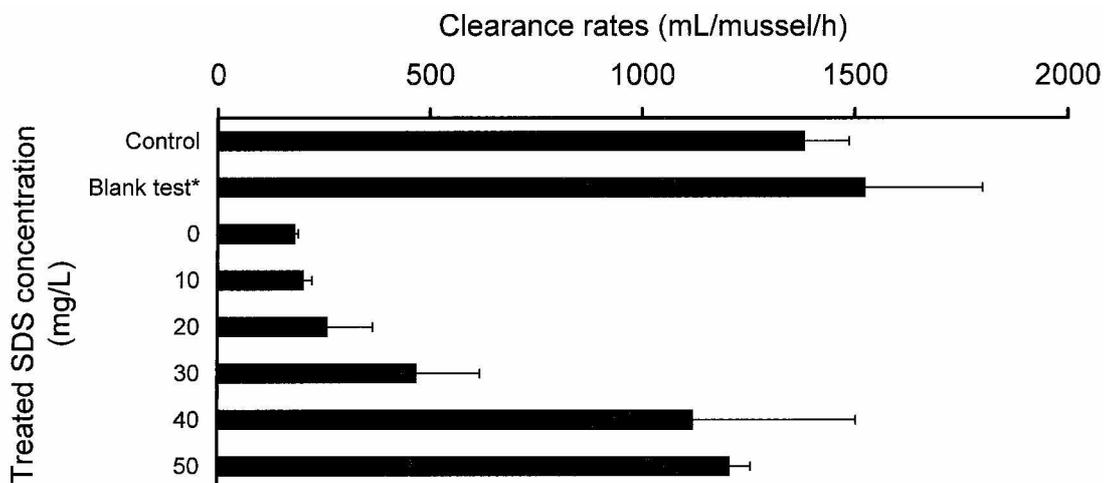


Fig. 62. Effect of SDS treatment on clearance rates of the mussels exposed to natural bloom water of *Heterocapsa circularisquama*. \* Final concentration of SDS was 2.4 mg/L in assay medium.

排出される。

実験は1999年5月に実施した。100 L容のパンライト水槽に砂ろ過された現場海水を注入し、これに *H. circularisquama* を細胞密度が655 cells/mLになるよう調整した。希釈後の容量は95 Lで、実験開始時の水温および塩分はそれぞれ22.7 および31.4psuであった。*H. circularisquama* を含んだ海水をポンプにより、 $0.1\text{m}^3/\text{min}$ の流量で処理器に供給した。供給時の海水にかかる圧力は $2.1\text{kgf}/\text{cm}^2$ で、排出時の圧力は $1.5\text{kgf}/\text{cm}^2$ であり、この装置の圧力損失は $0.6\text{kgf}/\text{cm}^2$ であった。また、流速は $7.1\text{m}/\text{s}$ であり、付与される遠心力は $385 \times g$ であった。処理後の海水は再び水槽に戻るよう設定した。以上の条件下での処理量は $51.6\text{L}/\text{min}$ で、実際の運転時間は3.67minであったことから、海水は処理装置を2回通過した計算となる。

処理後の海水は直ちに顕微鏡下で遊泳細胞と非遊泳

細胞に分けて計数した。なお、ここで言う非遊泳細胞とは、鞭毛と鎧板が剥離して楕円～球形に変化したいわゆる一時性シスト状の細胞のことである。さらに、処理後の細胞の毒性変化を調べるため、そのままムラサキガイ（殻高 $42 \pm 8$  [SD] mm,  $n=6$ ）に暴露し、ろ水率を指標として評価した（第4章第1節に準ずる）。対照区は餌料生物である *Isochrysis galbana* を与えて測定した。

### 結果および考察

Table 15に処理装置通過前と後の遊泳率および毒性の変化を示す。未処理区では遊泳率は80%を越え、ムラサキガイに対するろ水率も対照区の10%まで低下するなど強い毒性を示した。一方、処理装置通過後の遊泳率は0%で、すべての細胞が非遊泳細胞に変化していた (Fig. 64)。

なお、処理前後で細胞密度に変化はなかったことから、*H. circularisquama* の細胞自体はほとんど破裂していなかったと判断される。この処理海水を用いてムラサキガイに対する毒性をろ水率を指標として調べたところ、対照区の95%まで回復しており、ほとんど毒性が消失していた (Table 15)。なお、処理中の水温は $1.8$  上昇していた。塩分やpHは全く変化していなかった。

第5章で超音波や遠沈処理で *H. circularisquama* の毒性が失活することを述べた。今回の処理装置は、流体に回転運動を加えることで遠心力を付加しており、基本的には遠心分離と同様な効果を与えることができる。実際にこの装置で処理を行うことで、*H. circularisquama* を完全に非遊泳細胞に変化させ、同時に毒性も失活させることに成功した。本装置は駆動部が水中ポンプのみで、処理部分への電源供給の必要もなく、しかもより大型の装置（最大処理量 $2,895\text{m}^3/\text{h}$ ）が既に開発されていることから、低コストで多量に赤潮海水を処理することも理論的に可能である。今後処理を行った細胞がどの程度で再び毒性を有するようになるのか、培養細胞と天然細胞で耐性が異なるのか、あるいは珪藻類や動物プランクトンなどに悪影響がないかどうか確認する必要があるが、薬剤に頼らない方法での減毒手法としては有望であると言える。

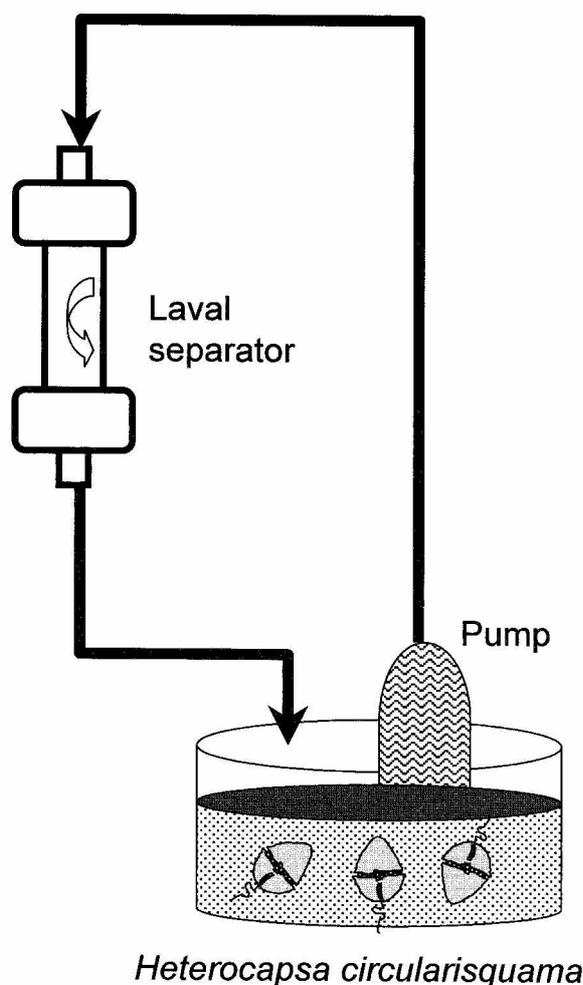


Fig. 63. Flow diagram of laval separator for the detoxification operation of *Heterocapsa circularisquama*

### 第2節 生物学的手法による *H. circularisquama* の制御

前項で薬剤と物理学的手法による *H. circularisquama* の毒性低減方法について検討した。いずれの

**Table 15.** Effects of Raval separator operation on the motility and toxicity of *Heterocapsa circularisquama*

Conditions	Results
Bursted cells (after operation)	15.0%
Inmotile cells (before operation)	12.6%
Inmotile cells (after operation)	99.7%
Clearance rate (control)	558 ± 49mL/mussel/h
Clearance rate (before operation)	37 ± 38mL/mussel/h
Clearance rate (after operation)	529 ± 158mL/mussel/h

**Fig. 64.** Micrograph of *Heterocapsa circularisquama*, treated with Raval separator for 3.67 min.

方法でも *H. circularisquama* の毒性を効果的に低減できるものの、環境保全やコストの面でさらに検討が必要である。ところで、現場における *H. circularisquama* の消長に重要な影響を及ぼしている要因として、珪藻類などの栄養競合者や繊毛虫類などの捕食者が深く関与していることが示唆されていることから、これらは *H. circularisquama* にとって「天敵生物」であるといえる。こうした天敵生物の活動を人為的に手助けすることで、間接的に *H. circularisquama* の増殖を抑制する手法が可能になれば、最も低コストで環境負荷の少ない生態学的防除法が可能になる。最後に珪藻類や捕食者を用いた赤潮防除法の可能性について検討した。

#### 第1項 珪藻類による防除の可能性

珪藻類によって *H. circularisquama* の増殖を抑制する方法としては、直接大量に培養した珪藻を添加する方法と、栄養塩類の添加によって珪藻類の活動を賦活させる間接的手法が考えられる。*H. circularisquama* が赤潮を形成する内湾域は、普段珪藻類が高密度に観察される海域であることから、人為的に珪藻類を添加しなくとも、栄養塩が十分に、しかも継続的に存在す

れば増殖速度の速い珪藻類が繁茂して *H. circularisquama* の増殖を抑制する効果が期待できる。しかしながら、窒素やリンなどの過剰添加は海域の富栄養化を阻止する観点から基本的には望ましくない。今回は珪藻類の増殖を選択的に賦活させるために、珪酸塩を添加する手法を検討してみた。

#### 材料および方法

1998年3月3日に広島湾の枝湾である江田島湾 (Fig. 13) の3.5m深の海水を、バンドーン式採水器を用いて採水し、3時間以内に研究所に持ち帰って実験に用いた。

採水した海水はまず100 μmのナイロンメッシュを通過させて大型の動物プランクトンを除いた。GF/Cでろ過された現場海水160 mLと未ろ過海水40 mLを混合し、ポリカーボネイト製のカルチャーポット (新日本理科社製) に収容した。これに予め改変 f/2-Si 培地 (N = 50 μM, P = 4 μM) で対数増殖後期まで培養された *H. circularisquama* の細胞を40 cells/mLの密度になるよう添加した。そして、1000 μMの珪酸塩溶液を2 mL添加し、水温22 °C, 12hL: 12hD, 100 μmol photons/m<sup>2</sup>/sの条件下で14日間培養を行った。なお、対照区には蒸留水をイオン交換樹脂装置を通過させた超純水を2 mL添加した。培養開始後2日目, 8日目, 11日目途中, 1 mLの海水をピペットで抜き取り、顕微鏡下で珪藻類と *H. circularisquama* の細胞密度を計数した。計数は2回行い、平均値を算出した。実験中の栄養塩濃度の測定は行わなかった。

#### 結果および考察

Fig. 65に培養中の珪藻類と *H. circularisquama* の推移を示す。珪酸塩を添加しなかった実験区では、最初の8日間、珪藻類 (*Eucampia zodiacus*, *Chaetoceros* spp., *Rhizosolenia* spp.) も *H. circularisquama* のいずれも指数級数的に増加したが、11日目以降は珪藻類

の増殖が停止して細胞密度も著しく減少した。しかしながら、*H. circularisquama* はその後も増殖を続け、11日目に2,450 cells/mLまで増加して珪藻類を凌駕した。

一方、珪酸塩を添加した実験区では、珪藻類が指数級数的に増加し、実験開始後8日目で最大6,120 cells/mL (3属の合計細胞密度)にまで達した。その後は増減を繰り返しながら横這い状態になった。しかしながら、*H. circularisquama* は最初の2日間若干増殖が認められたのみで、その後は徐々に減少して、実験終了時にはほとんど消滅した。残存している細胞もほとんどがいわゆる一時性シストであった。

今回の実験結果から、珪酸塩の単独添加区であっても、珪藻類の増殖は著しく賦活され、*H. circularisquama* の増殖を完全に抑制することが判明した。これは、Uchida *et al.* (1996) が珪藻と*H. circularisquama* の2者培養試験で得た結果とほぼ一致する。*H. circularisquama* を含む鞭毛藻は珪酸塩を生長のために必要としないので、これらを海域に添加しても基本的に無害な珪藻が増殖するだけである。珪藻類は魚介類や動物プランクトンの重要な餌料で、海の牧草とも呼ばれている。また、二枚貝類はこれら珪藻類を直接餌料としていることから、海域への珪酸塩の添加は、餌料となる珪藻の繁茂と*H. circularisquama*

*quama* の増殖抑制の2つの効果が期待される。珪酸塩は地殻成分であり、それ自体安価で無尽蔵に存在する。夏期の成層発達などで表中層の栄養塩が枯渇し、珪藻類の個体群が減衰しつつある時期に、主に漁場を中心に珪酸塩を含む溶液や、海水に溶解する「固形ガラス」を投入し、珪藻類の活動を賦活させることで、間接的に*H. circularisquama* の増殖を抑制する効果が期待される。ただし、この方法は珪藻類の増殖が珪酸塩によって制限を受けるような環境でのみ有効であり、*H. circularisquama* が頻発するようなリン制限環境では十分な効果が期待できない。

#### 第2項 捕食者特に付着生物による防除の可能性

*H. circularisquama* の生物学的防除法で、生態学的に調和した方法としては、動物プランクトンや過食性生物などの高次生物の捕食圧を利用することである (Uye and Takamatsu, 1990)。赤潮によって一時的に高まった基礎生産のエネルギーがより高次の生物へと転送されれば海域の高次生産にとっても有用であり、しかも捕食者から無機化されて排出される栄養塩は、後続の珪藻類などに吸収利用されてプランクトン相が元の健全な状態へと急速に回復することが期待される。また、この方法で有れば*H. circularisquama* の死滅による酸素欠乏などの影響も回避できる。Kamiyama *et*

