岩手県沿岸に出現する *Alexandrium* 属とその毒生産能加賀新之助,¹ 関口勝司,¹ 吉田 誠,² 緒方武比古^{3*}

(2006年2月3日受付, 2006年5月25日受理)

¹岩手県水産技術センター, ²熊本県立大学環境共生学部, ³北里大学水産学部Occurrence and toxin production of *Alexandrium* spp. (Dinophyceae)
in coastal waters of Iwate Prefecture, JapanSHINNOSUKE KAGA,¹ KATSUSHI SEKIGUCHI,¹
MAKOTO YOSHIDA² AND TAKEHIKO OGATA^{3*}¹Iwate Fisheries Technology Center, Kamaishi, Iwate 026-0001, ²Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto, Tsukide, Kumamoto 862-8502, ³School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Ofunato, Iwate 022-0101, Japan

The occurrence of *Alexandrium* spp. and their toxin production were investigated along the coast of Iwate Prefecture, Japan. Eight species of *Alexandrium* were found to occur, among which the appearance of five species (*A. insuetum*, *A. ostenfeldii*, *A. pseudogonyaulax*, *A. tamutum* and *A. minutum*) was newly confirmed in this area. Toxin analysis using the cultured cells of these species revealed that all the strains of *A. tamarensense* and *A. catenella* were toxic, as having been reported previously. In addition to them, one strain of *A. ostenfeldii* was confirmed to produce toxins dominated by GTX4. Toxin productivity of this strain was estimated to be 7.5 fmole/cell. However, it is suggested that this species is not a cause of significant contamination of bivalves, since its density and frequency in appearance are very low at the present time. On the other hand, the results imply the possibility that the cell density of the toxic *Alexandrium* species could be overestimated when morphologically similar non-toxic species co-occur in the same water mass. Based on the results obtained in this study, it is necessary to improve the method having been applied to predict contamination of bivalves in the area.

キーワード: *Alexandrium* 属, 麻痺性貝毒, 毒化予測, 出現分布

北日本の太平洋沿岸ではほぼ毎年のように *Alexandrium* 属の有毒種が出現して麻痺性貝毒による貝類等の毒化が起こり, 水産業振興ならびに公衆衛生の両面から深刻な問題となっている。¹⁾ 我々は 1961 年に大船渡湾において死者 1 名を含む 20 人の麻痺性貝毒 (Paralytic shellfish poison: PSP) による中毒事故²⁾が起きて以来, 同湾を中心に岩手県沿岸で主にホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の毒性と有毒種の出現状況を監視してきた。その結果, 本海域では有毒種として知られる *A. tamarensense* および *A. catenella* を含む *Alexandrium* 属が出現すること, このうち大量発生するのは前 2 種であること, また貝類の高毒化は初春から初夏にかけて出現する *A. tamarensense* によることを明らかにしてきた。^{3,4)} これらの情報は本海域における毒対策のベースとして大きな役

割を果たしてきた。しかし, 近年これらの知見では予測不可能な毒化現象も起こり, その見直しの必要性が生じている。その一つに *A. catenella* による貝類の毒化がある。*A. catenella* はこれまで夏から初秋にかけて時に大量に出現するものの, その出現時に貝類の顕著な毒化はほとんど認められてこなかった。大船渡湾で採集された *A. catenella* 天然細胞の毒性は極めて低いことが報告されており,⁵⁾ この事実も上記現象を裏付けるものであった。このため, 同種は貝類毒化にはほとんど関与しないとの認識が持たれてきた。しかし, 1997 年 11 月に大槌湾で本種が出現, それに伴いホタテガイの PSP 毒性が上昇, 出荷規制措置がとられる事例が起こった。⁶⁾ この時期は通常貝毒現象が沈静化する時期に当たり, このような毒化は貝類養殖産業に甚大な被害を与える。また,

* Tel. : 81-192-44-2121. Fax : 81-192-44-2125. Email : t.ogata@kitasato-u.ac.jp

これまで出現が見られなかった時期に本種が出現した事実は、岩手県沿岸における PSP 原因渦鞭毛藻の出現パターンが近年変化しつつあることも示唆する。

PSP 現象は近年多発化や広域化が進み、世界的に大きな問題となっている。この原因には、環境変化による既存種の顕在化や天然あるいは人為的な媒体による有毒種の移動と増殖などの可能性が考えられている。⁷⁾ 我が国においても、最近 *A. tamiyavanichii* の出現による貝類の毒化が瀬戸内海で新たに確認されるなど、⁸⁾ 同様の傾向が認められている。従って、岩手県沿岸においてもこのような現象が起きている可能性もある。すなわち、これまでの常識や経験にとらわれることなく、本属プランクトンの出現状況を再検討することは有効な毒化対策構築にとって極めて重要であると考えられる。

本研究は、麻痺性貝毒問題が貝類養殖業振興にとって大きな問題となっている岩手県沿岸を対象に、毒化予測手法の精度向上に資することを目的として *Alexandrium* 属の出現種、出現時期ならびにそれらの毒生産能を詳細に明らかにしようとしたものである。

