

リン制限下における *Alexandrium catenella* の 増殖の動力学および麻痺性貝毒生産

松田 篤志,^{a*} 故西島 敏隆, 深見 公雄,^b 足立真佐雄

(2005年7月26日受付, 2005年10月18日受理)

高知大学農学部栽培漁業学科

Growth kinetics and paralytic shellfish poisoning toxin production
in phosphorus-limited cultures of *Alexandrium catenella*

ATSUSHI MATSUDA,^{a*} THE LATE TOSHITAKA NISHIJIMA,
KIMIO FUKAMI,^b AND MASAO ADACHI

Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

The effects of phosphorus deficiency on the growth and PSP toxin production by an axenic clone culture of *Alexandrium catenella* TNY7 were examined under semi-continuous culture conditions.

The specific growth rate (μ) diminished with decreasing cell quota for phosphorus (Q_P). The relationship between μ and Q_P was described by the Droop equation. The calculated maximum specific growth rate and minimum cell quota for phosphorus were 0.79day^{-1} and 0.28 pmol/cell , respectively. Toxin content per cell increased with decreasing specific growth rate. When phosphorus limitation in the cells was the most severe, the highest toxin content per cell (92.3 fmol/cell) was obtained. The highest toxin content per cell was approximately 4 to 6 times higher than in nutrient sufficient conditions and 22 times higher than in nitrogen deficient conditions. Toxin composition and ratio remained constant independent of specific growth rate and phosphorus limitation in the cells.

Phosphorus limitation is one of the most important environmental factors which increase the total toxin per cell of *A. catenella*. Phosphorus limited cells of *A. catenella* may have some effect on increase in toxin content of shellfish in natural waters.

キーワード: *Alexandrium*, 渦鞭毛藻, 細胞内リン含量, 毒組成, 毒量, 比増殖速度, 麻痺性貝毒

Alexandrium catenella は、麻痺性貝毒と呼ばれる強力な神経毒を生産する有毒渦鞭毛藻であり、本藻を摂取した二枚貝などを毒化させることがある。¹⁾ 本藻による貝類の毒化は世界的規模で多発化・広域化しており、水産増養殖上並びに公衆衛生上大きな問題となっている。^{2,3)} 本藻は日本国内では沿岸域に広く分布しており、⁴⁾ 貝類の毒化だけでなく赤潮を引き起こすこともあることから、赤潮原因種としても重要である。⁵⁾

現場海域では、多種多様な生物が限りある栄養塩の利用をめぐる競争しており、本藻も栄養塩が制限された条件下で生存・増殖し、麻痺性貝毒を生産しているもの

と考えられる。本藻の現場海域での増殖および貝類の毒化機構を解明するためには、モニタリング調査とともに培養試験により本藻の栄養塩制限状態下での増殖生理特性ならびに麻痺性貝毒生産特性を明らかにする必要がある。

Alexandrium 属プランクトンの麻痺性貝毒生産特性については、これまでに水温、照度、塩分、栄養塩濃度等の環境要因により細胞内毒量に変化することが分かっている。⁶⁻¹¹⁾ 特に、リン源が制限された培養液で増殖した細胞は、単位細胞あたりの毒量が高くなることが *Alexandrium fundyense*,¹²⁾ *Alexandrium tamarense* (=Pro-

* Tel : 81-96-328-2111. Fax : 81-96-359-3926. Email : matsuda.atsushi@city.kumamoto.lg.jp

^a 現所属 : 熊本市役所 (Kumamoto City Office, Tetorihoncho, Kumamoto 860-8601, Japan)

^b 現所属 : 高知大学大学院黒潮圏海洋科学研究科 (Graduate School of Kuroshio Science, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan)

togonyaulax tamarensis),¹³⁾ *Alexandrium minutum*^{14,15)}で報告されている。しかしながら, *A. catenella* のリン制限下での麻痺性貝毒生産特性については全く明らかにされていない。

そこで, 本研究ではリン制限下で半連続培養試験を行い, 本藻の細胞内リン含量と比増殖速度との関係, リン制限と細胞内の麻痺性貝毒量との関係を明らかにすることを目的とした。また, 半連続培養系を閉鎖性内湾域での基本増殖モデルととらえ, リン制限下での本藻の細胞密度, 細胞内の麻痺性貝毒量, 培養容器内の麻痺性貝毒量から, リン制限が現場海域中の麻痺性貝毒量ならびに貝類毒化に及ぼす影響について考察した。

材料および方法

供試株 実験には京都大学大学院 左子芳彦氏らが1987年に和歌山県田辺湾の底泥中のシストを発芽させ, これより分離した *Alexandrium catenella* TNY7 (無菌クローン株) を用いた。

培養条件 全ての培養試験は, 本藻の増殖に適した物理環境条件下¹⁶⁾ (温度 20°C, 光強度 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 明暗周期 14 h 明 : 10 h 暗 (6 : 00 点灯, 20 : 00 消灯)) で行った。試験中の無菌状態は FeTY,¹⁷⁾ ST10⁰, ST10⁻⁴¹⁸⁾ 培地を用いた培養試験および DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) 染色による直接観察法¹⁹⁾ により確認した。

半連続培養 metals mix SW II 培地¹⁶⁾ で増殖させた本藻を, リン制限 (窒素 : 87.8 μM , リン : 0.4 μM , N/P 比 219.5) となるように調製した metals mix SW II 培地 (リン制限 metals mix SW II 培地) が 1.5 L 入った 3L 容三角フラスコに接種し, 10 日間, 前培養としてバッチ培養を行った。その後, 300 mL 容三角フラスコ 7 本に 200 mL ずつ分注し, それぞれ希釈率 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 にて半連続培養^{20,21)} を行った。