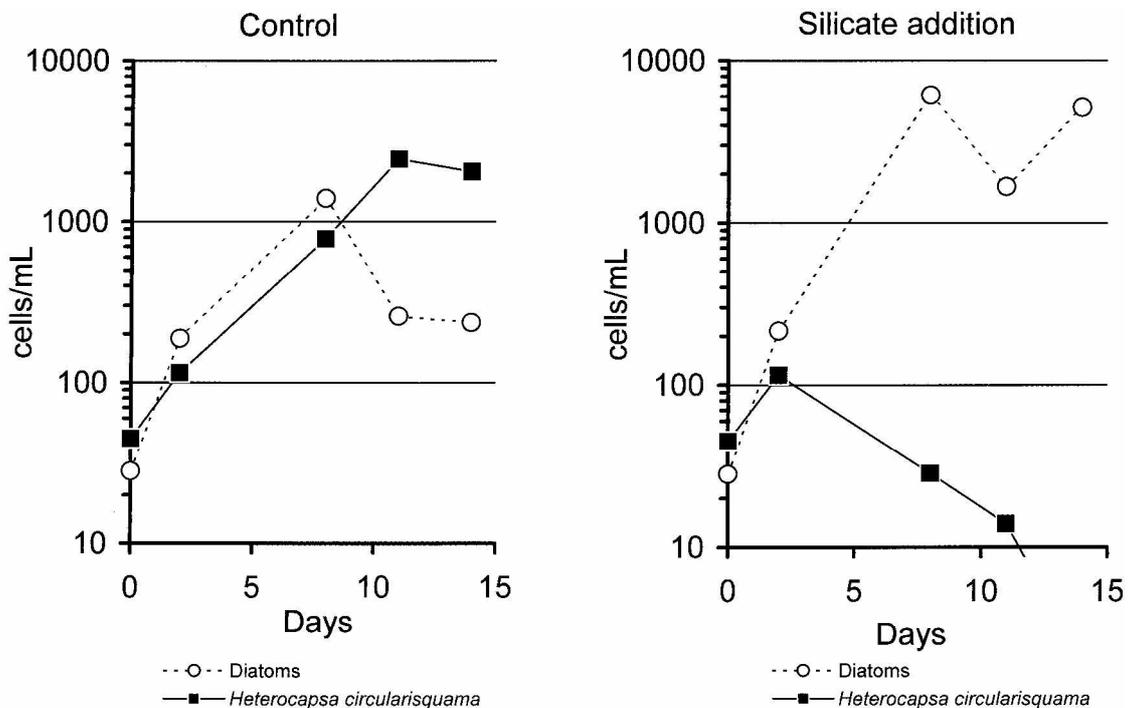


Fig. 65. Effects of silicate conditioning to the diatoms and *Heterocapsa circularisquama* succession in natural waters

al. (2001)あるいは松山(2003)でも述べたように、実際のH. circularisquama赤潮消滅時には繊毛虫や従属栄養性渦鞭毛藻など高次の生物による捕食活動と珪藻類の繁茂が認められている。

一方、これらプランクトンによる捕食活動をより実効あるものとして機能させるためには、赤潮発生前からこれら生物を多量に飼育し、しかも現場海域に多量に投入する必要がある。しかも、一度海域に負荷してしまった捕食者を再び回収することは不可能であり、以後の生態系に与える影響も予測不能である。結局のところ、こうした捕食者を用いた生物学的手法もコストと生態系のバランスという観点で評価すれば、物理学的・化学的防除法同様に大きな課題を抱えていると言える。

ところで、アコヤガイ養殖業者の間では、H. circularisquama赤潮が発生しているときはネットや貝殻表面に付着している付着生物の除去(いわゆる貝掃除)を控えることである程度斃死率を低減させることが可能であると言われている。同様な知見はアサリ業者も指摘しており、漁場でアナアオサ群落の直下に埋もれたアサリは赤潮による被害を受けにくいと言わ

れている。この原因としては、第一義的に付着生物による被覆効果でH. circularisquamaの細胞と貝類が直接接触する頻度が低下するため、生理的傷害を受けにくくなっているためではないかと考えられる。またもう一つの重要な点として、付着生物によるH. circularisquamaの除去効果も十分に考えられる。付着生物の中にはホヤ、フジツボ、ヒドロ虫、コケムシなどのろ過食性動物も多く、これらがH. circularisquamaを捕食している可能性もある。そこで、H. circularisquama頻発地帯の養殖漁場に普遍的に存在する付着生物(Fig. 66)の中でも、大型でろ水速度が大きいと考えられる生物であるホヤについて検討することとした。

#### 材料および方法

実験には取り扱いの容易さを考慮し、単体ホヤの一種であるエボヤ*Styela clava*(Fig. 67)を用いて試験を行った。瀬戸内海区水産研究所の浮き桟橋でロープに付着しているエボヤ( $1.73 \pm 0.35\text{g}$ , 体腔内の海水を吐き出して収縮した状態の重量)を付着基部からナイ

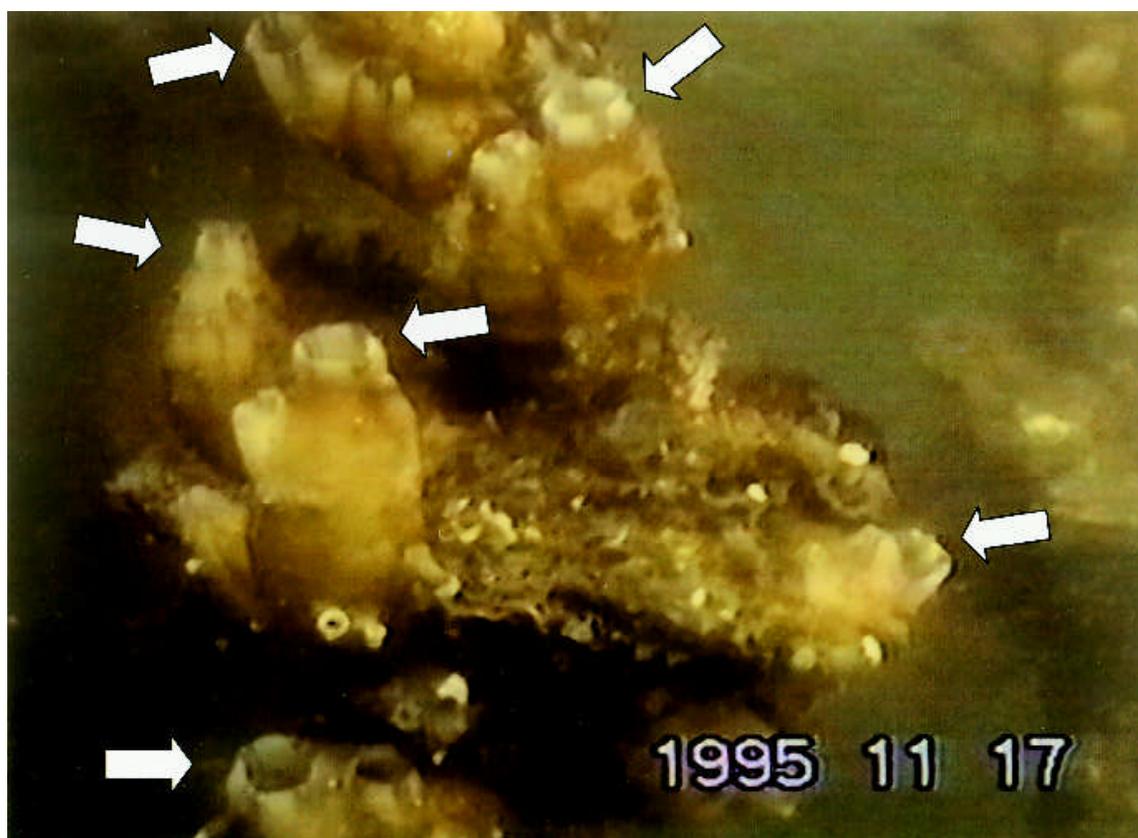


Fig. 66. Solitary ascidian *Styela plicata* (arrows) which attached on oyster assemblages in Station 1 (2m depth), on 17 November, 1995. Siphones were being opened in *H. circularisquama* red tide.



Fig. 67. Solitary ascidian *Styela clava* used in the feeding experiments

フを使って静かに切り落とし、実験室で *Skeletonema costatum* を給餌しながら1週間飼育し、馴致させた。このエボヤにそれぞれの細胞密度に調製された *H. circularisquama* の細胞を添加し、前述の方法に従ってろ水率を測定した。

実験に用いた *H. circularisquama* は、1994年に英虞湾から分離されたクローン株 (HA9401) である。培養には改変SWM3培地を用い、1L容のガラス製平底フラスコで *H. circularisquama* の大量培養を行った。水温22℃、塩分30psu、12hL: 12hD、100  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  の条件下で培養を行い、対数増殖後期の細胞を生物検定に用いた。

比較のため、それぞれの細胞密度でのアコヤガイとマガキのろ水率も併せて整理した。比較に用いたデータは第4章で示したものを参照した。

#### 結果および考察

Fig. 68に *H. circularisquama* の初期細胞密度とエボヤ、アコヤガイ、マガキのろ水率の関係を示した。第4章でも示したように、アコヤガイは100 cells/mL以上で、マガキは10 cells/mL以上でほとんどろ水活動を停止する。しかしながらエボヤは500 cells/mLまでは正常と変わりなくろ水活動を行っており、1,000 cells/mLでようやく対照区の50%、2,000~5,000 cells/mLで10~20%程度まで低下した。1,000 cells/mL以上ではアサリで見られるように、出水口を閉じて入水口から勢いよく海水を逆流させるvomiting現象が観察された。

エボヤにおいても *H. circularisquama* の高密度暴露区ではろ水率の低下が認められたものの、赤潮密度である1,000 cells/mLにおいてもかなりのろ水活動を行っていた。1個体当たりの捕食率 (Feeding rate) で見た場合、海中からの *H. circularisquama* の除去能力は500~5,000 cells/mLの範囲においてほぼ一定の値を示していた (Fig. 69)。また、20,000 cells/mLの高密度暴露では激しいvomitingが観察されるものの、5日

間は斃死等は全く観察されず、非常に少ない割合ではあるものの *H. circularisquama* の細胞も捕食されていた (松山, 未発表)。このことから、エボヤは二枚貝などと異なり、赤潮状態においても *H. circularisquama* を除去する能力が十分にあると判断された。今回実験に用いたのはエボヤであるが、*H. circularisquama* 赤潮発生後にはエボヤだけでなくシロボヤなども多量に繁殖していることから、複数の種類が *H. circularisquama* を除去する能力があると期待される。

今回用いたエボヤのサイズは比較的小さかったが、体長5~8cm程度の個体のろ水率は1,000mL/individual/hを越えており、これは同じサイズのムラサキガイやマガキに匹敵するろ水率であった。このことから、ホヤ類の捕食活動による *H. circularisquama* 細胞の潜在的除去能力は高いと考えられる。ただし、ホヤは普段は養殖二枚貝と付着基質や餌料を巡る競合関係にあるため、常時多量に蓄養しておくことと養殖活動に悪影響を及ぼす危険性もある。従って、ロープやネットなどに予め粗放的に付着させておいた個体を養殖場とは離れた海域で蓄養しておき、赤潮発生時にのみ筏周辺を取り囲んで *H. circularisquama* を捕食させるという手法が現実的であると考えられる。そのためには、ホヤの浮遊幼生の発生期を捉えることと、ロープなど付着趨向性のある基質の改良等の基礎的な知見を蓄えておく必要がある。

ろ過食性付着生物を利用した赤潮防除に関してはShirota (1989)に提案があり、ろ水量の多い二枚貝等の有効性が示唆されている。また鬼塚ら (2002) は過栄養化した洞海湾の浄化にムラサキガイ養殖が有効であると述べている。ただし、これらの提案では、赤潮生物が二枚貝に順調に摂食されるという前提での発想であり、*H. circularisquama* のように低密度でろ水活動を低下させるような赤潮生物には当然効果がない。Matsuyama *et al.* (1998a) で述べたように、*Karenia mikimotoi* も二枚貝のろ水活動を顕著に低下させる。このほかにも、ムラサキガイを使った室内試験では、*Alexandrium tamarense* (Matsuyama and Uchida, 1997)、*A. catenella*、*Prorocentrum dentatum*、*Gymnodinium instriatum*などの渦鞭毛藻がムラサキガイのろ水活動を著しく妨げ、*Chattonella antiqua* はろ水活動は妨げないが取り込まれた細胞のほとんどすべてが偽糞として排出される (松山, 未発表)。従って、二枚貝を使った有害赤潮生物の防除は *Heterosigma akashiwo* など貝類に悪影響を及ぼさない一部の種類を除いてあまり期待が持てない。生態学観点から見ると、赤潮生物は高次の生物の捕食を阻害する作用を獲得することで、赤潮の密度にまで増殖す

る能力を獲得できているのかもしれない (Uye and Takamatsu, 1990)。

いわゆる生物学的な赤潮防除策としては、バクテリアやウイルスなどの微生物を使った方法が既に検討されている (石田, 1994; 長崎, 1998; 今井, 1999; Doucette *et al.*, 1998; 山口, 2003)。この方法は、使用するバクテリアの種類を十分に検討すれば、赤潮生物を効果的かつ特異性の高い手法で、しかも低コストで殺藻できるという利点がある (石田, 1994; 長崎, 1998; 今井, 1999; 山口, 2003)。実際に現場海域におけ

る赤潮生物の消滅あるいは種交代現象時には、これら微生物群が活発に活動しているという (Yoshinaga *et al.*, 1995; Fukami *et al.*, 1996; Tarutani *et al.*, 2000)。現在までのところ、*H. circularisquama*の赤潮海中には、本種を特異的に殺藻するバクテリアはほとんど出現しておらず (今井ら, 1998)、*H. circularisquama*自身も殺藻性バクテリアに対する耐性が高いことが室内実験の結果から示唆されている (今井ら, 1998; 長崎, 1999)。しかしながら、最近*H. circularisquama*を特異的に殺滅するウイルスが分離・

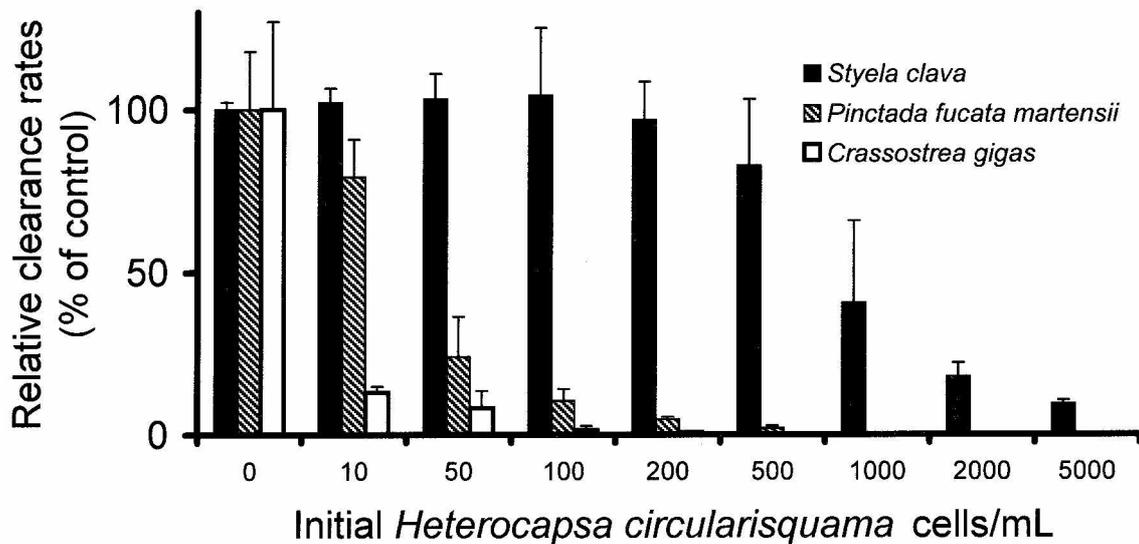


Fig. 68. Changes of the relative clearance rates of three filter-feeders exposed to various cell densities of *Heterocapsa circularisquama*

