

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380125
 研究課題名（和文） 二枚貝養殖環境における麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻の増殖・毒生産応答
 研究課題名（英文） Growth and toxin production of causative dinoflagellates for paralytic shellfish poisoning in the environment of bivalve culture farm
 研究代表者
 緒方 武比古（OGATA TAKEHIKO）
 北里大学・海洋生命科学部・教授
 研究者番号：00104521

研究成果の概要：

二枚貝養殖環境では排泄物を通じて栄養成分が供給され、これら栄養環境に応答して麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻の生長、毒生産が促進されること、海藻など栄養塩競合生物を共存させることにより促進効果を抑制できることが明らかとなった。また、今後貝類養殖業の振興が予想される東南アジア諸国において出現する麻痺性貝毒原因藻の発生状況と特性を調べ、将来に向けた基礎データを収集した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：麻痺性貝毒、渦鞭毛藻、養殖、二枚貝、生長、毒生産、*Alexandrium*、栄養塩

1. 研究開始当初の背景

麻痺性貝毒(PSP)による貝類の毒化現象は近年広域化、頻発化する傾向にある。PSPに関する研究の歴史は長く、これまでに原因種、分布、毒成分、生長・毒生産特性など多くの知見が得られている。しかし、原因藻の消長や毒生産の変動を支配する要因に関わる本質的な理解が不十分であり、貝毒現象に対する有効な対策は遅れている。このような状況下、我々は予備的にホタテガイ飼育水におけるPSP原因渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* および *A. catenella* の増殖、毒生産を調べ、以下のような知見を得ていた。す

なわち、1. 両種は飼育海水において、著しい増殖を示す。2. 両種の毒生産能も促進される傾向にある。これらの現象は *Alexandrium* がホタテガイの排泄物を利用して増殖・毒生産する可能性を示すものであり、有毒渦鞭毛藻の増殖生態や毒生産を理解する上で重要な意味を持つとの認識を持った。

2. 研究の目的

貝類の毒化程度が原因藻の出現量とその毒量によって規定されることを考えると、貝毒発生現場である養殖環境における原因藻

の動態を解明することは重要である。二枚貝養殖は通常はその効率化のためかなりの密殖状態で行われる。従って、養殖域の栄養環境はそれ以外と様相を異にすることが予測できる。しかし、貝毒研究において貝類養殖環境の特殊性を考慮した例はほとんどない。

本研究は、(ア)貝類など養殖対象生物の排泄物の増殖・毒生産に与える影響、(イ)増殖・毒生産促進因子・機構を様々な角度から検討し、さらには(ウ)これらを種々の有毒渦鞭毛藻間で比較することにより、養殖域における有毒渦鞭毛藻の動態を理解することを目的とした。また、二枚貝養殖が盛んな三陸沿岸、今後養殖の振興が予測される東南アジア諸国においてPSP原因種の特性を明らかにし、将来の貝毒対策構築に向けた基礎的知見を収集することも目的の一つとした。

3. 研究の方法

(1) 本研究ではわが国の主なPSP原因渦鞭毛藻である*A. tamarense*や*A. catenella*株を中心に培養実験を行った。また、比較検討のため、最近三陸沿岸に出現が観察されている*A. affine*、熱帯産*A. minutum*、*A. tamiyavanichii*などの株も用いた。いずれも、無菌株を作成して実験に供した。

(2) まず、*Alexandrium*各種の増殖、毒生産に対するホタテガイ飼育海水の影響をより詳細に調べた。すなわち、ホタテガイを海水中で飼育した後、飼育海水をろ過、これに培養細胞を接種して対照と比較しながら増殖を追跡した。また、培養過程で細胞を採取し、毒成分をHPLC-蛍光分析により測定した。同様に、マボヤ、カキ、ムラサキイガイについてもその効果を調べた。