比増殖速度 (μ) と希釈率 (D) の関係は, 希釈により細胞密度 (N_0) が $N_0(1-D)$ まで減少したのが比増殖速度 (μ) で指数的に増殖することで翌日の希釈時間には N_0 まで回復することから,

$$N_0(1-D)e^{\mu} = N_0$$

で表すことができる。上式より,

$$\mu = -\ln(1-D)$$

が導かれ, この式^{20,21)} を用いて希釈率から比増殖速度を求めた。

対数増殖期にある *A. catenella* TNY7 を上記と同じ明暗周期, 物理環境条件下で培養 (バッチ培養系, 栄養塩類が十分な条件下) し, 細胞密度の変化を観察した結果, 本藻の細胞分裂は 2 : 00 から 11 : 00 の間に集中することが分かっている。この結果を基に, 本半連続培養試験における希釈時間は細胞分裂終了後の 11 : 00 ~

12 : 00, 細胞内のリン・窒素含量, 細胞長径および短径の測定, 細胞内毒量の分析および細胞密度の計数のための試料採取は細胞分裂直前の 0 : 00 ~ 1 : 00 に行うこととした。

細胞分裂が終了した一定時刻 (11 : 00 ~ 12 : 00) に毎日, 各フラスコから希釈率に応じた量 (200 $\times D$ mL) の培養液を抜き取り, 等量の新鮮なリン制限 metals mix SW II 培地を添加した。抜き取るあるいは添加する培地の量は, 電子天秤を用いて重量を測定することにより確認した。抜き取った培養液中の細胞密度は, 界線入りスライドグラスを用いて倒立顕微鏡下で直接計数法により計数した。

細胞密度の変動が $\pm 5\%$ の誤差範囲内に収まった時に, 培養系が定常状態に達したと判断し, 細胞分裂直前の時刻 (0 : 00 ~ 1 : 00) に試料を採取し, 細胞内のリン含量, 窒素含量, 倒立顕微鏡 (倍率 600 倍) による細胞長径および短径の測定 (30 細胞以上の測定値の平均を長径 (a) および短径 (b) とした), 細胞内毒量の分析および細胞密度の計数に供した。なお, 細胞内リン・窒素含量 (Q_P, Q_N) は, 添加培養液中の溶存態無機リン・窒素濃度 (S_{0P}, S_{0N}) と定常状態下での細胞分裂直前の培養液中溶存態無機リン・窒素濃度 (S_P, S_N) および細胞密度 (N) から, 以下の(1)式を用いて計算した。定常状態下での細胞分裂直前の栄養塩濃度 (S_P, S_N) は, 450°C で 1 時間燃焼した GF/C ガラスファイバーフィルター (Whatman 社) で培養液を濾過した後, Strickland and Parsons²²⁾ の方法に準じて TRAACS 800 (BLAN + LUEBBE 社) により測定した。

$$Q = (S_0 - S) / N \quad (1)$$

比増殖速度 (μ) と細胞分裂直前の細胞内リン含量 (Q_P) との関係は以下の Droop の関係式(2)²³⁾ で示す双曲線で記述することができた (Fig. 1)。

$$\mu = \mu_m (1 - q_0 P / Q_P) \quad (2)$$

ここで, μ は比増殖速度 (day^{-1}), $q_0 P$ は最小細胞内リン含量 (pmol/cell), Q_P は細胞内リン含量 (pmol/cell), μ_m は Q_P が無限大にあるときの比増殖速度 (= 最大比増殖速度) (day^{-1}) を示している。(2)式から反復計算アルゴリズム (Levenberg-Marquardt 法²⁴⁾) により最大比増殖速度 (μ_m) 及び最小細胞内リン含量 ($q_0 P$) を算出した。

細胞体積 (V) は, 細胞を回転楕円体と仮定して長径 (a) および短径 (b) を測定し, 次式(3)により求めた。

$$V = 4/3 \cdot \pi \cdot (a/2)^2 \cdot (b/2) \quad (3)$$

麻痺性貝毒の分析 細胞内の麻痺性貝毒分析のため, 細胞分裂直前の時刻 (0 : 00 ~ 1 : 00) に細胞を集藻し, 0.05 M 酢酸を加え超音波破碎により細胞内の麻痺性貝毒を抽出した後,²⁵⁾ 蛍光-HPLC (L-6200 pump, F-1050 fluoromonitor, Hitachi 社), Wakosil 5C8 カラム

($\phi 4.6 \times 250$ mm, 和光社) を用いて麻痺性貝毒の種類と量を分析した。²⁶⁾ 藻 1 細胞中に含まれるすべての麻痺性貝毒成分の和を単位細胞あたりの総毒量 (fmol/cell) とした。また, これを細胞体積 (V) で除することにより単位細胞体積あたりの総毒量 ($\text{amol}/\mu\text{m}^3$) を求めた。

培養容器内の総毒量 培地 200 mL の入った培養容器内の本藻の総毒量は, 定常状態下での細胞分裂直前の培養容器内の細胞数と, 上記の方法により測定された単位細胞あたりの総毒量との積により求めた。

結 果

半連続培養 細胞密度は, 希釈開始から 16 日後には全ての希釈率において定常に達した。定常状態での希釈後の細胞密度は 1,400 cells/mL ($D=0.05$) から 700 cells/mL ($D=0.30$) の範囲内にあった (Table 1)。細胞内リン含量は, 0.29 pmol/cell (比増殖速度 0.05 day^{-1}) から 0.57 pmol/cell (比増殖速度 0.37 day^{-1}) の範囲内にあった (Table 1)。比増殖速度 (μ) は, 細胞分裂直前の細胞内リン含量 (Q_P) が增大するにつれて速くなり, 両者を Droop の式 (2) に当てはめたところ, 最小細胞内リン含量は 0.28 pmol/cell, 最大比増殖速度は 0.79 day^{-1} と計算された (Fig. 1)。