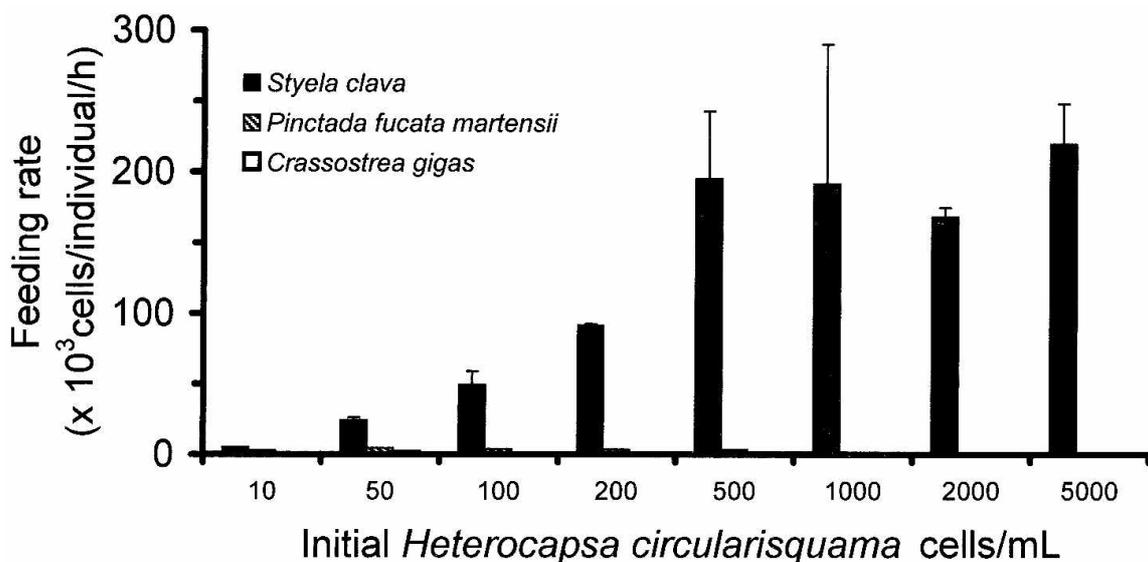


Fig. 69. Changes of feeding rates of three filter-feeders exposed to various cell densities of *Heterocapsa circularisquama*

同定されたことから (Tarutani *et al.*, 2001), ウィルスを利用した防除技術開発も想定される (Nagasaki, 2001)。また特異性は低いが *H. circularisquama* に対する殺藻性の高いバクテリアの存在も知られている (今井ら, 1998; 長崎, 1999; Kitaguchi *et al.*, 2001)。

一方で、赤潮による漁業被害をなくすために、高密度に増殖した赤潮生物そのものを一度に死滅させるということは、逆に漁業被害を増長させる危険性を抱えている。例えば、微生物群によって赤潮が一度に壊死・分解する段階では水中の酸素を多量に消費するだけでなく、アンモニアや硫化水素など水産生物にとって有毒な物質 (Theede *et al.*, 1969) も産生されるため、これらによる二次被害が懸念される。実際に、過去の赤潮による漁業被害の中でも、消滅期の貧酸素化、硫化水素やアンモニアの発生は、水産生物に対して壊滅的な被害を引き起こしている (西川, 1901; 塩川ら, 1966; 小泉ら, 1996)。バクテリアを利用すると比較的容易に赤潮生物の殺藻が可能であるが、赤潮生物が死滅すると今度はカビなど他の微生物が異常に繁殖して水質が変化し、これが魚類に悪影響を及ぼすこともあるという (Marshall, 私信)。さらには、植物プランクトンに対する殺藻性の高いバクテリアが他の有用水産生物に影響を及ぼす可能性も否定できない。しかしながら、バクテリアやウィルスの「不可逆的」な散布を基本とする微生物学的防除法は、殺藻効果を追求するあまり環境に対する二次的な影響について十分な配慮がなされているとは言えない。赤潮防除の要諦は漁業被害を防止することであり、その過程で赤潮生物を殺藻することは必ずしも必須の要件ではない。例えば、魚毒性の高い赤潮生物が発生した場合、「餌止め」を行って漁業被害を軽減させることが可能であるが、この場合赤潮生物に対して何ら物理化学的なアクションを行うことはなく、環境に対する悪影響も全く無い。

現在の技術水準において、微生物学的防除法の効果を最大限に発揮し、しかも二次的な被害を抑えるためには、赤潮の密度になる前に目的の微生物を必要最小限散布する必要がある。そのためには、現場でのモニタリングと赤潮予察という人的・経済的なコストのかかる手法に基づいて適切な処置を施すことが必要不可欠となり、これでは微生物学的防除法の最大の謳い文句である低労力・低コストな防除法の確立という観点 (石田, 1994; 長崎, 1998; 今井, 1999; Doucette *et al.*, 1998; 山口, 2003) からは大きく逸脱してしまう。いずれにしても、薬剤や微生物などの不可逆的な散布に頼った方法は、殺藻効果を追求するだけではむしろ漁業被害を増長させる危険性も含んでおり、再検討の必要性

がある。少なくとも実施に当たってはリスクとベネフィットを総合的に加味した危機管理 (リスクマネージメント) を確立しておく必要がある。

赤潮生物を死滅させることなく、捕食者を通じてより高次の生物へエネルギーを転送したり、これらの排泄活動によって無機化された栄養塩を再び珪藻類が利用して増殖することができれば、被害防除だけでなく海域の生態系保持や環境保全の観点からも最も望ましい。ホヤなど大型のろ過食性付着生物を使った防除法は、捕食者を人為的に回収できるという点で生物学的防除法の中でも優れた方法であろう。

### 第3節 *H. circularisquama* に対する耐性獲得能

これまで、*H. circularisquama* を物理化学的手法で処理したり、薬剤、競合者、捕食者などを使って制御することで、漁業被害を回避する手法を検討した。これらはある一定条件下におかれた実験室レベルでは十分な効果を発揮することが確認された。これら手法を実際の海域に応用するためには、いかにして大量かつ効率的に、しかも低コストで処理を行うかといった実用化に向けた技術開発が将来の課題になる。

最後に、環境への負荷を全くかけることなく *H. circularisquama* による漁業被害を低減する手法として、*H. circularisquama* による影響を受けにくい養殖貝育種の可能性について検討した。

*H. circularisquama* に暴露された二枚貝は、*H. circularisquama* を捕食・消化・吸収することなく、ただちに外套膜の収縮、閉殻、噴水活動 (vomiting) などの異常反応を示す。こうした貝の異常反応は、通常貝の体内に何らかの異物や有害な物質が侵入したり、著しい環境変化 (例えば、水温や塩分濃度の急激な昇降等) に遭遇した時に普遍的に認められるものである。こうした反応は *H. circularisquama* が 50~200 cells/mL といった低密度の存在であっても観察され、しかも、無害な他種微細藻類に *H. circularisquama* を混在させても引き起こされる。このことは、二枚貝がろ水活動中に餌料に紛れて殻内に侵入してくる *H. circularisquama* によって何らかの害作用を受けるか、もしくは選択的に *H. circularisquama* を異物として認知し、これを積極的に排除しようとして拒否反応を引き起こしているものと想定される。

ところで、外部環境からもたらされる微細な粒子に暴露されるだけで、全身の組織において異常な反応が瞬間的・連鎖的に引き起こされる症状を、我々人間において観察される症例にたとえると、アレルギーや花粉症で見られる作用に一見よく似ている。このアレ

ギーや花粉症の治療で一定の効果が認められるものの一つに、減感作（脱感作）治療法というのがある。これは、宿主側に対し、拒否反応を引き起こす原因物質（抗原）を低密度で投与もしくは暴露することで、ある種の「慣れ」を誘導したり「免疫亢進」を減衰させるなど、異常な抗体の産生やアレルギー作用を誘発させる物質の放出を抑制することで、症状を軽減しようという治療法である。また、魚病の分野では、病原微生物を抗原としたワクチン投与によって養殖魚に耐病性を付加する免疫的手法が実際に行われている（例えば、佐古，1998）。

第4章で示したH. circularisquamaによる暴露実験において、高密度暴露区（10,000 cells/mL以上）ではほとんどの貝が数日から1週間以内に斃死するものの、1,000～5,000 cells/mLでは最初に急激な斃死が起きた後、徐々に斃死個体数が横這いになる現象が伺える。実験に用いた貝はいずれも1ヵ月以上同じ条件下で予備培養を行われたもので、実験開始時の生理的な個体差は少ないと思われる。それにも拘わらず、一部の貝はH. circularisquamaに対して耐性を有していることから、先天的あるいは後天的な理由で貝がH. circularisquamaの暴露に対して耐性を獲得しうることが期待される。実際の現場でも、大規模な赤潮において斃死率が90%を越えても、必ず数%の個体は生残していることが多い（Nagai et al., 2000および第3章参照）。こうしたH. circularisquamaに対する耐性が強い個体を選抜育種したり、あるいはH. circularisquamaに対する耐性を有する遺伝子群を特定することで、H. circularisquamaに影響を受けにくい貝を作出する可能性も十分にある。本項では、H. circularisquamaに対するムラサキガイの後天的な耐性獲得能について検討した。

#### 材料および方法

実験には、1994年に英虞湾から分離されたH. circularisquamaのクローン株（HA9402）を用いた。培養には改変SWM3培地を用い、水温22℃、塩分32psu、12hL: 12hD、100  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/sの条件下で培養を行い、対数増殖後期の細胞を給餌および暴露実験に用いた。給餌試験に用いたIsochrysis galbanaも同様な方法で培養したものを使用した。

1995年8月に広島湾で採捕したムラサキガイ稚貝（殻高4.8±0.4mm）100個体を、900mLの海水が入ったプラスチック製容器に収容し、曝気（2.2 L/min）を施しながら飼育試験を行った。給餌は、1日2～3回、80,000 cells/mLの細胞密度のI. galbanaを含む海水

（塩分33psu）と換水することで行った。減感作処理は次のような手法に準じて行った。

換水時にH. circularisquamaをろ水活動を著しく阻害しない範囲で添加した。初日は50 cells/mLの密度で投与し、その後2日目に100 cells/mL、6日目に200 cells/mL、8日目に280 cells/mLと徐々に細胞密度を上昇させ、実験終了時の40日目には470 cells/mLまで密度を上昇させた（Fig. 70）。途中給餌を行わない期間があったので、実際の給餌期間は36日間となる。H. circularisquamaの細胞密度が50～320 cells/mLまでは、投与直後に外套膜の萎縮などの拒否反応が見られたが、次の換水時までには投与したI. galbanaおよびH. circularisquamaの半分以上が貝に摂餌されていた。H. circularisquamaの細胞密度が380 cells/mLを越えた22日目以降は若干水活動が低下したものの、それでも換水時までには最初に与えたH. circularisquamaの85%以上がムラサキガイによって摂食されていた。第4章で示したように、ムラサキガイはH. circularisquamaの細胞密度が50 cells/mL以上でろ水活動を低下させ、200 cells/mLを超えればほぼ停止することが分かっている。給餌中の細胞密度は明らかにろ水活動を超える密度に達していたが、かなりの割合の細胞がムラサキガイに取り込まれていた。この理由は、曝気による攪拌でH. circularisquamaの細胞表面が徐々にかく乱され、毒性を少しずつ失ったからだと判断される。対照区は、Isochrysis galbanaを含む海水に無害なHeterocapsa triquetraを初日から500 cells/mLの密度で投与し続けた。

実験終了後、ただちに暴露実験に取りかかった。実験方法は第4章に準じ、1個体ずつ6穴のマイクロプレートに収容し、0～10,000 cells/mLの濃度に調製したH. circularisquamaを含む試験海水12mLを加え、24℃で静置した。試験海水は毎日同様の細胞密度に調製されたものと交換し、5日間暴露実験を行った。試験海水の交換時に貝の生死を判別して集計した。生死の判別は開殻した状態の個体の外套膜をステンレス製のピンセットで数回強く刺激し、閉殻運動が見られるかどうかで判断した。また、暴露開始10時間後に、足糸形成の有無についても確認した。

#### 結果および考察

給餌試験中の累計斃死個体数は、対照区で4個体（斃死率4%）、減感作試験区で2個体（斃死率2%）であった。いずれの斃死個体も飼育開始後7日目以内に集中しており、それ以後は全く斃死が観察されなかった。予備飼育中の斃死は、元々天然個体の中に疲弊し