材料および方法

***Alexandrium* 属の採集・培養** Fig. 1 に示す広田湾、大船渡湾、唐丹湾、釜石湾、大槌湾、船越湾、山田湾および宮古湾の各 1 定点において、1998 年～2002 年に毎月 1～3 回、水深 0 m から 10 m まで 5 m 毎（大船渡湾のみ 2 m 毎）にバンドーン採水器を用いて海水を採取した。各海水は研究室に持ち帰った後、その 500 mL をメンブランフィルター（孔径 8 μ m）により重力ろ過して約 5 mL に濃縮した。これら濃縮試料について顕微鏡下で観察を行いながら、毛細管を用いて *Alexandrium* 属様のプランクトンを全て分離し、培養株の作成を試みた。分離した細胞は SW II 培養液⁹⁾あるいは T1 培養液¹⁰⁾に接種し、15～18°C、80～100 μ mol photon $\cdot$ m⁻² $\cdot$ s⁻¹（12 時間毎の明暗周期）の条件下で培養した。培養期間中、数日毎に細胞密度や連鎖群形成状況を光学顕微鏡（ニコン製 Optiphot）により観察し、概ね対数増殖後期の細胞を種同定と毒成分分析用試料として供した。

種の同定 上記で得られた培養細胞を中性ホルマリンで固定した後、Fluorescent Brightener 28（Sigma 社製）を用いて蛍光染色¹¹⁾し、落射蛍光装置付顕微鏡（オリンパス製 BX-60）により顕微鏡の観察を行った。種の同定は吉田¹²⁾に基づいて実施した。

培養細胞の毒成分分析 上記で得られた培養株について細胞数約 1,000–15,000 cells/mL の培養液を 30～40 mL 分取して遠心分離（1,200 $\times$ g, 10 min）し、沈殿物として得られる藻体を 0.5 M 酢酸 1 mL に懸濁させた。次に、懸濁物を超音波処理（Tomy 社製 Ultrasonic UD

Fig. 1 Map showing sampling locations.

–200) して細胞を破碎後、遠心分離（4,400 $\times$ g, 10 min）、上清を限外ろ過（排除限界 5,000 dalton, Millipore 社製 Ultrafree-MC、遠心処理：4,400 $\times$ g, 10 min）して得られるろ液を分析用検液とした。この検液について高速液体クロマトグラフィー（HPLC）–蛍光法¹³⁾により PSP 成分分析を行った。分析に当たっては東北大学大島教授より供与戴いた PSP 標品を比較標準として用いた。各毒成分の略号表記方法については Oshima¹³⁾に従った。

二枚貝の毒性 近年本海域で問題となっている *A. catenella* 秋冬季群の発生による貝類毒化の実態を把握するため、11 月から 12 月にかけて各湾の定点付近にある養殖筏より深度 10 m に垂下したホタテガイを採取して可食部の毒性を測定した。毒性試験は食品衛生検査指針に基づくマウス公定法¹⁴⁾により実施した。

結果および考察

***Alexandrium* 属の形態的特徴と出現状況** Fig. 2 から Fig. 9 に示す細胞形態ならびに顕微鏡配列に基づき種の同定を行ったところ、*A. catenella*, *A. fraterculus*, *A. insuetum*, *A. ostensfeldii*, *A. pseudogonyaulax*, *A. tamarense*, *A. tamutum* および *A. minutum* の、計 8 種の存在を認めることができた。同定された *Alexandrium* 種の各湾における出現期間は Table 1 にまとめた。以下に形態的特徴およびその出現状況と貝類毒化との関係につ

Fig. 2 *Alexandrium catenella* (Strain D-81-A-2): (a) ventral view; (b) hypotheca; (c) epithea (insert: apical pore complex). Scale bars = 10 μ m. 1', first apical plate; 4', fourth apical plate; s.p., posterior sulcal plate; APC, apical pore complex; a.a.p., anterior attachment pore.

いて述べる。

1. *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 細胞の腹面観は前後に偏圧しており、下端は凹んでいる (Fig. 2a)。縦溝は下端に近づくにつれ幅広くなる (Fig. 2a)。第1頂板の第4頂板側の辺は屈曲することなく、直線かわずに内側にカーブする程度である (Fig. 2a, c)。後縦溝板は左後縦溝板と右後縦溝板の両方が接する腹縁の辺を一辺とし、五角形をなしており、五辺の長さはほぼ等しい (Fig. 2b)。腹孔を欠く (Fig. 2a, c)。前部接続孔は頂孔の右側に開口している (Fig. 2c)。

