



Title	大阪湾における麻痺性貝毒原因藻Alexandrium tamarenseの大規模増殖および二枚貝の毒化に関する生物環境学的研究
Author(s)	山本, 圭吾
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	乙第7037号
Issue Date	2017-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7037
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88263
Type	doctoral thesis
File Information	Keigo_Yamamoto.pdf



大阪湾における麻痺性貝毒原因藻 *Alexandrium tamarense* の
大規模増殖および二枚貝の毒化に関する生物環境学的研究
(Bioenvironmental studies on large-scale blooms of the toxic dinoflagellate
Alexandrium tamarense in the Osaka Bay and toxic contaminations of bivalves)

山本圭吾
Keigo Yamamoto

平成 29 年 12 月 (2017)

目 次

第1章 序論：大阪湾における麻痺性貝毒の発生1
第1節 大阪湾	
第2節 麻痺性貝毒と原因プランクトン	
第3節 大阪湾における麻痺性貝毒原因プランクトンの発生	
第4節 大阪湾における二枚貝の毒化の特徴と漁業への影響	
第5節 本研究の目的	
第2章 大阪湾における麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 <i>Alexandrium tamarense</i> の出現動態8
第1節 大阪湾における栄養細胞の出現と増殖時の環境	
第2節 水平分布と鉛直分布	
第3節 日周鉛直移動と細胞当たり毒量の変化	
第4節 シストの分布と経年変化	
第5節 赤潮の発生と魚介類の斃死	
第3章 淀川感潮域における <i>Alexandrium tamarense</i> の発生62
第1節 感潮域における <i>Alexandrium tamarense</i> の増殖と環境要因	
第2節 感潮域における <i>Alexandrium</i> 属シストの分布	
第3節 感潮域における赤潮の発生と、河口堰解放によるブルーム抑制	
第4節 淀川大堰におけるブルーム抑制に対する放水効果の検証	
第4章 大阪湾における海洋環境の長期変化と <i>Alexandrium tamarense</i> の増殖91
第1節 <i>Alexandrium tamarense</i> 栄養細胞の長期的出現状況と春季の環境変化	
第5章 大阪湾における <i>Alexandrium tamarense</i> による二枚貝の毒化98
第1節 <i>Alexandrium tamarense</i> の出現と二枚貝毒化の関係	
第2節 アカガイとトリガイにおける麻痺性貝毒の部位別分布と毒成分	
第3節 同一海域の二枚貝毒量における個体間のばらつき、および同一調査日における海域間のばらつき	
第6章 プランクトン調査と ELISA 法の併用による麻痺性貝毒モニタリング129
第7章 総括140
要約143

Summary	·····146
謝辭	·····149
引用文献	·····151

第1章 序論：大阪湾における麻痺性貝毒の発生

第1節 大阪湾

大阪湾は瀬戸内海の東端に位置する北東から南西方向の長軸約 60km、北西から南東方向の短軸約 30 km の楕円形をした面積約 1,860 km² の内湾であり、北西で明石海峡を通して播磨灘に、南部で紀淡海峡を通して紀伊水道に連なっている。湾北東部には淀川、大和川といった一級河川が流入している半閉鎖水域で、湾奥から湾口にかけての環境勾配が著しく大きい。特に湾奥域は停滞性が強く、かつては赤潮が頻発し、底層が貧酸素化する典型的な富栄養海域として知られていた。しかし近年、大阪湾を含む瀬戸内海において栄養塩の低下による貧栄養化と、それに伴う漁獲量の減少が議論されるようになってきた (Yamamoto, 2003)。植物プランクトン群集は生態系の中で基礎生産者として機能することから、栄養塩の低下によって直接的に影響を受けると考えられる。

第2節 麻痺性貝毒と原因プランクトン

貝毒とは毒を産生するプランクトンを二枚貝等の捕食者が捕食することで体内に毒を蓄積し、さらに毒化二枚貝等を人が摂食することにより発症する自然食中毒の一種である。症状により麻痺性貝毒、下痢性貝毒、記憶喪失性貝毒などがあるが、なかでも麻痺性貝毒はふぐ毒と同様の症状を示し、死亡事例もあることから早くから注目されてきた (Carson, 1977)。麻痺性貝毒を産生するプランクトンとしては、渦鞭毛藻の仲間であるアレキサンドリウム属やギムノディニウム属、藍藻類のアナベナ属およびアファニゾメノン属に属するいくつかの種が知られているが、国内では海産の *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech, *Alexandrium catenella* (Whedon et Kofoid) Balech および *Gymnodinium catenatum* Graham の3種が主な原因プランクトンとなっている (Table 1-1)。麻痺性貝毒は、当初北海道や東北のホタテガイ *Patinopecten yessoensis* Jay が主な規制対象種であったが、近年その発生範囲は広域化し、規制対象もマガキ *Crassostrea gigas* (Thunberg) やアサリ *Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, ヒオウギガイ *Mimachlamys nobilis* (Reeve), アカガイ *Anadara broughtonii* Schrenck などの二枚貝だけでなく、貝の捕食者であるイシガニ *Charybdis japonica* A. Milne-Edwards, トゲグリガニ *Telmessus acutidens* Stimpson などの甲殻類についても毒化することから注意喚起がなされている。貝毒は有毒プランクトンを捕食することにより発生するため、原因プランクトンの増減と毒化の程度が密接に関わっている。そのため、発生と終息を予測するにあたってプランクトンの動向を把握することが重要となっている。

渦鞭毛藻の一種である *A. tamarense* は麻痺性貝毒原因プランクトンとしてよく知られており、日本沿岸域では北海道宗谷岬周辺海域から九州八代海にかけて広く分布する (板倉 2007)。他の麻痺性貝毒原因種である *A. catenella* と比較して *A. tamarense* にはおよそ5倍の毒量がある (高田, 2000)。 *A. catenella* が比較的頻繁に赤潮を形成する (竹内, 1992 など) のに対し、本種の赤潮発生例はほとんど報告されていない。ここで、John et al. (2014a) は *A. catenella-tamarense* グループの分子系統解析を行い、5つの分類群に分かれることを

示した上で、*A. catenella* の種名を廃棄することを提案した(John et al. 2014b)。この報告に従うと *A. tamarensense* は *Alexandrium fundyense* に、*A. catenella* は *Alexandrium pacificum* となるが、本件の是非については議論の途上であることから、本報告においては従来通り *A. tamarensense* および *A. catenella* とした。

Table 1-1. List of PSP causative phytoplankton.

PSP causative species	Taxon	Occurrence in Osaka Bay	Occurrence period in water column
<i>Alexandrium acatenella</i>	Dinoflagellate		
<i>Alexandrium catenella</i>	Dinoflagellate	○	spring to early summer
<i>Alexandrium tamiyavanichii</i>	Dinoflagellate	○	autumn to winter
<i>Alexandrium fundyense</i>	Dinoflagellate		
<i>Alexandrium minutum</i>	Dinoflagellate		
<i>Alexandrium tamarensense</i>	Dinoflagellate	○	early spring to late spring
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Dinoflagellate	○	summer to autumn
<i>Pyrodinium bahamense</i>	Dinoflagellate		
<i>Anabena circinalis</i>	Cyanobacteria		

Table 1-2. Occurrences of PSP causative phytoplankton in Osaka Bay before 2002.

Year	Month	Species	Maximum cell density (cells ml ⁻¹)
1978	May	<i>Protogonyaulax tamarensis</i>	660
1994	April	<i>Alexandrium tamarensense</i>	13
1995	May	<i>Alexandrium catenella</i>	60
1999	June	<i>Alexandrium catenella</i>	147
2001	March	<i>Alexandrium tamarensense</i>	7

第3節 大阪湾における麻痺性貝毒原因プランクトンの発生

大阪湾においては 1960 年代の高度成長期以降富栄養化が進行し赤潮が頻発したが、ほとんどの期間珪藻類が最優占種となっており、貝毒原因種が大規模に発生して問題になることはなかった。また、麻痺性貝毒原因プランクトンの出現も確認されていたものの、近年まで大規模な増殖をすることがなく、貝毒の蓄積も確認されていなかった (Table 1-2)。そのため、前述の通り国内では *Alexandrium tamarensense*, *Alexandrium catenella* および *Gymnodinium catenatum* の 3 種が主な原因プランクトンとなっており、大阪湾においてはこれに *Alexandrium tamiyavanichii* を加えた 4 種が確認されている (Table 1-1) が、麻痺性貝

毒の発生リスクは過小に評価され、近年まで原因プランクトンの出現状況、貝毒の検査事例などについては断片的なデータしか存在しなかった。しかし、2002年に *A. tamarensis* によりアサリで規制値を超える毒化が確認された（濱野ら、2002、山本、2004）。以来、ほぼ毎年のように春期には本種が増殖し、二枚貝の毒化がみられるようになり、現在も増殖の規模は拡大傾向にある。さらに2007年、2011年、2013年、2014年、2016年には、本種ではまれとされる「赤潮」の形成が確認された（山本ら、2009、山本未発表）。

Table 1-3. Annual maximum cell density of *A. tamarensis*, maximum toxicity and length of self regulation period in Osaka Bay during 2002 to 2016.

		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Annual maximum cell density (cells mL ⁻¹)		37	7	4	4	83	609	169	7	27	121	7	714	202	30	552
Maximum toxicity (MU g ⁻¹)	Manila clam	18	2.4	2.2	-	42.5	140	99	-	90.7	20	2.2	27.1	75.1	41.8	228.6
	Arc shell	2.1	-	-	-	14.9	16	7.3	2.4	10.5	4.2	-	21	41	2.9	39
	Japanese cockle	2.1	-	-	-	3.0	45	16	2.1	12.6	2.0	-	17.6	6.1	14	32
	Brackish water clam	-	-	-	-	-	46	-	N.D	-	22	-	15.2	27	N.D	63
Length of self regulation (days)	Manila clam	23	-	-	-	49	49	56	-	43	43	-	50	58	64	77
	Arc shell	-	-	-	-	43	63	49	-	22	-	-	69	106	-	70
	Japanese cockle	-	-	-	-	-	77	42	-	46	-	-	49	37	60	44
	Brackish water clam	-	-	-	-	-	36	-	-	-	42	-	62	38	-	35

第4節 大阪湾における二枚貝の毒化の特徴と漁業への影響

渦鞭毛藻の一種である有毒種 *Alexandrium tamarensis* の大規模な増殖と、厚生労働省の定める規制値 (4MU (マウスユニット) /g) を越える麻痺性貝毒の蓄積が2002年に初めて確認されて以降、ほぼ毎年一定規模の増殖と貝毒の蓄積が観測されるようになった (Table 1-3)。さらに2007年の赤潮発生時には、我が国では初の事例となるトリガイ *Fulvia mutica* Reeve と、汽水域に生息するヤマトシジミ *Corbicula japonica* Prime においても規制値を上回る貝毒の蓄積が認められた。特に2007年の事例ではアサリ、アカガイ、トリガイおよびヤマトシジミについて、1-2ヶ月の長期にわたって出荷自主規制が続いたため、漁家経営に大きな打撃となった。その後も *A. tamarensis* の増殖規模は拡大傾向にあり、規制日数も長期に及ぶことが多くなった (Table 1-3)。

Table 1-4 および Fig. 1-1 に2016年までに大阪湾において麻痺性貝毒の蓄積が確認された貝種を示した。大阪府立公衆衛生研究所の調査によると、他海域で主に問題となっているアサリ、マガキおよびムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* Lamarck や底曳き網漁業の漁獲対象種であるアカガイとトリガイの他、バカガイ *Mactra chinensis* Philippi やクチバガイ

Coecella chinensis Deshayes, さらにはツメタガイ *Glossaulax didyma* Röding やアカニシ *Rapana venosa* Valenciennes といった肉食性巻貝からも麻痺性貝毒が検出された（大阪府立公衆衛生研究所, 2008）。特にアカガイとトリガイは底曳き網における主要漁獲物であり、麻痺性貝毒が蓄積する春季は両種とも最も単価が高くなる時期であることから、漁業への影響は大きい。大阪湾における貝毒の特徴は、問題となる生物がすべて天然で採取される魚介類であり、ホタテガイやマガキといった養殖二枚貝のように貝自体のモニタリングが困難であることにある。したがって、大阪湾においては主に原因プランクトンのモニタリングを主体としたリスク管理体制を取っている。

Table 1-4. List of shellfish species accumulating PSP toxin in Osaka Bay

Year	Month	English common name
2002	March	Manila clam
2006	April	Arc shell
2007	May	Chinese mactra
2007	May	Oyseter
2007	May	Brackish water clam
2007	May	Japanese cockle
2007	May	Bladder Moon shell
2008	February	Mussel
2008	April	Rock-shell
2008	May	Kuchibagai
2008	May	Koshidakagangara



Fig. 1-1. Shellfish species accumulating PSP toxin in the Osaka Bay.

Fig. 1-2 に大阪府におけるモニタリング体制を示した。筆者が所属する水産技術センターにおいて週 1 回から月 2 回の頻度で調査船による調査を行い、原因プランクトンごとに定めた注意密度ないしは警戒密度を超えた場合二枚貝の検査に移行する。この二枚貝の検査で規制値の 4MU g^{-1} を上回った場合は漁業者に出荷自主規制の要請を行う。上回らなかった場合は原因プランクトンのモニタリングを継続し、再度警戒密度を上回った場合は同様に二枚貝の検査を行うが、上回らなかった場合は二枚貝の検査は行われぬ。すなわち、一度警戒値を上回っていたとしてもその後のプランクトンの発生状況次第で二枚貝の検査が行われぬことがある。これまでこの体制で市場に流通する二枚貝の中毒事例はなかったが、2008 年にムラサキイガイによって大阪湾で初となる中毒が発生した(大阪府, 2017)。

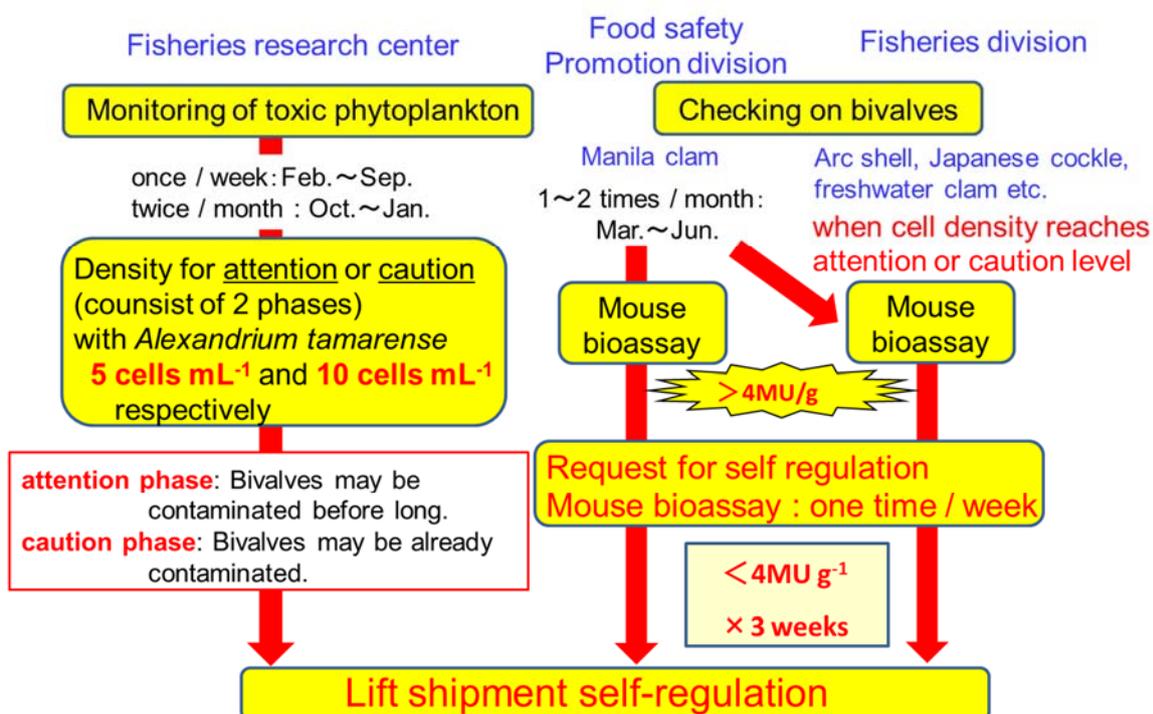


Fig. 1-2. Flow diagram of current PSP monitoring system in Osaka Bay.