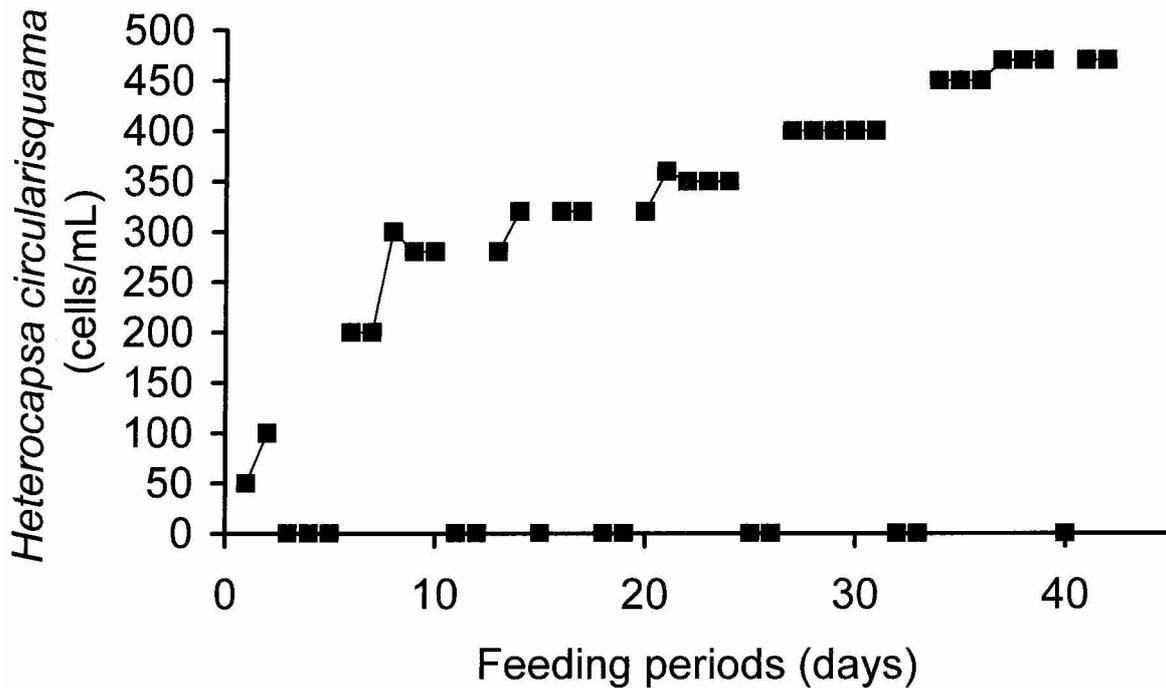


Fig. 70. Step-wise desensitization therapy on *Mytilus galloprovincialis* spat feeding *Heterocapsa circularisquama*

た個体が含まれていたためと推察される。

Fig. 71に予備飼育期間を経て暴露実験を行ったムラサキガイの細胞密度と生残率の関係を示した。10,000 cells/mLの高密度暴露区ではいずれの実験区でも実験開始後2日目以降から斃死が見られ始めた。対照区における、ムラサキガイの生残率は細胞密度の増加とともに低下しており、実験終了時の生残率は10,000 cells/mLで6%、5,000 cells/mLで39%、1,000 cells/mLで89%であった。Fig. 72に同じ実験区のムラサキガイの足糸形成率を示す。足糸の形成率は細胞密度の増加とともに低下しており、5,000 cells/mLで28%、10,000 cells/mLで11%に留まっていた（対照区で96%）。

一方、減感作区におけるムラサキガイの生残率は5,000 cells/mL以下では100%であった。10,000 cells/mLの暴露において、実験終了時の生残率が61%まで低下していたが、対照区と同じ暴露細胞密度と比較すると55%も高い生残率であった。足糸の形成率も対照区と比較すると高く、5,000 cells/mLで89%、10,000 cells/mLで78%にも達していた。減感作区の個体は、斃死率や足糸形成率以外でも明らかな違いが見られた。対照区では、すべての実験区で排糞活動は認められなかったが、減感作区では5,000 cells/mLの暴露においても排糞活動が見られた。暴露中の細胞密度も対照区と比較すると約20~30%減少しており、明らかに*H. circularisquama*を摂食していた。

アコヤガイなどの養殖においては、成長や真珠層の形成が良好な個体を選抜育種し、養殖用の種苗を大量生産する技術が既に幅広く取り入れられている（和田, 1984）。また、病気に感染した個体の中から生残した個体を選抜育種することにより、耐病性の高い個体を作成することも可能であるという（Farley *et al.*, 1995）。このように、本来宿主生物が有している優良な生理的特性を、選抜育種という形で強化する方法は二枚貝養殖業では一般的に行われている。

二枚貝の免疫系は脊椎動物とは根本的に異なるので、今回ムラサキガイが*H. circularisquama*の暴露に対してどのような機構で一定の耐性能を獲得したのか不明である。しかし、少なくとも減感作操作によって生残率を最大で50%以上向上できたことだけは事実である。このことは、*H. circularisquama*の暴露による二枚貝の斃死が、*H. circularisquama*の有する毒性物質の作用のみで成立しているのではなく、暴露された二枚貝側の生理的な応答も大きく影響していることを示すもので興味深い。第4章で示したように、同じ細胞密度での暴露であっても、二枚貝の種類によって生残率に及ぼす影響が異なった理由も、こうした貝類側の生理応答が種ごとに異なるためであると推察される。

今回の実験結果は、*H. circularisquama*に対する耐性の強さが異なる個体群で得られたものであり、先天的に*H. circularisquama*に対する耐性が強い個体に対

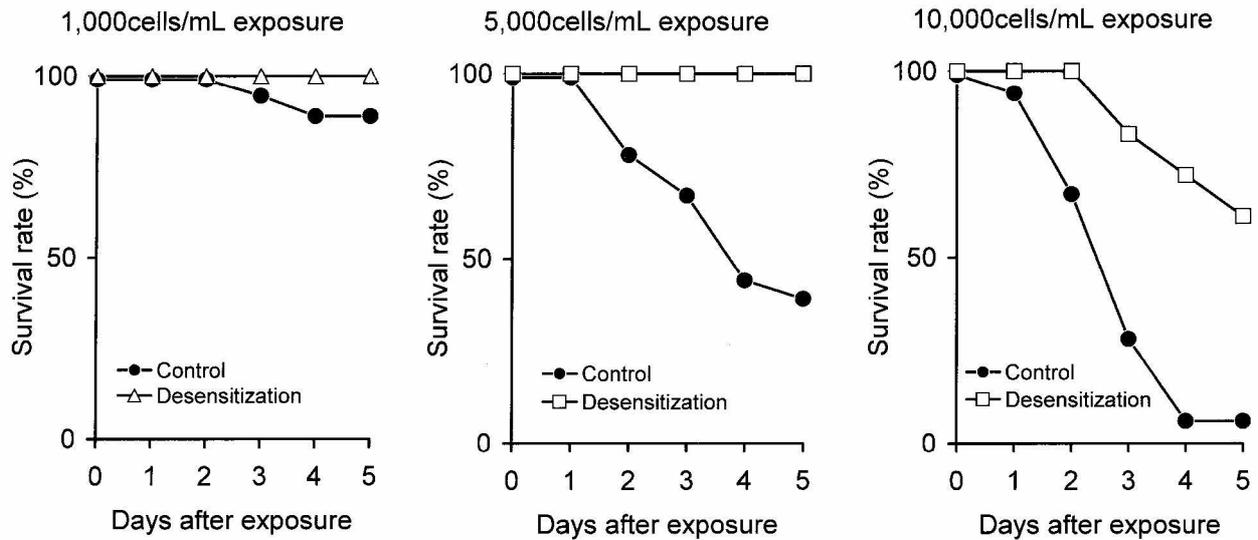


Fig. 71. Effect of desensitization therapy on survival of *Mytilus galloprovincialis* exposed to *Heterocapsa circularisquama*

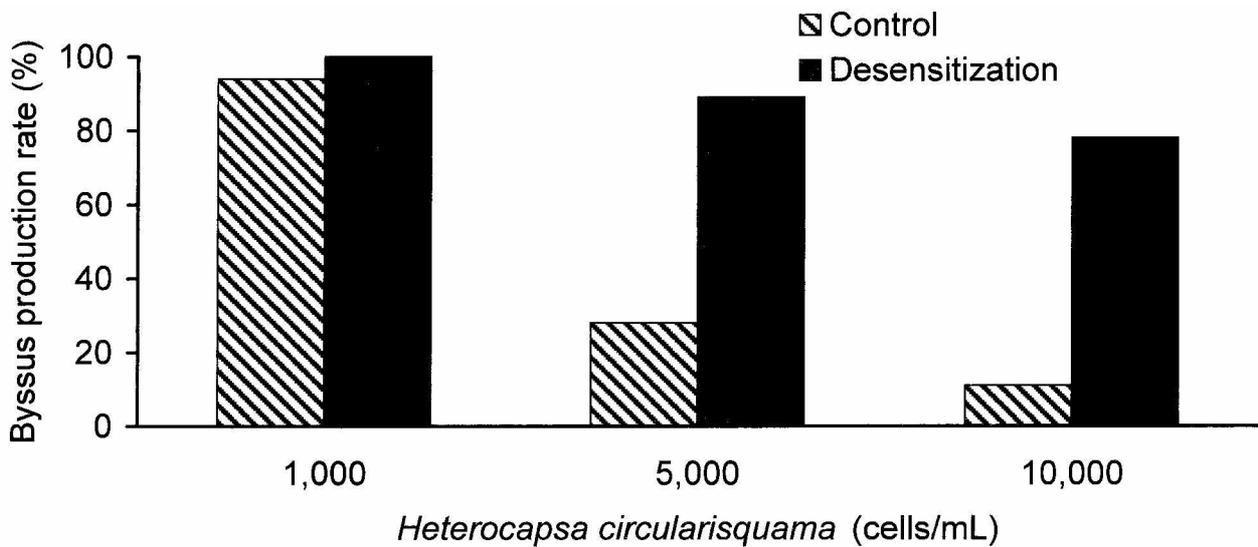


Fig. 72. Effect of desensitization therapy on byssus production rate of *Mytilus galloprovincialis* exposed to *Heterocapsa circularisquama*

してさらに減感作操作を行うと、もっと生残率を向上させる可能性もある。こうした宿主生物側が本来有する耐性を、選抜育種や遺伝子操作などによってより高めることができれば、*H. circularisquama*の赤潮による被害を受けにくい養殖貝の作出が可能になるかもしれない。

総 括

渦鞭毛藻*Heterocapsa circularisquama* Horiguchiは、1988年以降西日本各地で赤潮を形成し、二枚貝養

殖業に対して甚大な漁業被害を及ぼす有害種として知られてきた。被害額は、判明しているものだけでも累計で100億円以上に及ぶ。このため、本種による赤潮の発生機構及び二枚貝等有用水産生物に対する毒性発現機構の解明などが切に望まれていた。しかし、飛び火的にしかも散発的に発生する*H. circularisquama*赤潮について系統だった調査研究は少なく、また水産生物に対する毒性発現機構については全く未解明であったため、赤潮発生による被害防止策の開発が立ち遅れた状況にあった。本論文は上述の問題点を解明するため、現場海域における赤潮の観測結果とともに、被害を受

けた二枚貝の斃死状況を詳細に解析し、室内培養株を用いた毒性試験結果と比較検討することで、二枚貝の斃死原因を特定した。また同時に、毒性物質の生化学的性状や影響を受ける二枚貝の組織生理学変化について明らかにし、被害防除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。その主な内容は次の通りである。

*H. circularisquama* によって被害を受けた二枚貝の疫学的調査や培養株を用いた毒性試験を実施した結果、本種は二枚貝や巻貝といった一部の海産無脊椎動物に強い致死的作用を示すと同時に、繊毛虫、ホヤ、クラゲおよび他種渦鞭毛藻などの微生物群にも毒性を示すことが明らかとなった。これらの作用は *H. circularisquama* の細胞密度に強く依存し、例えば二枚貝の場合、ろ水率の低下は20~100 cells/mLあたりから、斃死は5,000~10,000 cells/mLあたりから指数級数的に始まる。本種により影響を受ける生物は主にfilter-feederなどのプランクトンに対する食性を示す生物が中心であることから、*H. circularisquama* の毒性は高次の生物による摂食圧を逃れたり、栄養競合者を排除したりするために、このような機構を発達させたのではないかと考えられる。

*H. circularisquama* のムラサキイガイに対する致死活性は水温、塩分、栄養塩濃度といった環境要因によって大きく影響を受ける。最も毒性が高まる組み合わせは高水温、高塩分、リン欠乏環境下であり、逆に低水温、低塩分、窒素欠乏環境下で毒性は著しく低下する。*H. circularisquama* の細胞あたりの毒性は非常に変動しやすいものの、通常モニタリングにおける環境項目の測定結果から毒性をある程度推定することが可能となった。また、同じ実験条件下でも、*H. circularisquama* が分離された海域によって毒性は大きく異なることから、弱毒・強毒個体群の存在が示唆された。

*H. circularisquama* の二枚貝に対する毒性物質は細胞表層に局在し、これらは遠心分離の過程で細胞外に容易に放出されずみやかに失活する。従って、原因物質を直接分離精製し、生化学的な性状を明らかにすることはできなかったが、各種薬剤処理によって間接的に推測した結果、原因物質は糖タンパク質様物質に由来すると考えられた。*H. circularisquama* によって影響を受けた貝類組織は外套膜や閉殻筋の異常な収縮、鰓繊毛組織の崩壊、心筋梗塞などの強い傷害を受けている。ただし、異常な症状が頻繁に観察される筋組織も、摘出された状態では直接影響を受けないことから、二枚貝の神経伝達系を強く支配しているモノアミン類の関与は低かった。一方で、アカニシ由来の筋肉に対して強く影響を及ぼすこと、未受精卵の卵外皮を特異

的に崩壊させること、幼生などでは影響を受けた部位がカルシウム感受性試薬存在下で強い蛍光を発することから、*H. circularisquama* は貝類組織の表層に存在するある種のレセプターや膜チャンネルを特異的に崩壊させ、これにより体内のカルシウムイオンのバランスが著しく攪乱され、結果的に死に至っているものと推察された。

*H. circularisquama* の発生海域は冬期水温が10~12.5 を上回る閉鎖性内湾に限られ、赤潮は概ね23以上で頻発し、15 以下では赤潮を形成できない(松山, 2003)。また、冬期水温が夏場の赤潮発生規模や時期に大きく影響することから(松山, 2003)、冬期水温の動向から当該年の養殖規模や避難漁場の確保を予め想定し、直前の水温や *H. circularisquama* の初期発生個体群のモニタリング結果に基づいて適宜海水交換が良好な沖合や海峡部に養殖貝をすばやく移動することで赤潮の被害を逃れることが可能になる。また、ろ水率の低下は20~100 cells/mLあたりから、斃死は5,000~10,000 cells/mLあたりから指数級数的に始まるので、これらを基に「注意報」や「警報」発令基準を設定し、現場でのモニタリングと組み合わせることでの確かな漁場管理が可能となる。

さらに、*H. circularisquama* の毒性は、細胞表層を物理的あるいは化学的に「攪乱」させるだけで容易に失活することから、将来的には遠心力を負荷できる装置を搭載した船舶、あるいは浮上式のブイを開発することで、赤潮被害を低減できる可能性がある。栄養競合者である珪藻の賦活、捕食者などの益虫散布、あるいはホヤなどろ過食性付着生物を利用した生物学的防除方法も、生態系の保全という観点から有望である。さらには、ムラサキイガイは低密度の *H. circularisquama* の暴露によって後天的に耐性を獲得する能力があるだけでなく、低い割合でも *H. circularisquama* の暴露によっても生残する個体が存在することから、将来的に *H. circularisquama* に抵抗力を持った貝類の選抜育種も期待される。