(3) 次に、上記の培養実験過程で飼育海水中の無機態窒素、リン酸態リンの濃度、アミノ酸や尿素などの有機態窒素濃度を測定するとともに、培養過程での変動を調べた。

(4) ホタテガイ飼育海水をベースとした栄養塩添加培地を作成して飼育海水に増殖促進因子が存在する可能性を検討した。

(5) さらに、*A. tamarense*および*A. catenella*について貝類排泄物利用過程での毒含量変動機構について排泄物に存在する栄養物質の毒含量や毒生産速度に与える影響を調べた。影響解析に当たっては、飢餓培養のシステムを応用した。

(6) 二枚貝養殖が盛んな三陸沿岸において出現する有毒種とその毒生産能を調べた。本海域では1980年代の調査で春先から夏前にかけて*A. tamarense*が、また夏から初秋にかけて*A. catenella*が出現し、貝類の毒化には前者が関与すると考えられてきた。しかし、近年この定説では説明困難な貝類毒化が起こるなど、問題が複雑化しており、有毒種の出現状況を再検討したものである。

(7) PSPの広域化が問題となっている東南アジア諸国を考慮すると、これら海域に発生する有毒種についても貝類養殖の影響を把握しておくことは重要と考えられる。そこで、マレーシア海域より分離された*A. minutum*、*A. tamiyavanichii*、*A. taylori*、*A. affine*を対象に検討を行った。

(8) 養殖業の影響がほとんどないベトナム・ハイフォン海域において、*Alexandrium*の出現動向と貝類毒化状況の季節変動を複数年にわたって調査した。

(9) 渦鞭毛藻と生長競合が予想される大型海藻についてホタテガイ排泄物の利用とによる*Alexandrium*増殖抑制が起こるか否かについて検討した。

4. 研究成果

(1) まず、ホタテガイ2個体を5Lの海水で2日間飼育し、飼育海水をろ過した後、*Alexandrium*種を接種してその生長をコントロール海水と比較した。図1に*A. tamarense*および*A. catenella*の例を示す。この図から、飼育海水中での最大増殖量は両種とも対照と比べて高いことが確認される。この傾向は、*A. affine*、*A. tamiyavanichi*、*A. minutum*、珪藻*Thalassiosira* sp.でも同様であった。この結果は、ホタテガイの排泄物中に微細藻類の生長を支える因子の存在を示す。また、図1の結果は生長速度も飼育海水中で高い傾向にあることを示唆する。そこで、飼育海水および通常海水をベースにSWII培地を作成し、その生長を比較した。その結果、図2に示すように、生長速度はわずかではあるが、飼育海水をベースとした培地の方が高い傾向にであった。この傾向は排泄物中に生長促進物質が存在する可能性を示唆する。

次に、*Alexandrium*の毒生産に対する影響を調べた。すなわち、上記培養実験過程の対数期終期に細胞を回収し、毒含量を測定した。その結果、*A. tamarense*、*A. catenella*両種ともホタテガイ飼育海水で培養した場合、その毒含量はコントロールに比べて2倍から10倍程度高くなった(図3)。この傾向は、他の有毒*Alexandrium*種でも同様で、排泄物中に*Alexandrium*毒生産促進因子が含まれることを示唆した。一方、飼育海水をベースに培地を作成した場合、効果が認められなかったことから、毒生産促進効果は栄養塩に起因すると予測された。

さらに、マガキ、ムラサキイガイ、マボヤについても同様に検討した。図4に各生物飼育海水で培養した*A. catenella*の生長速度

(上段)、最大増殖量(下段)を示す。この結果から、生物によりその効果に違いがあり、マボヤ、ムラサキイガイはホタテガイと同程度の生長促進効果を示すのに対し、マガキでの生長コントロールと同程度であった。

