

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006 年 ～ 2008 年

課題番号：18255012

研究課題名（和文） 東南アジアにおける有毒渦鞭毛藻類の発生と広域化機構

研究課題名（英文） Studies on occurrence and expansion mechanisms of toxic dinoflagellates in the South East Asian Countries.

研究代表者

福代 康夫（FUKUYO YASUWO）

東京大学・アジア生物資源環境研究センター・教授

研究者番号：10165318（2008 年から 70095511）

研究成果の概要：フィリピンでは麻痺性貝毒による中毒事件が、1983 年以降たびたび発生してきたが、1999 年以降は減少傾向にあり、原因生物 *Pyrodinium bahamense* の発生量も減少していた。しかし 2006 年にルソン島のソルソゴン湾で中毒事件が発生し、同湾ではその後も毎年発生をみている。現在、同湾から同種の培養株作成に成功し、その毒組成および成長生理学的特性に関する実験を行っている。また、ベトナムなど東南アジア各国で、記憶喪失性貝中毒の原因となるドウモイ酸の二枚貝類への蓄積を明らかにした。本物質は、珪藻類が産生することが報告されており、東南アジアにおいて渦鞭毛藻類ばかりでなく広い視野で有毒藻類の発生と広域化機構に関して研究を進めていく必要性が明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	14,690,000	3,390,000	18,080,000
2007 年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2008 年度	10,400,000	3,312,000	13,712,000
年度			
年度			
総計	35,990,000	9,972,000	45,962,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：有毒鞭毛藻、麻痺性貝毒、フィリピン、記憶喪失性貝毒、有毒微細藻、ベトナム

## 1. 研究開始当初の背景

東南アジアに発生する有毒渦鞭毛藻類の中で、麻痺性貝毒の原因生物の *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* は最重要種であるとの認識のもと、1989 年にブルネイにおい

て *Pyrodinium* のワークショップが開催され、赤潮・生物・分類・毒等に関して発表が行われた。この時から *Pyrodinium* の生理生態学的研究が始まったが、培養株の確立・維持が難しいために生理・生態・毒生産能・遺伝子

情報に関する報告は少ない。1998年に Usup and Azanza が生理生態についてまとめているが、そのデータの多くはマレーシア産の株を用いて研究した結果のみであり、様々な地域から培養株を作り、比較する必要があるとしている。その後 Omura (2002) がフィリピン株の成長生理学的特性について報告し、2005年にマレーシア産の株の遺伝子に関する情報を Leaw *et al.* が報告しているものの、複数の地域における生物・生理・生態・化学的特徴について比較した例は無い。他の有毒渦鞭毛藻類についてもほぼ同様な状況であり、本研究はこれまで滞っていたこの研究分野をさらに進める先鞭をなすものと考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、有毒渦鞭毛藻による魚貝類の毒化現象およびその毒化魚貝類を摂食することによる中毒事件が頻発化・長期化・広域化している東南アジア海域において、従来のプランクトン調査と併せ、研究分担者（および連携研究者）の開発した最新の酵素抗体免疫測定キット（ELISA キット）を用いて原因有毒渦鞭毛藻の発生状況を的確に把握し、原因種の広域化の現状を明らかにするとともに、その広域化機構について考察を行い、将来の広域化防止に役立てることを目的とした。

生物種の広域化機構の検討には、種レベルではなく、地域系群レベルの解析を行う必要があるため、遺伝子塩基配列解析を含めた最新の生物特性解析技術を用いて研究を行った。これらの研究実施には、有毒種発生域の各国研究者からの情報と試料の迅速な伝達が不可欠であり、本研究では各国の研究者に調査および分析技術の移転を行いつつ、研究への支援を依頼して、長期的・継続的な共同調査体制の確立を目指した。それにより研究代表者の研究室を各国の有毒種の固定標本の維持管理と、培養株の作成、維持管理などを集中して研究しうるキーステーションとする体制を整えた。具体的には、東南アジアのフィリピン、ベトナム、インドネシア等の各国の研究者と共同して以下の研究を行うことを目的とした。