単位細胞当たりの細胞内窒素含量 (pmol/cell) は, 比増殖速度 (day^{-1}) が遅くなるにつれてやや増加する傾向が見られたが, 大差はなく, 16.0~21.3 pmol/cell の範囲内にあった (Table 1)。

リン制限下での本藻の平均細胞径は, 長径は 32.6~35.6 μm , 短径は 30.9~33.0 μm の範囲内にあった (Fig. 2)。長径, 短径ともに比増殖速度 0.05 day^{-1} で, それぞれ $35.6 \pm 2.4 \mu\text{m}$, $33.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$ と最も大きくなった。

麻痺性貝毒の分析 単位細胞あたりの総毒量は, 比増殖速度 0.43 day^{-1} において 36.8 fmol/cell であったが, 比増殖速度が低くなるにつれて上昇し, 比増殖速度 0.11 day^{-1} の時に 92.3 fmol/cell, 0.05 day^{-1} の場合で

は 84.9 fmol/cell であった (Fig. 3)。単位細胞体積あたりの総毒量についても同様に, 比増殖速度 0.43 day^{-1} で 1.93 $\text{amol}/\mu\text{m}^3$ であったのが, 比増殖速度の低下とともに増大し, 比増殖速度 0.11 day^{-1} で 4.73 $\text{amol}/\mu\text{m}^3$, 0.05 day^{-1} では 3.88 $\text{amol}/\mu\text{m}^3$ となった (Fig. 4)。

細胞内の毒成分の種類, 毒成分の構成比 (mol%) は, 比増殖速度, リン制限の程度に関わらずほぼ一定であった (Fig. 5)。主要な毒成分として GTX5 (46.7~60.5 mol%) と C1+C2 (29.3~35.6 mol%) を含んでおり, 微量成分として GTX1+4 (4.7~12.0 mol%), C4 (1.5~4.9 mol%) および STX (0.1~0.3 mol%) を含んでいた (Fig. 5)。また, neoSTX (0~0.1 mol%) あるいは

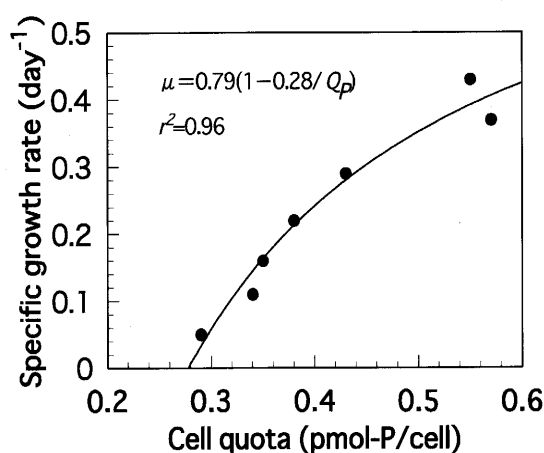


Fig. 1 Relationship between specific growth rate (day^{-1}) and cell quota for phosphorus (pmol-P/cell) of *A. catenella* in phosphorus-limited, semi-continuous cultures (line is the fitted curve using Equation (2)). Maximum growth rate (μ_m) and minimum cell quota for phosphorus (q_0P) were calculated to be 0.79 day^{-1} and 0.28 pmol/cell, respectively.

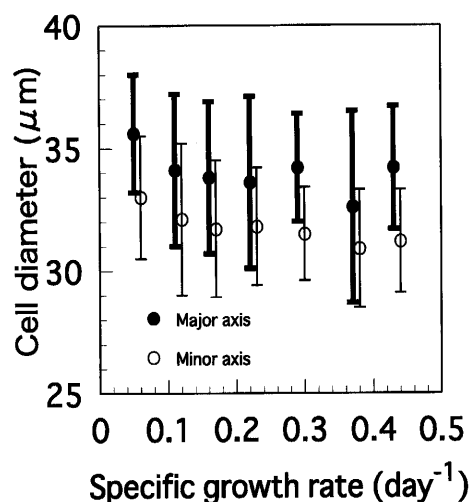


Fig. 2 Mean cell diameter (μm) of *A. catenella* in phosphorus-limited, semi-continuous cultures. Closed and open circles indicate major axis and minor axis, respectively. Bars represent the SD.

Table 1 Cell density after dilution, cell quota for phosphorus and cell quota for nitrogen of *A. catenella* under phosphorus-limited steady state

Dilution rate (day^{-1})	Specific growth rate (day^{-1})	Cell density after dilution (cells/mL)	Cell quota for phosphorus (pmol/cell)	Cell quota for nitrogen (pmol/cell)
0.05	0.05	1400	0.29	21.3
0.10	0.11	1180	0.34	16.0
0.15	0.16	1140	0.35	19.0
0.20	0.22	1040	0.38	17.4
0.25	0.29	940	0.43	17.2
0.30	0.37	700	0.57	17.0
0.35	0.43	720	0.55	16.3

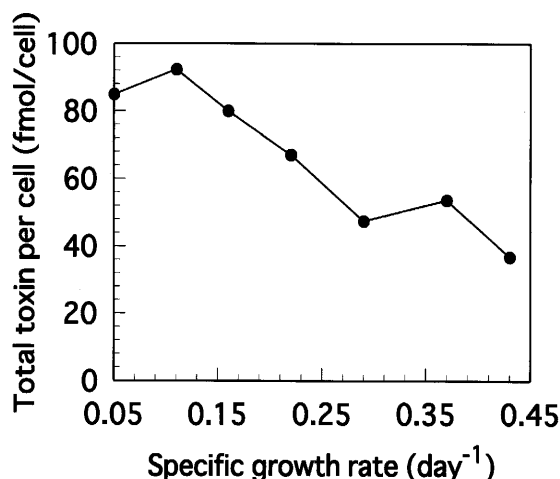


Fig. 3 Total toxin per cell (fmol/cell) of *A. catenella* as a function of specific growth rate (day^{-1}) in phosphorus-limited, semi-continuous cultures.