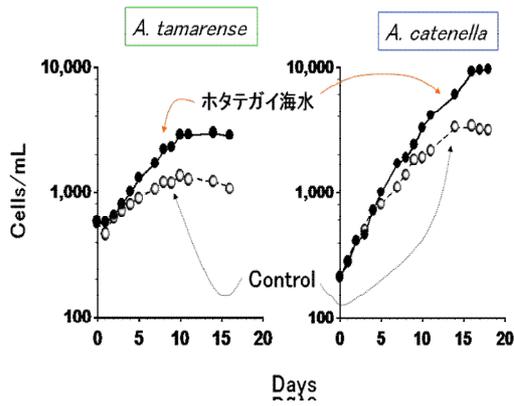


図1 ホタテガイを飼育した海水中で培養した *A. tamarensis* および *A. catenella* の生長曲線

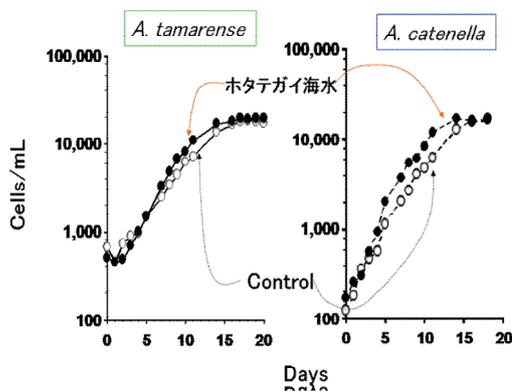


図2 ホタテガイ飼育海水をベースとして作成したSWII培地で培養した *A. tamarensis* および *A. catenella* の生長曲線

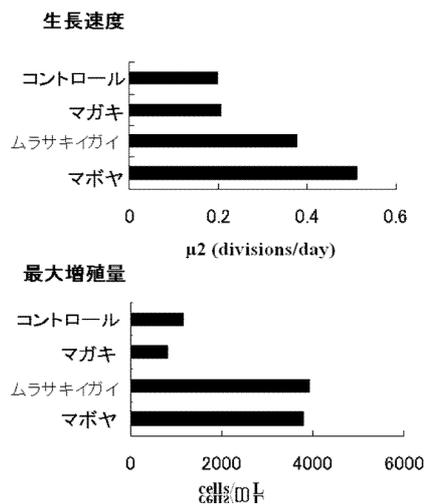


図3 ホタテガイ飼育海水ならびに飼育海水をベースに作成したSWII培地で培養した *A. tamarensis* および *A. catenella* の毒生産能

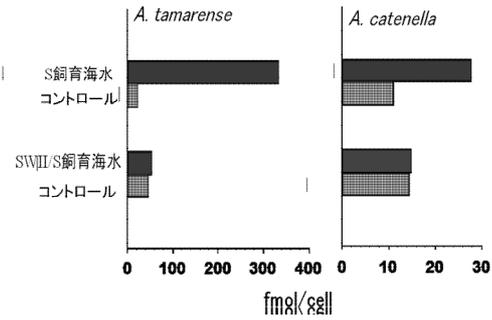
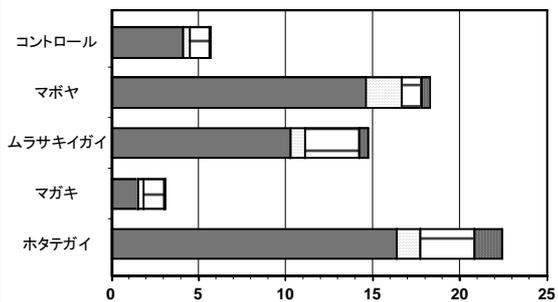


図4 マガキ、ムラサキイガイ、マボヤ飼育海水で培養した *A. catenella* の生長速度 (上段) ならびに最大増殖量 (下段)