Table 1-5 に日本国内における麻痺性貝毒中毒事例を示した。北海道から鹿児島県まで広く中毒事例が確認されるが、2000 年代以降の 4 件のうち 3 件が大阪湾における中毒事例となっており、近年健康問題としても深刻な問題となっている。これらはすべて、出荷自主規制後遊漁として採取された二枚貝によるものであり、市場での流通という点ではリスク管理は滞りなく進行しているといえるが、流通魚介類で中毒が起こっていないとはいえ、中毒を起こさないため今後より高精度で効果的なモニタリング体制の構築が必要と考えられる。

Table 1-5. Reported cases of PSP in Japan after 1947 updated to Imai and Itakura (2007)

Period (year/month)	Location (city, prefecture)	English common name of hazard bivalves	Number of patients (Number of deaths)
1947/July	Toyohashi, Aichi	Manila clam	12 (1)
1961/May	Ofunato, Iwate	Akazara-scallop	20 (1)
1962/February	Miyazu, Kyoto	Oyster(culture)	42 (0)
1979/January	Senzaki, Yamaguch	Oyster(culture)	16 (0)
1979/April	Asahikawa, Hokkaido	Mussel	3 (1)
1982/May	Ofunato, Iwate	Sea squirt	2 (0)
1987/June	Kagoshima, kagoshima	Manila clam	1 (0)
1989/April	Ofunato, Iwate	Scallop	5 (0)
1989/April	Ofunato, Iwate	Mussel	1 (0)
1989/July	Shimokita, Aomori	Mussel	6 (1)
1991/May	Nanae, Hokkaido	Scallop	1 (0)
1996/April	Nobeoka, Miyazaki	Mussel	2 (0)
1997/March	Tamanoura, Nagasaki	Oyster (natural)	26 (0)
1998/February	Yawatahama, Ehime	Oyster (natural)	4 (0)
2008/April	Kaizuka, Osaka	Mussel	3 (0)
2013/May	Osaka, Osaka	Mussel	2 (0)
2015/May	Tochigi	Scallop	4 (0)
2016/March	Hannan, Osaka	Manila clam	2 (0)

Bold-faced data indicate those added to Imai and Itakura(2007).

第5節 本研究の目的

以上の様に、大阪湾における麻痺性貝毒の問題は比較的新しいものであり、本研究以前には大阪湾において原因プランクトンを含め麻痺性貝毒について集中して行われた研究事例はない。そのためまずは大阪湾で近年急に麻痺性貝毒が増加増殖し始めた要因を明らかにする必要がある。また上述の通り、大阪湾における麻痺性貝毒は渦鞭毛藻の *Alexandrium tamarense* を原因種とする事例が大半を占める。本種は主に春季に増殖する（後述）が、この時期アサリの潮干狩りのシーズンであり、観光業に対して問題が大きい。また、Fig. 1-3で示すとおり、大阪湾で操業する底曳き網漁業の重要漁業生物であるアカガイ、トリガイでは1年のうち単価が最も高くなる時期にあるため、麻痺性貝毒による出荷自主規制は漁家経営に大きな影響を与える。このように本種の増殖による麻痺性貝毒の蓄積は、大阪湾においては特に大きな問題となる。

本研究においては、まず第2章で現場調査に基づいて大阪湾における麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *A. tamarense* の出現生態について明らかにする。続く第3章では、大阪湾における本種増殖の特徴的な事例として、河川感潮域における出現と同水域に生息するヤマトシジミの毒化、可動式河口堰からの放流と大規模発生との関係について論じる。第4章では大阪湾で環境モニタリングのデータから環境要因の長期変動と本種の出現状況を明らかにし、近年になって大阪湾で本種の増殖規模が拡大してきた要因について検討する。さらに第5章では、本種の出現と二枚貝毒化の関係、貝種の違いによる毒化の差異等を、大阪湾の底

曳き網の重要漁業対象であり、他の海域では事例が少ないアカガイとトリガイについて明らかにする。加えて、第6章でプランクトンによる毒化モニタリングを補完する目的で実施した、簡易分析法による麻痺性貝毒毒化モニタリングの有効性を検討する。これらで得られた結果を総合し、第7章においては、今後の大阪湾における麻痺性貝毒リスクの管理体制の構築を試みる。

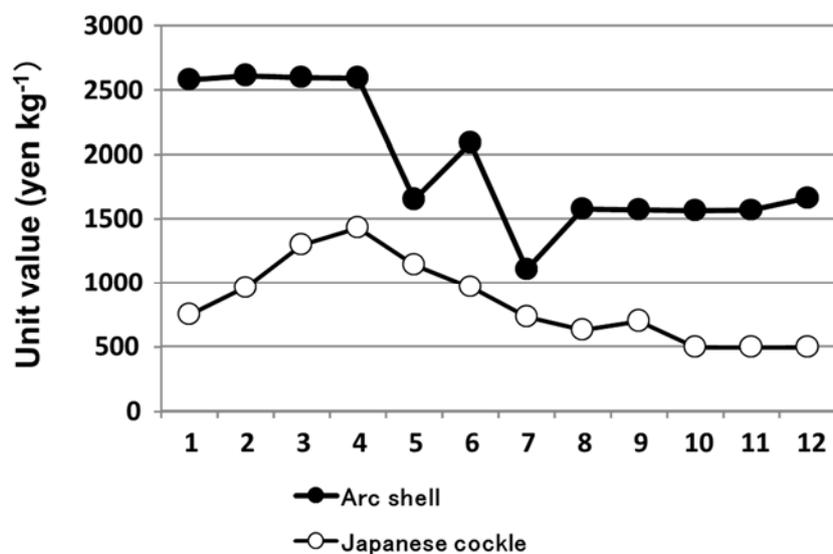


Fig. 1-3. Monthly changes in the unit values of Arc shell and Japanese cockle caught in Osaka Bay. Values are means during 2011-2013.

第2章 大阪湾における麻痺性貝毒原因薄鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の出現動態

麻痺性貝毒を産生するプランクトンとしては、渦鞭毛藻の仲間である *Alexandrium* 属や *Gymnodinium* 属、藍藻類の *Anabena* 属などのいくつかの種で知られている。国内では *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium catenella*, *Gymnodinium catenatum* の3種が主な原因プランクトンとなっており、中でも *A. tamarense* は大阪湾における主たる麻痺性貝毒原因種となっている。本種による麻痺性貝毒は、当初北海道や東北のホタテガイが主な対象種であった。しかし、近年その発生範囲は広域化し、対象もカキやアサリ、ヒオウギガイ、アカガイなどの二枚貝だけでなく、貝の捕食者であるイシガニ、トゲグリガニなどの甲殻類についても注意喚起がなされている。貝毒は有毒プランクトンを捕食することによって発生するため、原因プランクトンの増減と毒化の程度が密接に関わっている。そのため、発生と終息を予測するにあたって、原因プランクトンの生活史を通じての動向を把握することが重要である。

本章では大阪湾における本種栄養細胞とシストの出現動態を明らかにする。さらに、特異的な事例として確認された本種の赤潮の発生状況と他生物への影響についてまとめた。

第1節 大阪湾における栄養細胞の出現と増殖時の環境

緒言

第1章で示した通り、大阪湾で *Alexandrium tamarense* が大規模に増殖し、麻痺性貝毒が問題となったのは2002年以降である。それ以前は、本種栄養細胞の出現は確認されていたが、大規模に増殖することはなかった。近年になって大阪湾で大規模増殖が頻発するようになった要因を明らかにするためには、まず *A. tamarense* の天然海域における増殖環境を明らかにする必要がある。

本項では、2002年から2016年に大阪湾で行ったモニタリング調査のデータおよび2009年以降に実施した集中調査の結果を用い、大阪湾における *A. tamarense* 栄養細胞の出現状況と増殖時の環境要因について検討を加えた。

材料と方法

Alexandrium tamarense 栄養細胞密度および環境要因の調査は、2002年から2016年の2月から5月に月2回から5回の頻度で行った。月の上旬に大阪湾全域の20定点 (Fig. 2-1A) で、残りの週を大阪湾東部の14定点ないし定点dを除いた13定点 (Fig. 2-1B) において実施した。なお、cとc'の位置は若干異なるが、データの処理上同じ定点とした。調査は大阪府立環境農林水産総合研究所 (旧大阪府立水産試験場) 調査船「おおさか (1998年4月-2013年2月: 28 t, 2013年3月-: 19 tの新造船)」により行った。各定点で表層水をバケツにより採水し、一部については現場で25%グルタルアルデヒド水溶液を最終濃度2.5%になるように加えて固定した。採水した試水は実験室に持ち帰り、無固定の試水は生物顕微鏡下で1 mL中の細胞数を計数し、固定した試水はCalcofluor whiteで染色 (Fritz

and Triemer, 1985) した細胞の鏡板観察を行い，第一頂板の腹孔の確認により種を同定した。水温については毎回調査時に，バケツ採水した表層水を現場にて棒状水銀温度計で測定した。実験室に持ち帰った試水を用い，サリノメーター（鶴見精機製デジオート Model3-G または Model-5）で塩分を測定した。2009 年以降は上旬，中旬に月 2 回の頻度で表層水の栄養塩濃度を，2011 年以降は栄養塩に加えてクロロフィル a 濃度を分析した。栄養塩濃度の分析には，400 °C で 2 時間強熱処理したグラスファイバーフィルター（Whatman GF/C）で濾過した試水についてオートアナライザー（BLTEC 社製 swAAt）を用い，溶存無機態窒素濃度（NO₃-N, NO₂-N, NH₄-N：なお，NO₃-N, NO₂-N, NH₄-N の総和を DIN として扱う），溶存無機態リン濃度（DIP：PO₄-P），溶存態ケイ素濃度（SiO₂-Si）を分析した。クロロフィル a 濃度はフィルター上の捕集物を 90%アセトンで 24 時間抽出し，Holm-Hansen 法（Holm-Hansen et al., 1965）により蛍光光度計（ターナーデザイン社製 TD700）で測定した。

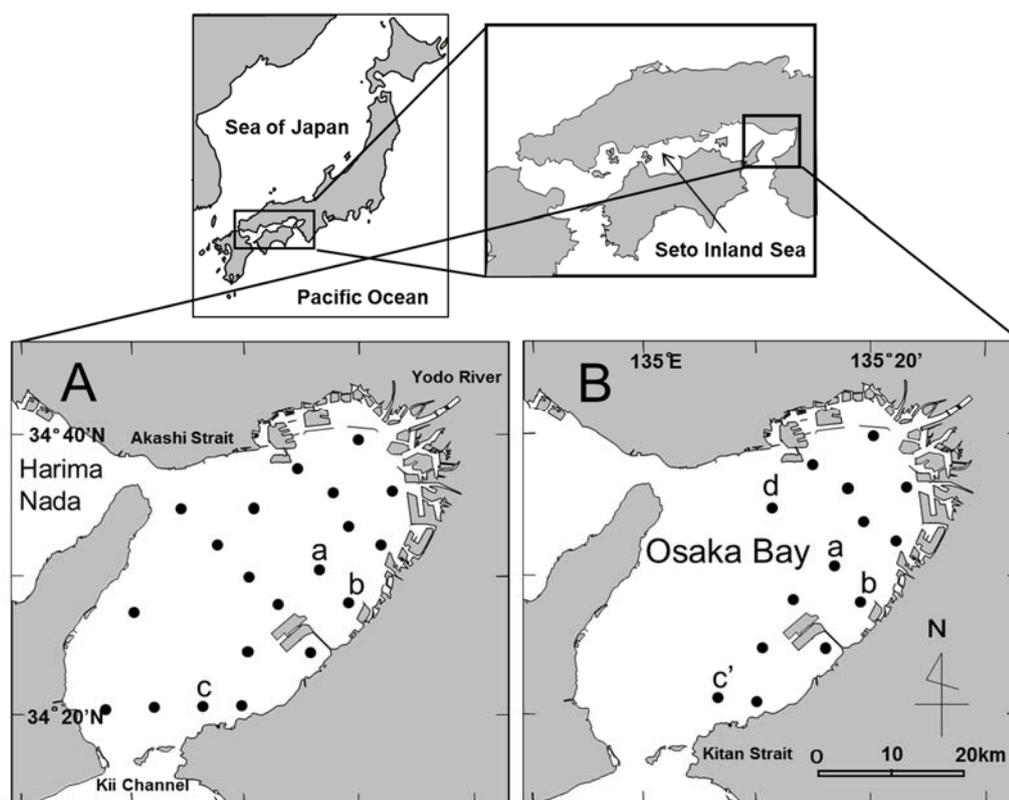


Fig. 2-1. Location of sampling stations for monitoring of *Alexandrium tamarense* in Osaka Bay. A: stations for the samplings at every first Monday and Tuesday of each month and B: stations for the samplings of the other Monday in a month. a and b: station for quantify all phytoplankton species (especially diatoms). c and c' : nearby stations, so treated as the same station. d: station for samplings usually on every third Monday (middle of month) (modified from Yamamoto et al., 2017).

結果

Alexandrium tamarense 栄養細胞の年別出現状況

2002年から2016年の各年の2月から5月における*A. tamarense* 栄養細胞の出現状況をFig. 2-2に示した。この15年間のいずれの年も 1 cell mL^{-1} 以上の*A. tamarense* 栄養細胞が確認され、最高細胞密度が 10 cells mL^{-1} を超えたのは2002年、2006年-2008年、2010年、2011年、2013年-2016年の10年であった。 10 cells mL^{-1} を超えた年はいずれも出荷自主規制値を超える二枚貝類の毒化が確認された（以降、これらを貝毒発生年、これ以外を貝毒非発生年と称する）。これら10年のうち2007年、2008年、2011年、2013年-2014年、2016年は $100 \text{ cells mL}^{-1}$ を超える出現が確認された（貝毒発生年のうち、これらが大規模発生年と称する）。出現のピークは概ね3月中旬-4月中旬に見られたが、ピーク時期は年により異なった。すなわち2002年、2006年は3月中下旬、2004年、2011年、2016年は4月上旬、2003年、2005年、2007年-2009年、2013年、2014年は4月中下旬にピークが確認された。さらに2010年、2012年、2015年については3月下旬と4月下旬の2回のピークが認められた。

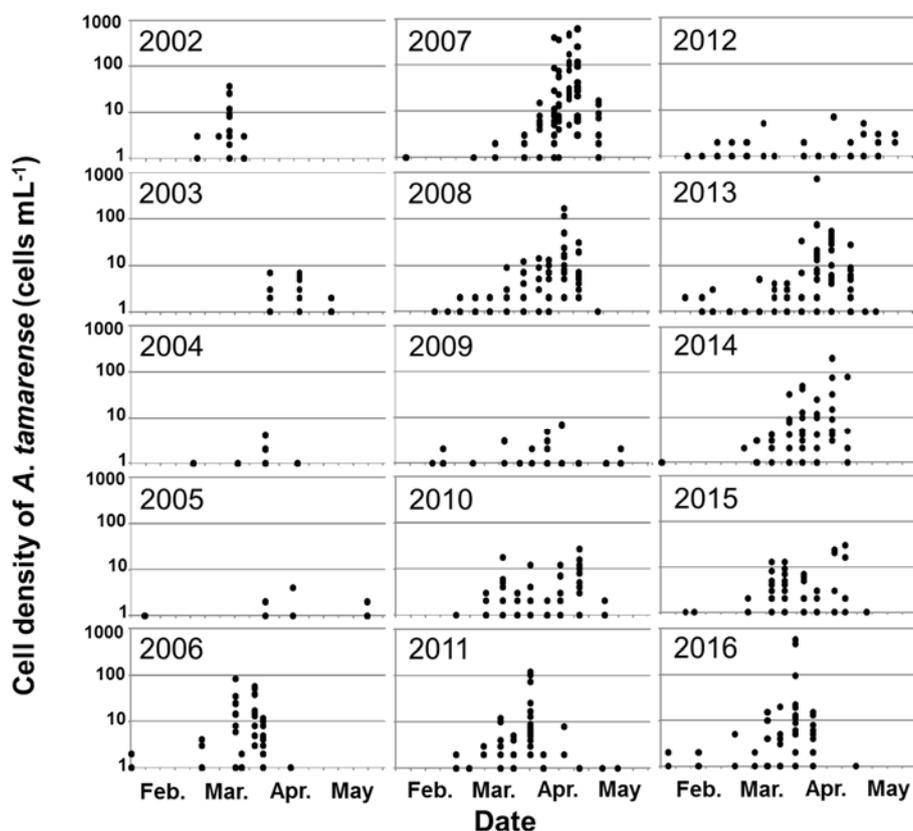


Fig. 2-2. Temporal changes in cell densities of *Alexandrium tamarense* in Osaka Bay from February to May, during 2002-2016 (modified from Yamamoto et al., 2017). Note that cell density scales are in log-scales.