1) 各地で発生している有毒種を、従来より行われている顕微鏡下における形態確認のみならず、プランクトン中の毒を ELISA キットにより検出する方法で、よりの確迅速に有毒種の発生を検知することにより、プランクトン中の有毒種を固定試料として保存するとともに、培養株の作成を各国の分担研究者と共同で行う。

2) それらの形態、生理生態的特徴、産生毒およびその組成、遺伝子塩基配列などを調べ、各地の発生株の生物学的特性の比較を行

う。

3) これらの結果をもとに、有毒種、およびその地域系群の広域化の現状を把握するとともに、その機構について考察する。

4) 本研究で取り扱う有毒渦鞭毛藻類の中には培養株の作成・維持が困難である種も含まれるので、原因渦鞭毛藻類の固定試料と培養株の維持・管理および研究を研究代表者の研究室において行う体制を確立する。

## 3. 研究の方法

2006年度は、東南アジア各国に発生する有毒渦鞭毛藻類のうち、麻痺性貝毒を産生し毒性が強いことを知られている *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* を最も重要な研究対象種として研究を進めた。なお、研究は同種にだけ限定するものではなく、海外共同研究者から他の有毒・有害渦鞭毛藻類の発生に関する情報を得た際には、可及的速やかに採集・分析・培養株の確立をすすめた。

1) 福代は海外共同研究者に依頼して、各国内の海底堆積物あるいはプランクトン試料を供与してもらい、研究分担者とともにそれら試料から培養株を作成した。この試料採集重点海域として、フィリピンのパラワン諸島、ネグロス島、サマール諸島、パナイ島、マレーシアのボルネオ島のサバ州、サラワク州、ブルネイ、インドネシアのスマトラ島、アンボン島、およびハルマヘラ島が上げられたが、現地の治安等を考慮して無理のない範囲で調査を実施した。この調査実施には、わが国研究者もできる限り参加するように努めた。なお、2006年度は、貝毒被害が最も大きく発生海域も広いフィリピンを最重点海域として現地での調査を進めた。

2) 調査は、採集回数を増やすことによって培養株作成の成功率を高めるため、研究代表者および分担者が時期を変えてフィリピンへ赴き、貝、プランクトン、海底堆積物を採集した。なお、調査実施に先立ち、研究代表者はフィリピン水産資源局から調査許可を取得し、同時に調査海域の安全性を確認するため、マニラに協議に赴いた。

3) 試料中の有毒渦鞭毛藻類の有無は、顕微鏡観察を行うとともに、ELISA キットを用いた、プランクトン試料あるいは海底堆積物中の毒の検出で確認した。後者の方法は今まで行われていない最新の方法であるが、操作が容易で結果が短時間で得られるので、調査対象海域の国外共同研究者にも技術を習得してもらい、現場海水から採集したプランクトン試料を定期的に分析するようにした。毒が検出された場合は、プランクトン中に有毒渦鞭毛藻が発生していることを意味するので、日本側研究者に連絡をとって、プランクトン試料などの輸送、あるいは日本側研究

者による調査などの体制を組むようにした。

4) 採水したサンプル中には、目的である渦鞭毛藻類を捕食する動物プランクトンや原生動物も含まれているので、それらによる捕食を防ぎ、培養株の作成の確率を上げるための予備的な分離作業は、フィリピン水産資源局の研究室(マニラ)にて行い、日本に持ち帰った後に、多くの単一種クローン培養株を作成した。

5) これまでの予備的な研究において、フィリピン産のマシロック株とパラワン株の SSU rDNA および LSU rDNA (D1 と D2 領域) において差異が認められないことから、これらの領域に加え微細藻の系群判別を行う場合有効であるとされている ITS 領域の塩基配列を比較し、また同時に高等植物の個体群判別や集団遺伝学においてよく用いられるミトコンドリアの変異領域( *cox2-3 spacer region* 等)の利用やマイクロサテライトの開発・検証についても検討を加えた。

6) 培養株の毒組成を高速液体クロマトグラフィーにより分析し、その結果より得られた組成の差異も系群判別の情報として用いた。さらにこの結果は、現地調査によって得られたプランクトンと貝の毒組成とも比較し、海域毎の有毒種とその系群の発生に関する情報を補足した。