本種は調査した全ての湾から採集することができた。培養、同定した株数は104株で、このうち40株を毒成分分析に供した。本種は連鎖群体を形成する種として知られており、¹⁵⁻¹⁷⁾ 本研究の培養細胞でも16細胞連鎖まで観察された。本種は西日本でしばしば赤潮を形成する種であり、¹⁸⁻²⁰⁾ また岩手県の釜石湾においても1977年11月に赤潮を形成している。²¹⁾ 本研究では赤潮の事例は認められなかったが、これまでにその出現が報告されていない広田, 唐丹, 船越, 山田および宮古湾でも出現が観察され、本海域における本種の分布拡大が明らかとなった。一方、本種の出現時期は年や湾により異なるものの、7~12月の間であることが認められた。特に、近年までほとんど出現例の無かった11月にも高頻度で観察され、例えば唐丹湾では1999年11月30日に10 cells/L, 船越湾では1998年11月24日に30 cells/L, 山田湾では1999年11月16日に45 cells/Lが確認された。これらの事実はこの時期における本種の出現が本海域で定着化しつつあることを示唆するものである。

本種の出現と貝類毒化の関係についてみると、広田湾では1998年11月25日に採捕したホタテガイ可食部から8.6 MU/gのPSP毒性が検出され、同年11月27日に同定点において本種が10 cells/L確認されている。また、宮古湾でもホタテガイが5.0 MU/g (可食部)の毒性を示した2001年11月19日の前後に本種の存在が確認された。従って、この時期に出現する本種は貝類の毒

Fig. 3 *Alexandrium fraterculus* (Strain D-150-D-3): (a) ventral view; (b) hypotheca; (c) apical pore complex and first apical plate (insert: apical pore complex); (d) antapical view. Scale bars = 10 μ m. 1', first apical plate; 4', fourth apical plate; s.p., posterior sulcal plate; p.a.p., posterior attachment pore; APC, apical pore complex; v.p., ventral pore; a.a.p., anterior attachment pore.

化原因となる可能性が高いと考えられた。

2. *Alexandrium fraterculus* (Balech) Balech 本種の細胞形態の特徴は以下の通りである。腹面観は角張っている (Fig. 3a)。後縦溝板は大きく、後部接続孔は後縦溝板のほぼ中央に位置する (Fig. 3b)。腹孔は第1頂板と第4頂板の縫合線上に開口する (Fig. 3c)。頂孔板は、第1頂板側が先細り、第1頂板と接続する (Fig. 3a, c)。前部接続孔は頂孔の右側に開口する (Fig. 3c)。鎧板に模様はないが小孔は大きい (Fig. 3d)。

本種は釜石湾において2001年10月に*A. catenella*とともに出現が認められ、その出現密度は10 cells/L程度であった。培養株は同時期に2株の作成に成功し、これらを種同定および毒成分分析に供した。本種は連鎖群体を形成する種として知られており、^{12,15-17)} 本研究でも16細胞連鎖まで観察できた。

3. *Alexandrium insuetum* Balech 細胞の腹面観では、上殻は丸みが少ないが、下殻は丸みがある (Fig. 4a, d, e)。後縦溝板は小さく、横長である (Fig. 4b)。頂孔板は丸みを帯びた三角形である (Fig. 4c)。第1頂板は縦長であるが、小さく頂孔板に達しない (Fig. 4a, c, d)。腹孔は第1頂板と第4頂板の縫合線上に開口する (Fig. 4c)。縦溝の両縁は後縦溝板に達するまではほぼ並行である (Fig. 4e)。横溝板を含めて鎧板には明瞭な網目模様がみられる (Fig. 4a-f)。

本種は岩手県沿岸における分布を初めて認めた種であり、大船渡湾において2001年11月に*A. catenella*とともに採集した。出現密度は500 cells/L程度であった。この際に同定した4株は全て毒成分分析に供した。本種は長い連鎖群体は形成せず、最高でも2細胞連鎖までであった。Yukiら²²⁾は本種が連鎖群体を形成しないとしているが、この点では様相を異にした。

4. *Alexandrium ostensfeldii* (Paulsen) Balech and Tangen 鎧板は非常に薄い。細胞は丸みが強く下端は凹まない (Fig. 5a, d, f)。第1底板と接する辺と第2底板と接する辺の挟角はほぼ直角となる (Fig. 5b, e)。頂

Fig. 4 *Alexandrium insuetum* (Strain D-155-D-3): (a), (d) and (e) ventral view; (b) hypotheca; (c) epitheca; (f) dorsal view. Scale bars = 10 μ m. s.p., posterior sulcal plate; 1', first apical plate; 4', fourth apical plate; APC, apical pore complex; v.p., ventral pore.

Fig. 5 *Alexandrium ostenfeldii* (Strain D-81-B-6): (a) and (f) ventral view; (b) and (e) hypotheca; (c) epitheca (insert: apical pore complex); (d) optical dorso-ventral views. Scale bars = 10 μ m. 1', first apical plate; 2', second apical plate; 4', fourth apical plate; 6'', sixth precingular plate; v.p., ventral pore; s.a., anterior sulcal plate; s.p., posterior sulcal plate; 1'', first antapical plate; 2'', second antapical plate.