#### 謝 辞

本研究をとりまとめるに当たり、終始、公私に亘りご指導を賜るとともに、本論文の御校閲を頂いた九州大学大学院本城凡夫教授に心から厚く御礼を申し上げます。また、本論文の御校閲を頂いた同中村 孝教授、今田信良助教授、同大学大学院理学研究院高橋孝三教授に深く感謝の意を表します。

さらに本研究を遂行するにあたり種々の分野でご指導と有益な御助言を頂いた瀬戸内海区水産研究所赤潮

環境部長杜多 哲博士, 西海区水産研究所石垣支所長玉井恭一博士, 有毒プランクトン研究室長板倉 茂博士, 同主任研究官長井 敏博士, 赤潮生物研究室長山口峰生博士, 赤潮制御研究室長崎慶三博士, および赤潮環境部の歴代部長および部内の臨時職員等の方々, 生産環境部環境動態研究室の伊藤賀代子女史, 北海道区水産研究所海区水産業研究部長内田卓志博士, 中央水産研究所企画連絡科長小谷祐一氏, 九州大学大学院大嶋雄治助教授, 長崎大学水産学部小田達也教授, 広島大学生物生産学部松田治教授および山本民次助教授, 京都大学大学院農学研究科今井一郎助教授, 東海大学海洋学部水産学科増殖課程鈴木伸洋助教授, 元広島大学総合科学部宗岡洋二郎教授, 鹿児島大学水産学部田中淑人教授, Connecticut 州立大学 Sandra E. Shumway 準教授に厚く御礼を申し上げます。

また, 現場調査と取りまとめにあたり, 貴重な労力と資料を御提供いただいたミキモト真珠研究所長永井清仁氏, 同研究所の皆様, 三重県科学技術振興センター水産研究部の水口忠久氏, 西村昭史氏, 石村美佐氏や小林智彦氏をはじめとする研究部の皆様, 間崎島漁業協同組合, 全国真珠養殖漁業協同組合連合会, 熊本県庁の宮本政秀氏, 熊本県水産研究センターの皆様, 広島県栽培漁業協会大内 晟博士, 広島県水産試験場資源環境部長高山晴義博士および試験場の方々, 広島県農林水産部水産振興室, 広島県地域事務所, 広島市水産振興協会, 大野町役場, 大野漁業協同組合, 浜毛保漁業協同組合, 大野町漁業協同組合の方々, 森山貴光, 広田仁志, 織田純生氏をはじめとする高知県水産試験場の皆様に深く感謝します。

浦ノ内湾における赤潮の発生状況について貴重な資料を提供頂いた高知県水産試験場の村田 宏氏, 高知県高岡高等学校, 高知県教育センターの関係者方, 香川県赤潮研究所吉松定昭博士, 福岡湾における *Heterocapsa circularisquama* 赤潮発生に関する貴重な資料を提供頂いた福岡市市役所嘱託(元福岡県水産試験場)の田中義興氏, 浜名湖で発生した *H. circularisquama* 赤潮に関する資料を提供して頂いた静岡県水産試験場浜名湖分場上村信夫氏, *H. circularisquama* 等プランクトンの各種イラストを提供頂いた佐賀県玄海水産振興センター山浦啓治氏に感謝します。

調査研究等で専門的観点から日常的に種々の情報提供やご助言等を賜った東北区水産研究所海区水産業研究部長佐古 浩博士, 海区水産業研究室長神山孝史博士及び同主任研究官鈴木敏之博士, 西海区水産研究所海区水産業研究部海区水産業研究室長渡邊康憲博士, 愛媛県宇和島地方局水産課の小泉喜嗣博士, 山口県水産

研究センターの馬場俊典氏, その他赤潮発生等について貴重な情報や天然海水試料を提供頂いた各県水産試験場等の皆様に御礼申し上げます。また, 広島湾での調査や, 室内実験等で多大なご協力と情報提供を頂いた石岡宏子博士, 瀬戸内海区水産研究所企画連絡科長薄 浩則博士, 同研究所生産環境部濱口昌己博士, 同赤潮環境部坂本節子博士, 後藤幹夫氏, 橋本(旧姓岩崎)真琴氏の各位に感謝する。

この研究の一部は水産総合研究センター, 水産庁, 環境省, 文部科学省等からの研究費補助の下で進められた。最後に, 研究遂行の過程における家族の献身的な支えに心から感謝します。

## 文 献

- Aiello E., 1990: Nervous control of gill ciliary activity in *Mytilus edulis*. in "Neurobiology of *Mytilus edulis*" (ed. by Stefano G. B.), Manchester University Press, Manchester, UK, pp.189-208.
- Ali R. M., 1970: The influence of suspension density and temperature on the filtration rate of *Hiatella arctica*. *Mar Biol.*, **6**, 291-302.
- Albright L. J., Yang C. Z., and Johnson S., 1993: Sub-lethal concentrations of the harmful diatoms, *Chaetoceros concavicornis* and *C. convolutus*, increase mortality rates of penned Pacific salmon. *Aquaculture*, **117**, 215-225.
- Anderson D. M., Kulis D. M., Sullivan J. J., and Hall S., 1990: Toxin composition variations in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Toxicon*, **28**(8), 885-889.
- Anderson D. M., 1990: Toxin variability in *Alexandrium* species. in "Toxic Marine Phytoplankton" (ed. by Granéli E., Sundström B., Edler L., and Anderson D. M.) Elsevier, New York, pp.45-51.
- Anderson D. M., Kulis D. M., Doucette G. J., Gallagher J. C., and Balech E., 1994: Biogeography of toxic dinoflagellates in the genus *Alexandrium* from the northeastern United States and Canada. *Mar. Biol.*, **120**(3), 467-478.
- Arzul G., Gentien P., Bodennec G., Toularastel F., Youenou A., and Crassous M. P., 1995: Comparison of toxic effects in *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* polyunsaturated fatty acids. in "Harmful Marine Algal Blooms" (ed. by Lassus

- P., Arzul G., Erard E., Gentien P., and Marcaillou C.) Lavoisier, Paris, 1995, pp.395-400.
- 馬場俊典, 檜山節久, 池田武彦, 1995: 貝毒に関する報告(4) 仙崎湾における貝毒原因プランクトンの出現と養殖カキの毒化について. 山内水試報, **24**, 22-25.
- 馬場俊典, 吉岡貞範, 矢尾宏志, 白木信彦, 1997: 1995年初夏下関漁港内に発生した有害渦鞭毛藻 *Gymnodinium* sp.の赤潮と漁業被害. 山内水試研報, **26**, 25-30.
- Bechemin C., Grzebyk D., Hachame F., Hummert C., and Maestrini S. Y., 1999: Effect of different nitrogen/phosphorus nutrient ratios on the toxin content in *Alexandrium minutum*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **20**(2), 157-165.
- Berges J. A. and Falkowski P. G., 1996: Cell-associated proteolytic enzymes from marine phytoplankton. *J. Phycol.*, **32**, 566-574.
- Boyer G. L., Sullivan J. J., Andersen R. J., Harrison P. J., and Taylor F. J. R., 1987: Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.*, **96**, 123-128.
- Brand L. E., Guillard R. R. L., and Murphy L. S., 1980: A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankton Res.*, **3**, 193-201.
- Bricej M. V. and Lonsdale D. J., 1997: *Aureococcus anophagefferens*: Causes and ecological consequences of brown tides in U.S. mid-Atlantic coastal waters. *Limnol. Oceanogr.*, **42**(5), 1023-1038.
- Bricej M. V., MacQuarrie S. P., and Schaffner R. A., 2001: Differential effects of *Aureococcus anophagefferens* isolates ("brown tide") in unialgal and mixed suspensions on bivalve feeding. *Mar. Biol.*, **139**, 605-616.
- Burkholder J. M., Noga E. D., Hobbs C. H., and Glasgow H. B. Jr., 1992: New "phantom" dinoflagellate is the causative agent of major estuarine fish kills. *Nature*, **358**(6385), 407-410.
- Burkholder J. M., Glasgow H. B. Jr., and Hobbs C. W., 1995: Fish kills linked to a toxic ambush-predator dinoflagellate: distribution and environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **124**, 43-61.
- Cembella A. D., Sullivan J. J., Boyer G. L., Taylor F. J. R., and Anderson R. J., 1987: Variation in paralytic shellfish toxin composition within the *Protogonyaulax tamarensis/catenella* species complex: red tide dinoflagellates. *Biochem. Syst. Ecol.*, **15**, 171-186.
- Cembella A. D., 1998: Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine algae. in "Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms" (ed. by Anderson D. M., Cembella A. D., and Hallegraeff G. M.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.381-403.
- Chen L. C. M., Edelstein T., and McLachlan J., 1969: *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.*, **5**, 211-220.
- Ching W. T. and Meyer R. D., 1987: *Legionella* infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, **1**(3), 595-614.
- Coughlax J., 1969: The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar. Biol.*, **2**, 356-358.
- Daugbjerg N., Hansen G., Larsen J., and Moestrup Ø., 2000: Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellate. *Phycologia*, **39**(4), 302-317.
- Doucette G. J., Kodama M., Franca S., and Gallacher S., 1998: Bacterial interactions with harmful algal bloom species: bloom ecology, toxigenesis and cytology. in "Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms" (ed. by Anderson D. M., Cembella A. D., and Hallegraeff G. M.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.619-647.
- Edvardsen B., Moy F., and Paasche E, 1990: Hemolytic activity in extracts of *Chrysochromulina polylepis* grown at different levels of selenite and phosphate. in "Toxic Marine Phytoplankton" (ed. by Granéli E., Sundström B., Edler L., and Anderson D. M.), Elsevier, New York, pp.284-289.
- Eis D., 1989: Simplification in the etiology of recent seal deaths. *Ambio*, **18**(2), 144.
- Endo M., Onoue Y., and Kuroki A., 1991: Neurotoxin-induced cardiac disorder and its role in the death of fish exposed to *Chattonella marina*.

- Mar. Biol., **112**(3) 371-376.
- 江藤拓也, 桑村勝士, 佐藤博之, 1998 : 1997年秋季に豊前海で発生した*Heterocapsa circularisquama*赤潮の発生状況と漁業被害の概要 . 福岡水産海洋技術センター研報, **8**, 91-96.
- Farley C. A., Lewis E. J., Relyea D., and Zahtila J., 1995 : Studies of resistance in progeny of blood stock selected from juvenile oyster disease (JOD) survivors. *J. Shellfish Res.*, **14**, 242.
- Flynn K. J., Flynn K., John E. H., Reguera B., Reyero M. I., and Franco J. M., 1996: Changes in toxins, intracellular and dissolved free amino acids of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in response to changes in inorganic nutrients and salinity. *J. Plankton Res.*, **18**, 2093-2111.
- Fong P. P., Noordhuis R., and Ram J. L., 1993 : Dopamine reduces intensity of serotonin-induced spawning in zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J. Exp. Zool.*, **266**, 79-83.
- Fukami K., Sakaguchi K., Kanou M., and Nishijima T., 1996: Effect of bacterial assemblages on the succession of blooming phytoplankton from *Skeletonema costatum* to *Heterosigma akashiwo*. in "Harmful and Toxic Algal Blooms" (ed. by Yasumoto T., Oshima Y., and Fukuyo Y. ), IOC of UNESCO, pp.335-338.
- 福岡県豊前水産試験場, 1989 : *Gymnodinium nagasakiense*の季節的分布, 赤潮形成機構並びに貝類へい死機構に関する研究. 昭和63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, pp.8.
- 古田岳志, 岩田仲弘, 菊池弘太郎, 2002 : 海水魚を用いた毒性試験法の開発(その1) - 急性毒性試験における適正試験条件の解明 - . 電力中央研究所報告, U02015, 1-15.
- Gainey L. F. Jr. and Shumway S. E., 1988 : A compendium of the responses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. *J. Shellfish Res.*, **7**, 623-628.
- Gainey L. F. Jr. and Shumway S. E., 1991 : The physiological effect of *Aureococcus anophagefferens* ("brown tide") on the lateral cilia of bivalve mollusks. *Biol. Bull.*, 181, 298-306.
- Gallager M. S., Stoecker K. D., and Bricelj M. V., 1989 : Effects of the brown tide alga on growth, feeding physiology and locomotory behavior of scallop larvae (*Argopecten irradians*) in "Novel Phytoplankton Blooms: Causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms" (ed. by Cospser E. M., Bricelj M. V., and Carpenter E. J. ), Springer-Verlag, Berlin, pp.511-541.
- Gentien P., 1998: Bloom dynamic and ecophysiology of the *Gymnodinium mikimotoi* species complex. in "Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms" (ed. by Anderson D. M., Cembella A. D., and Hallegraeff G. M. ), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.155-173.
- Gjøæter J., Lekve K., Stenseth N. C., Leinaas H. P., Christie H., Danielssen S., Edvardsen B., Olsgard F., Dahl E., DidrikOug E., and Paasche E., 2000 : A long-term perspective on the *Chrysochromulina* bloom on the Norwegian Skagerrak coast 1988, a catastrophe or an innocent incident? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **207**, 201-218.
- Granéli E. and Johansson N., 2003: Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions. *Harmful Algae*, **2**(2), 135-145.
- Guillard R. R. L., 1975 : Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. in "Culture of Marine Invertebrate Animals" (ed. by Smith W. L. and Chanley M. H. ) Plenum Press, New York, pp.26-60.
- 花井孝之, 長谷川 仁, 長谷川雅俊, 野田浩之, 野中敬八, 1992 : 浜名湖における *Gymnodinium nagasakiense*赤潮の発生状況について . 静岡水試研報, **27**, 33-40.
- 半田慎也, 広海十朗, 内田直行, 1998 : ミズクラゲ自己溶解液の新型赤潮生物 *Heterocapsa circularisquama* に対する殺藻効果 . 日水誌, **64**(1), 123-124.
- Hang D. F. and Lu Y. H., 2000: Influence of environmental and nutritional factors of growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon*, **38**, 1491-1503.
- Hansen G., Daugbjerg N., and Henriksen P., 2000 : Comparative study of *Gymnodinium mikimotoi* and *Gymnodinium aureolum*, comb. nov. (*Gyrodinium aureolum*) based on morphology, pigment composition, and molecular data. *J. Phycol.*, **36**, 394-410.
- Hallegraeff G. M., 1993 : A review of harmful algal

- blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, **32**, 79-99.
- Hashimoto T., Matsuoka S., Yoshimatsu S. A., Miki K., Nishibori N., Nishio S., and Noguchi T., 2002 : First paralytic shellfish poison (PSP) infestation of bivalves due to toxic dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii*, in the southeast coasts of the Seto Inland Sea, Japan. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **43**(1), 1-5.
- Heinig C. S. and Campbell D. E., 1992 : The environmental context of a *Gyrodinium aureolum* bloom and shellfish kill in Maquoit Bay, Maine, September 1988. *J. Shellfish Res.*, **11**, 111-122.
- Hidaka T. and Twarog B. M., 1977 : Neurotransmitter action on the membrane of *Mytilus* smooth muscle-I. Acetylcholine. *Gen. Pharmacol.*, **8**(2), 83-86.
- Hidaka T., Yamaguchi H., Twarog B. M., and Muneoka Y., 1977 : Neurotransmitter action on the membrane of *Mytilus* smooth muscle-II. Dopamine. *Gen. Pharmacol.*, **8**(2), 87-91.
- Higman W. A., Stone D. M., and Lewis J. M., 2001: Sequence comparisons of toxic and non-toxic *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) isolates from UK waters. *Phycologia*, **40**(3), 256-262.
- Hiraga Y., Kaku K., Omoda D., Sugihara K., Hosoya H., and Hino M., 2002: A new digalactosyl diacylglycerol from a cultured marine dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *J. Nat. Prod.*, **65**(10), 1494-1496.
- 平井明夫, 林 智草, 1986 : 低酸素海中におけるムラサキイガイの酸素消費量と生残日数 . 付着生物研究, **6**(1), 31-34.
- Ho M. S. and Zubkoff P. L., 1979 : The effects of a *Cochlodinium heterolobatum* bloom on the survival and calcium uptake by larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. in "Toxic Dinoflagellate Blooms" (ed. by Taylor D. L. and Selinger H. H. Y. ) Elsevier, New York, pp.409-412.
- Holmes M. J., Bolch C. J., Green D. H., Cembella A. D., Lay S., and Teo M., 2002: Singapore isolates of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) produce a unique profile of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.*, **38**, 96-106.
- Honjo, T. and K. Tabata, 1985. Growth dynamics of *Olisthodiscus luteus* in outdoor tanks with flowing coastal water and in small vessels. *Limnol. Oceanogr.*, **30**(3), 653-664.
- Honjo T., 1993 : Overview on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma akashiwo*. in "Toxic Phytoplankton Bloom in the Sea" (ed. by Smayda T. J. and Shimizu Y. ) Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp.33-42.
- Honjo T., 1994a : The biology and prediction of representative red tides associated with fish kills in Japan. *Rev. Fish. Sci.*, **2**, 225-253.
- Honjo T., 1994b : Overview on prediction and prevention of red tides causing death of marine life. *Farming Japan*, **28**, 9-15.
- 本城凡夫, 松山幸彦, 2000 : 赤潮植物プランクトン . 月刊海洋, 号外21号, 76-84.
- Hooper J. K. and Hughes M. J., 1992 : Purification and characterization of a membrane-bound protease from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, **99**, 932-937.
- Horiguchi T., 1995 : *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae) a new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycol. Res.*, **43**, 129-136.
- 星 元紀, 1992 : 海産無脊椎動物の受精における複合糖質の役割 . タンパク質核酸酵素, **37**(11), 115-121.
- Hoshiai G., Suzuki T., Onodera T., Yamasaki M., and Taguchi S., 1997: A case of non-toxic mussels under the presence of high concentrations of toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* that occurred in Kesenuma Bay, northern Japan. *Fish. Sci.*, **63**, 317-318.
- Hrs-Brenko M and Calabrese A., 1969 : The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **4**, 224-226.
- Hwang D. F. and Lu Y. H., 2000: Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon*, **38**, 1491-1503.
- Ichimi K., Suzuki T., and Ito A., 2002: Variety of PSP toxin profiles in various culture strains of *Alexandrium tamarense* and change of toxin profile in natural *A. tamarense* population. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **273**, 51-60.
- Imai I., Ishida Y., and Hata Y., 1993: Killing of

- marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.*, **116**, 527-532.
- 今井一郎, 中桐 栄, 永井清仁, 1998: 夏季の英虞湾における有害赤潮渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* 殺藻微生物の変動. 南西水研報, **31**, 53-61.
- 今井一郎, 1999: 微生物を用いた赤潮の防除. 化学工業, **50(9)**, 12-20.
- 石田祐三郎, 1994: 赤潮藻の微生物学的防除に関する現状と将来, 赤潮と微生物—環境に優しい微生物農薬を求めて—, 石田祐三郎, 菅原庸編, 恒星社厚生閣, 東京, pp.9-21.
- 板倉 茂, 今井一郎, 伊藤克彦, 1990: 広島湾における赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* 出現密度の季節変化. 南西水研報, **23**, 27-33.
- 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, pp.304-473.
- John E. H. and Flynn K. J., 2000: Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) the effect of changing N[ $\text{ratio}$ ]P supply ratios on internal toxin and nutrient levels. *Eur. J. Phycol.*, **35(1)**, 11-23.
- Jørgensen C. B., 1990: Bivalve filter feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark, 140pp.
- Ishimatsu A., Maruta H., Tsuchiyama T., and Ozaki M., 1990: Respiratory, ionoregulatory and cardiovascular responses of the yellowtail *Seriola quinqueradiata* to exposure of the red tide plankton *Chattonella*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 189-199.
- Ishimatsu A., Oda T., Yoshida M., and Ozaki M., 1996a: Oxygen radicals are probably involved in the mortality of yellowtail by *Chattonella marina*. *Fish. Sci.*, **62**, 836-837.
- Ishimatsu A., Sameshima M., Tamura A., and Oda T., 1996b: Histological analysis of the mechanism of *Chattonella*-induced hypoxemia in yellowtail. *Fish. Sci.*, **62**, 50-58.
- Iwataki M., Takayama H., Matsuoka K., and Fukuyo Y., 2002a: *Heterocapsa lanceolata* sp. nov. and *Heterocapsa horiguchii* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae), two new marine dinoflagellates from coastal Japan. *Phycologia*, **41(5)**, 470-479.
- Iwataki M., Wong M. W., and Fukuyo Y., 2002b: New record of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) from Hong Kong. *Fish. Sci.*, **68(5)**, 1161-1163.
- 鹿児島県, 1993: シャットネラ赤潮被害防止技術開発試験, 鹿児島湾のシャットネラ赤潮被害防止技術開発, 平成5年年度報告書, pp.1-8.
- Kamiyama T. and Arima S., 1997: Lethal effect of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* upon the tintinnid ciliate *Favella taraikaensis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **160**, 27-33.
- Kamiyama T., Takayama H., Nishii Y., and Uchida T., 2001: Grazing impact of the field ciliate assemblage on a bloom of the toxic dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Plankton Biol. Ecol.*, **48(1)**, 10-18.
- 加戸隆介, 平野礼次郎, 1979: 付着生物浮遊期幼生の飼育法. 付着生物研究, **1(1)**, 11-19.
- Kennedy S., Smyth J. A., McCullough S. J., Allan G. M., McNeilly F., and McQuaid S., 1988: Confirmation of cause of recent seal deaths. *Nature*, **335(6189)**, 404.
- Kim C. H., Sako Y., and Ishida Y., 1992: Comparison of toxin composition between populations of *Alexandrium* spp. from geographically distant areas. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **59(4)**, 641-646.
- Kim C. H., Sako Y., and Ishida Y., 1993: Variation of toxin production and composition in axenic cultures of *Alexandrium catenella* and *A. tamarense*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **59(4)**, 633-639.
- Kim D., Oda T., Ishimatsu A., and Muramatsu T., 2000a: Galacturonic-acid-induced increase of superoxide production in red tide phytoplankton *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64(4)**, 911-914.
- Kim D., Sato Y., Oda T., Muramatsu T., Matsuyama Y., and Honjo T., 2000b: Specific toxic effect of dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64(12)**, 2719-2722.
- Kim D., Okamoto T., Oda T., Tachibana K., Lee K. S., Ishimatsu A., Matsuyama Y., Honjo T., and Muramatsu T., 2001: Possible involvement of the glycocalyx in the ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae): immunological approach using antiserum against

- cell surface structures of the flagellate. *Mar. Biol.*, **139**, 625-632.
- Kim D., Sato Y., Miyazaki Y., Oda T., Muramatsu T., Matsuyama Y., and Honjo T., 2002a : Comparison of hemolytic activities among strains of *Heterocapsa circularisquama* isolated in various localities in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**( 2 ), 453-457.
- Kim D., Oda T., Muramatsu T., Matsuyama Y., and Honjo T., 2002b : Possible factors responsible for the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides*, a red tide phytoplankton, *Comp. Biochem. Physiol. C*, **132**( 4 ), 415-423.
- Keusgen M., Curtis J. M., Thibault P., Walter J. A., Windust A., and Ayer S. W., 1997: Sulfoquinovosyl diacylglycerols from the alga *Heterosigma carterae*. *Lipids*, **32**( 10 ), 1101-1112.
- Kitaguchi H., Hiragushi N., Mitsutani A., Yamaguchi M., and Ishida Y., 2001 : Isolation of an algicidal marine bacterium with activity against the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae). *Phycologia*, **40**, 275-279.
- 木村知博, 溝上昭男, 橋本俊将, 1973 : 漁業被害をもたらした広島湾の赤潮 : その発生状況と発生環境 . 日本プランクトン学会報, **19**( 2 ) 24-38.
- Kodama M., Fukuyo Y., Ogata T., Ishimaru T., Kamiya H., and Matsuura F., 1982 : Comparison of toxicities of *Protogonyaulax* cells of various sizes. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **48**( 4 ), 567-571.
- 小島 至, 1992 : カルシウムと細胞情報, 羊土社, 東京, 156 pp.
- 小泉喜嗣, 河野慈敬, 松山紀彦, 内田卓志, 本城凡夫, 1996 : 1994年宇和島湾周辺で発生した *Gonyaulax polygramma* 赤潮の環境特性と魚貝類の大量斃死 . 日水誌, **62**( 2 ) 217-224.
- 小泉喜嗣, 市川 衛, 田村成男, 永友聖代, 内田卓志, 2001 : 愛媛県下波湾で観察された渦鞭毛藻 *Gonyaulax polygramma* Stein の日周鉛直移動 . 水産海洋研究, **65**( 4 ), 131-134.
- Korringa K., 1976 : Farming the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Hiroshima Bay. in "Farming the cupped oyster of the genus *Crassostrea*" (ed. by Korringa K.) Elsevier, Amsterdam, pp.153-182.
- 小谷祐一, 坂本節子, 1998 : 西日本海域で頻発するギムノディニウム・カテナータムによる麻痺性貝毒 . 養殖, **435**, 92-93.
- 黒木 暘, 村田 寿, 延東 真, 山内 清, 上野貴治, 椎原久幸, 境 正, 1992 : *Chattonella* 赤潮防除に有効な過酸化水素の最低濃度の検討 . 宮崎大農学部研報, **39**( 2 ), 117-121.
- Landsberg J. H., 2002: The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.*, **10**( 2 ) 113-390.
- Lesser M. P. and Shumway S. E., 1993 : Effects of toxic dinoflagellates on clearance rates and survival in juvenile bivalve molluscs. *J. Shellfish Res.*, **12**, 377-381.
- Lewis C. A., Talbot C. F., and Vacquier V. D., 1982 : A protein from abalone sperm dissolves the egg vitelline layer by a nonenzymatic mechanism. *Dev. Biol.*, **92**( 1 ), 227-239.
- Lippemeier S., Frampton D. M. F., Blackburn S. I., Geier S. C., and Negri A. P., 2003: Influence of phosphorus limitation on toxicity and photosynthesis of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) monitored by in-line detection of variable chlorophyll fluorescence. *J. Phycol.*, **38**, 320-331.
- Lovko V. J., Vogelbein W. K., Shields J. D., Haas L. W., and Reece K. S., 2003: A new larval fish bioassay for testing the pathogenicity of *Pfiesteria* spp. (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **39**( 3 ), 600-609.
- Luckenbach M. W., Sellner K. G., Shumway S. E., and Greene K., 1993 : Effects of two bloom-forming dinoflagellates, *Prorocentrum minimum* and *Gyrodinium uncatenum*, on the growth and survival of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791). *J. Shellfish Res.*, **12**, 411-415.
- Lutz R. A. and Kennish M. J., 1992 : Ecology and morphology of larval and early postlarval mussels. in "The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture" (ed. by Gosling E.) Elsevier, Netherland, pp.53-85.
- Mahoney J. B., Olsen P., and Cohn M., 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.
- Maki T. and Imai I., 2001: Relationships between intracellular bacteria and the bivalve killer dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae). *Fish. Sci.*, **67**( 5 ), 794-803.