最後に、各飼育海水中の栄養塩およびアミノ酸量を測定して生長、毒生産との関係を検討した。その結果、図5に示すように、高い増殖・毒生産促進効果を示したホタテガイ、ムラサキイガイ、マボヤでは各栄養塩、アミノ酸ともコントロールより高い傾向にあった。特にアンモニア態窒素の量はコントロールの2~3倍程度に及んだ。これに対し、マガキではいずれも低く、コントロールとほぼ同等であった。これらの結果は以下のことを示唆する。すなわち、ホタテガイなどが示した *Alexandrium* 増殖促進効果は排泄物に含まれる栄養塩によること、特にアンモニア態窒素は窒素源として生長を促進したことである。マガキ飼育海水が増殖促進効果を示さなかった理由は飼育海水中の栄養塩レベルが低かったことによると説明できる。

Alexandrium の毒生産は培地中の窒素源濃度と正の相関をもつことが明らかにされている。従って、ホタテガイなどの飼育海水が示した毒生産促進効果は主にアンモニア態窒素による考えられる。



栄養塩、アミノ酸濃度 (μM)

図5 試験に供した各生物の飼育海水に含まれるアンモニア態窒素 (■)、硝酸態窒素 (□)、アミノ酸 (≡)、リン再態リン濃度 (▣)

(2) 上述のようにホタテガイなどの排泄物

は微細藻の生長を支えるとともに、有毒渦鞭毛藻の毒生産も促進する。このことは、二枚貝養殖域では高毒性の有毒渦鞭毛藻が多量に発生する可能性を示唆する。貝類養殖が普及すると貝毒現象が起こるとの通説も上記の結果と矛盾しない。PSPによる貝類毒化は食品衛生上、水産業振興上、大きな問題であり、被害防止対策の確立が急務とされている。上記の結果は、二枚貝が排泄する栄養成分を低減できれば貝類毒化の抑制につながる可能性を示唆する。そこで本研究では技術開発の基礎となるいくつかの方法を試みた。ここでは最も高い効果の認められたアオサと二枚貝の混合飼育法を示す(図6~8)。

ホタテガイ3個体を10Lの海水に収容し、アオサ葉体20gとともに7日間飼育した(図6~8における“S飼育海水+U”)。また、ホタテガイのみを収容した区(図6から8の“S飼育海水”)、アオサのみの区(図6から8の“U飼育海水”あるいは“U添加海水”)、海水のみの試験区を用意し、アンモニア量の変化(図6)を調べた。また、飼育2日目の試験海水に*A. tamarense*を接種して培養、最大増殖量(図7)および対数期終期の細胞毒含量(図8)を求めた。その結果、ホタテガイ飼育海水では培養2日目でアンモニア濃度は100 μ Mを超え、その後徐々に減少した(図6)。一方、アオサとともに飼育したホタテガイ飼育海水では上昇せず、そのレベルはアオサのみを収容した海水、コントロール海水と同程度であった。この結果は、アオサがホタテガイ排泄物中のアンモニアを吸収利用した結果と考えられる。また、図7に示すようにアオサ添加ホタテガイ飼育海水では最大増殖量がホタテガイ飼育海水に比べて著しく低く、また毒含量も低いレベルであった(図8)。この方法は有毒渦鞭毛藻の発生や毒生産を抑制する方法開発の一つのヒントを与えるものと考えられる。