孔板は丸みのある三角形である (Fig. 5c)。鎧板には模様はみられず、小孔も観察できない (Fig. 5a-c, e, f)。第1頂板は特徴的な形態をしており、第4頂板に接する辺がかなり前縦溝板寄り大きく屈曲する (Fig. 5a, c, f)。また第2頂板と接する辺は長く、第6前帯板に接する辺と同じくらいそれより長い (Fig. 5a, c)。第6前帯板は明らかに幅広で、前縦溝板の縫合線は細胞の長軸に対して大きく傾いている (Fig. 5a, c, f)。非常に大きな腹孔を持っておりその形態は小判型である (Fig. 5a, f)。細胞長は 19–55 μ m である。

岩手県沿岸における分布を初めて認めた種である。し

Fig. 6 *Alexandrium pseudogonyaulax* (Strain D-105-A-1): (a) and (c) ventral view; (b) epitheca (insert: apical pore complex). Scale bars = 10 μ m. 1', first apical plate; 4', fourth apical plate; 6'', sixth precingular plate; v.p., ventral pore.

かし、その培養株の作成は唐丹湾において 1999 年 11 月に *A. catenella* とともに採集された 1 株にとどまった。このことから、本海域における本種の出現頻度および出現密度は現在のところ低いものと予想された。なお、本種の連鎖群形成は 2 細胞連鎖までであった。

5. *Alexandrium pseudogonyaulax* (Biecheler) Horiguchi, ex Yuki and Fukuyo 細胞形態の特徴は以下の通りである。上殻の腹面観は低い (Fig. 6a)。第1頂板は五角形で頂孔板とは接しない (Fig. 6b, c)。第6前帯板は明らかに縦長である (Fig. 6b, c)。腹孔が第1頂板と第4頂板の縫合線上にみられるが、第4頂板側へほとんど侵入しない (Fig. 6b, c)。頂孔板は長細く、かつ丸みを帯びた三角形である (Fig. 6b)。頂孔も細長い (Fig. 6b)。細胞長は 22–55 μ m、細胞幅は 21–63 μ m である。

本種も岩手県沿岸における分布を初めて認めた種の一つであり、山田湾および大槌湾において 2000 年 8 月に 10 cells/L 程度を観察した。培養株は大槌湾より分離した細胞から 1 株の作成に成功し、これを毒成分分析に供した。本種の連鎖群形成は観察することができず、既往の報告^{23,24)}と一致した。

6. *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech 後縦溝板は五角形に近い形態をしており、縦横はほぼ同じ長さである (Fig. 7b, c)。後部接続孔が後縦溝板の右側に開口する (Fig. 7b, c)。第1頂板と前縦溝板は接続する (Fig. 7e)。第4頂板はくの字型に緩く屈曲する (Fig. 7e)。頂孔板は腹側を上底とする台形である (Fig. 7f, g)。前部接続孔は頂孔の右側に開口する個体と開口しない個体が見られる (Fig. 7f, g)。腹孔は第1頂板と第4頂板の縫合線上にみられる (Fig. 7d, e)。

本種は大船渡湾および大槌湾において 1–6 月に採集した。大槌湾における出現は 10 cells/L 程度と低いものの、本湾における確認は本研究が初めての例である。上記出現時期に分離、培養、同定した株数は 22 株で、このうち 15 株を毒成分分析に供した。本種の連鎖群形成は多くの場合 Fukuyo ら¹⁵⁾の観察と同様に 2 細胞連鎖までであったが、稀に 4 細胞連鎖群も観察された。

Fig. 7 *Alexandrium tamarense* (Strain D-129-A-4): (a) and (e) ventral view; (b) and (c) posterior sulcal plate; (d) apical pore complex and first apical plate; (f) and (g) apical pore complex; (h) first apical plate. Scale bars = 10 μm. 1', first apical plate; 6'', sixth precingular plate; p.a.p., posterior attachment pore; s.p., posterior sulcal plate; 4', fourth apical plate; APC, apical pore complex; v.p., ventral pore; a.a.p., anterior attachment pore.

Fig. 8 *Alexandrium tamutum* (Strain D-135-D-5): (a) and (b) ventral view; (c) and (d) hypothea; (e) and (f) epitheca. Scale bars = 10 μm. 1', first apical plate; 4', fourth apical plate; 6'', sixth precingular plate; s.a., anterior sulcal plate; v.p., ventral pore; s.p., posterior sulcal plate; APC, apical pore complex.

7. *Alexandrium tamutum* Montresor, Beran and John
細胞は球形に近い (Fig. 8a)。鎧板は平滑で模様はみられない (Fig. 8a-f)。後縦溝板は横長である (Fig. 8c, d)。腹孔は第1頂板と第4頂板の縫合線上にある (Fig. 8e)。頂孔板は第1頂板との縫合線が比較的長いために第4頂板側に湾曲した丸みを帯びた長方形のように見える (Fig. 8e, f)。第6前帯板は縦横ほぼ同じ長さから横長まで変動する (Fig. 8a, b)。これらの形態的特徴から本種は Montresor ら²⁵⁾ がイタリアで分離し, *A.*

Fig. 9 *Alexandrium minutum* (Strain D-164-C-4): (a), (d), (e) and (f) ventral view; (b) and (c) sulcal plate. Scale bars = 10 μm. 1', first apical plate; 6'', sixth precingular plate; v.p., ventral pore; s.a., anterior sulcal plate; s.p., posterior sulcal plate; APC, apical pore complex.