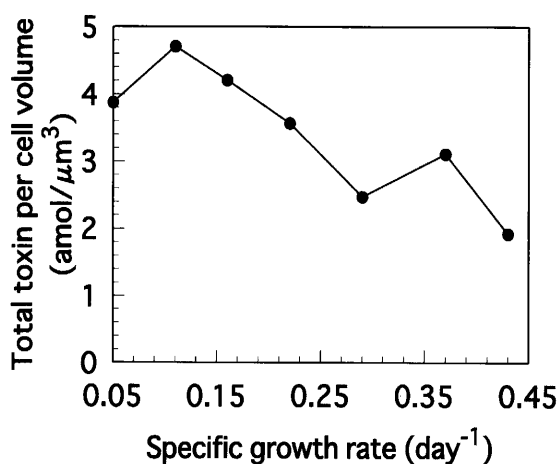


Fig. 4 Total toxin per cell ($\text{amol}/\mu\text{m}^3$) of *A. catenella* as a function of specific growth rate (day^{-1}) in phosphorus-limited, semi-continuous cultures.

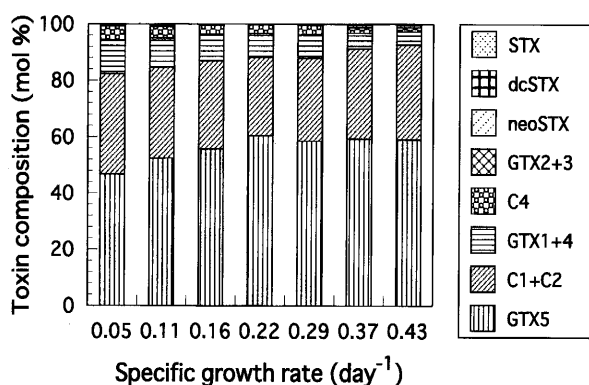


Fig. 5 Changes in toxin composition (mol%) of *A. catenella* as a function of specific growth rate (day^{-1}) in phosphorus-limited, semi-continuous cultures.

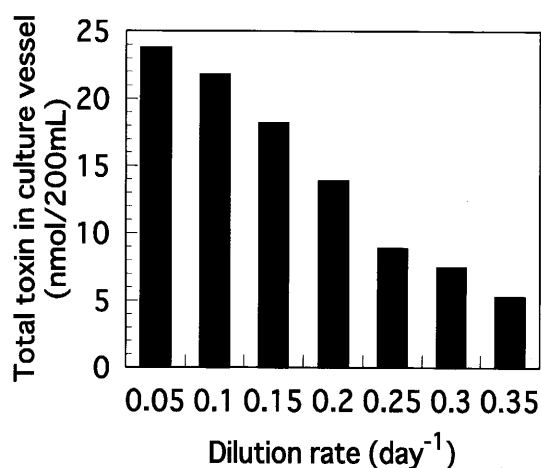


Fig. 6 Total toxin in culture vessel ($\text{nmol}/200\text{mL}$) of *A. catenella* as a function of dilution rate (day^{-1}) in phosphorus-limited, semi-continuous cultures.

は dcSTX (0~0.1 mol%) はほとんど検出されなかった (Fig. 5)。

培養容器内の総毒量 培地 200 mL の入った培養容器内の総毒量は、希釈率 0.35 day^{-1} において $5.3 \text{ nmol}/200 \text{ mL}$ であったが、希釈率が低くなるにつれて増大し、希釈率 0.05 day^{-1} で $23.8 \text{ nmol}/200 \text{ mL}$ となった (Fig. 6)。

考 察

細胞内リン含量が増大するにつれて比増殖速度は高くなる傾向が得られ、Droop の式²³⁾ で示す関係が両者に見られたことから (Fig. 1), 希釈率 (D) が低いときに (つまり、栄養塩供給速度が低いとき)、細胞は厳しいリン制限下にあることが強く示唆された。

最小細胞内窒素含量と最小細胞内リン含量との比は、増殖にとって最適な N:P 比とみなされ、これを境に栄養塩制限が窒素制限からリン制限、あるいは、その逆に変化すると考えられる。²⁷⁾ 今回の試験により得られた最小細胞内リン含量 ($0.28 \text{ pmol}/\text{cell}$) 及び、これまでに半連続培養試験で明らかにされた本藻の最小細胞内窒素含量 ($6.99 \text{ pmol}/\text{cell}$)¹⁶⁾ をもとに本藻の最適 N:P 比を計算すると、25.0 と算出された。今回の試験での細胞内 N:P 比を算出したところ、比増殖速度 0.43 day^{-1} で 29.6 と最も低く、比増殖速度が速くなるにつれて上昇し、比増殖速度 0.05 day^{-1} で 73.4 と最も高くなった。このことから、本実験条件下では、全ての条件下で細胞内はリンのみが制限となっていたと考えられる。

これまでに、半連続培養で求めた最小細胞内含量は、バッチ培養系で最大細胞収量と栄養塩濃度との関係から求めた値よりも低いことが報告されている。²⁸⁾ 今回、半連続培養系で得られた本藻の最小細胞内リン含量 ($0.28 \text{ pmol}/\text{cell}$) は、これまでの報告²⁸⁾ と同様、バッチ培養