7) 有毒渦鞭毛藻類による食中毒あるいは有毒渦鞭毛藻類の発生情報が得られた際には、海外共同研究者に依頼するか、あるいはわが国研究者も出来る限り現場に赴き、ELISA キットを用いて現場海水中のプランクトンおよび現場に生息する二枚貝類の毒性および毒化状況を把握するようにした。毒が検出された場合には、より詳細な分析を行うために、分析用プランクトン試料および二枚貝試料を作成し、日本に持ち帰り高速液体クロマトグラフィーによる分析を行った。

8) 2006 年度には福代および児玉が外国旅費により、9 月にデンマークのコペンハーゲンで開催される第 12 回有害藻類研究国際会議に参加し、研究の概要とそれまでの研究成果を報告した。

2007 年度以降は、調査対象海域をフィリピン国内からベトナム、インドネシア等へ広げて 2006 年度と同様な体制で調査研究を行った。

#### 4. 研究成果

フィリピンでは 1983 年以降麻痺性貝毒による中毒事件が国内各地で発生しているが、1987-1998 年に比べ、1999 年以降は中毒発生件数のみならず、原因種 *P. bahamense* の発生量にもかなり減少傾向が見られた。しかし 2006 年 8 月に、1983 年と 1999 年以降問題が起こっていなかったルソン島ソルソゴ

ン湾において死者 9 名を含む患者 80 名以上の中毒事件が起こった。同海域に有毒種 *P. bahamense* が再発したことによる中毒事件の発生であり、その再発機構については全く不明である。2007 年度には、その発生機構を調べるため培養株の作成を試み、まずソルソゴン湾より培養株の作成に成功した。またこれまでに *P. bahamense* の発生の知られている海域から培養株の作成のために海底堆積物の採取を行った。採集地は、ルソン島のマシロック湾、マスバテ島のミラグロス、ミンダナオ島のバリテ湾である。これら堆積物から培養株の作成を試みたが、成功しなかった。2008 年度には、*P. bahamense* をさらに 1 株増やすことに成功した。これらの成長特性としては、予備的なデータであるが、高温・高塩分・高照度を好むようである。今後、これらの培養株の毒組成および成長生理学的特性に関する実験を実施予定である。

また、フィリピン タクロバンにおいて 2006 年 12 月から 2008 年 5 月まで少なくとも月 1 回の有毒種のモニタリング調査を実施するとともに、二枚貝類の *Spondylus* と *Perna* を用いて毒化の有無を把握するため垂下飼育実験を行った。同海域では *P. bahamense* が過去に発生していたが、本調査期間中には多量の増殖は観察されなかった。記憶喪失性貝毒の原因物質であるドウモイ酸を産生することが報告されている 2 種 (*P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*) を含む *Pseudo-nitzschia* 属珪藻が少なくとも 5 種、一年を通じて発生していることが明らかになった。また、垂下実験では微量ではあるがドウモイ酸が検出され、貝への毒蓄積の可能性が示唆された。

ベトナムにおいては、麻痺性貝毒は確認されなかったが、2006 年 8-9 月にベトナム中部沿岸域のニャチャン市近郊のニャフー湾で記憶喪失性貝毒が二枚貝 *Spondylus versicolor* に多量に認められ、同時に採取されたプランクトン試料にも検出された。このため、原因種として、従来より世界各地で毒生産能のある珪藻 *Pseudo-nitzschia* 属の種が疑われたが、その発生量が少なく、2006 年の調査では原因種は特定できなかった。その後定期的観測を継続しているが、その時の優占種が今まで毒性確認の分析例のない *P. cacciantha* であったため、2007 年度の調査において培養株の確立と毒性確認、同種の発生消長の観測、及び消長と海洋環境の関係を含め、貝類毒化機構と原因プランクトン発生機構を主題として様々な調査を試みた。そこで同湾から植物プランクトンの培養株を 10 種 37 株作成し毒性を精査したところ、原因種の 1 つが珪藻類の *P. cacciantha* であったことが明らかになった。