tamutum と命名した新種と同一と考えられる。本種の連鎖群体形成は2細胞連鎖までであり, 吉田¹²⁾の記載と一致した。

本種も岩手県沿岸における分布を初めて認めた種であり, 大船渡湾 (2株) および釜石湾 (1株) において6月に採集し, 全株を毒成分分析に供した。出現密度は100 cells/L 未満と推定された。

8. *Alexandrium minutum* Halim 腹面観は, 下殻にのみ網目模様がみられる (Fig. 9a-c, e)。第6前帯板は明らかに縦長である (Fig. 9a, d, f)。後縦溝板は横長である (Fig. 9b, c)。第4頂板との縫合線上には腹孔がある (Fig. 9a, d, f)。頂孔板は三角形に近い台形である (Fig. 9f)。

本種も岩手県沿岸における分布を初めて認めた種である。本種は大船渡湾において2002年8月に *A. catenella* とともに採集された。*A. catenella* との形態上の識別が難しいため, 出現密度については不明であるが, 両種が混在する試料から分離, 培養した株を同定した結果, *A. catenella* と想定した株のうちおよそ2割が本種で占められていた。この結果および同一時期の *A. catenella* の出現密度が海水1,000 cells/L程度であったことを考慮すると, 本種の上記時期における出現密度は数100 cells/L程度と推定される。本種については4株の培養株作成に成功し, これら全てを種同定および毒成分分析に供した。本種の培養細胞は連鎖群体を形成しない株, 2および4細胞連鎖を形成する株に分かれた。

Alexandrium 属培養株の毒生産能 上記8種の培養株を用いて HPLC-蛍光法により毒成分分析を行った結果, *A. catenella*, *A. ostenfeldii* および *A. tamarense* の3種のみに毒生産能を確認することができた。従って, こ

Fig. 10 Cellular toxin contents of *Alexandrium catenella*, *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium ostenfeldii*. Toxin contents were examined using clonal cultures (*A. catenella*; 40 isolates, *A. tamarense*; 15 isolates, *A. ostenfeldii*; 1 isolate) established from the coast of Iwate Prefecture. PSP toxins were detected from these three species among eight species of *Alexandrium* spp. appearing in this area.

れら3種以外は無毒あるいは著しく低毒生産能の種と判断された。なお、今回毒成分が検出されなかった *A. minutum* については有毒株・無毒株の存在が知られている。²⁶⁻²⁹⁾ 上述したように我々が得た株は下殻に網目模様を有するタイプであったが、吉田¹²⁾の報告によれば網目模様を有するタイプの場合、その出現による貝毒の発生はないとのことであり、本研究の結果はこれを裏付けた。

有毒種3種について各株の1細胞当たりの毒量を Fig. 10 に、また各海域におけるこれら3種の平均毒成分組成を Fig. 11~13 に示す。以下、これらのデータに基づいて有毒種の毒生産能について述べる。

1. *A. catenella* 分析した40株全てから毒成分が検出された (Fig. 10)。細胞当たりの毒含量は同一条件で培養したにもかかわらず2.9~81.7 fmol(femtomole)/cellと株間で著しい違いが認められた。毒含量のバラツキは同一湾から分離された株間でも認められたが、その平均値は唐丹湾 (24.6 fmol/cell)、山田湾 (4.9 ± 2.0 fmol/cell; 平均値 $\pm$ 標準偏差)、宮古湾 (8.2 ± 4.9 fmol/cell)を除き、他の湾では50 fmol/cell程度 (広田湾 49.5 fmol/cell, 大船渡湾 48.7 ± 20.8 fmol/cell, 釜石湾 53.4 ± 27.6 fmol/cell, 大槌湾 50.9 ± 12.3 fmol/cell, 船越湾 50.4 ± 21.1 fmol/cell) でほぼ同様であった。山田湾や宮古湾の株で著しく低い毒生産能が認められた理由は明確ではないが、これらの湾では他の湾と異なる系群が出現している可能性も考えられる。

Fig. 11 Average toxin composition (mol%) of *Alexandrium catenella* strains from different bays along the coast of Iwate Prefecture. A: Hirota Bay (1), B: Ofunato Bay (3), C: Toni (1), D: Kamaishi (5), E: Otsuchi (10), F: Funakoshi (6), G: Yamada (9), H: Miyako (5). Number in the bracket indicates the number of strains analysed.

Fig. 12 Average toxin composition (mol%) of *Alexandrium tamarense* strains from Ofunato Bay (A) and Otsuchi Bay (B). Number of strains analysed in A and B are 11 and 4, respectively.