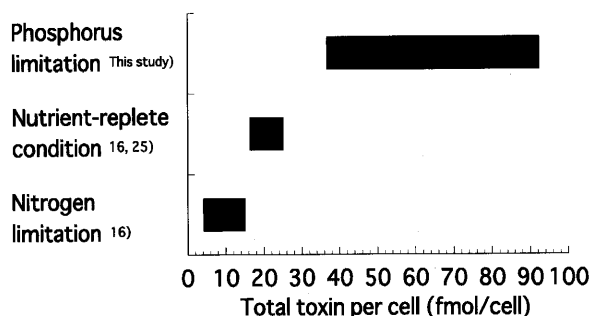


Fig. 7 Effects of nutrient condition on total toxin per cell (fmol/cell) of *A. catenella* TNY7.

系で推算された値 (0.32 pmol/cell)²⁹⁾よりもやや低く、また大差はないことから、信頼できる値と考えられる。

今回の試験で得られた本藻の最小細胞内リン含量 (0.28 pmol/cell) 及び最大比増殖速度 (0.77 day⁻¹) は、同じ *Alexandrium* 属である *Alexandrium tamarense* 三河湾株の 0.59 pmol/cell, 0.44 day⁻¹,³⁰⁾ 広島湾株の 0.56 pmol/cell, 0.54 day⁻¹³¹⁾ と比較して、最小細胞内リン含量は小さく、最大比増殖速度は大きかった。このことから、本藻は *A. tamarense* よりも低い細胞内リン含量で速く増殖できると考えられる。

本藻の単位細胞あたりの総毒量は、リン制限が厳しい条件下においてより高くなることがわかった。これは、*A. fundyense*,¹²⁾ *A. tamarense*¹³⁾ あるいは *A. minutum*^{14,15)} がリン制限下において単位細胞内の総毒量が高くなったとの報告と一致するものであった。

細胞内のリン制限が厳しいことが示唆された低比増殖速度下の細胞で得られた、最も高い単位細胞あたりの総毒量 (92.3 fmol/cell) は、本試験で用いた株と同一株 (*A. catenella* TNY7) を厳しい窒素制限下 (半連続培養系, 窒素: 11.8 μM, リン: 69.5 μM, 比増殖速度: 0.051 day⁻¹) で培養したときの細胞分裂直前の細胞内の総毒量 (4.23 fmol/cell)¹⁶⁾ と比較して約 22 倍高いことが明らかになった (Fig. 7)。また、*A. catenella* TNY7 を栄養塩類が十分に存在する条件下 (バッチ培養系, 対数増殖期中期) で培養したときの明期開始から 7~8 時間後の細胞内の総毒量 (16.45~25.04 fmol/cell)^{16,25)} と比較して約 4~6 倍高いことが分かった (Fig. 7)。

A. tamarense を明暗周期下で培養すると、単位細胞あたりの総毒量は明期から暗期にかけて増加し、細胞分裂の起こる暗期の半ばから終わりにかけて急激に減少したとの報告がある。³³⁾ このことから、明暗周期下で半連続培養を行い定常状態にある *A. catenella* TNY7 の細胞内の総毒量についても同様に、細胞分裂直後付近で最も低く、その後、増加傾向で推移し、細胞分裂直前付近で最も高くなると考えられる。このことから、同一株を異な

る培養条件下で培養したときの単位細胞あたりの総毒量を比較する場合、総毒量の分析に用いた細胞の集藻時刻の違いにより細胞内の総毒量に差が出ることをないように集藻時刻を統一することが望ましい。しかし、本試験では細胞分裂直前の細胞を集藻・分析しており、明期開始から 7~8 時間後に集藻・分析を行ったこれまでの栄養塩十分条件下での試験^{16,25)}とは異なっている。本試験で細胞分裂直前の細胞を集藻し分析に用いた理由は、細胞内リン・窒素含量については明暗周期下で最も高くなる細胞分裂直前の値を求めることとしたことから、細胞内の麻痺性貝毒の分析も細胞内リン・窒素含量との関係を知るためにこれに合わせることとしたためである。栄養塩類が十分な条件下で対数増殖期にある、細胞分裂直前の細胞内の総毒量は、これまでに報告されている明期開始から 7~8 時間経過後の総毒量 (16.45~25.04 fmol/cell)^{16,25)}よりも高くなると予想される。しかし、本試験において、比増殖速度が高くなり、細胞内のリン制限が緩やかで栄養塩類が十分条件下により近づくにつれて細胞内の総毒量は減少傾向にあったことから (Fig. 3), 栄養塩類十分条件下で対数増殖期にある本藻の、細胞分裂直前の細胞内の総毒量が、本試験で明らかになったリン制限下の総毒量を超えることはないと考えられる。よって、細胞分裂直前の細胞内の総毒量同士を比較しても、本藻の細胞内の総毒量は、栄養塩類が十分な条件下で対数増殖期にある細胞よりも、リン制限下にある細胞で高くなると推察される。

リン制限下での本藻の平均細胞径は、細胞内のリン制限が厳しい条件下にてやや大きくなる傾向がみられた (Fig. 2)。また、本藻の窒素制限下での細胞径¹⁶⁾と比較して、リン制限下では細胞径が大きくなることも明らかになった。リン制限下で細胞体積が増大することは、他の渦鞭毛藻 (*Karenia mikimotoi* (= *Gymnodinium mikimotoi*),³²⁾ *Alexandrium tamarense*,¹³⁾ *Alexandrium minutum*¹⁵⁾)でも報告されており、本藻の細胞体積の増大は、リン制限下の渦鞭毛藻で一般的に観察される現象によるものと思われる。