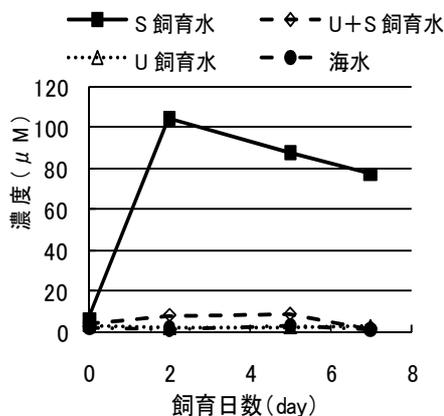


図6 ホタテガイ飼育海水、アオサ添加ホタテガイ飼育海水におけるアンモニア濃度の経時的変化

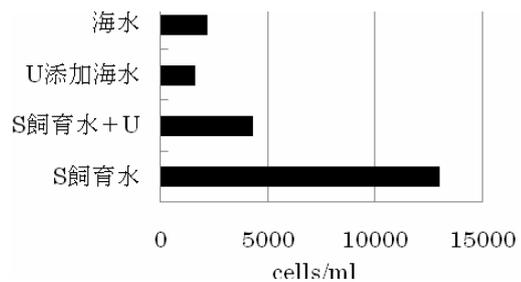


図7 図6の各試験区の海水で培養した*A. tamarense*の最大増殖量

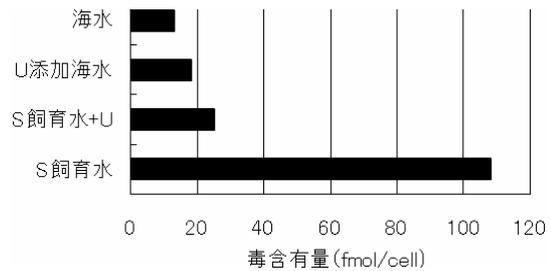


図8 図6の各試験区海水で培養した*A. tamarense*対数期終期の細胞あたりの毒含量

(3) 東南アジア海域に出現する有毒*Alexandrium*の特性:熱帯域で出現する有毒*Alexandrium*種については、生長特性や毒生産特性がほとんど不明である。出現温度や環境因子の様相が異なるこれらの海域では栄養環境への応答も亜寒帯種と異なることが予想される。東南アジア諸国では今後貝類養殖の振興が予想されることを考慮すると、これら有毒種の特性を明らかにすることは重要である。

①マレーシア海域より分離された有毒*A. tamiyavanichi*ならびに*A. minutum*について水温、光に対する生長、毒生産応答を調べた。その結果、*A. tamiyavanichi*の生長は水温20 $^{\circ}$ C、光強度40 μ mol photons/m 2 /s以下で抑制されること、両種は水温10 $^{\circ}$ C以下、光強度10 μ mol photons/m 2 /s以下では生長しないことなどが明らかとなった。また、細胞あたりの毒含量は*A. tamiyavanichi*で高く(60-80fmol/cell)、*A. minutum*は低い(10-42fmol/cell)こと、毒生産速度は水温の上昇とともに増加することも判明した。これらの傾向は三陸産*A. tamarense*とは異なるものであった。本研究の内容は、下記“主な発表論文”[雑誌論文]の①により公表した。②今後貝類養殖の振興が予測されるベトナム・ハイフォン沿岸の2定点において2年間にわたり現地研究者と協力して有毒渦鞭毛藻の出現量を調査した。調査に際しては、同海域で採取される二枚貝の毒性もモニター

した。その結果、貝類には食品衛生上問題にならない程度の毒性が検出され、この毒性は季節変化を示した。比較的高い毒性を示した貝類について毒成分を HPLC および LC-MSMS により同定することができた。このことは、同海域における原因微細藻の存在を示唆する。そこで、有毒渦鞭毛藻を検索したところ、*A. minutum*, *A. tamiyavanichi*, *A. ostenfeldii* の存在を確認することができた。これらの結果は、これまで PSP 中毒事例のない本海域においても、水産養殖業の振興に伴い、有毒渦鞭毛藻の発生が顕在化する可能性を示唆する。なお、本研究の内容は下記“主な発表論文”[雑誌論文]の②により公表した。

③ベトナム・ハイフォン沿岸より分離した *A. minutum* 株に毒成分の新規誘導体を発見した。同株を大量培養して毒成分を HPLC で分析したところ、既知成分 GTX4 と GTX1 の間に未知のピークの存在を確認、この成分を精製してその特性、構造を調べたところ、本成分は deoxy-GTX4-12ol であると推察された。PSP 成分の生合成はいまだ不明の部分が多いが、本成分はその解明に向けたツールとなるものと期待される。なお、本研究の内容は下記“主な発表論文”[雑誌論文]の④により公表した。