培養株の毒成分組成は分離海域が異なっても弱毒成分である C1+2 を主成分とする点で共通していた (Fig. 11)。一方, C1+2 の占める割合は湾毎に多少の違いが見られ, 分離株の平均は広田湾で 72.4%, 大船渡湾で $65.1 \pm 5.9\%$ (平均 $\pm$ 標準偏差), 唐丹湾 82.7% , 釜石湾 $66.7 \pm 0.6\%$, 大槌湾では $69.0 \pm 2.7\%$, 船越湾 $71.7 \pm 2.4\%$, 山田湾 $72.7 \pm 15.3\%$, 宮古湾では $53.1 \pm 11.9\%$ であった。C1+2 に次ぐ成分は山田湾の株を除き neoSTX であり, これら各湾の平均値は 17.3% (唐丹湾) から 38.1% (宮古湾) の範囲にあった。山田湾の株では neoSTX がほとんど含有されず, GTX1+4 ($22.5 \pm 14.6\%$) が主成分の一つである点で特徴的であった。GTX1+4 の比率は宮古湾産の株でも比較的高く, 毒含量がこれらの湾で著しく低く特徴的であったことと相関が見られた。このことも, 両海域に出現する本種は他の湾と系群を異にすることを示唆するものかもしれない。

2. *A. tamarense* 本種の場合も大船渡湾と大槌湾から分離した 15 株全てから毒成分が検出された (Fig. 10)。分離株の毒成分組成は大船渡湾株では C1+2 が $53.1 \pm 8.4\%$ および GTX1+4 が $37.8 \pm 2.4\%$ を占めるのに対し, 大槌湾では C1+2 が $69.7 \pm 6.2\%$ および GTX1+4 が $13.0 \pm 6.5\%$ と若干の違いがみられたが, これらの成分を主成分とする点, またこの他には GTX2+3, neoSTX, STX および GTX5 が少量含まれる点ではほぼ共通していた (Fig. 12)。1 細胞当たりの毒量は大船渡湾で $18.4 \sim 108.4$ fmol/cell (75.8 ± 46.1 fmol/

Fig. 13 Toxin composition (mol%) of *Alexandrium ostenfeldii* isolated from Toni Bay in Iwate Prefecture.

cell), 大槌湾では $17.7 \sim 161.0$ fmol/cell (135.0 ± 22.7 fmol/cell) と株間の違いは著しいものであったが, 両湾で大きな毒生産能の違いは見いだすことはできなかった。なお, 本種については無毒株の存在が知られているが,^{30,31} これまで岩手県沿岸より採取された本種についてはすべて有毒とされており,^{5,32,33} 本研究でも無毒株は認められなかった。このことは, 本海域における無毒株存在の可能性が著しく低いことを示唆するものである。

3. *A. ostenfeldii* 本種 1 株の毒成分組成は GTX1+4 が 52.6% と主成分であること, GTX6 が 21.1%, neoSTX が 12.6%, STX が 8.1% を占めること, ならびに GTX5 および GTX2+3 が少量存在することで特徴づけられた (Fig. 13)。この毒成分組成は C toxin が存在しない点で上記 *A. catenella* や *A. tamarense* と明確に異なるものであり, 本海域では毒成分組成を調べることでにより本種の存在を推定することが可能に思われた。一方, 1 細胞当たりの毒量は 7.5 fmol と上記両種における弱毒株とはほぼ同程度であった。Hansen ら³⁴)は北欧産の本種について, GTX6 が 90% 以上を占め, 1 細胞当たりの毒量が $0.8 \sim 2.9$ fmol/cell と報告している。一方, Mackenzie ら³⁵)はニュージーランドの異なる海域から採取した本種について, 無毒, 弱毒 (細胞毒量が $24 \sim 52$ fmol/cell) および強毒 (細胞毒量が 558 fmol/cell) 株が存在することを報告している。また, 毒成分組成についてもほとんどが STX で占められる株や GTX3, 5 および STX をほぼ同程度に含む株があり, 上記の毒含量とともに本種の毒生産能は著しく多様であることを示している。今回唐丹湾で見出された株の細胞毒含量は上記報告の範囲内であったが, 毒成分組成に関しては明確に異なっており, Mackenzie らの報告³⁵)を裏付けるものであった。

毒化予測手法との関連 福代³⁶)は 1980 年に岩手県沿岸における *Alexandrium* 属の分布を詳細に調査し, 未同定の 2 種を含め 5 種 (*A. tamarense*, *A. catenella*, *A. fraterculus*, *A. sp.* (HIR), *A. sp.* (ISH)) が出現すること

Table 1 Periods of occurrence of *Alexandrium* spp.