リン制限下での細胞体積の変化を考慮し、本藻の単位細胞体積あたりの総毒量 (amol/μm³) を算出したところ、最大で 4.73 amol/μm³であったが、これは栄養塩類が十分ある条件下 (バッチ培養系, 対数増殖期中期) の 2.66 amol/μm³ (未発表), 窒素制限下 (半連続培養系, 比増殖速度 0.051 day⁻¹) で得られた 0.45 amol/μm³ (未発表) より大きいことが明らかになった。このことから、リン制限下で単位細胞あたりの総毒量が高くなったのは、細胞体積が増大したことに加え、単位体積あたりの総毒量が増大したためと考えられた。

本藻のリン制限下での毒成分組成は全ての条件下ではほぼ一定であり、主要成分が GTX5, C1+C2, 微量成分

が GTX1+4 であったが (Fig. 5), これらは, 栄養塩類が十分にある条件下あるいは窒素制限下での毒成分・毒組成比とはほぼ一致するものであった。^{16,25)} このことから, *A. catenella* TNY7 の毒成分及び毒組成比は, リン制限の程度に関わらずほぼ一定で, 安定的であることが明らかになった。*Alexandrium* 属の毒成分・毒組成比については, 比較的安定であるとの報告がこれまでに多数あり,^{9,10,13,33-35)} 今回の結果はこれらの報告と一致するものであった。

麻痺性貝毒の成分は, それぞれ比毒性 (MU/ μ mol) が異なるため,³⁶⁾ 総毒量が同じでも毒成分や毒組成比が違えば, 単位細胞あたりの毒力 (MU/cell) は異なることがあると考えられる。しかし, 今回の試験の場合, 本藻の毒成分・毒組成比は, 細胞内リン含量, 増殖速度に関わらずほぼ一定であったことから, 単位細胞あたりの毒力 (MU/cell) についても総毒量 (fmol/cell) とほぼ同様に, 細胞内のリン制限が厳しくなるにつれて上昇すると考えられる。各毒成分の比毒性 (MU/ μ mol)³⁶⁾ をもとに, 総毒量 (fmol/cell) から単位細胞あたりの毒力 (MU/cell) を推算したところ, 細胞内のリン制限が厳しい比増殖速度 $0.05\sim 0.11 \text{ day}^{-1}$ (総毒量 $84.9\sim 92.3 \text{ fmol/cell}$) の時 $3.43\sim 3.49 \times 10^{-5} \text{ MU/cell}$, また, リン制限が緩やかで比増殖速度が 0.43 day^{-1} (総毒量 36.8 fmol/cell) の時に $1.06 \times 10^{-5} \text{ MU/cell}$ と算出された。厚生省通知 (昭和 55 年 7 月 1 日付環乳第 29 号) による規制値 (可食部 1 g あたりの毒量が 4MU) を越える量の麻痺性貝毒が二枚貝に蓄積されるためには, 細胞内のリン制限が厳しい本藻の細胞数にして, 貝類の可食部 1 g あたり $1.15\sim 1.17 \times 10^5$ 細胞以上が二枚貝に供給される必要があると推算された。

本実験で用いた半連続培養を, 競合するプランクトン, 本藻を捕食する生物の全くいない閉鎖性内湾域での本藻の増殖を単純にモデル化した実験装置とすれば, 培養容器 (=フラスコ) は閉鎖性内湾域, 培養容器内の培養液の抜き取りは湾内海水の湾外への流出, 培養容器内への新鮮な培養液の添加は湾内への栄養物質の供給, 希釈率は湾内の海水交換率に置き換えることができる。本試験では, 細胞密度が高く, また, 単位細胞あたりの総毒量が大きかった低希釈率の培養容器で容器内の麻痺性貝毒量も最も多くなった (Fig. 6)。このことから, 現場海域においても, 本試験での低希釈率の培養容器内と同じように, リンが本藻の制限栄養塩となっており, 本藻への単位時間あたりのリン供給量が小さく, 同時に, 単位時間あたりに海域から除去される細胞数が少ない状態のときに, 海域中の二枚貝に供給可能な麻痺性貝毒量が増大する可能性がある。

湾内に二枚貝に供給可能な麻痺性貝毒量が多く存在するとき, 二枚貝に供給される麻痺性貝毒量も多くなり,

二枚貝に蓄積される毒量も増大するあるいは高い蓄積量が維持されることが期待される。しかし, 本試験結果は, あくまでも他のプランクトンの影響や二枚貝により摂食, 蓄積される麻痺性貝毒量が全く考慮されていない, 極めて単純なモデル系での本藻の細胞密度, 単位細胞あたりの総毒量, 培養容器内の麻痺性貝毒量の変動でしかない。今後さらに, 現場モニタリング調査や本半連続培養試験のようなモデル実験系を通じて, 二枚貝による摂食の影響が加わった場合, 現場海域あるいは培養容器内の本藻細胞密度, 単位細胞あたりの総毒量, 細胞内リン含量さらに二枚貝の摂食量 (二枚貝に供給された本藻細胞数), 二枚貝に蓄積される麻痺性貝毒量がどのように変動するのか確認する必要があると思われる。仮に, 本藻の半連続培養系に二枚貝が加わった場合を考えると, 本藻については, 二枚貝の摂食により除去される本藻の細胞数が増えることから, 培養容器内の本藻細胞密度は二枚貝が共存しない場合と比べて減少することが予想される。そして, 希釈率 (培養容器内へのリン供給量) に変化がなければ, 細胞密度が減少することにより本藻 1 細胞あたりのリン供給量が多くなり本藻の細胞内リン含量が上昇, 細胞内のリン制限状態が緩くなることで単位細胞あたりの総毒量は二枚貝が共存しない場合よりも低下することが予想される。