Alexandrium tamarens 栄養細胞出現時の水域環境

Fig. 2-3 に各年における *A. tamarens* 栄養細胞出現時の水温と細胞密度を, Fig. 2-4 に塩分と細胞密度の関係を示した。*A. tamarens* 栄養細胞の出現は, 7.7 °C–21.4 °C と広い水温範囲で確認された。細胞密度のピークは 15 °C 前後の水温帯で確認される年が多かったが, 2002 年, 2006 年, 2011 年のように 10 °C 前後でピークとなった年も散見された。塩分は概ね 30 前後の時に高密度の増殖が集中していたが, 2003 年, 2008 年, 2015 年のように 20 未満の低塩分で高密度の増殖が確認されるケースもあった。

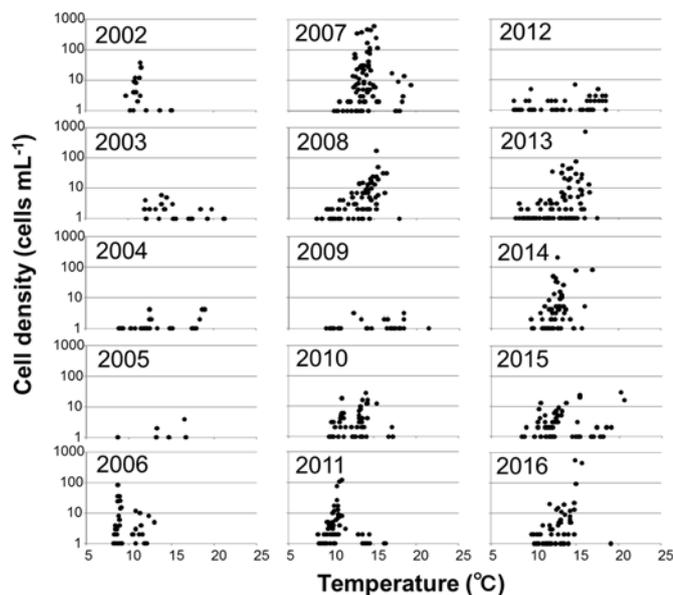


Fig. 2-3. Relationships between cell density of *Alexandrium tamarens* (>1 cell mL⁻¹) and water temperature in Osaka Bay during 2002 to 2016 (modified from Yamamoto et al., 2017).

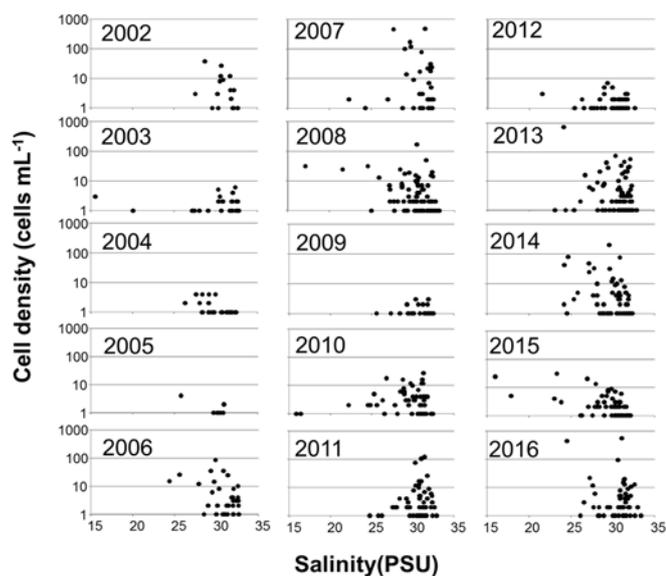


Fig. 2-4. Relationships between cell density of *Alexandrium tamarens* (>1 cell mL⁻¹) and salinity in Osaka Bay during 2002 to 2016 (modified from Yamamoto et al., 2017).

2009年から2016年の細胞密度と溶存無機態栄養塩濃度の関係を Fig. 2-5 に示した。NO₃-N, NO₂-N, NH₄-N, DIN, DIP, SiO₂-Si のすべてについて、有意な相関は認められないものの、栄養塩が高いときに細胞密度が低い傾向がみられた。珪藻をはじめとする他の植物プランクトンと *A. tamarensis* の出現状況を比較するため、Fig. 2-6 に *A. tamarensis* 出現時のクロロフィル a と細胞密度の関係およびクロロフィル a 濃度階級ごとの出現頻度を示した。ここで、*A. tamarensis* 自体にもクロロフィルが含まれるため、*A. tamarensis* の細胞密度が高い場合、環境中のクロロフィルに補正が必要となる。そこで、*A. tamarensis* 以外の植物プランクトンがほとんど出現していなかった 2016 年 4 月の湾奥の試料（細胞密度 450 cells mL⁻¹、クロロフィル a 濃度 10.67 μg L⁻¹）を基に *A. tamarensis* の細胞当たりクロロフィル a 量を 2.4 × 10⁻⁵ μg と算出した。これと細胞密度から *A. tamarensis* の占めるクロロフィル a 濃度を求め、全体のクロロフィル a 濃度から減じることで、海域における *A. tamarensis* 以外の植物プランクトンの現存量の指標とした。なお、ここで得られた細胞当たりクロロフィル a 量は、山本ら（2010）に示された回帰式から計算されるクロロフィル a 量とほぼ同量であった。*A. tamarensis* の細胞密度とクロロフィル a 濃度との関係では、クロロフィル a 濃度が高い定点で本種の高い増殖を示すこともあったが、1 cell mL⁻¹ 以上の *A. tamarensis* 出現はクロロフィル a 濃度 5 μg L⁻¹ 以下が全体の半分以上を占めていた。

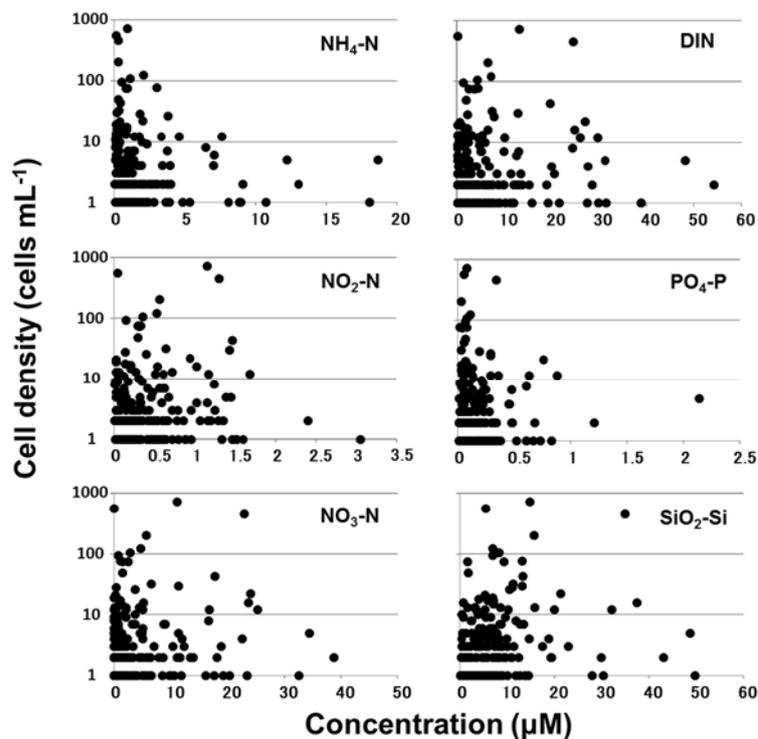


Fig. 2-5. Relationships between cell density of *Alexandrium tamarensis* (>1 cell mL⁻¹) and nutrient concentrations (NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N, DIN, PO₄-P, SiO₂-Si) in Osaka Bay. For these panels, whole data from 2009 to 2016 were plotted (modified from Yamamoto et al. 2017).

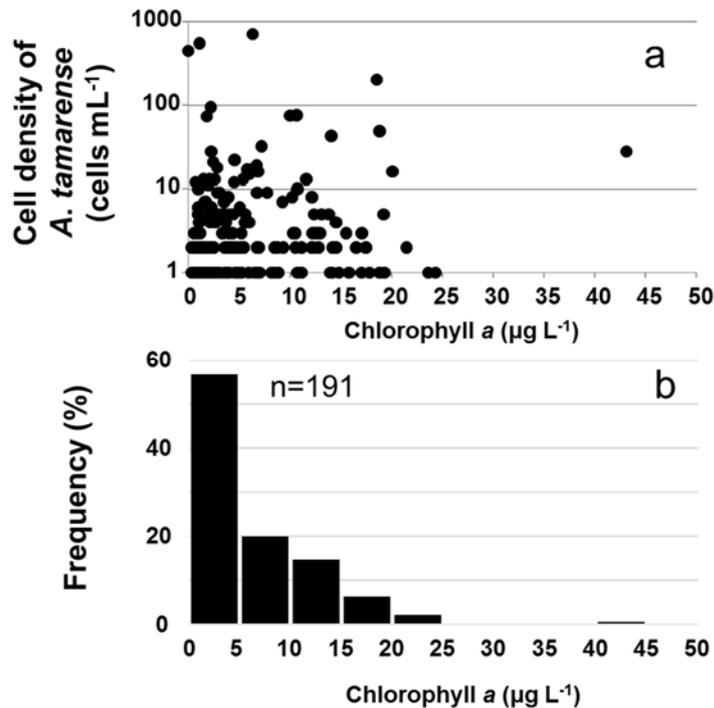


Fig. 2-6. Relationship between cell density of *Alexandrium tamarensis* (>1 cell mL⁻¹) and chlorophyll *a* concentration at each station (a) and frequency distribution of chlorophyll *a* (b). Data were obtained from 2011 to 2016 (modified from Yamamoto et al. 2017).

考察

大阪湾における *A. tamarensis* 栄養細胞の増殖と環境要因

2002年以降の大阪湾では *A. tamarensis* が毎年春季に確認されているが、そのピークの時期は年により異なっていた (Fig. 2-2)。日本沿岸における *A. tamarensis* の出現ピークは、豊前海で3月-4月 (江崎ら 2002)、広島湾で3月-5月 (Itakura et al., 2002)、的矢湾で4月-5月 (結城, 2008)、三河湾で1月-4月 (石田・尊田, 2003)、大船渡湾では5月-6月 (関口, 2003)、噴火湾で2月-7月 (Shimada et al., 2010)、オホーツク海では6月-8月 (長井, 2007) と、概ね北ほど遅い傾向がある。これらの出現水温を見ると北海道での盛期は約 5 °C-11 °C (Shimada et al., 2010)、宮城では 8 °C-9 °C (Ichimi et al., 2001)、呉湾では 12.6 °C-16.6 °C と、かなり地域差があることが分かる。三河湾株と広島湾株で行われた培養試験において、増殖に最適な水温はともに 15 °C、増殖可能な水温範囲はそれぞれ 5 °C-20 °C、10 °C-20 °C と報告されている (山本・樽谷, 1997)。さらに台湾株では最適水温が 28 °C という (Su et al., 1993) 例もある。これら地域による増殖水温の差が生じた原因について、早い時期から出現が確認される三河湾株で増殖可能水温が低いように、株による適水温に差がある可能性はある。しかし、大阪湾においても 7.7 °C-21.4 °C と広い水温範囲で確認されたことから、天然海域においても *A. tamarensis* はかなり広い水温範囲で

増殖可能と推測される。

本研究において出現時の塩分は概ね 30 前後に集中していたが、20 を下回る塩分でも出現は確認された。山本・樽谷 (1997) の培養実験では 2 湾の株における最適塩分で 32, 30, 増殖可能な塩分範囲は 10-35, 15-35 と報告されている。大阪湾奥に位置する淀川の感潮域では海域と比較してさらに高密度に増殖することが多く、2016 年までに赤潮として 4 回確認されている (山本ら 2009a ; 山本ら 2010 など)。仙台湾においても河口付近で増殖することが多いこと (一見ら 2000) , カナダの St. Lawrence 川の河口域などで増殖が頻発していることから (Fauchot et al., 2005 など) , 天然水中においては比較的低塩分を好む傾向があると推察される。

Alexandrium tamarense の増殖と溶存無機態栄養塩との関係を見ると、本種が高密度に増殖した際には、DIN, DIP とともに概ね低濃度で、特に DIP でこの傾向が顕著であった。赤潮が形成された 2007 年の昼夜観測時には $\text{NH}_4\text{-N}$ が特に高い傾向が見られた (山本ら, 2010) が、今回の結果からは確認されなかった。また、*A. tamarense* の増殖時のクロロフィル *a* 濃度は、ほぼ $5 \mu\text{g L}^{-1}$ 以下であった。Itakura et al. (2002) は広島湾における *A. tamarense* の発生と環境要因を整理し、大型珪藻類の増殖と溶存無機態栄養塩濃度の低下に続いて珪藻類が減少すると *A. tamarense* が増殖することを報じた。山本ら (2000) は、*Skeletonema costatum* と *A. tamarense* のリン代謝に関する実験結果から、*S. costatum* は取り込んだリンをすぐに増殖に回して個体群密度を増大させるのに対し、*A. tamarense* ではリンを細胞内に急速に取り込んで暫時蓄積できるが増殖速度が遅いことを見いだした。このことはリン濃度が低い時期には、蓄積したリンを利用することで、*A. tamarense* が *S. costatum* より有利に増殖できることを示す。したがって、大阪湾における春季の *A. tamarense* の増殖についても、広島湾と同様に、リン濃度の低下とその後の珪藻類の減少が引き金となっていると考えられた。

第 2 節 水平分布と鉛直分布

緒言

大阪湾では、ホタテガイやカキといった養殖二枚貝の麻痺性貝毒が問題となる他の多くの海域と異なり、問題となるのはアサリや底曳き網の重要漁獲対象種であるアカガイやトリガイ、淀川感潮域のヤマトシジミといった天然貝類である。二枚貝の毒化が有毒プランクトンの摂食により起こることから、どの海域で二枚貝が高い毒力を持つ可能性があるか類推するためには、大阪湾のどの海域のどのような水深で *A. tamarense* が主に増殖するか、水平、鉛直的な栄養細胞の分布パターンを明らかにする必要がある。

本項では前項と同様、2002 年から 2016 年のモニタリング調査のデータおよび 2011 年から 2015 年に実行した層別採水の結果を用い、大阪湾における *A. tamarense* 栄養細胞の水平分布および鉛直分布について検討した。

材料と方法

Alexandrium tamarense 栄養細胞密度の調査は、2002年から2016年の2月から5月に月2回から5回の頻度で行った。月の月上旬に大阪湾全域の20定点 (Fig. 2-1A) で、残りの週を大阪湾東部の14定点ないし定点cを除いた13定点 (Fig. 2-B) において実施した。なお、bとb'の位置は若干異なるが、データの処理上同じ定点とした。調査は大阪府立環境農林水産総合研究所 (旧大阪府立水産試験場) 調査船「おおさか (1998年4月-2013年2月: 28t, 2013年3月-: 19tの新造船)」により行った。各定点で表層水をバケツにより採水し、一部については現場で25%グルタルアルデヒド水溶液を最終濃度2.5%になるように加えて固定した。採取した試水は実験室に持ち帰り、無固定の試水は生物顕微鏡下で1mL中の細胞数を計数し、固定した試水はCalcofluor whiteで染色 (Fritz and Triemer, 1985) した細胞の鎧板観察を行い、第一頂板の腹孔の確認により種を同定した。

鉛直分布調査は2011年から2015年の5年間、Fig. 2-1A, Bに示した定点のうち、湾中部に位置する2定点 (Stns. a, b) において2月から5月に月2回の頻度で行った。それぞれの定点で層別採水および柱状採水を行い、*A. tamarense* 栄養細胞密度および出現時の環境を調査した。層別採水は北原式採水器を用いて、表層、5m, 10m, B-1m層の4層からそれぞれ0.5-1L採取した。2012年から2016年については宮村 (2007) に従い、0-10mの柱状採水を併せて行った。柱状採水には洗濯機の排水ホース (直径3cm, 長さ10m) を用いた。一方の端におもりを取り付け、もう一方の端を水面近くになるまで繰り出した後、シリコン栓で蓋をした。陰圧のかかった状態でホースを引き上げ、先端をバケツに取り込んだ後シリコン栓を取り外し、ホース内の試水を回収した。*A. tamarense* 遊泳細胞は、実験室において試水300-750mLを目合い20 μ mのプランクトンネットで10mLに濃縮したものの1mLについて、直接検鏡により計数した。なお*A. tamarense* については水平分布調査と同様に鎧板観察を行い、腹腔 (ventral pore) の確認により種を同定した。環境項目については各定点においてCTDで水温、塩分を測定した。気象庁が公表している全天日射量のデータ (URL:<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etm/index.php>) を使用し、光環境と鉛直分布傾向について検討した。

結果

栄養細胞の水平分布傾向

大阪湾の年ごとの出現動態をみるために、2000年-2015年の増殖盛期における*A. tamarense* の水平分布を示した (Fig. 2-7)。全域調査時に増殖盛期が認められたのは2004年、2011年、2016年であったが、いずれも西部海域の密度は低く、主に東部海域で増殖が確認された。東部海域においては、関西国際空港以北で大規模な増殖が確認され、中でも空港周辺から泉大津沿岸と、淀川河口に近い定点 (湾奥増殖パターン) を中心に高密度に増殖することが多かった。