このほか、有害種の *Cochlodinium*

*polykrikoides* や赤潮原因種 *Noctiluca scintillans* についても調査を行った。*Cochlodinium* については、分子生物学的手法を用いた分類学的研究を進め、1 新種を含む 3 種の発生を確認した。*Noctiluca* は、東南アジアに発生する緑色の群集とわが国の紅色の群集が同一種である可能性が高いことを認めた。また、東南アジアに発生する緑色の群集の生態学的研究を進め、本種は増殖速度が低く、その赤潮形成には摂餌や濃縮過程が重要であることが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 16 件)

Dao, V. Ha, Takata, Y., Sato, S., Fukuyo, Y. and M. Kodama, Domoic acid in a bivalve *Spondylus cruentus* in Nha Trang bay, Khanh Hoa Province, Vietnam, Coastal Marine Science, 30, 130-132, 2006, 査読あり.

Azanza, R.V., Baula I.U. and Y. Fukuyo, Seasonal changes in phytoplankton composition in an extensive fish culture area in Bolinao, Pangasinan, northern Philippines, Coastal Marine Science, 30, 85-87, 2006, 査読あり.

Bajarias, F.F.A., Relox, J.Jr. and Y. Fukuyo, PSP in the Philippines: three decades of monitoring a disaster, Coastal Marine Science, 30, 104-106, 2006, 査読あり.

福代康夫, 都丸亜希子, 大村卓朗, バラスト水管理条約とその問題点, 日本プランクトン学会報, 54 巻・1 号, 50-54, 2006, 査読あり.

Furio, E. F., Matsuoka, K., Mizushima, K., Baula, I., Chan, K.W., Puyong, A., Srivilai, D., Sidharta, B.R. and Y. Fukuyo, Assemblage and geographical distribution of dinoflagellate cysts in surface sediments of coastal waters of Sabah, Malaysia, Coastal Marine Science, 30, 62-73, 2006, 査読あり.

Huyen N.T.M., Thuoc C.V., Ogata T., Sato S., Takata Y., Kodama M. and Y. Fukuyo, Seasonal variation of paralytic and amnesic shellfish toxicities in bivalves and microalgae in Haiphong area, Vietnam, Coastal Marine Science, 30, 111-115, 2006, 査読あり.

Murray, S., Nagahama, Y. and Fukuyo, Y., Phylogenetic study of benthic,

spine-bearing proro-centroids, including *Prorocentrum fukuyoi* sp. nov., Phycological Research, 55, 91-102, 2007, 査読あり.

Mizushima, K., Matsuoka, K., and Fukuyo, Y., Vertical distribution of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Dinophyceae) cysts in Ambon Bay and Hurun Bay, Indonesia, Plankton & Benthos Research, 2, 163-174, 2007, 査読あり.

Azanza, R.V., David, L.T., Borja, R.T., Baula, I.U. and Fukuyo Y., An extensive *Cochlodinium* bloom along the western coast of Palawan, Philippines, Harmful Algae, 7, 324-330, 2007, 査読あり.

Wang, S.F., Tang, D.L., He, F.L., Fukuyo, Y. and Azanza, R.V., Occurrence of harmful algal blooms (HABs) associated with ocean environments in the South China Sea, Hydrobiologia, 596, 79-93, 2008, 査読あり.

Iwataki, M., Kawami, H. and Matsuoka, K., *Cochlodinium fulvescens* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new chain-forming unarmored dinoflagellate from Asian coasts, Phycological Research, 55, 231-239, 2007, 査読あり.

Matsuoka, K., Iwataki, M. and Kawami H., Morphology and taxonomy of chain-forming species of the genus *Cochlodinium* (Dinophyceae), Harmful Algae, 7, 261-270, 2008, 査読あり.

Iwataki, M., Kawami, H., Mizushima, K., Mikulski, C.M., Doucette, G.J., Relox, Jr., J.R., Anton, A., Fukuyo, Y. and Matsuoka, K., Phylogenetic relationships in the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) inferred from LSU rDNA sequences, Harmful Algae, 7, 271-277, 2008, 査読あり.