- Maranda L., Anderson D. M., and Shimizu Y., 1985: Comparison of toxicity between populations of *Gonyaulax tamarensis* of eastern north American waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **21**, 401-410.
- Marsden I. D. and Shumway S. E., 1992: Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* on the greenshell mussel *Perna canaliculus*. *N.Z. J. Mar. Freshwat. Res.*, **26**, 371-378.
- 丸山俊郎, 鈴木祥広, 河添智, 土手裕, 増田純雄, 1998: 凝集剤とタンパク質を併用した空気分散型一泡沫分離法による海産赤潮プランクトンの直接回収. *水環境学会誌*, **21(5)**, 310-317.
- Matsuda Y., Saito T., and Taketoshi T., 1994: Two novel endopeptidases released into the medium during mating of gametes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.*, **35(6)**, 957-961.
- 松里寿彦, 小林博, 1974: 海産ミドリムシ赤潮による魚類の斃死機構解明に関する研究. *南西水研報*, **7**, 43-67.
- 松浦昌宏, 斉藤仁志, 平田たつみ, 藤本成明, 高島育雄, 宗岡洋二郎, 1986: イガイ足糸前牽引筋におけるモノアミン類の作用. *広島大総合科学部紀要 情報行動科学研究*, **10**, 1-29.
- 松山幸彦, 永井清仁, 水口忠久, 藤原正嗣, 石村美佐, 山口峰生, 内田卓志, 本城凡夫, 1995: 1992年に英虞湾において発生した*Heterocapsa* sp.赤潮発生期の環境特性とアコヤガイ斃死の特徴について. *日水誌*, **61(1)**, 35-41.
- Matsuyama Y., Uchida T., Nagai K., Ishimura M., Nishimura A., Yamaguchi M., and Honjo T., 1996: Biological and environmental aspects of noxious dinoflagellate red tides by *Heterocapsa circularisquama* in the west Japan. in "Harmful and Toxic Algal Blooms" (ed. by Yasumoto T., Oshima Y., and Fukuyo Y.), IOC of UNESCO, Paris, pp.247-250.
- 松山幸彦, 木村淳, 藤井 斉, 高山晴義, 内田卓志, 1997: 1995年広島湾西部で発生した*Heterocapsa circularisquama*赤潮の発生状況と漁業被害の概要. *南西水研報*, **30**, 189-207.
- Matsuyama Y. and Uchida T., 1997: Simplified method to measure the clearance rate of bivalve fed on microalgae. *Bull. Nansei Natl. Fish. Res. Inst.*, **30**, 183-188.
- Matsuyama Y., Koizumi Y., and Uchida T., 1998a: Effect of harmful phytoplankton on the survival of the abalones, *Haliotis discus* and *Sulculus diversicolor*. *Bull. Nansei Natl. Fish. Res. Inst.*, **31**, 19-24.
- Matsuyama Y. Uchida T., and Honjo T., 1998b: The harmful effect of red tide dinoflagellates, *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* on the clearance rate and survival of the blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. in "Harmful Algae" (ed. by Reguera B., Blanco J., Fernandez M. L., and Wyatt T.), Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Paris, pp.422-424.
- Matsuyama Y. and Suzuki T., 1998: Free fatty acid in *Heterocapsa circularisquama* and *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae). *Fish. Sci.*, **64(4)**, 662-663.
- Matsuyama Y., 1999: Harmful effect of dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on shellfish aquaculture in Japan. *JARQ*, **33**, 283-293.
- Matsuyama Y., Miyamoto M., and Kotani Y., 1999a: Grazing impacts of the heterotrophic dinoflagellate *Polykrikos kofoidii* on a bloom of *Gymnodinium catenatum*. *Aqua. Microb. Ecol.*, **17(1)**, 91-98.
- Matsuyama Y., Uchida T., and Honjo T., 1999b: Effect of harmful dinoflagellates, *Gymnodinium mikimotoi* and *Heterocapsa circularisquama*, red-tide on filtering rate of bivalve molluscs. *Fish. Sci.*, **65(2)**, 248-253.
- Matsuyama Y., Uchida T., Honjo T., and Shumway S. E., 2001a: Impacts of the harmful dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*, on shellfish aquaculture in Japan. *J. Shellfish Res.*, **20(3)**, 1269-1272.
- Matsuyama Y., Usuki H., Uchida T., and Kotani Y., 2001b: Effects of harmful algae on the early planktonic larvae of the oyster, *Crassostrea gigas*. in: "Harmful Algal Blooms 2000" (ed. by Hallegraeff G. M., Blackburn S. I., Bolch C. J., and Lewis R. J.), IOC of UNESCO, Paris, pp.411-414.
- 松山幸彦, 2003: 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama*に関する生理生態学的研究一: *H. circularisquama* 赤潮の発生および分布拡大機構に影響する環境要因等の解明. *水研センター研報*, **7**, 24-105.
- 宮本政秀, 吉田雄一, 河邊 博, 松山幸彦, 高山晴義, 2002: 1995年に羊角湾で発生した渦鞭毛藻 *Gyrodinium* sp.の赤潮: 発生期の環境特性と養殖

- 魚への影響 . 日水誌 , **6**( **2** ) , 157-163.
- 宮崎照雄 , 倉田恵吉 , 宮崎武弥 , 1990 : 過酸化水素の *Gymnodinium nagasakiense* と魚類に対する毒性 . 三重大生物資源学部紀要 , **4** , 165-173.
- Muneoka Y., Cottrell G. A., and Twarog B. M., 1977 : Neurotransmitter action on the membrane of *Mytilus* smooth muscle . Serotonin. *Gen. Pharmacol.*, **8**( **2** ) 93-96.
- 宗岡洋二郎 , 1993 : 無脊椎動物神経ペプチドの構造と活性の比較生態学 . 日本農薬学会誌 , **18** , S191-S199.
- 村田 寿 , 境 正 , 延東 真 , 黒木 暘 , 木村正雄 , 九万田一己 , 1989 : *Chattonella marina* 赤潮除去剤の検討—特に過酸化水素の高度不飽和脂肪酸から発生するフリーラジカルの除去能 . 日水誌 , **56** , 1075-1082.
- 村田 寿 , 境 正 , 延東 真 , 山内 清 , 松元正剛 , 黒木 暘 , 1991 : *Chattonella antiqua* 赤潮暴露ブリの過酸化水素による救命の試み . 水産増殖 , **39** , 189-193.
- Nagai K., Matsuyama Y., Uchida T., Yamaguchi M., Ishimura M., Nishimura A., Akamatsu S., and Honjo T., 1996 : Toxicity and LD<sub>50</sub> levels of the red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on juvenile pearl oysters. *Aquaculture*, **144** , 149-154.
- Nagai K., Matsuyama Y., Uchida T., Akamatsu S., and Honjo T., 2000 : Effect of a natural population of the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on the survival of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish. Sci.*, **66**( **5** ) , 995-997.
- Nagasaki K., Uchida A., and Ishida Y., 1991 : A monoclonal antibody which recognizes the cell surface of red tide alga *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**( **6** ) , 1211-1214.
- 長崎慶三 , 1998 : 殺藻性ウイルスによる赤潮防除の可能性 . *Microbes and Environments*, **13**( **2** ) , 109-113.
- 長崎慶三 , 山口峰生 , 今井一郎 , 1999 : 英虞湾から分離された海洋細菌 AA8-2 株の *Heterocapsa circularisquama* に対する殺藻性に関する検討 . 日水誌 , **66**( **4** ) , 666-673.
- Nagasaki K., 2001 : Selective eradication of a shellfish-killing phytoplankton *Heterocapsa circularisquama* using natural viruses. *Farming Japan*, **35**( **6** ) , 44-46.
- 中西雅幸 , 1982 : アカガイの成長に及ぼす水温 , 塩分 , 溶存酸素濃度の影響について . 京都海洋センター研報 , **5** , 23-28.
- 中西克之 , 増田 健 , 畑 直亜 , 山形陽一 , 2001 : 英虞湾における底質汚染の現状と近年の進行状況 . 三重科学技術振興センター水産研究部研報 , **10** , 71-77.
- Nielsen M. V. and Strømgren T., 1991 : Shell growth response of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to toxic microalgae. *Mar. Biol.*, **108** , 263-267.
- 西川藤吉 , 1901 : 赤潮に就て . 動物学雑誌 , **12** , 127-133.
- 西川藤吉 , 1903 : 再び赤潮に就て . 動物学雑誌 , **15** , 347-353.
- 西尾幸郎 , 1982 : 4 . 有毒・有害プランクトンの魚介類への影響 , 有毒プランクトン—発生・作用機構・毒成分 , 水産学シリーズ , 日本水産学会監修 , 恒星社厚生閣 , 東京 , pp.50-61.
- 西岡 純 , 和田洋藏 , 今西裕一 , 1993 : 久美浜湾における *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) の出現について . 京都海洋センター研報 , **16** , 43-49.
- Noe-Nygaard F., Surlyk K. F., and Piasecki S., 1987 : Bivalve mass mortality caused by toxic dinoflagellate blooms in a Berrisian-Valanginian lagoon, Bornholm, Denmark. *Palaios*, **2** , 263-273.
- 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.
- Oda T., Ishimatsu A., Shimada M., Takeshita S., and Muramatsu T., 1992 : Oxygen-radical-mediated toxic effects of the red tide flagellate *Chattonella marina* on *Vibrio alginolyticus*. *Mar. Biol.*, **112**( **3** ) , 505-509.
- Oda T., Sato Y., Kim D., Muramatsu T., Matsuyama Y., and Honjo T., 2001 : Hemolytic activity of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its possible involvement in shellfish toxicity. *J. Phycol.*, **37**( **4** ) , 509-516.
- Oda T., Sato Y., Miyazaki Y., Muramatsu T., Matsuyama Y., and Honjo T., 2003 : Hemolytic toxin of *Heterocapsa circularisquama* as a possible causative factor responsible for shellfish kill. HAB2002
- Ogata T., Ishimaru T., and Kodama M., 1987 : Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.*, **95** , 217-

- 220.
- Okaichi T., 1989 : Red tide problems in the Seto Inland Sea, Japan. in "Red Tides" (ed. by Okaichi T., Anderson D. M., and Nemoto T.) Elsevier, New York, pp.137-142.
- Okaichi T., Montani S., Higaki J., and Hasui A., 1989 : The role of iron in the outbreaks of *Chattonella* red tide. in "Red Tides" (ed. by Okaichi T., Anderson D. M., and Nemoto T.) Elsevier, New York, pp.137-142.
- 岡市友利, 1995 : 日本の赤潮研究とその国際的役割 . 学術月報, **48**(2), 134-139.
- 岡市友利, 1996 : 瀬戸内海の赤潮40年 . 瀬戸内海, **7**・8, 22-36.
- 岡市友利, 1997 : 「赤潮の科学」(岡市友利編), 第二版, 恒星社厚生閣, 東京, pp.28-33.
- 岡本 研, 1995 : 浜名湖の植物プランクトン : 汽水性の強い内湾の事例として . 水産海洋研究, **59**, 175-179.
- 岡村金太郎, 1916 : 赤潮に就て . 水産講習所試報, **12**(5), 26-41.
- 鬼塚 剛, 柳 哲雄, 門谷 茂, 山田真知子, 上田直子, 鈴木 學, 2002 : ムラサキイガイ養殖による洞海湾浄化の試み . 海の研究, **11**(3), 403-417.
- 大森 信, 池田 勉, 1976 : 動物プランクトン生態研究法 . 生態学研究法講座 5, 共立出版, 東京, 229pp.
- Ono K., Arakawa O., Onoue Y., Matsumoto S., Shihara H., Takeda K., Nakanishi M., Yamaji T., Uemura K., and Ogawa Y., 1998 : Synthetic surfactants for protecting cultured fish against toxic phytoplankton. *Aqua. Res.*, **29**, 569-572.
- Onoue Y., Hag M. S., and Nozawa K., 1990 : Separation of neurotoxins from *Chattonella marina*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **56**(4), 695.
- Oshima Y., Hayakawa T., Hashimoto M., Yasumoto T., and Kotaki K., 1982 : Classification of *Protogonyaulax tamarensis* from northern Japan into three strains by toxin composition (in Japan) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **48**(6), 851-854.
- Oshima Y., Blackburn S. I., and Hallegraef G. M., 1993: Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Mar. Biol.*, **116**(3), 471-476.
- Oshima Y., Yamada S., Matsunaga K., Moriya T., and Ohizumi Y., 1994: A monogalactosyl diacylglycerol from a cultured marine dinoflagellate, *Scrippsiella trochoidea*. *J. Nat. Prod.*, **57**(4), 534-536.
- Osterhaus A. D., 1988 : Seal death. *Nature*, **334**(6180), 301-302.
- Osterhaus A. D. and Vedder E. J., 1988 : Identification of virus causing recent seal deaths. *Nature*, **335**(6185), 20.
- Park J. S., 1982 : Studies on the characteristics of red tide and environmental conditions in Jinhae Bay. *Bull. Fish. Res. Dev. Agency*, **28**, 55-88.
- Parkhill J. P. and Cembella A. D., 1999: Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* from northeastern Canada. *J. Plankton Res.*, **21**(5), 939-955.
- Parrish C. C., Bodenec G., and Gentien P., 1998: Haemolytic glycolipids from *Gymnodinium* species. *Phytochemistry*, **47**(5), 783-787.
- Partensky F. P., Vaulot D., Coute A., and Sournia A., 1988 : Morphological and nuclear analysis of the bloom-forming dinoflagellates *Gyrodinium* cf. *aureolum* and *Gymnodinium nagasakiense*. *J. Phycol.*, **24**, 408-415.
- Quayle D. B., 1969: Paralytic shellfish poisoning in British Columbia. *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, **168**, 1-68.
- Rosenberg R., Lindahl O., and Blanck H., 1988 : Silent spring in the sea. *Ambio*, **17**, 289-290.
- 佐古 浩, 1998 : プリの *Streptococcus iniae* 感染症に関する研究 . 南西水研報, **31**, 63-120.
- Saito T. and Matsuda Y., 1984 : Sexual agglutinin of mating-type minus gametes in *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Loss and recovery of agglutinability of gametes treated with EDTA (Algae). *Exp. Cell Res.*, **152**(2), 322-330.
- Sakata K. and Ina K., 1985: Digalactocyl diacylglycerols and phosphatidylcholines isolated from a brown alga as effective phagostimulants for a young abalone. *Bull. Jpn. Soc. Fish.*, **51**, 659-665.
- 坂本節子, 小谷祐一, 1998 : 呉湾に発生した *Alexandrium tamarensis* の麻痺性貝毒量および毒成分組成の株間における変異 . 南西水研報, **31**, 45-52.
- 坂本節子, 長崎慶三, 松山幸彦, 小谷祐一, 1998 : 徳山