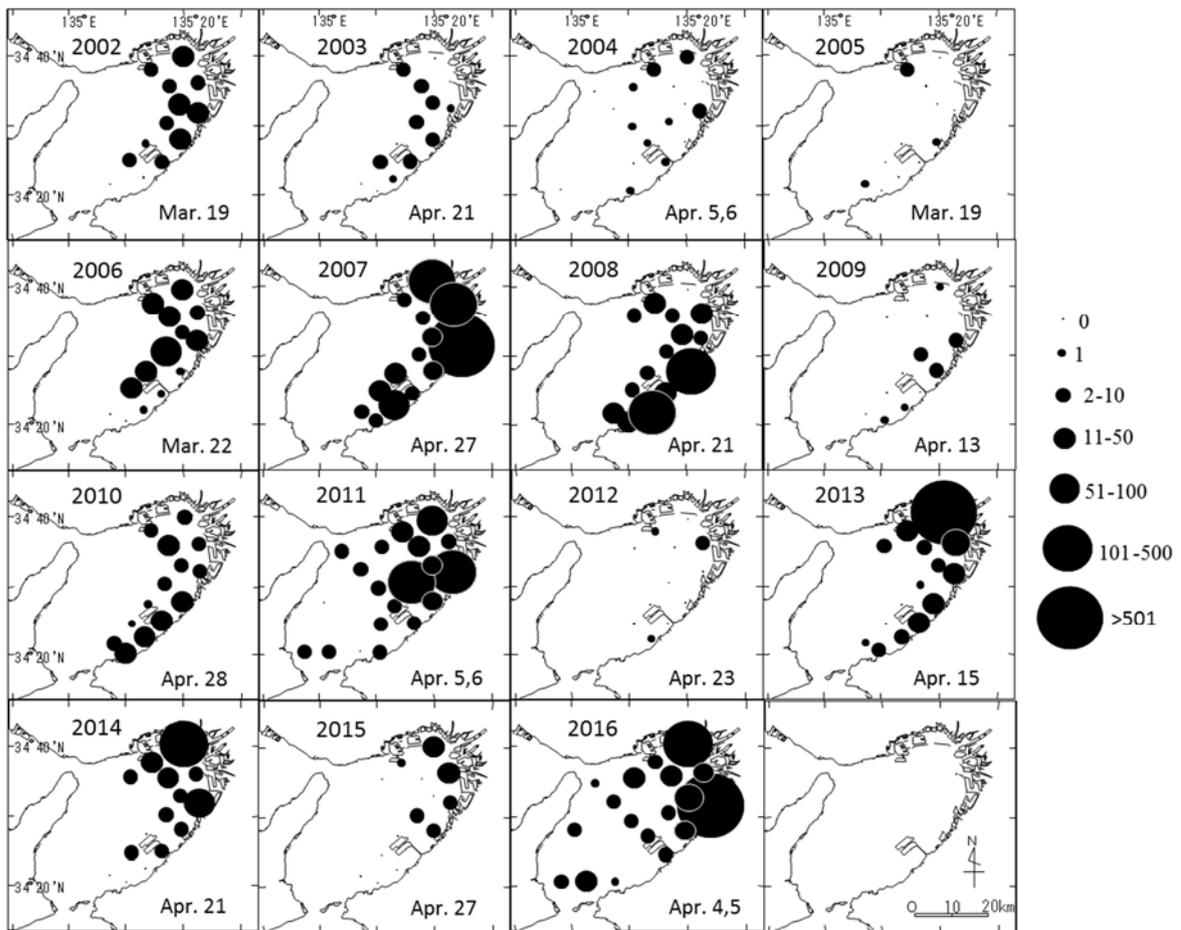


Fig. 2-7. Horizontal distributions of cell densities of *Alexandrium tamarense* at surface water showing maximum bloom phase for every year from 2002-2016 (modified from Yamamoto et al. 2017).

中部発生の典型例として2008年の経時変化を Fig. 2-8 に、湾奥発生の典型例として2013年の経時変化を Fig. 2-9 に示した。2008年の *A. tamarense* は2月中旬から確認された。3月中旬までは低いレベル (5 cells mL⁻¹ 以下) で推移したが、3月25日に空港北部沿岸で9 cells mL⁻¹、4月2日、4月9日の調査で湾南部から中部にかけての沿岸域で最大12 cells mL⁻¹ と増殖の兆候が確認された。さらに4月14日、15日の調査では湾全域で広く確認された後、4月21日の調査では関西国際空港南北の沿岸域において、100 cells mL⁻¹ を超える高密度 (空港北部沿岸で最大169 cells mL⁻¹) で確認された。一方、2013年の *A. tamarense* は2月中旬から確認され、3月下旬まで低いレベル (5 cells mL⁻¹ 以下) で推移し、4月8日に神戸沖の定点で34 cell mL⁻¹ の密度で確認された後、4月15日には淀川河口に近い定点で100 cells mL⁻¹ を超える高い密度 (714 cells mL⁻¹) で確認された。

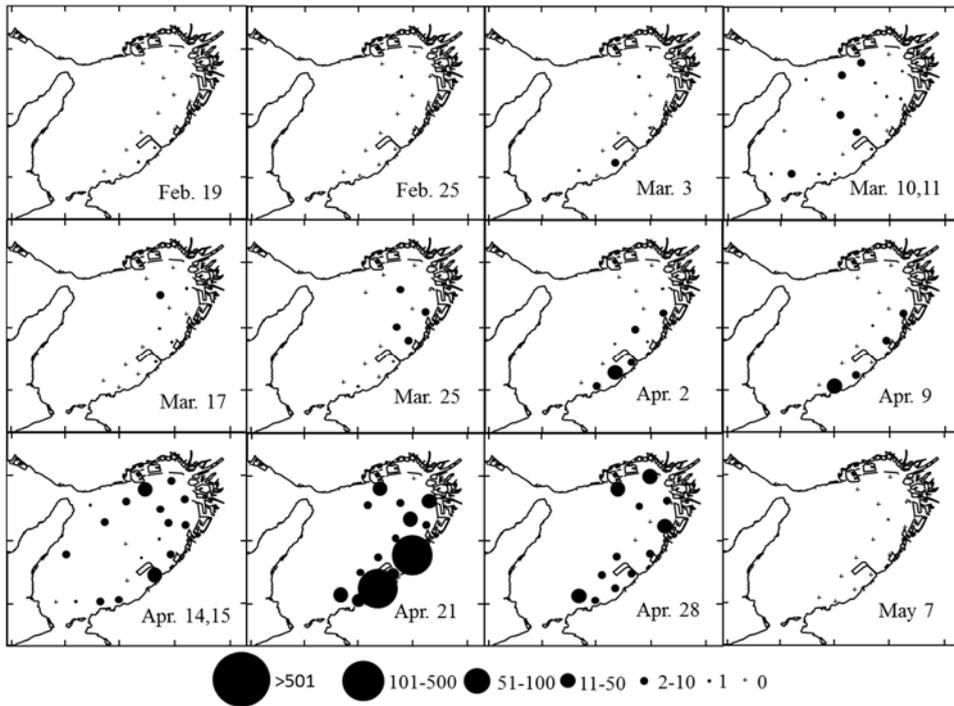


Fig. 2-8. Changes in horizontal distributions of cell densities of *A. tamarensis* at surface water in 2008 during February to May.

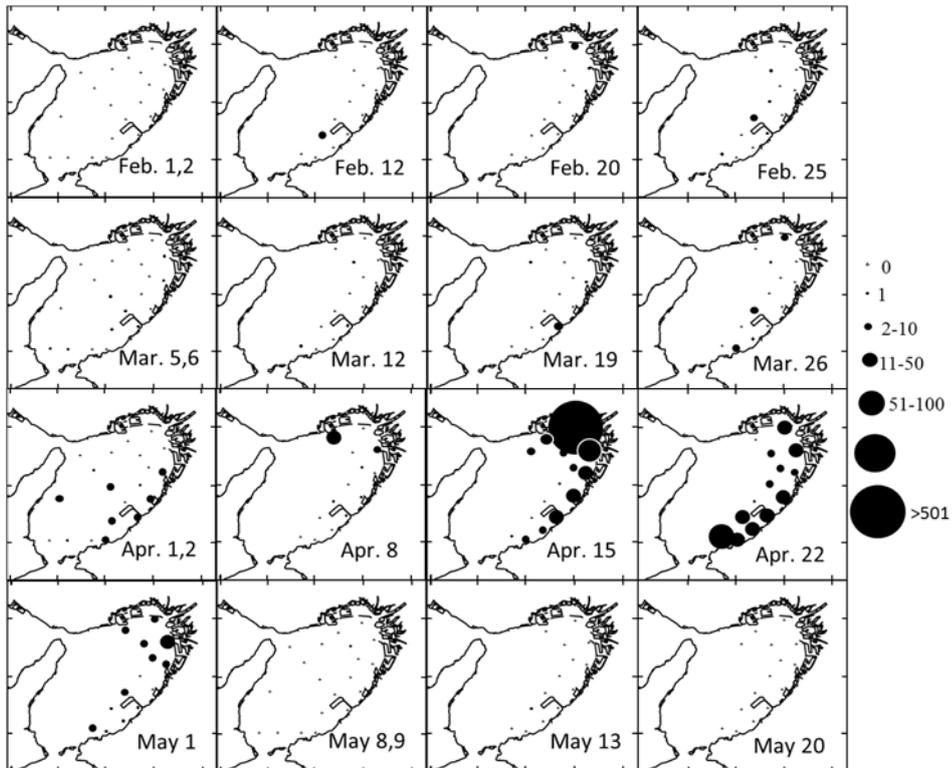


Fig. 2-9. Changes in horizontal distributions of cell densities of *A. tamarensis* at surface water in 2013 during February to May.

栄養細胞の鉛直分布および環境の推移

Fig. 2-10 に中部沖合に位置する Stn. a における, Fig. 2-11 に沿岸の Stn. b における 2011 年-2015 年の栄養細胞の鉛直分布の経時変化を示した。Stn. a, Stn. b とも 2012 年以外では多くの年で表層よりも 5 m-10 m 層で高い密度で確認された。沖合の Stn. a においては, 2012 年は 3 月上旬以降に 5 m 層を中心に細胞密度が増加し, 4 月上旬まで 5 m 層から底層にかけて細胞密度が高い状態にあった。2012 年は 2 月下旬に 5 m 層で増加の兆候が見られたが直後に消滅した。その後再び 4 月上旬に 10 m 層から増殖し始め, 表層で最も高密度になった後減少した。2013 年から 2015 年は 5 m 層から 10 m 層の広い範囲で増殖を開始し, 3 月下旬から 4 月上旬に 5 m 層から表層にかけて高い密度で観察された。沿岸の Stn. b においては, 2011 年は 3 月上旬以降に 5 m 以浅で細胞密度が増加し, 4 月上旬に 5 m 層から 10 m 層で最大密度となった。2012 年は 2 月下旬に表層を中心に一時細胞密度が増加したが Stn.a と同様, 直後に消滅した。その後, 再び 4 月上旬より表層から 5 m 層で細胞密度は増加し 5 月上旬に 5 m 層で最大密度となった。2013 年から 2015 年は 3 月下旬から 5m 以浅で細胞密度が増加し, 5 m 層を中心に 10 m 層まで高い細胞密度が確認された。以上のように, 水深が 20 m 近くある Stn. a においては, 底層での栄養細胞は低密度であったが, 水深が約 13m の Stn. b では 10m 層がほぼ底層に相当しており, ほぼ全層で比較的高い密度で存在していた。

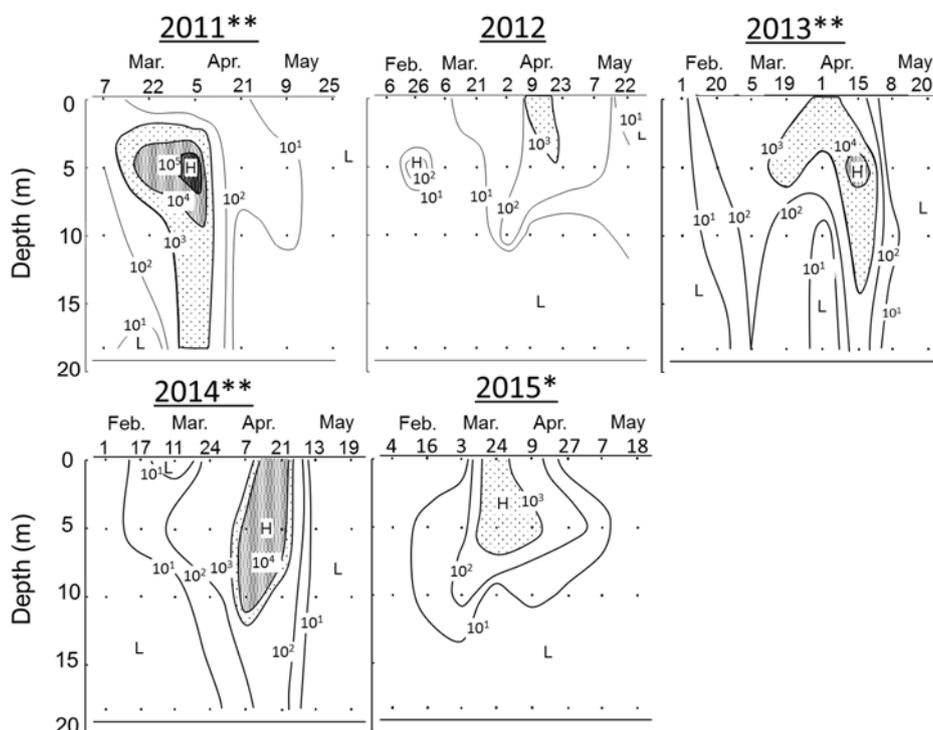


Fig. 2-10. Temporal changes in vertical profiles of cell density of *Alexandrium tamarensis* during February to May of 2011 to 2015 at Stn. a (from March to May in 2013) in Osaka Bay,. Number of asterisks indicate magnitude of *A. tamarensis* bloom (*<**))

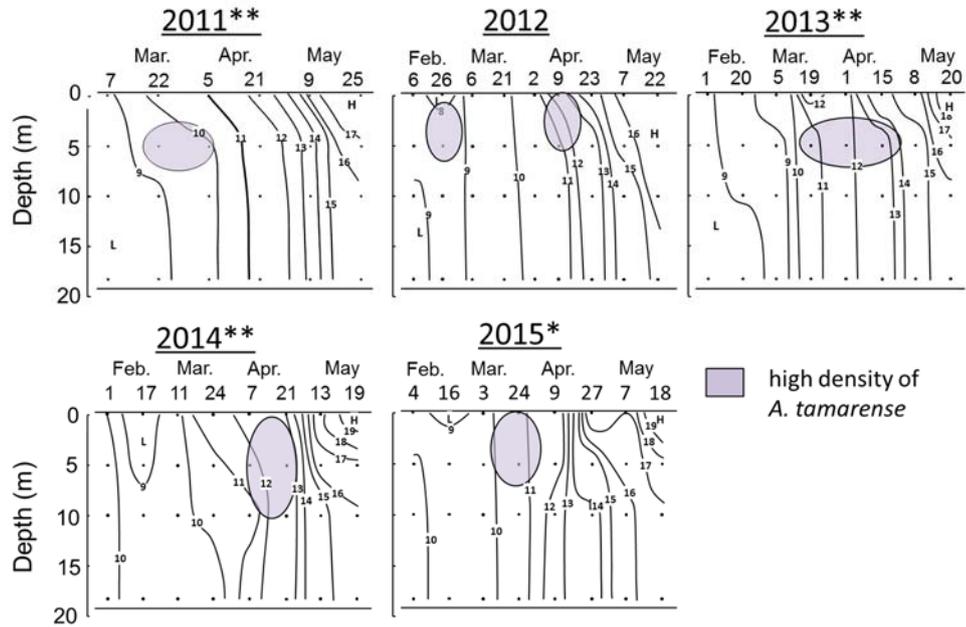


Fig. 2-12. Temporal changes in vertical profiles of temperature and high density of *A. tamarensis* (shaded areas) during February to May (during March to May in 2013) at Stn. a in Osaka Bay of 2011 to 2015. Number of asterisks indicate magnitude of *A. tamarensis* bloom (*<**).