④マレーシア海域より分離された *A. tamiyavanichi* と *A. minutum* についてその鎧板の形状を培養過程で詳細に調べた。その結果、これまで両 2 種と近縁種の区別に用いられている鎧板は同一クローンの細胞でも変異することを明らかにし、同グループの同定に際しては今後十分な検討が必要であることを示唆した。この研究の内容は下記“主な発表論文”[雑誌論文]の⑤により公表した。

(4) 岩手県沿岸に出現する *Alexandrium* 属とその毒生産能：岩手県沿岸 7 湾において *Alexandrium* 種の出現ならびにその毒生産能を調べた。その結果、本海域には少なくとも 8 種の *Alexandrium* が出現することを確認した。そのうち 5 種 (*A. insuetum*, *A. ostenfeldii*, *A. pseudogonyaulax*, *A. tamutum*, *A. minutum*) は今回の調査で初めて確認したものであり、本海域における *Alexandrium* の出現動態に変化が起きていることを示した。また、本海域では初めて *A. ostenfeldii* に GTX4 を主成分とする PSP 成分の存在を認めた。同種の毒生産能は 7.5fmol/cell 程度と低く、出現量も低いことから、現状では貝類高毒化の原因にはならないものと予想された。今後本海域における有毒出現予測などにおいては種査定に十分な注意を払い、新たな毒化原因種も想定する必要も考えられる。なお、本研究の内容は下記“主な発表論文”[雑誌論文]の③により公表した。

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 6 件)

- ① Lim PT, Leaw CP, Usup G, Kobiyama A, Koike K, Ogata T, Effects of light and temperature on growth, nitrate uptake and toxin production of two tropical dinoflagellates, *Alexandrium tamiyavanichii* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 42, 786-799, 2006, 査読あり
- ② Nguyen TMH, Thuoc CV, Ogata T, Sato S, Takata Y, Kodama M, Fukuyo Y, 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
- ③ 加賀新之助, 関口勝司, 吉田 誠, 緒方武比古, 岩手県沿岸に出現する *Alexandrium* 属とその毒生産能、日本水産学会誌、72、1068-1076、2006、査読あり
- ④ Lim PT, Sato S, Thuoc CV, Tu PT, Nguyen TMH, Takata Y, Yoshida M, Kobiyama A, Koike K, Ogata T, Toxic *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Vietnam with new gonyautoxin analogue. *Harmful Algae*, 6, 321-331, 2007, 査読あり
- ⑤ Lim PT, Leaw CP, Ogata T, Morphological variation of two *Alexandrium* species responsible for paralytic shellfish poisoning in Southeast Asia. *Botanica Marina*, 50, 14-21, 2007, 査読あり
- ⑥ Kobiyama A, Ikeda Y, Koike K, Ogata T, Isolation of a differentially expressed gene in separate mating types of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *European Journal of Phycology*, 42, 183-190, 2007, 査読あり

[学会発表] (計 17 件)

- ① 田中将平、小檜山篤志、金子豊、小池一彦、緒方武比古、渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の温度応答、平成 18 年度日本水産学会大会 (高知)、2006.3.31
- ② 緒方武比古、伊東詩織、坪井優卓、小檜山篤志、小池一彦、麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *Alexandrium* の休眠過程と毒成分変化、平成 18 年度日本水産学会大会 (高知)、2006.3.31、
- ③ Kobiyama A, Koike K, Ogata T,