現場海域での貝類毒化の程度は, 原因プランクトンの一種である本藻の現場細胞密度とは必ずしも一致しないことが報告されている。³⁷⁾ このようなことが起こる原因としては, 二枚貝自身の摂餌量・代謝の変化,³⁹⁾ 餌選択性,⁴⁰⁾ 濾水量の違いや, 細菌類等の本藻以外の麻痺性貝毒生産生物^{40,41)} の影響, 生息海域の海水交換速度の影響, 本藻の株間で麻痺性貝毒量に差があること,⁴²⁾ その他様々なことが考えられるが, 現場の本藻細胞密度から二枚貝が摂食した本藻細胞数を正確に推測できないこと及び麻痺性貝毒生産プランクトンである本藻の毒量が環境条件により大きく変動し, 今回の試験で明らかになったように特に細胞内がリン制限状態にあるとき単位細胞あたりの総毒量が高くなることもその原因の一つであると考えられる。二枚貝に蓄積される本藻由来の麻痺性貝毒量は, 二枚貝に供給された本藻の細胞数とその単位細胞あたりの総毒量に影響されると思われる。本藻が二枚貝の毒化に及ぼす影響, 毒化機構をより正確に捉えるためには, 現場海域, 室内実験いずれにおいても単位細胞あたりの総毒量が物理・化学環境要因等により変動することを考慮して, 本藻の単位細胞あたりの総毒量を経時的・連続的に測定すること, ならびに, 二枚貝に供給された本藻の細胞数を押さえる必要があると思われる。

今回の実験から, 本藻は細胞内がリン制限状態となると窒素制限下, 栄養塩類十分な条件下よりも単位細胞あたりの総毒量が高くなることが明らかになった。また,

本藻が貝類毒化に及ぼす影響をより正確に解明・予見するためには、二枚貝に供給されたあるいは供給可能な本藻の単位細胞あたりの総毒量ならびにその細胞数を調べる事が重要であると考えられた。本半連続培養試験では、低希釈率の培養容器内で単位細胞あたりの総毒量が大きく、また、細胞密度が高くなったことから、現場海域中においても同様の環境条件下において二枚貝に供給可能な麻痺性貝毒量が高くなる可能性がある。本試験の低希釈率の培養容器内と同じような、リンが本藻の増殖を制限する栄養塩となっており、同時に、単位時間あたりに海域から除去される細胞数が少なくなる環境条件は、本藻による貝類毒化を考える上で注目すべき環境条件の一つであることが明らかになった。リン制限状態は、本藻の細胞内総毒量を上昇させる環境因子の一つとして重要であり、同一海域に生息する二枚貝に蓄積される麻痺性貝毒量の増大・変動に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。現場海域で生存・増殖している本藻の細胞内リン含量を測定するなど、本藻のリン制限の状態を調べることも、本藻の出現・増殖ならびに貝類毒化機構を解明・予見する上で必要であると思われる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、*Alexandrium catenella* の無菌・クローン株を分譲いただきますとともに、HPLC—蛍光分析による麻痺性貝毒の分析法をご指導いただきました京都大学名誉教授 石田祐三郎先生、京都大学大学院農学研究科 左子芳彦先生に心より感謝いたします。また、麻痺性貝毒の標準物質をご提供いただきました東北大学大学院生命科学研究所 大島泰克先生、東北大学名誉教授 安元 健先生に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Sekiguchi K, Ogata T, Kaga S, Yoshida M, Fukuyo Y, Kodama M. Accumulation of paralytic shellfish toxins in the scallop *Patinopecten yessoensis* caused by the dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Otsuchi Bay, Iwate prefecture, northern Pacific coast of Japan. *Fisheries Sci.* 2001; **67**: 1157–1162.
- 2) Hallegraeff GF. A review of harmful blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 1993; **32**: 79–99.
- 3) 宮沢啓輔. 日本における最近の貝毒発生状況. 日水誌 1994; **60**: 683–684.
- 4) 福代康夫. 6・5 アレキサンドリウム. 「赤潮の科学 (第2版)」(岡市友利編) 恒星社厚生閣, 東京. 1997; 278–283.
- 5) 坂本節子, 長崎慶三, 松山幸彦, 小谷祐一. 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 1999; **1**: 55–61.
- 6) White AW. Salinity effects on growth and toxin content of *Gonyaulax excavata*, a marine dinoflagellate causing paralytic shellfish poisoning. *J. Phycol.* 1978; **14**: 475–479.
- 7) Ogata T, Kodama M, Ishimaru T. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxin production of toxic dinoflagellates. In: Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T (eds). *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier, New York. 1989; 423–426.
- 8) Anderson DM, Kulis DM, Sullivan JJ, Hall S, Lee C. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp.. *Mar. Biol.* 1990; **104**: 511–524.
- 9) Ogata T, Ishimaru T, Kodama M. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* 1987; **95**: 217–220.
- 10) Parkhill JP, Cembella AD. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* from northeastern Canada. *J. Plankton Res.* 1999; **21**: 939–955.
- 11) Hamasaki K, Horie M, Tokimitsu S, Toda T, Taguchi S. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* isolated from Hiroshima Bay, western Japan, as a reflection of changing environmental conditions. *J. Plankton Res.* 2001; **23**: 271–278.
- 12) Anderson DM, Kulis DM, Sullivan JJ, Hall S. Toxin composition variation in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Toxicon* 1990; **28**: 885–893.
- 13) Boyer GL, Sullivan JJ, Andersen RJ, Harrison PJ, Taylor FJR. Effect of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* 1987; **96**: 123–128.
- 14) Lippemeier S, Frampton DMF, Blackburn SI, Geier SC, Negri AP. Influence of phosphorus limitation on toxicity and photosynthesis of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) monitored by in-line detection of variable chlorophyll fluorescence. *J. Phycol.* 2003; **38**: 320–331.
- 15) Maestrini SY, Bechemin C, Grzebyk D, Hummert C. Phosphorus limitation might promote more toxin content in the marine invader dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Plankton Biol. Ecol.* 2000; **47**: 7–11.
- 16) Matsuda A, Nishijima T, Fukami K. Effects of nitrogen deficiency on the PSP production by *Alexandrium catenella* under axenic cultures. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (eds). *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, 1996; 305–308.
- 17) Fukami K, Nishijima T, Hata Y. Availability of deep seawater and effect of bacteria isolated from deep sea water on mass culture of food microalga *Cheatocecos ceratosporum*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; **58**: 931–936.
- 18) Ishida Y, Eguchi M, Inoue H. Existence of obligately oligotrophic bacteria as a dominant population in the South China Sea and the West Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1986; **30**: 197–203.
- 19) Porter KG, Feig YS. The use DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 1980; **25**: 943–948.
- 20) Tilman D, Kilham SS. Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the Diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semicontinuous culture. *J. Phycol.* 1976; **12**: 375–383.
- 21) Nakamura Y. Kinetics of Nitrogen- or Phosphorous-limited growth and effects of growth conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Japan* 1985; **41**: 381–387.