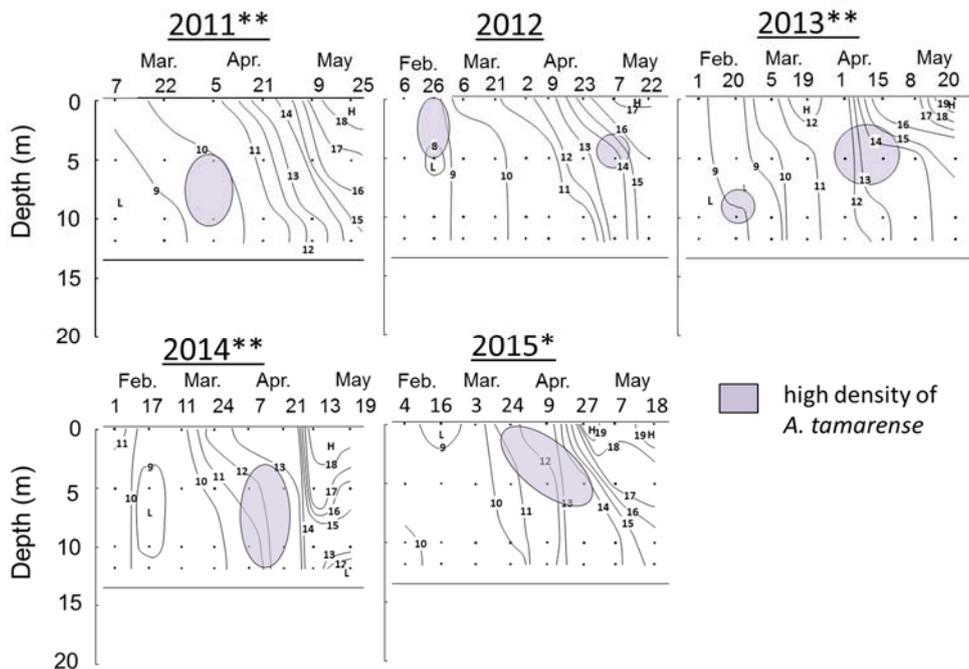


Fig. 2-13. Temporal changes in vertical profiles of temperature and high density of *A. tamarensis* (shaded areas) during February to May of 2011 to 2015 (during March to May in 2013) at Stn. b in Osaka Bay. Number of asterisks indicate magnitude of *A. tamarensis* bloom (*<**).

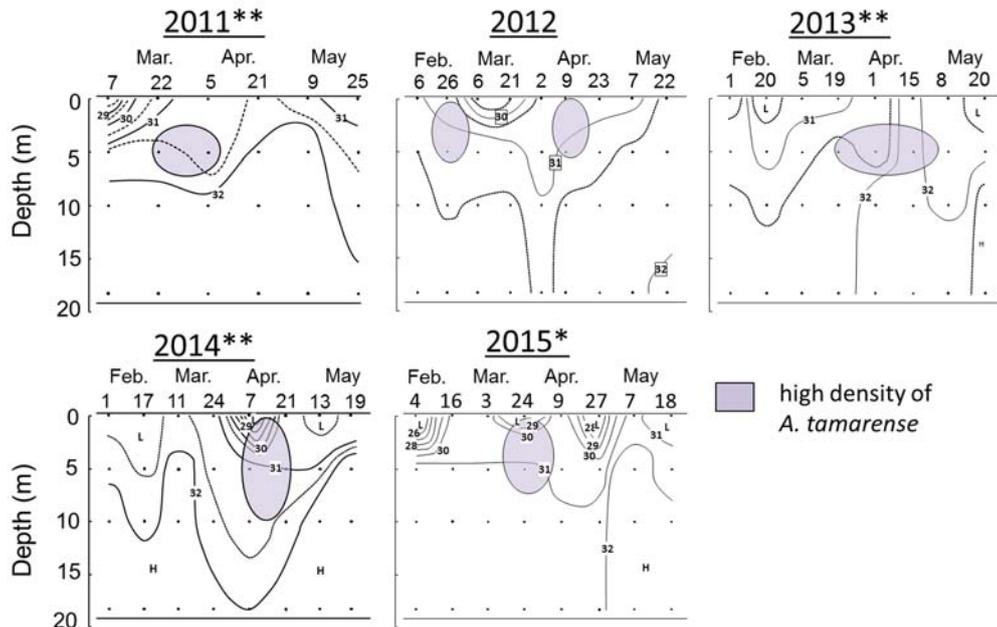


Fig. 2-14. Temporal changes in vertical profiles of salinity and high density of *A. tamarensis* (shaded areas) during February to May of 2011 to 2015 (from March to May in 2013) at Stn. a in Osaka Bay. Number of asterisks indicate magnitude of *A. tamarensis* bloom (*<**).

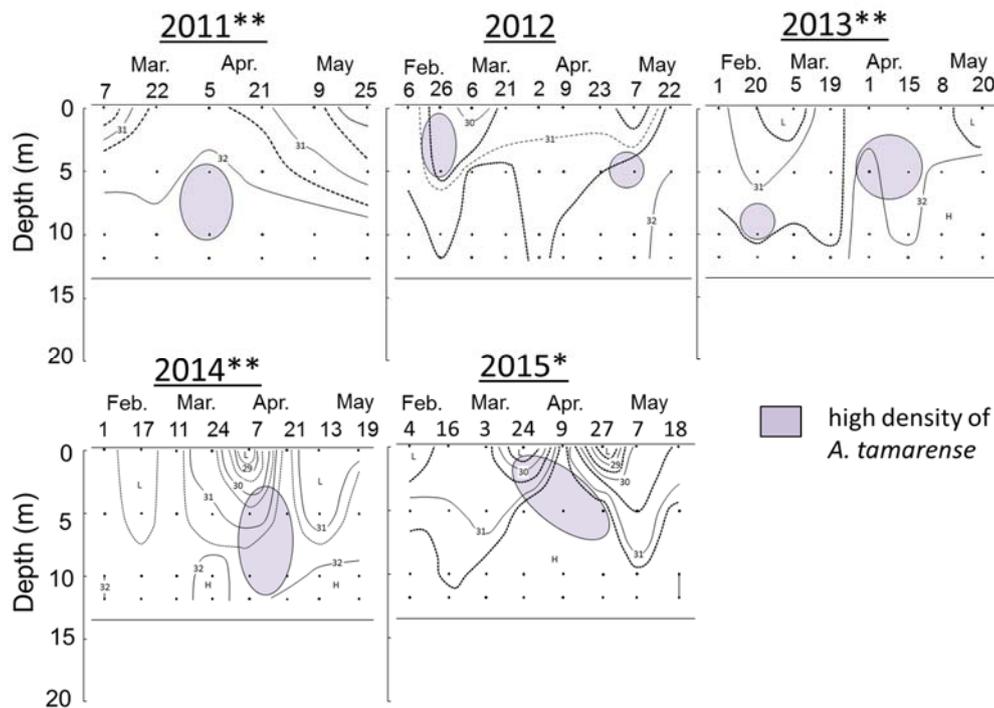


Fig. 2-15. Temporal changes in vertical profiles of salinity and high density of *A. tamarensis* (shaded areas) during February to May of 2011 to 2015 (from March to May in 2013) at Stn. b in Osaka Bay. Number of asterisks indicate magnitude of *A. tamarensis* bloom (*<**).

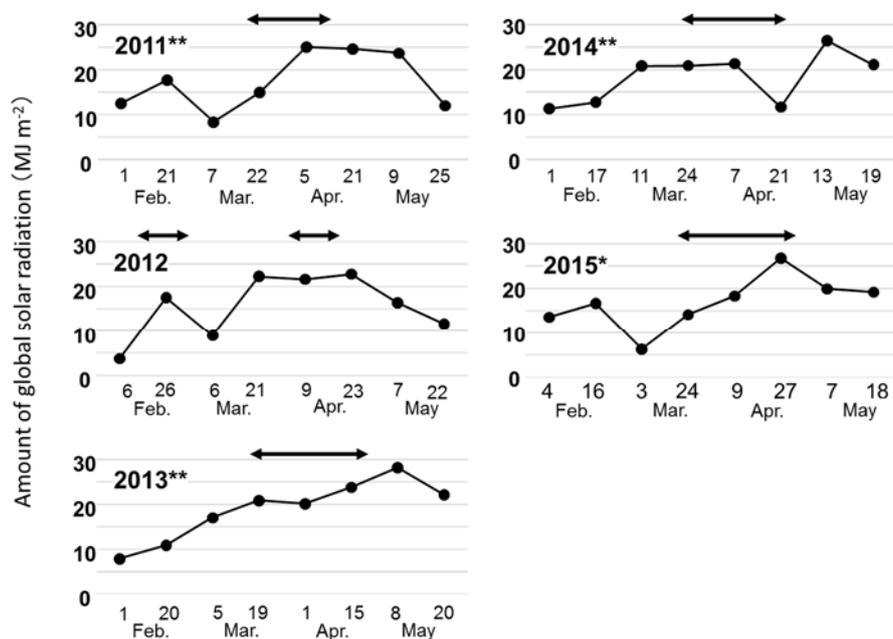


Fig. 2-16. Temporal changes in amount of global solar radiation at sampling date in Osaka city during February to May of 2011 to 2015. Arrows indicate *A. tamarensis* bloom period. Number of asterisks indicate magnitude of *A. tamarensis* bloom (*<**.).

栄養細胞出現の採水方法による差異

Fig. 2-17 に Stns. a, b における表層採水, カラム採水の細胞密度および層別採水の平均細胞密度の推移を示した。5 年間の調査期間において栄養細胞の増減傾向は 3 種類の採水法で概ね一致した。2011 年はカラム採水を行っていないが, 表層採水, 層別採水平均値とも 4 月上旬にピークがある単峰型であった。一方, ピーク時の値は層別平均で 10^4 cells L⁻¹ のレベルであったのに対し, 表層では 10^3 cells L⁻¹ と 1 桁の差があった。2012 年は全体的に増殖規模が小さく, 最大でも 1,367 cells L⁻¹ に留まった。Stns. a, b とも概ね同様の変動傾向を示し, ピーク時の細胞密度の差も小さかった。2013 年は, Stns. a, b とも 2 月下旬から 10^2 - 10^3 cells L⁻¹ のレベルで経過した後, 4 月中旬に最大の増殖が確認された。変動傾向は過去 2 年と同様, 3 種類の採水法で概ね一致していたが, 細胞密度は表層, 層別採水, カラムの順に大きい傾向があった。2014 年と 2015 年についても過去の結果と同様に, ピークの時期はほぼ一致していたが, 細胞密度はカラムで大きい傾向であった。

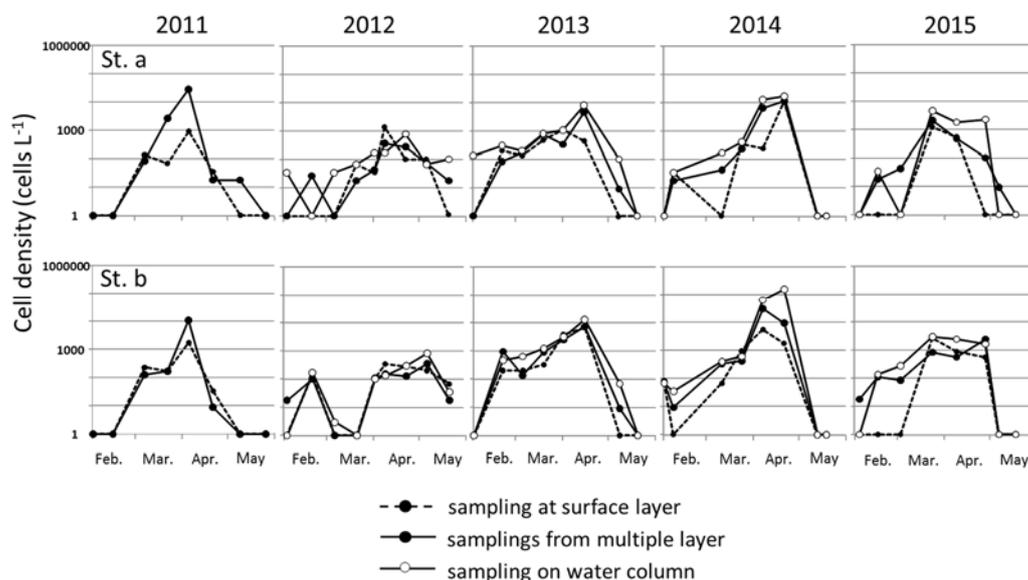


Fig. 2-17. Temporal change in cell density quantified by three different sampling methods at Stn. a (upper) and Stn. b (lower) during February to May of 2011 to 2015.

考察

本研究により、大阪湾における主増殖域が関西国際空港以北の東部沿岸域であることが明らかになった。さらに、同海域においても淀川河口沖と空港周辺で栄養細胞の高密度域が形成される2つの増殖パターンがあることが確認された。このうち、前者のパターンでは同時に汽水域の淀川感潮域で大規模な増殖が確認されることが多かった(第3章)。大阪湾で最大規模の赤潮の形成が確認された2007年においては、淀川河川内の感潮域でも *A. tamarensis* が赤潮として観測され、同水域に生息するヤマトシジミで毒化が確認されている(山本ら2009)。さらに、2011年、2013年、2017年にも淀川河川内の感潮域で *A. tamarensis* が赤潮として観測されるとともに、ヤマトシジミの高毒化が確認されている(山本未発表)。そのため同水域におけるヤマトシジミの毒化は漁業者にとっても大きな問題となっている。山本ら(2011)は淀川感潮域での調査から、淀川感潮域における増殖は、海域から侵入したシードポピュレーションの増殖と、感潮域内でのシストの発芽の可能性を示している(第3章)。淀川感潮域では海域に比べ水温の上昇が早いいため、海域と比較して早期に *A. tamarensis* が確認されることが多い。すなわち、海域から進入もしくは感潮域内でのシストが発芽した栄養細胞が海域より早く増殖することで、湾奥の河川感潮域が初期増殖域の一つとなっている可能性がある。前述の通り淀川河口沖において栄養細胞の高密度域が確認されたのは2007年、2011年、2013年、2014年、2016年などである。2007年や2011年、2013年は淀川の赤潮と同時期に淀川河口沖の高密度域が確認されていることから、前者のパターンであった淀川河口沖の高い細胞密度での出現は、淀川河川内感潮

域で増殖したものが流出したものであると考えられた。

2008 年を後者のパターンとして例示したが、前者のパターンであった 2011 年は空港北部における増殖も顕著であり、両方のパターンが並列して存在していたと推測される。一方、前者の典型例とした 2013 年においても経時的な出現を見ると、低密度で観測される初期の段階では両年とも空港周辺の海域で出現が確認されていた。すなわち、淀川河口沖において高密度で栄養細胞が確認されるパターンでは、急激に細胞密度が上昇するのに対し、空港周辺で増殖するパターンでは、徐々に密度が上昇する傾向があった。第 2 章第 4 節で後述するが、大阪湾におけるシストは空港以北の東部沿岸に高い密度で存在し、特に泉大津から岸和田沿岸で多い傾向がある。増殖初期における空港周辺での栄養細胞の出現は、このようなシストの分布と関係している可能性がある。すなわち大阪湾東部沿岸域においては、湾奥ないし河川感潮域でシストから発芽し、感潮域内で増殖したポピュレーションが沿岸海域に拡大するパターンと、湾東中部域で発芽したシスト由来のポピュレーションによる増殖が年により発現するものと推測される。この増殖パターンの違いの要因については本研究では明らかに出来なかった。しかし Yamamoto et al. (2013) は、淀川感潮域における増殖が河口堰からの放水量に大きく影響を受けること、すなわち降水量が少なく河口堰からの放水がない場合に大規模に増殖し、放水の多い場合には増殖がないことを示していることから、主増殖期における降水の程度によって出現パターンの違いが生じると推察される。

A. tamarense は表層で最大密度を示すこともあるが、多くの年で 5m 層から 10m 層に分布の中心が存在していた (Figs. 2-10, 11)。同属の *A. catenella* では日中表層に集中分布することが明らかになっているが (竹内, 1988), 本種は大阪湾でも表層よりも亜表層から中層に主に分布することが明らかになった。過去の事例でも本種は日中表層付近まで上浮するが表面に達することはなく (福代, 1982; Anderson and Stolzenbach, 1985), 広島湾の調査では大阪湾と同様に 5 m 層を中心に確認されていた (松山ら, 2002)。栄養細胞の出現と水温、塩分とは明瞭な関係性は確認できず、水塊構造にかかわらず日中は亜表層から中層に分布することが観察された。渦鞭毛藻類では多くの種で日周鉛直移動を行うことが観察されており、夜間は底層に、昼間は上層に集積する (Cullen and Horrigan, 1981; 小泉ら, 2001 など)。これらの日周鉛直移動は走光性や重力走性で説明されているが (Kamykowski et al., 1999 など), いくつかの種においては昼間光が強すぎると逆の走光性を示し、中層に留まる例も観察されている (Heaney and Eppley, 1981; Ault, 2000)。*A. tamarense* においても同様の現象が確認されており、300 $\mu\text{mol photons m}^{-1} \text{s}^{-1}$ 以上の光条件の深度では集積しなかったことが報告されている (Fauchot et al., 2005)。本調査時においては、上層で細胞密度が高かった 2013 年 4 月上旬, 2014 年 4 月中旬, 2015 年 3 月中旬などでは、前後の調査に比べ、全天日射量が低い傾向を示した。赤潮渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* では、初期の低密度時には中層で増殖した後、赤潮状態になると表層で集積する (Honjo et al., 1990) が、本種においては一般的に赤潮状態にまで増殖することがまれとされることから、多くの場合