- Isolation preferentially expressed gene between different mating type cells in the dinoflagellated *Alexandrium tamarense*. 12th International Conference on Harmful Algae (Copenhagen, Denmark), 2006.9.7
- ④ Lim PT, Sato S, Thuoc CV, Nguyen TMH, Takata Y, Yoshida M, Kobiyama A, Koike K, Ogata T, New gonyautoxin analogue isolated from the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). 12th International Conference on Harmful Algae (Copenhagen, Denmark), 2006.9.7
- ⑤ Ogata T, Leaw CP, Usup G, Kobiyama A, Koike K, Lim PT, Growth and toxin production of the dinoflagellate, *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) isolated from Tumpat estuary, northeastern part of peninsula Malaysia. 12th International Conference on Harmful Algae (Copenhagen, Denmark), 2006.9.7
- ⑥ Lim PT, Leaw CP, 小檜山篤志、小池一彦、緒方武比古、Effect of nitrogen and phosphorus ratios on growth and toxin production of dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). 平成 19 年度日本水産学会春季大会 (東京)、2007.3.30
- ⑦ 加賀新之助、小檜山篤志、小池一彦、緒方武比古、*Alexandrium tamarense* 自然集団における生活史と毒生産の関係、平成 19 年度日本水産学会春季大会 (東京)、2007.3.30
- ⑧ 小檜山篤志、田中将平、緒方武比古、渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* における uncoupling protein 様遺伝子のクローニングと発現解析、第 10 回マリンバイオテクノロジー学会大会 (山形)、2007.5.27
- ⑨ Lim PT, Leaw CP, Kaga S, Sekiguchi S, Sato S, Kobiyama A, Ogata T, Growth responses of five non paralytic shellfish toxins (PSTs) producing *Alexandrium* species (Dinophyceae) to temperature and salinity. LIPI-JSPS Joint Seminar on Coastal Marine Science (Yogyakarta, Indonesia) 2007.8.4
- ⑩ 小檜山篤志、角南玲子、山田雄一郎、緒方武比古、渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* 遺伝子の発現機構の解析、平成 20 年度日本水産学会春季大会 (清水)、2008.3.30
- ⑪ Sato S, Sakata E, Aburatani H, Hayashi T, Kodama M, Biochemical degradation of C11-O-sulfate paralytic shellfish poisoning toxins. 5th World Fisheries Congress (Yokohama), 2008.10.21
- ⑫ Okiyama S, Kobiyama A, Ogata T, Molecular cloning and expression analysis of transketolase in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. 5th World Fisheries Congress (Yokohama), 2008.10.23
- ⑬ Kobiyama A, Ogata T, Effect of calcium ion on cyst formation of *Alexandrium tamarense*. 5th World Fisheries Congress (Yokohama), 2008.10.23
- ⑭ 加藤千晶、山田雄一郎、小檜山篤志、緒方武比古、岩手県沿岸域における主要カイアシ類 2 種の有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* に対する摂餌活性、2009 年度日本海洋学会春季大会 (東京)、2009.4.6
- ⑮ 沖山晋吉、小檜山篤志、緒方武比古、渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* のアンモニウム輸送体 (AMT) に関する研究、平成 21 年度日本水産学会春季大会 (東京)、2009.3.30
- ⑯ 篠原なつみ、伊早坂ゆかり、山田雄一郎、小檜山篤志、緒方武比古、加賀新之助、有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の細胞内自家蛍光顆粒に関する研究、平成 21 年度日本水産学会春季大会 (東京)、2009.3.30
- [図書] (計 1 件)
- ① Kodama M, Sato S, CRC Press, New York, Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection、(担当章題名: Chaper 7 – Metabolism of paralytic shellfish toxins incorporated into Bivalves.), 2008, pp. 165 – 175
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
緒方 武比古 (OGATA TAKEHIKO)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号: 00104521
- (2) 研究分担者
佐藤 繁 (SATO SHIGERU)
北里大学・海洋生命科学部・准教授
研究者番号: 20170748
小檜山 篤志 (KOBIYAMA ATSUSHI)
北里大学・海洋生命科学部・講師
研究者番号: 60337988
- (3) 連携研究者
なし