- 22) Strickland JDH, Parsons TR. *A practical handbook of Seawater Analysis*. Bull. Fish. Res. Bd. Canada, Ottawa. 1972; 1-310.
- 23) Droop MR. Vitamin B₁₂ and marine ecology: the response of *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 1968; **46**: 659-671.
- 24) Press WH, Teukolsky A, Vetterling WT, Flannery BP. 「ニューメリカルレシピ・イン・シー: C言語による数値計算のレシピ」(丹慶勝市他訳) 技術評論社, 東京. 1993; 505-510.
- 25) Sako Y, Kim CH, Ishida Y. Mendelian inheritance of paralytic shellfish poisoning toxin in the marine dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992; **56**: 692-694.
- 26) Oshima Y, Sugino K, Yasumoto T. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. In: Natori S, Hashimoto K, Ueno Y (eds). *Mycotoxins and Phycotoxins '88*, Elsevier, New York. 1989; 319-326.
- 27) Rhee GY. Effects of N: P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnol. Oceanogr.* 1978; **23**: 10-25.
- 28) 中村泰男. 窒素あるいはリン制限下における *Chattonella antiqua* の増殖の動力学. 国立公害研究所報告 1985; **80**: 73-83.
- 29) 松田篤志, 西島敏隆, 深見公雄. 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* の増殖に及ぼす窒素・リン栄養塩の影響. 日水誌 1999; **65**: 847-855.
- 30) Yamamoto T, Tarutani K. Growth and phosphate uptake kinetics of *Alexandrium tamarense* from Mikawa Bay, Japan. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (eds). *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris. 1996; 293-296.
- 31) 樽谷賢治. 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖機構に関する生理生態学的研究. 瀬戸内水研報 1999; **1**: 63-96.
- 32) Yamaguchi M, Itakura S. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of noxious red tide dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*. *Fisheries Sci.* 1999; **65**: 367-373.
- 33) Kim CH, Sako Y, Ishida Y. Variation of toxin production and composition in axenic cultures of *Alexandrium catenella* and *A. tamarense*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 633-639.
- 34) Boyer GL, Sullivan JJ, Andersen RJ, Taylor FJR, Harrison PJ, Cembella AD. Use of high-performance liquid chromatography to investigate the production of paralytic shellfish toxins by *Protogonyaulax* spp. in culture. *Mar. Biol.* 1986; **93**: 361-369.
- 35) Flynn K, Franco JM, Fernandez P, Reguera B, Zapata M, Wood G, Flynn KJ. Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphorus stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1994; **111**: 99-109.
- 36) Oshima Y. Post-Column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (eds). *Manual on Harmful Marine Microalgae*, UNESCO, Paris. 1995: 81-94.
- 37) 池田武彦, 松野 進, 遠藤隆二. 貝毒プランクトンの生態学—山口県日本海沿岸. 「貝毒プランクトン—生物学と生態学」(福代康夫編) 恒星社厚生閣, 東京. 1985; 109-118.
- 38) 児玉正昭, 佐藤 繁. 麻痺性貝毒とチオール化合物の複合体. 化学と生物 2001; **39**: 502-503.
- 39) 上 真一. 植物プランクトン摂食者に及ぼす N:P 比の影響. 「水域の窒素:リン比と水産生物」(吉田陽一編) 恒星社厚生閣, 東京. 1993; 63-72.
- 40) Juntongjin K, Piyakarnchana T, Kodama M, Kogure K, Simidu U, Ohwada K. Marine bacteria that produce toxins similar to paralytic shellfish poisons and tetrodotoxins from the sand clam (*Asaphis violascens*) of the Gulf of Thailand. *J. Mar. Biotechnol.* 1996; **3**: 268-273.
- 41) Sakamoto S, Ogata T, Sato S, Kodama M, Takeuchi T. Causative organism of paralytic shellfish toxins other than toxic dinoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1992; **89**: 229-235.
- 42) Kim CH, Sako Y, Ishida Y. Comparison of toxin composition between populations of *Alexandrium* spp. from geographically distant areas. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 641-646.