中層で増殖し、曇天等の弱光条件において表層に分布すると推測される。本種のモニタリングは、通常表層水の採水により行われているが、本種が 1 mL あたり数細胞の低密度で二枚貝が毒化すること、採水法別に比較して表層、層別平均、カラム採水の順に細胞密度が高くなる傾向があることを考慮すると、より正確に本種の個体群動態を把握するためには、今後モニタリング方法を再検討する必要があると考えられる。

第3節 日周鉛直移動と細胞当たり毒量の変化

緒言

大阪湾では、西日本で麻痺性貝毒の毒化が頻繁に確認されるアサリやムラサキイガイだけでなく、湾のやや沖合域に生息し、底曳き網の重要漁獲対象種であるアカガイ、トリガイなどにおいても毒化が確認されている（山本ら，2009a）。前項において *Alexandrium tamarense* が表層よりも 5 m から 10 m 層に高い細胞密度で存在することが明らかになったが、比較的深い海域に生息するこれらの天然貝類で毒化が見られたことは、原因種がその水深まで移動している可能性を示している。しかし、天然海域で鉛直移動を明らかにした事例は少なく、St. Lawrence 川河口域での例（Fauchot et al., 2005）などが報告されているに過ぎない。

2007 年は大阪湾において過去最大規模の *A. tamarense* の増殖と濃密な赤潮の形成が確認された（山本ら，2009a）。本項では、赤潮が確認された大阪湾奥に位置する堺出島漁港において昼夜連続観測を行い、*A. tamarense* の日周鉛直移動と環境および日周的な毒量の変化について新たな知見を得ることができたので報告する。

材料と方法

現場調査

調査をおこなったのは大阪湾奥に位置する堺出島漁港内にある水深約 4 m の栈橋である（Fig. 2-18）。この海域は 2007 年春期の *A. tamarense* ブルーム発生中、栄養細胞が最も高密度で出現し続けた海域であり、また海水の流動が少ないために定点連続観測に適していると判断した。調査はブルームの最盛期である 2007 年 4 月 29 日 14 時 30 分から 30 日 12 時にかけて 1-3 時間間隔でおこなった。遊泳細胞計数用および栄養塩、Chlorophyll *a*、細胞毒量分析用試料は、栈橋の先端において、容量 1 L の北原式採水器を用いて海底上 0.5 m 層、海底上 1.5 m 層、海底上 2.5 m 層、表層の 4 層について海水を採取した。なお、潮汐により水深が増した 30 日 6 時の観測では海底上 3 m 層においても同様に海水を採取した。遊泳細胞計数用試料については現場で 25% グルタルアルデヒド水溶液を総量の約 7% になるように加えて固定し、その他の試料については保冷剤入りのクーラーボックスに収容した。また同時に 0.5-2.5 時間間隔で水中型蛍光光度計（アレック電子製、クロロテック MODEL ACL215-DK）を投入し、水温、塩分、蛍光強度、水中照度について 0.1 m 間隔のデータを取得した。採取した試水は調査終了後実験室に持ち帰り、1 mL 中の細胞数を生物

顕微鏡下で直接計数した。*A. tamarense* は鏡板観察を行い、腹腔 (ventral pore) の確認により種を同定した。さらに未固定試料の一部について LAMP 法 (Nagai and Itakura, 2012) を施し、種の分子同定を行った。栄養塩ならびに Chlorophyll *a* 分析用海水については、ガラス繊維濾紙 (GF/C, 47 mm φ, Whatman 社製) で濾過後、濾液、濾紙上の残渣とも -30°C で凍結してそれぞれ保管した。栄養塩の分析はオートアナライザー (BLTec SwAAt) を用い、NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N, PO₄-P について行った。Chlorophyll *a* の分析はアセトン抽出による蛍光法 (海洋観測指針, 1990) で Chlorophyll *a* の 1 L あたりの量を求めた。毒量分析用試料については、採水した各層の試水を 3 mL ずつ等量混合したものを凍結保存し分析に供した。また、同様に混合した試料について細胞密度および連鎖細胞の割合を別途計数した。

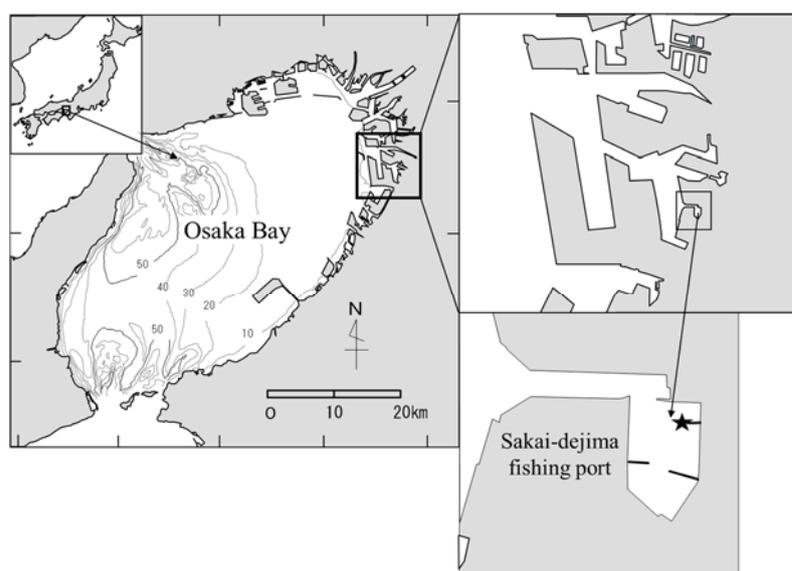


Fig. 2-18. Location of Sakai-Dejima Fishing Port, study site of this study. *Alexandrium tamarense* and environmental factors were determined at edge of landing pier (4 m depth) (modified from Yamamoto et al., 2010).

細胞毒量の分析

今回の試料は *A. tamarense* が赤潮密度まで増殖していたため、未濃縮の海水試料からすべての毒成分を検出することができた。通常、天然細胞の毒量を測定する際に行われるプランクトンネット等による濾過や遠沈分離などの濃縮操作を省略して毒の分析を実施した。すなわち、等量混合し凍結された試料 (*A. tamarense* の細胞を含む現場海水) に、0.4% (v/v) になるように 0.5N 酢酸を添加して pH を 3-4 付近まで下げた状態で解凍後、超音波処理を行った。この凍結-解凍-超音波作業を 2 回繰り返すことで細胞内に含まれる毒を十分に海水中に分散させた。この破碎海水試料 250 μL をウルトラフリー C3GC (M.W.50,000, Millipore 社) で限外濾過に供し、このろ液について蛍光 HPLC 法による PSP 成分の分析 (Oshima, 1995) を行った。毒の分析条件等は Oh et al. (2009) に準じた。C-

toxin 群の分析に 2 μL , GTX 群の分析に 20 μL , STX 群の分析に 100 μL の抽出試料を装置に注入して分析を行った。定量は (社) 日本水産資源保護協会から配布された終末希釈用の標準品を基準に濃度の算出を行った。細胞当たりの毒量 (f mole cell^{-1}) は試料中に含まれていた全成分の毒量を、試水中に存在していた *A. tamarensis* 細胞数で除して算出した。

結果

細胞密度および蛍光値の鉛直プロファイルの経時変化

調査日の月齢は 11.6 (若潮期) から 12.6 (中潮期) にかけてであった。また、4 月 29 日の日没は 18:41, 30 日の日の出は 5:10 で天候は両日とも快晴であった。

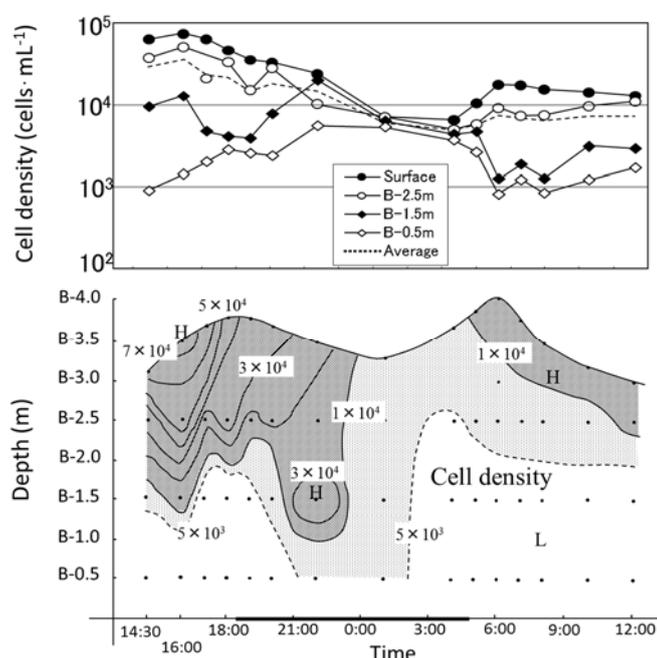


Fig. 2-19. Temporal changes in cell density at each layer (upper) and vertical profiles of cell density (lower) of *Alexandrium tamarensis* in Sakai-Dejima Fishing Port during 29–30 April 2007 (modified from Yamamoto et al., 2010).

Fig. 2-19 に層別採水により計数した採水層別細胞密度の経時変化を示した。*A. tamarensis* 遊泳細胞は採水したすべての試水で確認された。調査開始時の 4 月 29 日 14:30 には、表層で細胞密度が最も高く、底層ほど低かった。表層では 16:00 の観測時に調査期間中最大の細胞密度 ($7.27 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$) が確認されたが、密度は日没に向けて徐々に減少していき、夜明け前の 4:00 の観測で $6.46 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ で最低となった後、夜明けとともに再び増加した。B-2.5 m 層では表層と概ね同様の変化を示し、深夜の 1:00 に細胞密度は表層を上回ったが、その他の時間帯は常に表層より低い細胞密度であった。B-1.5 m 層では 16:00 に細胞密度が最高になった後 19:00 まで減少したが、その後再び細胞密度は上昇し、22:00 には 0-2.5 m 層を上回り表層と同等のレベルとなった。さらに 8:00 まで減少傾向であった後、

再度増加した。B-0.5 m 層では他の層とは逆に 14:30 から 22:00 まで増加傾向を示し、1:00 以降は減少傾向となった。

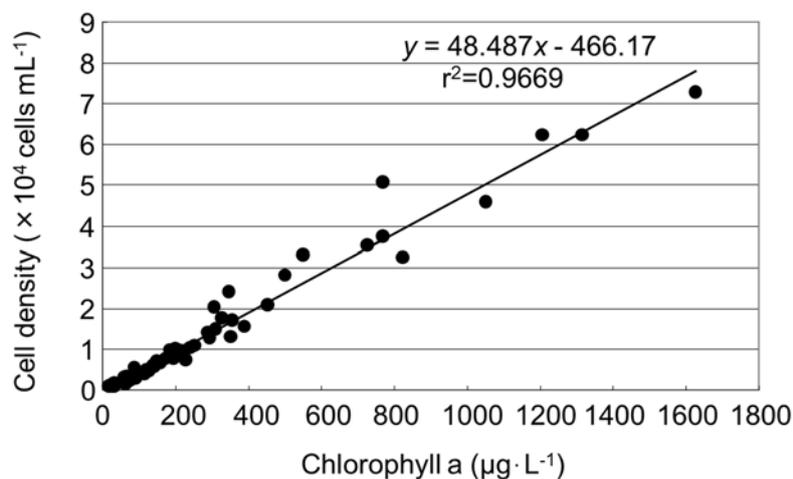


Fig. 2-20. Relationship between cell density of *Alexandrium tamarense* and Chlorophyll *a* in Sakai-Dejima Fishing Port during 29 – 30 April 2007 (modified from Yamamoto et al., 2010).

Fig. 2-20 に蛍光法による Chlorophyll *a* 濃度と *A. tamarense* 細胞密度の関係を示した。調査期間中 *A. tamarense* 以外の植物性プランクトンの出現が少なく、*A. tamarense* 細胞密度と Chlorophyll *a* の相関は極めて高かった ($p < 0.01$)。このため、現場における蛍光強度のプロファイルは *A. tamarense* の分布を反映していると考えられた。水中型蛍光光度計による蛍光強度の鉛直プロファイルの経時変化を Fig. 2-21 に示した。蛍光値の鉛直プロファイルは 14:30 に水深 1 m 以深で急激に低下していたが、18:30 まで蛍光値のピークは徐々に表層に集中するようになり、21:00 までは概ね表層に蛍光値のピークが認められた。その後、底層付近に小さな蛍光値のピークが確認され、表層の密度が低下していくとともに底層の蛍光値のピークが顕著になり、30 日 2:30 の観測では全体的に細胞密度は低いものの底層に明確な蛍光値のピークが確認された。4:00 から 5:00 にかけては再び蛍光値のピークが上昇する様子が観察され、8:00 にはごく表層に集中分布していたが、10:00 から 12:00 の観測ではピークは再び 0.5 m 層に下降していた。

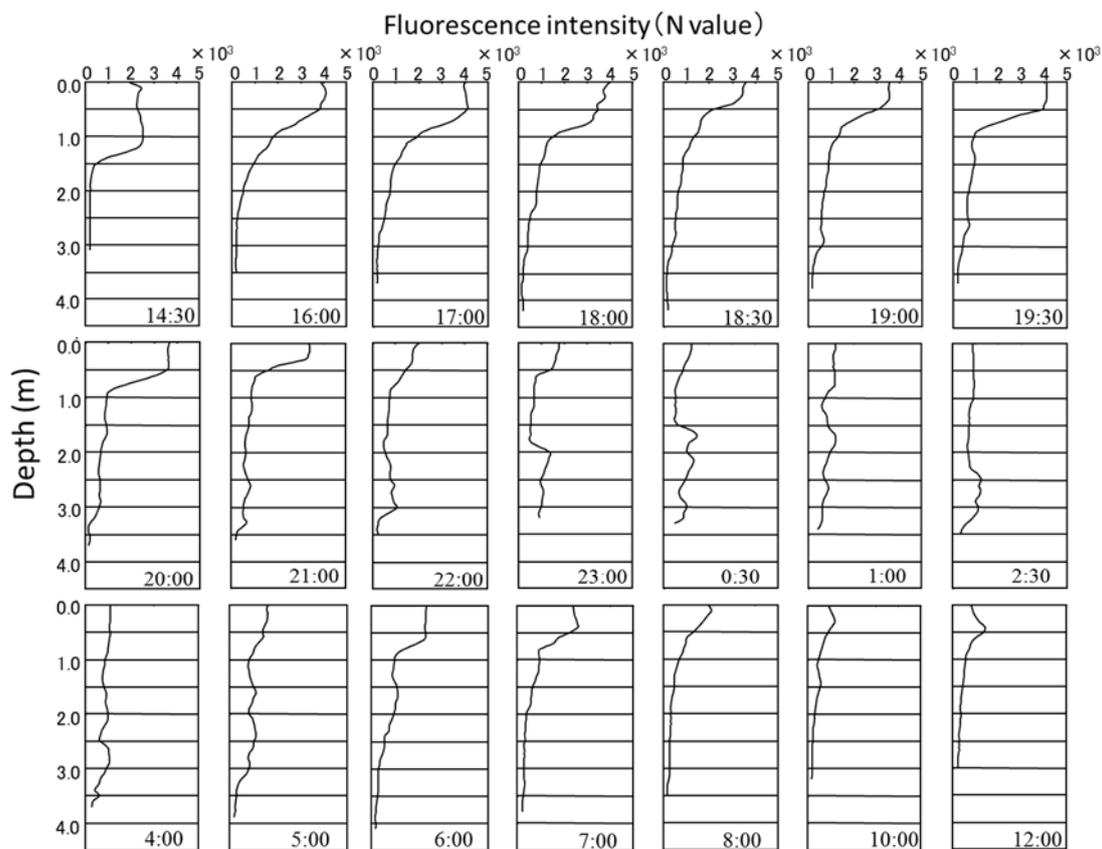


Fig. 2-21. Temporal changes in vertical profiles of fluorescence (relative units) observed in Sakai-Dejima Fishing Port during 29–30 April 2007 (modified from Yamamoto et al., 2010).