Nguyen V. N., Omura T., Furuya K. and Y. Fukuyo, *Dinophysys* (Dinophysiales) in the pelagic waters of central and western Pacific, La Mer, 46, 29-36, 2008, 査読あり.

Viet H. D., Takata Y., Omura T., Sato S., Fukuyo Y. and M. Kodama, Seasonal variation of domoic acid in a bivalve *Spondylus versicolor* in association with that in plankton samples in Nha Phu Bay, Khanh Hoa, Vietnam, Fisheries

Science, Fisheries Science, 75, 507-512, 2009, 査読あり.  
Viet H. D., Takata Y., Omura T., Nguyen T. D., Hong T. N., Sato S., Fukuyo Y. and M. Kodama, Domoic acid in different size fractions of plankton-net sample from Nha Phu Bay, Khanh Hoa Province, Vietnam, La Mer, in print, 2009, 査読あり.

〔学会発表〕(計 16件)

Omura T., Omura K., Takata Y., Dao V. H., Nguyen T. D., Leni Y. D., Kodama M. and Fukuyo Y., Occurrence of domoic acid producing strains of *Pseudo-nitzschia* in Nha Phu Bay, Vietnam, LIPI-JSPS Joint Seminar on Coastal Marine Science, August 3-5, 2007, Yogyakarta, Indonesia.

Nguyen V. N., Omura T., Furuya K. and Fukuyo F., Genetic implication on two morphotypes of *Dinophysis hastata* Stein 1883, LIPI-JSPS Joint Seminar on Coastal Marine Science, August 3-5, 2007, Yogyakarta, Indonesia.

Takata Y., Omura T., Omura K., Sato S., Dao V. H., Nguyen T. D., Fukuyo Y. and Kodama M., Domoic acid in different size fractions of plankton-net samples collected from Nha Phu Bay, Vietnam, LIPI-JSPS Joint Seminar on Coastal Marine Science, August 3-5, 2007, Yogyakarta, Indonesia.

Azanza R., Furuya K., Ferrera C., Vargas V. M., Borja V., Norvida G., Omura T. and Fukuyo Y., Physical conditions during the predominance of *Noctiluca scintillans* in the 24-hour phytoplankton sampling at Manila Bay, Philippines, LIPI-JSPS Joint Seminar on Coastal Marine Science, August 3-5, 2007, Yogyakarta, Indonesia.

Dao V. H., Takata Y., Omura T., Sato S., Fukuyo Y. and Kodama M., Occurrence of causative plankton of domoic acid in *Spondylus versicolor* in Nha Phu Bay, Vietnam, LIPI-JSPS Joint Seminar on Coastal Marine Science, August 3-5, 2007, Yogyakarta, Indonesia.

大村卓朗, 大村加奈, 高田義宜, Dao Viet Ha, Leni Yap-Dejeto, 佐藤 繁, 兎玉正昭, 福代康夫, Vietnam Nha Phu Bay の有毒プランクトン 東南アジアにおける有毒有害プランクトンの発生 その, 日本水産学会 秋季大会, 2007

年9月26日, 北海道大学, 北海道.

福代康夫, 大村卓朗, Leni Yap-Dejeto, Dao Viet Ha, Marjorie Cobacha, Geneline Cinco, 大村加奈, 高田義宜, 兎玉正昭, Philippines San Pedro Bay の有毒プランクトン 東南アジアにおける有毒有害プランクトンの発生 その, 日本水産学会 秋季大会, 2007年9月26日, 北海道大学, 北海道.

高田義宜, 佐藤 繁, 大村卓朗, Dao Viet Ha, 福代康夫, 兎玉正昭, 熱帯域における貝類のドゥモイ酸蓄積と原因プランクトン, 日本水産学会 秋季大会, 2007年9月26日, 北海道大学, 北海道. Nguyen Van Nguyen, Takuo Omura, Yasuo Fukuyo, Morphological and genetic variation in dinophysoid dinoflagellates (海産渦鞭毛藻類 dinophysoid グループの形態および遺伝子の多様性), 日本水産学会 春季大会, 2008年3月30日, 東海大学, 静岡県.