Species \ Month	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.
<i>Alexandrium catenella</i>							←	→				→
<i>Alexandrium fraterculus</i>										←	→	
<i>Alexandrium insuetum</i>											←	→
<i>Alexandrium ostenfeldii</i>											←	→
<i>Alexandrium pseudogonyaulax</i>								←	→			
<i>Alexandrium tamarense</i>	←	→										
<i>Alexandrium tamutum</i>						←	→					
<i>Alexandrium minutum</i>								←	→			

Arrows indicates those months in which *Alexandrium* spp. occurred

を報告している。なお、未同定の2種はその後、*A. sp.* (HIR) が *A. affine* (Inoue and Fukuyo) Balech¹⁵⁾ と、*A. sp.* (ISH) が *A. compressum* (Fukuyo, Yoshida and Inoue) Balech¹⁵⁾ と同定された。本研究ではこのうち *A. affine* および *A. compressum* を除く、前者3種を認めるとともに、新たに5種の出現を確認した。近年、*Alexandrium* 属の分類は飛躍的に進展し、分類体系の再構築が進んでいる。また、それに伴い新種の記載も相次いでいる。本研究で新たに分布が確認された種についても一部、例えば *A. tamutum* の場合は本種が分類体系の変化により最近新種として記載されたこと²⁵⁾ に起因する。一方、本研究の結果は本海域に新たな種が導入されていることも示唆する。貝毒原因種は近年世界的にその分布拡大が指摘されており、拡大にはバラスト水や貝類の移植などの人為的機構が関与することも明らかにされている。⁷⁾ 本海域に分布する *Alexandrium* 種の増加もこのような機構によるものかもしれない。このことは、出現種が今後さらに多様化し、新たな毒化様式が起こりうることも意味するもので、本属渦鞭毛藻の継続的な出現監視は貝毒対策上極めて重要であること示す。

本研究では出現した *Alexandrium* について可能な限り培養株の作成を行い、その毒生産能を調べた。その結果、上記のように有毒と確認できたのは *A. catenella*, *A. ostenfeldii*, *A. tamarense* の3種のみであった。このうち、*A. ostenfeldii* については本海域における新有毒種の確認を意味する。本種は1999年11月に唐丹湾より採取した海水から *A. catenella* 群集に混在していた1細胞を分離し、培養株として確立したものである。同一時期に他の湾でも同様に調査を実施したが、得られたのは *A. catenella* のみであった。このことから、*A. ostenfeldii* の出現頻度および出現密度は低いと予想され、本種に関する動向監視が引き続き必要ではあるものの、現状では本種が毒化の主原因となる可能性は低いと考えられた。従って、基本的に岩手県沿岸の主たる毒化原因種はこれまでと同様に *A. tamarense* および *A. catenella* の2種と考

えられた。一方、Table 1に示したとおり *A. tamarense* の発生時期に *A. tamutum* および *A. catenella* の発生時期に他5種が同時に発生することも確認された。従って、このような時期には有毒種の細胞数計数に混在する形態上識別困難な無毒種の細胞数が反映されてしまう可能性が高い。このことは、有毒種の出現密度により貝類毒化を予測しようとする現在の手法のあり方に修正が必要であることを示唆する。今後、自然集団中の *Alexandrium* を1細胞ずつ迅速に同定する技術の開発とともに、水塊の毒性を直接測定してホタテガイ毒性との関連を明らかにするなど、より精度の高い毒化予測手法の構築を進める必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、フィールド調査にご協力いただきました大船渡市漁業協同組合、大槌町漁業協同組合、宮古漁業協同組合、岩手県漁業協同組合連合会の各位に感謝申し上げます。なお、本研究の一部は水産庁補助事業で行われたことを付記し、謝意を表します。

文 献

- 1) Oshima Y, Yasumoto T, Kodama M, Ogata T, Fukuyo Y, Matsuura F. Features of paralytic shellfish poison occurring in Tohoku district. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1982; **48**: 525–530.
- 2) Kawabata T, Yoshida T, Kubota Y. Paralytic shellfish poison-I. A note on the shellfish poisoning occurred in Ofunato City, Iwate Prefecture. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1961; **28**: 344–351.
- 3) Ogata T, Kodama M, Fukuyo Y, Inoue T, Kamiya H, Matsuura F, Sekiguchi K, Watanabe S. The occurrence of *Protogonyaulax* spp. in Ofunato Bay, in association with the toxification of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1982; **48**: 563–566.
- 4) Sekiguchi K, Inoguchi N, Fukuyo Y. Occurrence of *Protogonyaulax tamarensis* and shellfish toxicity in Ofunato Bay from 1980–1986. In: Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T (eds) *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology*, Elsevier, New York. 1989; 399–