環境要因の経時変化および遊泳細胞出現との関係

Fig. 2-22 に水温，塩分の鉛直分布の経時変化を示した。観測された水温範囲は 15.24-22.40 °C，塩分は 28.11-30.11 であった。水温は観測を通じて表層で高く，底層になるほど低い傾向が見られた。表層では 29 日 18:00 まで 21 °C 以上の水温が観測され，特に 16:00 の観測では 22 °C を超えていた。その後，表層の水温は日没とともに徐々に低下し，夜明け前には 18 °C 台まで低下した。30 日 8:00 以降は再び上昇し，調査終了の 12:00 には 22 °C を超える水温となった。表層における観測中の水温差は大きく，約 4 °C となった。一方底層では日没以降 16 °C 以下で安定していた。塩分は概ね表層で低く，底層で高い傾向であったが，29 日 18:00 から 21:00 にかけて表層に比較的高塩分の水塊が確認された。底層については塩分 29 以上で安定していた。

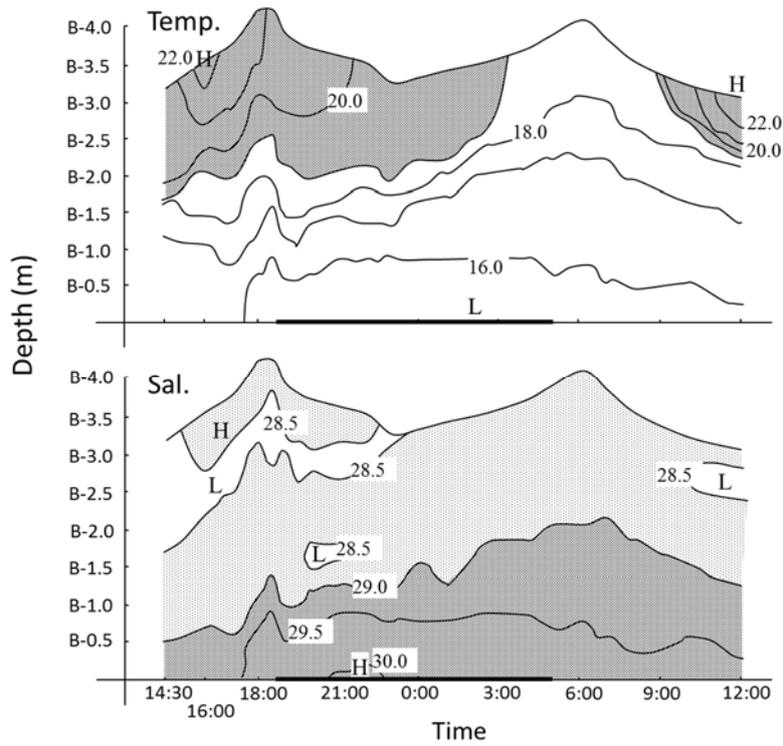


Fig. 2-22. Temporal change in vertical profiles of water temperature (upper) and salinity (lower) during 29 – 30 April 2007 (modified from Yamamoto et al. 2010).

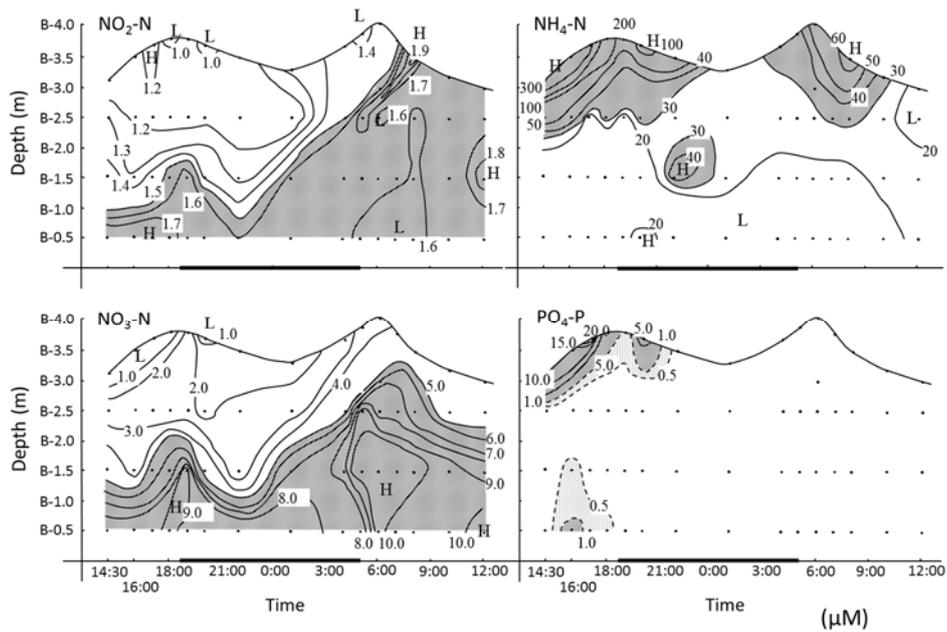


Fig. 2-23. Temporal changes in vertical profiles of dissolved inorganic nutrients: NO₂-N: upper left, NO₃-N: lower left, NH₄-N: upper right, PO₄-P: lower right in Sakai-Dejima Fishing Port during 29 – 30 April 2007 (modified from Yamamoto et al., 2010).

Fig. 2-23 に溶存態無機態栄養塩の鉛直分布の経時変化を示した。3 態無機窒素のうち $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の分布は類似しており、表層で低く、底層で高い傾向であった。また変化についても概ね同様で、29 日 22:00 までは底層に高濃度で存在していたが、その後徐々に高濃度の水が上昇し、30 日 4:00 以降は表層近くまで比較的高い濃度が観測された。一方、 $\text{NH}_4\text{-N}$ ではこれらとは逆の傾向で、表層で高く深度が深くなるにつれ濃度は低い傾向が見られた。特に 29 日 22:00 まで表層では極めて高濃度であった。さらに 22:00 には海底上 1.5 m の層にも高濃度が確認された。その後、30 日の 1:00 から 3:00 には全層で低くなったが、30 日の夜明け前後から 10:00 まで、再び表層において高濃度となった。 $\text{PO}_4\text{-P}$ については調査を通じて $1 \mu\text{M}$ 以下のレベルで推移したが、29 日の調査開始時から 20:00 までの表層で、19:00 の観測時を除き $2.51 \mu\text{M}$ から最大 $21.59 \mu\text{M}$ と極めて高い濃度で確認された。

Fig. 2-24 に細胞密度と各栄養塩との関係を示した。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ では細胞密度の対数と栄養塩濃度の間には負の関係がみられ、細胞密度が高いほど栄養塩濃度は低い傾向であった。 $\text{NH}_4\text{-N}$ は概ね低い傾向であったが、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ とは逆に細胞密度との間には弱い正の関係がみられた。 $\text{PO}_4\text{-P}$ も概ね低レベルで細胞密度との関係は小さかったが、密度が $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ 以上で極端に高い値がみられた。

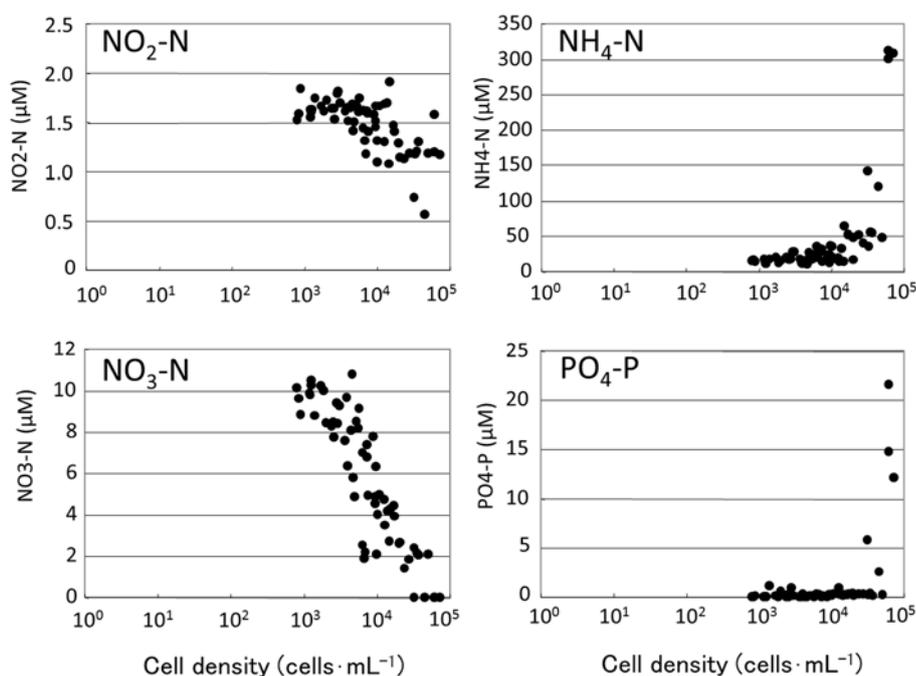


Fig. 2-24. Relationship between nutrients concentrations and cell density of *A. tamarensis*. $\text{NO}_2\text{-N}$: upper left, $\text{NO}_3\text{-N}$: lower left, $\text{NH}_4\text{-N}$: upper right, $\text{PO}_4\text{-P}$: lower right (modified from Yamamoto et al., 2010).

Fig. 2-25 に水中照度の鉛直分布の経時変化を示した。表層の照度は調査開始の 14:30 に最も高く $10^3 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ のレベルであったが、水中における減衰は非常に大きく、

最も高かった 14:30 においても 0.5m までに約 $10^3 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と表層の 100 分の 1 以下のレベルにまで減衰していた。表層の照度はその後日没にかけて徐々に低下し、日没後の 19:00 にはほぼ 0 になった。30 日は 5:00 の観測時には薄明かりになり、6:00 には $10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、8:00 には $10^2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を超えたが、調査終了の 12:00 まで $10^3 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を超えることはなかった。30 日は前日と異なり、水中における減衰は緩やかで、8:00 以降は底層まで $10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を超える照度が観測された。

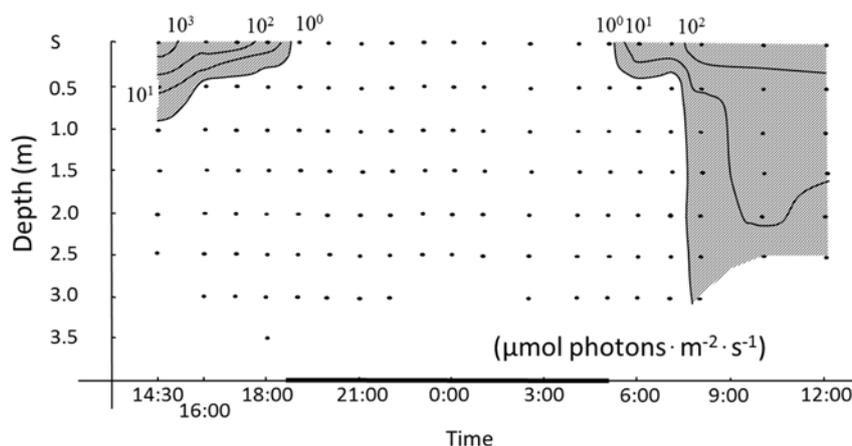


Fig. 2-25. Temporal changes in vertical profiles of light intensity during 29 – 30 April 2007 (modified from Yamamoto et al., 2010).

毒組成および細胞毒量の経時変化

Fig. 2-26 に *A. tamarese* 天然細胞の毒成分組成の推移を示した。調査期間を通じて毒成分組成にほとんど変化は見られなかった。毒成分割合では弱毒成分である C1, C2 の割合が最も高く、約 60 mol% を占めていた。そのほとんどが C2 であった。次に多かったのは GTX1, 4 で、この 4 成分で全体の 80-90 mol% であった。これに続き、GTX2, 3, neoSTX, STX が微量成分として検出された。GTX5 および GTX6 が全く検出されなかったことから、毒性的に見ても、*A. catenella* が混在していた可能性は低いと判断される。

Fig. 2-27 に *A. tamarese* 細胞あたり毒量 (fmole cell^{-1}) の推移と、連鎖細胞の割合の推移を示した。細胞あたり毒量は調査開始の 29 日 14:30 には約 $200 \text{ fmole cell}^{-1}$ であったが、日没前後から徐々に上昇し、30 日の 1:00-4:00 には 2 倍以上の約 $450 \text{ fmole cell}^{-1}$ となった。その後、夜明け前の 30 日 5:00 から 6:00 にいったん下がったが、再び上昇し、8:00 には調査開始時の 2.5 倍の約 $500 \text{ fmole cell}^{-1}$ となった。一方、連鎖細胞の割合は 29 日 14:30 から 17:00 までは増加したが、その後は減少傾向となり、30 日 5:00 にいったん増加した後、再び減少し調査終了の 12:00 にはほとんど確認されなくなった。連鎖細胞はすべて 2 連鎖で 3 連鎖以上の細胞は確認されなかった。

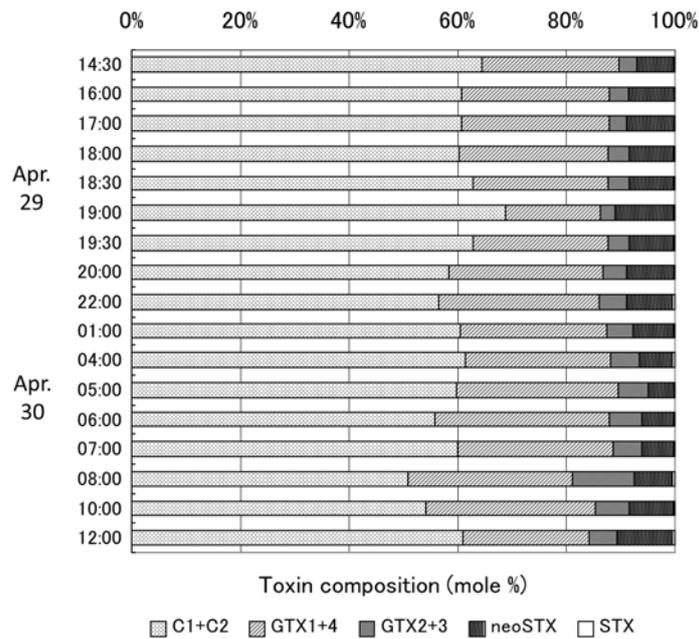


Fig. 2-26. Temporal changes in toxic composition of *A. tamarensis* in Sakai-Dejima Fishing Port during 29 – 30 April 2007 (modified from Yamamoto et al., 2010).

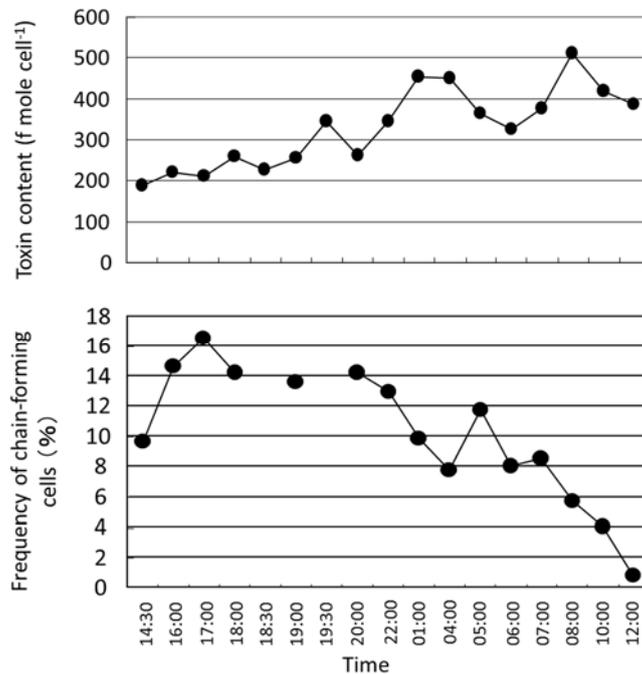


Fig. 2-27. Temporal changes in toxic content (upper) and frequency of chain-forming cells (lower) of *A. tamarensis* in Sakai-Dejima Fishing Port during 29 – 30 April 2007 (modified from Yamamoto et al., 2010).