- 湾に発生した *Alexandrium catenella* 赤潮による二枚貝類の毒化—麻痺性貝毒の毒量および毒成分組成の比較. 瀬戸内水研報, **1**, 55-61.
- Sato Y., Oda T., Muramatsu T., Matsuyama Y., and Honjo T., 2002: Photosensitizing hemolytic toxin in *Heterocapsa circularisquama*, a newly identified harmful red tide dinoflagellate. *Aqua. Toxicol.*, **56**(3), 191-196.
- 沢田茂樹, 和田有二, 1983: 宇和海に発生した *Gymnodinium* '65年型赤潮に対する魚貝類の二、三の抵抗試験について. 昭和57年度赤潮予察調査報告書, pp.131-140.
- Schmitter R. E., Njus D., Sulzman F. M., Gooch V. D., and Hastings J. W., 1976: Dinoflagellate bioluminescence: A comparative study of *in vitro* components. *J. Cell. Physiol.*, **87**(1), 123-134.
- Schulte, E. H., 1975: Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **30**, 331-341.
- Shimada M., Murakami T. H., Imahayashi T., Ozaki H. S., Yoyoshima T., and Okaichi T., 1983: Effects of sea bloom, *Chattonella antiqua*, on gill primary lamellae of the young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Acta. Histochem. Cytochem.*, **16**, 232-244.
- Shimada M., Akagi N., Nakai Y., Goto H., Watanabe M., Watanabe H., Nakanishi M., Yoshimatsu S., and Ono C., 1991: Free radical production by the red tide alga, *Chattonella antiqua*. *Histochem. J.*, **23**(8), 361-365.
- Singh H. T., Oshima Y., and Yasumoto T., 1982: Growth and toxicity of *Protogonyaulax tamarensis* in axenic culture. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **48**(9), 1341-1343.
- 塩川 司, 立石 賢, 飯塚昭二, 入江春彦, 1966: 1962年大村湾に発生した赤潮現象と水産被害について. 長崎大水産学部研報, **21**, 45-57.
- Shirota A., 1989: Red tide problem and countermeasure. *Int. J. Aqua. Fish. Technol.*, **1**, 195-223.
- Shumway S. E., 1990: A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J. World Aquaculture Soc.*, **21**, 65-104.
- Shumway S. E., Cucci T. L., Newell R. C., and Yentsch C. M., 1985: Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **91**, 77-92.
- Shumway, S. E. and Cucci T. L., 1987: The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aqua. Toxicol.*, **10**, 9-27.
- Shurova N. M., 2001: The influence of salinity on the structure and state of bivalve *Mytilus galloprovincialis* populations. *Biologiya morya*, **27**(3), 187-191.
- Smayda T. J., 1990: Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic. in "Toxic Marine Phytoplankton" (ed. by Granéli E., Sundström B., Edler L., and Anderson D. M.) Elsevier, New York, pp.29-40.
- Smolowitz R. and Shumway S. E., 1997: Possible cytotoxic effects of the dinoflagellate, *Gyrodinium aureolum*, on juvenile bivalve molluscs. *Aquaculture International*, **5**, 291-300.
- Sola F, Masoni A., Fossat B., Porthe-Nibelle J., Gentien P., and Bodennec G., 1999: Toxicity of fatty acid 18:5n3 from *Gymnodinium* cf. *mikimotoi*: I. Morphological and biochemical aspects on *Dicentrarchus labrax* gills and intestine. *J. Appl. Toxicol.*, **19**(4), 279-284.
- Southgate T., Wilson K., Cross T. F., and Myers A. A., 1984: Recolonization of a rocky shore in S. W. Ireland following a toxic bloom of the dinoflagellate, *Gyrodinium aureolum*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **64**, 485-492.
- Stoecher D. K. and Gustafson Jr. D. E., 2003: Cell-surface proteolytic activity of photosynthetic dinoflagellates. *Aquat. Microb. Ecol.*, **30**, 175-183.
- 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. 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所編, pp.18.
- 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所, 1996: 平成7年瀬戸内海の赤潮.
- Suzuki, N., 1992: Fine structure of the mudskipper, *Periophthalmus modestus* (Gobiidae). *Japan J. Ichthyol.*, **38**(4), 379-396.
- Suzuki R. and Ishimaru T., 1992: Characteristics of photosynthetic pigment composition of *Gymnodinium mikimotoi* Miyake et Kominami ex Oda. *J. Oceanogr.*, **48**(4), 367-375.
- Suzuki T. and Matsuyama Y., 1995: Determination

- of free fatty acids in marine phytoplankton causing red tides by fluorometric high-performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**(10), 1211-1214.
- Suzuki T., Mitsuya T., Imai M., and Yamasaki M., 1997: DSP toxin contents in *Dinophysis fortii* and scallops collected at Mutsu Bay, Japan. *J. Appl. Phycol.*, **8**, 509-515.
- Swanson W. J. and Vacquier V. D., 1997 : The abalone egg vitelline envelope receptor for sperm lysin is a giant multivalent molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(13), 6724-6749.
- Sweeny, 1987: Bioluminescence and circadian rhythms. in: "The Biology of Dinoflagellates" (ed. by Taylor F. J. R.) Blackwell, London, pp.269-281.
- 田端健二, 1993 : 水質汚染における魚類急性毒性試験値(LC<sub>50</sub>等)の変動要因と変動幅. 中央水研報, **5**, 143-157.
- 高岡高等学校, 1988 : 宇佐湾・浦ノ内湾一帯における自然の研究第7報: 赤潮とアサリに関する研究. 高岡高校宇佐分校定時制郷土研究クラブ編, 28 pp.
- Takatani T., Morita T., Anami A., Akaeda H., Kamijo Y., Tsutsumi K., and Noguchi T., 1998 : Appearance of *Gymnodinium catenatum* in association with the toxification of bivalves in Kamea, Oita Prefecture, Japan. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **39**, 275-280.
- 高山晴義, 1973 : 赤潮プランクトンにおよぼす超音波の影響. 広島水試研報, **4**, 1-5.
- 高山晴義, 1986 : 広島県沿岸に出現する赤潮生物—ナガサキハダカウズモ *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi. 広島水試研報, **16**, 39-44.
- 玉井恭一, 1993 : シズクガイの貧酸素耐性. 日水誌, **59**(4), 615-620.
- Tamaki S., Matsuda Y., and Tsubo Y., 1981 : The isolation and properties of the lytic enzyme of the cell wall released by mating gametes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.*, **22**(1), 127-133.
- Tanaka K., Muto Y., and Shimada M., 1994 : Generation of superoxide anion radicals by the marine phytoplankton organism, *Chattonella antiqua*. *J. Plankton Res.*, **16**(2), 161-169.
- Tangen K., 1977 : Bloom of *Gyrodinium aureolum* (Dinophyceae) in north European waters, accompanied by mortality in marine organism. *Sarsia*, **62**, 123-133.
- Taroncher-Oldenburg G., Kulis D. M., and Anderson D. M., 1999: Coupling of saxitoxin biosynthesis to the G1 phase of the cell cycle in the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: temperature and nutrients effects. *Nat. Toxins*, **7**(5), 207-219.
- Tarutani K., Nagasaki K., and Yamaguchi M., 2000 : Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4916-4920.
- Tarutani K., Nagasaki K., Itakura S., and Yamaguchi M., 2001 : Isolation of a virus infecting the novel shellfish-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Aqua. Microb. Ecol.*, **23**, 103-111.
- Taylor F. J. R., 1985: The taxonomy and relationships of red tide flagellates. in "Toxic Dinoflagellates" (ed. by Anderson D. M., White A. W., and Baden D. G.) Elsevier, New York, pp.11-26.
- Twarog B. M., 1976 : Aspects of smooth muscle function in molluscan catch muscle. *Physiol. Rev.*, **56**(4), 829-838.
- Thain J. E. and Watts J., 1987 : The use of a bioassay to measure changes in water quality associated with a bloom of *Gyrodinium aureolum* Hulbult. *Rapports et Proces-verbaux des Reunions Conseil International pour L'Exploration de la Mer*, **187**, 103-107.
- Theede H., Ponat A., Hiroki K., and Schlieper C., 1969 : Studies on the resistance of marine bottom invertebrates to oxygen-deficiency and hydrogen sulphide. *Mar. Biol.*, **2**, 325-337.
- 富山真一, 1974 : 界面活性剤の魚に対する作用について. 日水誌, **40**(12), 1291-1296.
- Tracey G. A., 1988 : Feeding reduction, reproductive failure, and mortality in *Mytilus edulis* during the 1985 'brown tide' in Narragansett Bay, Rhode Island. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **50**, 73-81.
- Uchida T., Yamaguchi M., Matsuyama Y., and Honjo T., 1995 : The red-tide dinoflagellate *Heterocapsa* sp. kills *Gyrodinium instriatum* by cell contact. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **118**, 301-303.
- Uchida T., Matsuyama Y., Yamaguchi M., and

- Honjo T., 1996 : Growth interactions between a red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and some other phytoplankton species in culture. in "Harmful and Toxic Algal Blooms" (ed. by Yasumoto T., Oshima Y., and Fukuyo Y. ), IOC of UNESCO, Paris, pp.369-372.
- Uchida T., Toda S., Matsuyama Y., Yamaguchi M., Kotani Y., and Honjo T., 1999 : Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **241**( 2 ), 285-299.
- Uchida T., 2001 : The role of cell contact in the life cycle of some dinoflagellate species. *J. Plankton Res.*, **23**( 8 ), 889-891.
- Usup G., Kulis D. M., and Anderson D. M., 1994 : Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in laboratory cultures. *Nat. Toxins*, **2**( 5 ), 254-262.
- Usup G. and Azanza R. V., 1998 : Physiology and bloom dynamics of the tropical dinoflagellate *Pyrodinium bahamense*. in "Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms"( ed. by Anderson D. M., Cembella A. D., and Hallegraeff G. M. ), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.81-94.
- Uye S. and Takamatsu K., 1990 : Feeding interactions between planktonic copepods and red-tide flagellates from Japanese coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **59**, 97-107.
- Vacquier V. D., Carner K. R., and Stout C. D., 1990 : Species-specific sequences of abalone lysin, the sperum protein that creates a hole in the egg envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**( 15 ), 5792-5796.
- 和田克彦, 1984 : アコヤガイ *Pinctada fucata* の改良に関する研究 . 養殖研報 , **6**, 79-157.
- 和歌山県水産試験場, 1986 : 昭和59年熊野灘海域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 . 水産庁・三重県・和歌山県編 , 140pp.
- Walne P. R., 1974 : Shellfish culture. in "Sea Fisheries Research" ( ed. by Harden-Jones F. R. ), Elek, London, pp.379-398.
- Ward J. E., Cassel H. K., and MacDonald B. A., 1992 : Chemoreception in the sea scallop *Placopecten magellanicus* ( Gmelin ) . Stimulatory effects of phytoplankton metabolites on clearance and ingestion rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **163**, 235-250.
- Ward J. E., Levinton J. S., Shumway S. E., and Cucci T., 1997 : Site of particle selection in a bivalve mollusc. *Nature*, **390**( 6656 ), 131-132.
- White A. W., 1978: Salinity effects on growth and toxin content of *Gonyaulax excavata*, a marine dinoflagellate causing paralytic shellfish poisoning. *J. Phycol.*, **14**, 475-479.
- White A. W., 1986 : High toxin content in the dinoflagellate *Gonyaulax excavata* in nature. *Toxicon*, **24**, 605-610.
- Widdows J., Moore M. N., Lowe D. M., and Salkeld P. N., 1979 : Some effects of a dinoflagellate bloom ( *Gyrodinium aureolum* ) on the mussel *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **59**, 522-524.
- Wikfors G. H. and Smolowitz R. M., 1995 : Experimental and histological studies of four life-history stages of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to a cultured strain of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Biol. Bull.*, **188**, 313-328.
- Winter, J. E., 1978: A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture*, **13**, 1-33.
- 山口県内海水産試験場, 1988 : 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 ) *G. nagasakiense* の分布実態把握と魚介類等のへい死機構の解明 ( A ), 16pp.
- Yamaguchi M., Itakura S., Nagasaki K., Matsuyama Y., Uchida T., and Imai I., 1997 : Effects of temperature and salinity on the growth of the red tide flagellates *Heterocapsa circularisquama* ( Dinophyceae ) and *Chattonella verruculosa* ( Raphidophyceae ) . *J. Plankton Res.*, **19**, 1167-1174.
- 山口峰生, 1998 : 新型赤潮生物 *Heterocapsa circularisquama* の増殖特性と細胞分裂指数による増殖速度の推定 , 渦鞭毛藻・ラフィド藻等新型赤潮の発生機構と予測技術の開発に関する研究 , 平成 9 年度研究報告書 , pp.7-12.
- Yamaguchi M., Itakura S., and Uchida T., 2001 : Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the 'novel red

- tide' dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) *Phycologia*, **40**(3), 313-318.
- 山口峰生, 2003: 有害・有毒プランクトンの発生予察および生物学的防除に関する研究. 日水誌, **69**(3), 322-325.
- 山本民次, 橋本俊也, 松田 治, 多田邦尚, 1999: 瀬戸内海における植物プランクトン態N:P比とその変動要因. 水産海洋研究, **63**(3), 6-13.
- 山本千裕, 田中義興, 1990: 福岡湾で発生した2種類の有害赤潮プランクトンについて. 福岡水試研報, **16**, 43-44.
- Yan T., Zhou M., Fu M., Wang Y., Yu R., and Li J., 2001: Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop, *Chlamys farreri*, associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Toxicon*, **39**, 1239-1244.
- Yang C. Z. and Albright L. J., 1992: Effects of the harmful diatom *Chaetoceros concavicornis* on respiration of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **14**(2), 105-114.
- Yang, C. Z. and Albright L. J., 1994: The harmful phytoplankter *Chaetoceros concavicornis* causes high mortalities and leucopenis in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and coho salmon (*O. kisutch*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **51**(11), 2493-2500.
- Yang Z. B., Hodgkiss I. J., and Hansen G., 2001a: *Karenia longicanalis* sp. nov. (Dinophyceae): a new bloom-forming species isolated from Hong Kong, May 1998. *Bot. Mar.*, **44**, 67-74.
- Yang Z. B., Takayama H., Matsuoka K., and Hodgkiss I. J., 2001b: *Karenia digitata* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new harmful algal bloom species from the coastal waters of west Japan and Hong Kong. *Phycologia*, **39**(6), 463-470.
- Yasumoto T., Underdal B., Aune T., Hormazabal V., Skulberg O. M., and Oshima Y., 1990: Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polylepis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters. in "Toxic Marine Phytoplankton" (ed. by Granéli E., Sundström B., Edler L., and Anderson D. M.) Elsevier, New York, pp.436-440.
- Yokote M., Honjo T., and Asakawa M., 1985: Histochemical demonstration of a glycocalyx on the cell surface of *Heterosigma akashiwo*. *Mar. Biol.*, **88**, 295-299.
- Yokote M. and Honjo T., 1985: Morphological and histochemical demonstration of a glycocalyx on the cell surface of *Chattonella antiqua*, a "naked flagellate". *Experientia*, **41**, 1143-1145.
- 吉田雄一, 宮本政秀, 1995: 1994年に楠浦湾に発生した *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の消長と日周変化について. 熊本水研センター研報, **3**, 31-35.
- Yoshinaga I., Kawai T., Takeuchi T., and Ishida Y., 1995: Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe Bay (Wakayama Pref., Japan) *Fish. Sci.*, **61**(5), 780-786.