- 402.
- 5) Kodama M, Fukuyo Y, Ogata T, Igarashi T, Kamiya H, Matsuura F. Comparison of toxicities of *Protogonyaulax* cells of various sizes. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1982; **48**: 567-571.
- 6) 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. *Fish. Sci.* 2001; **67**: 1157-1162.
- 7) Hallegraeff GM. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 1993; **32**: 79-99.
- 8) Hashimoto T, Matsuoka S, Yoshimatsu S, Miki K, Nishibori N, Nishio S, Noguchi T. First paralytic shellfish poison (PSP) infestation of bivalves due to toxic dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii*, in the southeast coasts of the Seto Inland Sea, Japan. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2002; **43**: 1-5.
- 9) Iwasaki H. The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro. *Biol. Bull.* 1961; **121**: 173-187.
- 10) 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.
- 11) Fritz L, Triemer RE. A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *J. Phycol.* 1985; **21**: 662-664.
- 12) 吉田 誠. 渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の分類学的研究. 博士論文, 東京大学, 東京. 2000.
- 13) Oshima Y. Post-column derivatization liquid chromatography method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Internat.* 1995; **78**: 528-532.
- 14) 安元 健. 麻痺性貝毒. 「食品衛生検査指針」(理化学編) 日本食品衛生協会, 東京. 1991; 300-305.
- 15) Fukuyo Y, Yoshida K, Inoue H. *Protogonyaulax* in Japanese coastal waters. In: Anderson DM, White AW, Baden DG (eds) *Toxic dinoflagellates*. Elsevier, New York. 1985; 27-32.
- 16) Balech E. The Genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, Sherkin Island, Co., Cork, 1995; 1-151.
- 17) Steidinger KA, Tangen K. Dinoflagellates. In: Tomas CR (eds) *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press Inc., San Diego. 1996; 387-584.
- 18) Hashimoto Y, Noguchi T, Adachi R. Occurrence of toxic bivalves in association with the bloom of *Gonyaulax* sp. in Owase Bay. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1976; **42**: 671-676.
- 19) 吉松定昭. 瀬戸内海における赤潮生物特に渦鞭毛藻類 *Alexandrium* 属 2 種, ラフィド藻類 3 種の生活史に関する研究. 香川県赤潮研究所研究報告. 1992; 1-90.
- 20) 竹内照文. 和歌山県田辺湾における赤潮渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* の生態に関する研究. 和歌山県水産試験場特別研究報告. 1994; 1-88.
- 21) Toriumi S, Takano H. Some species of *Gonyaulax* of the "catenella group" occurring in Japanese coastal waters. In: Taylor DL, Seliger HH (eds) *Toxic dinoflagellate Blooms*. Elsevier, North Holland. 1979; 57-60.
- 22) Yuki K, Yoshimatsu S. New record of *Alexandrium insuetum* Balech (Dinophyceae) from Japan with some supplementary observations on thecal morphology. *Bull. Plankton Soc. Japan* 1990; **36**: 121-126.
- 23) Kita T, Fukuyo Y, Tokuda H, Hirano R. Life history and ecology of *Goniodoma pseudogoniaulax* (Pyrrhophyta) in a rockpool. *Bulletin of Marine Science* 1985; **37**: 643-651.
- 24) Yuki K, Kobayashi S, Fukuyo Y. Thecate and cyst forms of *Alexandrium pseudogonyaulax* (Dinophyceae) from Japanese coastal waters. *Bull. Plankton Soc. Japan* 1996; **43**: 46-50.
- 25) Montresor M, John U, Beran A, Medlin LK. *Alexandrium tamutum* sp. Nov. (Dinophyceae): a new nontoxic species in the genus *Alexandrium*. *J. Phycol.* 2004; **40**: 398-411.
- 26) Lilly EL, Halanich KM, Anderson DM. Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the *Alexandrium minutum* group. *Harmful Algae* 2005; **4**: 1004-1020.
- 27) Montresor M, Marino D, Zingone A, Dafnis G. Three *Alexandrium* species from coastal Tyrrhenian waters (Mediterranean Sea). In: Graneli E, Sundstrom B, Edler L, Anderson DM (eds) *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York. 1990; 82-87.
- 28) Yoshida M, Ogata T, Thuoc CV, Matsuoka K, Fukuyo Y, Hoi NC, Kodama M. The first finding of toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* in Vietnam. *Fish. Sci.* 2000; **66**: 177-179.
- 29) Oshima Y, Hirota M, Yasumoto T, Hallegraeff GM, Blackburn SI, Steffensen DA. Production of paralytic shellfish toxins by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim from Australia. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 925.
- 30) Yentsch CM, Dale B, Hurst JW. Coexistence of toxic and nontoxic dinoflagellates resembling *Gonyaulax tamarensis* in New England coastal waters (NW Atlantic). *J. Phycol.* 1978; **14**: 330-332.
- 31) Boyer GL, Sullivan JJ, Andersen RJ, Harrison PJ, Taylor FJR. Toxin production in three isolates of *Protogonyaulax* sp. In: Anderson DM, White AW, Baden DG (eds) *Toxic Dinoflagellates*, Elsevier, New York. 1985; 281-286.
- 32) Oshima Y, Yasumoto T. Analysis of toxins in cultured *Gonyaulax excavata* cells originating in Ofunato Bay, Japan. In: Taylor DL, Seliger HH (eds) *Toxic Dinoflagellate Blooms*, Elsevier, North Holland. 1979; 377-380.
- 33) Ogata T, Kodama M, Ishimaru T. Toxin production in the dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon* 1987; **25**: 923-928.
- 34) Hansen PJ, Cembella AD, Moestrup O. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. Paralytic shellfish toxin concentration, composition, and toxicity to a tintinnid ciliate. *J. Phycol.* 1992; **28**: 597-603.
- 35) Mackenzie L, White D, Oshima Y, Kapa J. The resting cyst and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in New Zealand. *Phycologia* 1996; **35**: 148-155.
- 36) 福代康夫. 日本沿岸における *Protogonyaulax* の分類と生態に関する研究. 博士論文, 東京大学, 東京. 1982.