高田義宜, 大村卓朗, Thaitaworn Lirdwitayaprasit, Ulysses M. Montojo, 佐藤 繁, 福代康夫, 兎玉正昭, 熱帯域におけるドゥモイ酸による貝類の毒化と原因珪藻, 日本水産学会 春季大会, 2008年3月30日, 東海大学, 静岡県. Leni G. Y. D., Omura T. and Fukuyo Y., Occurrence of *Pseudo-nitzschia* species in San Pedro Bay, Leyte, Philippines, 日仏海洋学会, 2008年6月28日, 日仏会館(東京).

Leni G. Y. D., Omura T., Cobacha M., Cinco G., Dao V. H. and Y. Fukuyo, Seasonal changes of *Pseudo-nitzschia* species in San Pedro Bay, Leyte Philippines, 13th International Conference on Harmful Algae, 2008年11月3-7日, Hong Kong.

Takata Y., Omura T., Osako T., Fukuyo Y., Sato S. and M. Kodama, Domoic acid detected in the culture of *Alexandrium tamarense*, 13th International Conference on Harmful Algae, 2008年11月3-7日, Hong Kong.

大村卓朗, Leni G. Y. D., Cobacha M., Cinco G., 福代康夫, フィリピン San Pedro 湾の *Pseudo-nitzschia* spp. 東南アジアにおける有毒有害プランクトンの発生 その, 日本水産学会 春季大会, 2009年3月28日, 東京海洋大学, 東京.

大村卓朗, 山本秀行, 吉田勝美, 福代康夫, 水生生物の生死判定方法としての生物染色法の検討 水生生物の自動計測装置への利用を目指して, 日本水産学会 春季大会, 2009年3月30日, 東

京海洋大学, 東京.  
福代康夫, 大村卓朗, 高田義宜, 長濱幸生, 江原克信, 吉田勝美, 水生生物の生物量判定方法としての改良ATP法の検討  
水生生物の自動計測装置への利用を目指して, 日本水産学会 春季大会, 2009年3月30日, 東京海洋大学, 東京.

〔図書〕(計 1件)

大村卓朗・福代康夫, (株)エヌ・ティエー・エス, パラスト水規制とパラスト水処理装置の開発事例 ~ 国際条約の動きから各種処理システムの比較・評価および展望まで~, 第3講 パラスト水中の生物計数と処理装置の性能評価 ~ パラスト水管理システム承認の際の生物分析方法も含めて~, 2008, 27-56.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)  
なし

取得状況(計 0件)  
なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福代 康夫 (FUKUYO YASUWO)  
東京大学・アジア生物資源環境研究センター・教授  
研究者番号: 10165318 (2008年から70095511)

(2) 研究分担者

以下の4名は2007年度まで。  
児玉 正昭 (KODAMA MASA AKI)  
北里大学・水産学部・教授  
研究者番号: 40050588  
松岡 数充 (MATSUOKA KAZUMI)  
長崎大学・環東シナ海海洋環境資源研究センター・教授  
研究者番号: 00047416  
古谷 研 (FURUYA KEN)  
東京大学・農学生命科学研究科・教授  
研究者番号: 30143548  
岩滝 光儀 (IWATAKI MITSUNORI)  
長崎大学・環東シナ海海洋環境資源研究センター・助教  
研究者番号: 50423645

(3) 連携研究者

以下の4名は2008年度から。

児玉 正昭 (KODAMA MASA AKI)  
北里大学・水産学部・教授  
研究者番号: 40050588  
松岡 数充 (MATSUOKA KAZUMI)  
長崎大学・環東シナ海海洋環境資源研究センター・教授  
研究者番号: 00047416  
古谷 研 (FURUYA KEN)  
東京大学・農学生命科学研究科・教授  
研究者番号: 30143548  
岩滝 光儀 (IWATAKI MITSUNORI)  
長崎大学・環東シナ海海洋環境資源研究センター・助教  
研究者番号: 50423645