考察

Alexandrium tamarense 遊泳細胞の日周鉛直移動

赤潮を形成する渦鞭毛藻類やラフィド藻の多くの種で日中は表層に分布し、夜間は底層に移動するといった日周鉛直移動を行うことが知られている (Eppley et al., 1968; Yamochi and Abe 1984; Koizumi et al., 1996; 小泉ら, 2001 など)。本種においても日周鉛直移動が過去に報告されている (MacIntyre et al., 1997; 福代, 1982 など) が、日中表層付近まで浮上するが表面に達することはなく (福代, 1982 ; Anderson and Stolzenbach, 1985) , 広島湾の調査では 5 m 層を中心に確認されていた (松山ら, 2002)。今回、遊泳細胞の密度分布、および蛍光強度のプロファイルから、上層から下層へ、下層から上層へといった明確なピークの移動は認められなかったが、夕方から夜間にかけて表層に集中し、夜間に下層に移動しつつ底層まで分散、夜明けには再び表層に集積した後、少し沈降する様子が観察された。この傾向は田辺湾における *Alexandrium catenella* の鉛直移動パターン (竹内, 1988) に類似しており、これまで報告された *Alexandrium* 属で共通した移動パターンとも考えられる。一方で、*A. tamarense* は表層よりも中層付近で高密度に存在するが、雨天もしくは曇天時には高密度層が表層にみられ、その理由として光強度の低下にともない、細胞が表層まで移動したことによると考察している報告もある (樽谷, 1999)。第2章第2節では、大阪湾でも低照度時に表層近くに分布する可能性を示した。本調査における 29 日の分布は 30 日より表層性が強い傾向であったが、天候については両日とも快晴で表層の照度も 10^2 - 10^3 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ にあり、むしろ 29 日の照度が高い傾向であった。今回の赤潮はほぼ本種単独のものであり、水中照度の鉛直方向への減衰は本種自身の集積によるものと考えられる。ここで、水柱あたりの細胞密度をみると 29 日から 30 日にかけて大きく減少していた。すなわち 30 日は表層からの照度の減衰が緩やかで、底層においても 10^1 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度の照度はあったことから、29 日より分布が下方に分散した可能性も考えられる。観測定点における水柱あたりの細胞密度が減少した理由については定かではないが、気象条件で見ると 29 日は概ね南西風 (風速 1.1-4.4 m), 30 日は北東風 (風速 0.5-4.1 m) であった (<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>, 気象庁)。一方、潮汐は中潮で、調査時間中の干満差は最も近い大阪港において 29 日が 48 cm, 30 日が 86 cm (<http://www1.kaiho.mlit.go.jp/>, 海上保安庁海洋情報部) と動きは小さかった。調査が行われた漁港は西向きに開口することから、水柱における減少は、以上の条件とあわせ風による逸散と考えるのが妥当であろう。

ブルーム発生と環境要因との関係

培養実験による *A. tamarense* の増殖至適水温、塩分の組み合わせは広島湾産株で 15 °C, 30, 愛知県産株で 15 °C, 30 と報告されている (山本・樽谷, 1997)。その一方で、現場海域でのブルーム発生は概ね培養条件で得られる至適水温よりも低水温側で観察されており (長井, 2007 ; Ichimi et al., 2001) , 広島湾では通常水温 15 °C を上回ると水中から見ら

れなくなる (Itakura et al., 2002)。今回観測された水温は 15.24-22.40 °C と過去に *A. tamarense* の増殖で報告された水温と比較するとかなり高かった。さらに、表層では 1 日で約 4 °C の水温差が生じるなど変化が大きかった。同時期、周辺海域でも *A. tamarense* の増殖が確認されていたが (山本ら, 2009), これらの出現水温は至適水温に近いものであったことから、このような港内の周辺海域とは異なった水温条件が赤潮まで増殖させた一因であった可能性も考えられる。一方、塩分については 28.11-30.11 で培養実験における増殖至適範囲内にあった。

栄養塩との関係について、松山ら (2000) は各種窒素源が *A. tamarense* の増殖に及ぼす影響を調べた結果、NO₂-N, NO₃-N が NH₄-N に比べ相対成長が約 2 倍あることを示した。今回の結果でも NO₂-N, NO₃-N については細胞密度と逆相関の傾向が見られたことから、主な栄養源として利用されていたことが推察される。渦鞭毛藻の多くの種で、日周鉛直移動が底層の栄養塩を利用するために有利となる可能性が示唆されており (Yamochi and Abe 1984; 小泉ら, 2001), 主に利用すると考えられる NO₂-N, NO₃-N が底層に偏在することは、夜間の底層への分散、移動が本種においても同様の意義があることが考えられる。一方、NH₄-N の分布は NO₂-N と NO₃-N とは逆に表層で高く底層で低い傾向で、細胞密度の高い 29 日の日没にかけての表層や、22:00 の B-1.5 m 層、30 日の日の出以降の表層などで高く、細胞密度の鉛直分布の経時変化に類似した分布変化を示した。また、密度が 10³ cells mL⁻¹ を超えるようなところでは特に高い濃度で観察され、水温、塩分の値から異なる水塊と考えられる 29 日表層を除いても細胞密度との間に弱い正の相関が確認された。*A. tamarense* は NH₄-N も栄養源として利用可能であることから、細胞密度との関係とは矛盾しているように思われる。また、通常 NO₃-N と NH₄-N が全く異なる挙動を示すことも考えにくい。

麻痺性貝毒成分は 20 種類以上が知られているが、国内産二枚貝で確認される主要な毒成分はゴニオトキシン (GTX) 群やネオサキシトキシン (neoSTX) である (大島・濱野, 2007)。今回細胞毒組成を分析した結果においてもゴニオトキシン群の C1, C2, GTX1-4 などが主要な成分であった。栄養塩分析時の陰圧濾過では、経験的に栄養細胞に含まれる 10-20% の細胞内毒がろ液画分に漏出する。例えば 1 細胞当たりの毒量を 200 f mole とし、そのうち 20% の毒量 (40 f mole) が濾過によって溶存画分に漏出したとする。海水 1L あたりの細胞密度から計算するならば、漏出毒量は 0.1-2.9 μM となる。麻痺性貝毒の分子内には NH₂-が 2 基含まれることから、NH₄-N 分析時のアルカリ-次亜塩素酸反応時に細胞外に流出したこれら成分が分解され NH₄-N として検出された可能性がある。もちろん現場で観測された NH₄-N 濃度はより高濃度であったので、詳細については今後検討が必要である。

PO₄-P については細胞密度にかかわらず概ね低い傾向であったが、29 日 21:00 までの表層では NH₄-N とともに例外的に高濃度で観測された。PO₄-P が高濃度に観察されたのは 29 日の表層のみであり、前述の通り、由来は不明であるが異なる水塊と考えられることから、枯渇したリン源を取り込むため 29 日の表層に分布が集中した可能性も考えられる。

細胞の毒組成と細胞あたり毒量の変化

毒の組成は株や海域、環境条件等によって変わることが報告されている (Kim et al., 1993a; 加賀ら, 2006)。今回、調査開始時の表層に異なる水塊が存在したと考えられるが、毒の組成はほとんど変化していなかった。また、*A. catenella* が産生する GTX5 や GTX6 が検出されなかったことから、*Alexandrium* 属の他種が混在していた可能性も低い。すなわち、調査中漁港内では同一種、同一系群の個体群が優占していたと推察され、その毒組成は分布中心層の水温、塩分、栄養塩が刻々と変化する中でもほとんど変化していなかったといえよう。培養条件下では環境要因と毒成分の関係について比較的調べられているものの、天然細胞の日周変化を観察した研究はほとんど例のないものと思われる。

Kim et al. (1993b) は培養細胞において実験を行い、細胞あたりの毒量は明期の後半から暗期中頃まで徐々に上昇した後急速に減少したことを報告しており、毒の減少理由を細胞の分裂による娘細胞への分配・希釈によるものと考察している。今回の結果でも、Kim et al. (1993b) と同様、細胞あたり毒量は明期後半から上昇しており、天然海域においても経時的に毒が蓄積することが確認された。一方で、調査終了まで減少することなく、夜明け以降も継続して上昇傾向であった。他の渦鞭毛藻においても細胞分裂は明け方に起こる例が多く (飯塚・平山, 1980), Kim et al. (1993b) の結果からも本種においても分裂は通常明け方に行われると考えられる。しかし、今回は最終的な細胞あたりの毒含量も他海域の例 (Kim et al., 1993a) と比べてもかなり高く、同時に計数した連鎖細胞の割合は明期後半をピークに明け方以降も減少傾向となっていた。細胞の毒含量は増殖速度の遅い時期に高くなることから (Ogata et al., 1987), 原因は不明であるが本観測中は細胞分裂が止まった状態で、さらに毒量が高まったものと推察される。

今回観測を行った漁港は水深 4 m 程度と深くないため、アカガイ、トリガイ漁場である、沖合の水深 10 m 前後の海域において、本種が底層まで移動できるかは不明である。しかし、St. Lawrence 川河口では 10m を越える水深でも出現が確認されていること (Fauchot et al., 2005), 同属の *A. catenella* では移動速度が 1.6 m h^{-1} - 2.5 m h^{-1} と算出されており、10 m の層まで拡散していたことから (竹内, 1988), 細胞の外部形態がほとんど同じである *A. tamarense* においても、同程度の移動速度を持つ可能性はあると考えられる。このことと遊泳細胞の分布が夜間に底層まで広がる傾向が観察されたこと、細胞あたり毒量が夜間に増大していくことを合わせると、アカガイ、トリガイ等においても毒化リスクは高いと考えられる。さらにアカガイ、トリガイはアサリ、ヤマトシジミに比べて毒化、減毒が遅い傾向が観察されている (山本未発表)。二枚貝では種によって毒の蓄積能や排出能に差があることが知られており (高田ら, 2004), 貝ごとの毒化状況についてはさらに知見を蓄積する必要がある。さらにプランクトンの出現と毒化のタイムラグが大きいことから、毒を直接かつ迅速にモニタリングする手法についても検討する必要がある。

第4節 シストの分布と経年変化

緒言

渦鞭毛藻類には生活史の中に休眠期を持つものが多く、このような種類では増殖に不適な環境下ではシスト（休眠接合子）を形成し、海底泥中で生息している。*Alexandrium tamarense* もシストを形成することが知られていることから（福代, 1997 など）、大阪湾では近年の発生により本種のシストが大量に形成されたことが推測される。シストは種の分布域の拡大、ブルームの開始や終焉、不適な環境下での生き残りに重要な役割を果たしていることが知られている（Anderson and Wall, 1978）。またシストは seed population として遊泳細胞の供給源となっており（Anderson and Wall, 1978）、次年度以降の貝毒発生の可能性を推測する有用な指標であることから（Shimada and Miyazono, 2005）、シストの分布状況を把握することは重要である。

本項では、大阪湾における麻痺性貝毒発生リスクを評価する目的で、春期に本種が増殖し、麻痺性貝毒による二枚貝の毒化が確認された 2006 年に行った全域調査、および大阪湾において本種による赤潮が初めて確認された 2007 年以降に東部海域で継続的に行っているシストモニタリング調査の結果について述べる。

材料と方法

大阪湾全域シスト調査

調査は、2006 年 10 月 24-25 日に、Fig. 2-28A に示した大阪湾内の 17 定点において、独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所調査船「しらふじ丸」(138 トン)によって行った。各定点において G. S. 型表層採泥器（アシュラ；離合社）もしくはスミスマッキンタイヤ採泥器（採泥面積 0.1 m²）を用いて海底泥試料を採取した。G. S. 型表層採泥器では 1-3 本の各コアの表面から 1 cm 深までの泥を、スミスマッキンタイヤ採泥器では表層泥約 1 cm を薄くなぞるように分取し、不透明なプラスチック容器に入れ、分析まで温度約 10 °C の暗所に保存した。

大阪湾東部海域におけるシストモニタリング

調査は 2007 年-2016 年の 9 年間、5 月および 10 月に Fig. 2-28B に示した大阪湾東部海域の 6 定点において、大阪府環境農林水産総合研究所調査船「おおさか」(28 トン)によって行った。ただし、2008 年-2012 年については断片的にしかデータを取得していないことから、解析には主に 2007 年および 2013 年以降のデータを用いた。採泥はスミスマッキンタイヤ採泥器（採泥面積 0.1 m²）を用い、採取した海底泥は表層泥を薄くなぞるように分取した。また 2007 年のみ、春期に赤潮の発生が確認された（山本ら, 2009）2 漁港（田尻漁港、堺出島漁港；Fig. 2-28Ba, b）において 2007 年 10 月 19 日に採泥をおこなった。田尻漁港では遊漁用いけすの筏から、堺出島漁港では栈橋に停泊している遊漁船の船縁から、KK 式柱状採泥器（木俣ら, 1960）を用いて海底泥試料を 1-3 本採集した。各コアの表面

から 1 cm 深までの泥をそれぞれ分取してあわせたものを試料に供した。各試料は不透明なプラスチック容器に入れ、分析まで温度約 10 °C の暗所に保存した。調査船から採取した泥については、泥分率 (<63 μm の粒子の重量%) の測定も併せて行った。

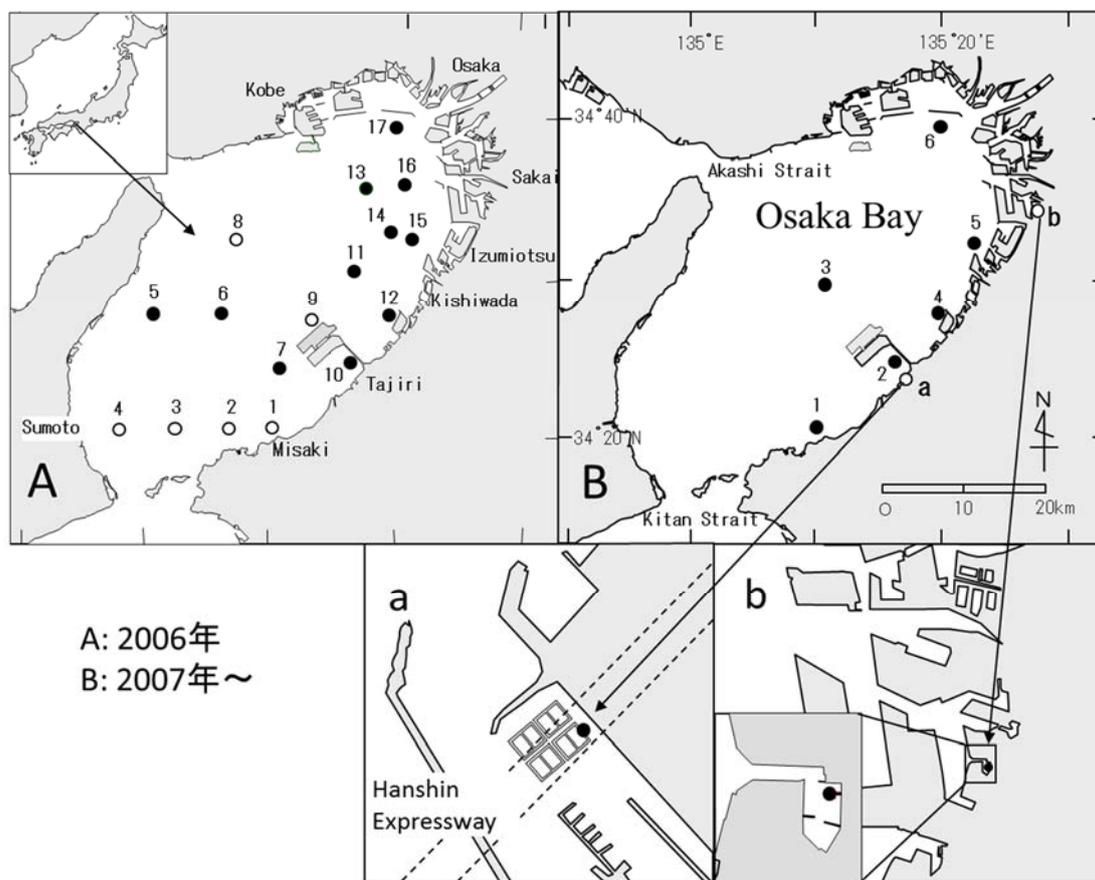


Fig. 2-28. Location of the sampling stations for collecting bottom sediments in Osaka Bay. A: stations in 2006, sampling by G. S. type core sampler (closed circles) and by Smith-McIntyre bottom sampler (open circles). B: stations in 2007, a: Tajiri Fishing Port, b: Sakai-Dejima Fishing Port (modified from Yamamoto et al. 2009b).

シストの直接計数

シストの計数は、Yamaguchi et al. (1995)によって開発された primuline による蛍光染色と落射蛍光顕微鏡を用いた直接計数法によった。すなわち、湿泥 5 g をふるい分けし、20-150 μm 画分を得た後、グルタルアルデヒドで固定、メタノールで処理を行い、primuline 溶液で染色した。さらに蒸留水で洗浄後、10 ml に定容したものから 0.1 ml を分取して蛍光顕微鏡下で観察した。本法で染色した *Alexandrium* 属シストは B 励起 (青色励起) 下で黄緑色の蛍光を発する (Yamaguchi et al., 1995)。蛍光が認められたシストのうち *A. tamarensis* と *Alexandrium catenella* に特徴的な形状である長楕円形のシストについて計数を行い、各

試料で3回の計数を繰り返し、平均値と標準偏差を求めた。2006年については計数結果のばらつきが大きかったため同様の操作を再度行い、計6回の平均とした。*A. tamarensis* のシストと *A. catenella* のシストは酷似しており、長径に若干の違いはあるものの (Itakura and Yamaguchi, 2005), 形態的には区別できないとされる (Fukuyo, 1985)。2012年までの試料では底泥中シストの培養法等による種同定を行っていないため、経年的な変化を解析する際には *A. tamarensis* と *A. catenella* をあわせて扱った (以下、*Alexandrium* シストとする)。得られた値は底泥湿重あたりの数値となるため、Kamiyama (1996) に従い泥の比重を測定し、単位体積あたりのシスト量を求めた。

***Alexandrium tamarensis* および *A. catenella* シストの種別割合の推定**

種別の構成比の把握は2013年から2016年の10月分採泥サンプルにおいて行った。堆積物中の *A. tamarensis* と *A. catenella* の比率を定量PCRにより推定し、比率データを *Alexandrium* シスト総数に乗ずることで種別シスト数を算出した。定量PCRによる両種の出現割合の推定は以下の方法で行った。泥試料0.5gからキット (Fast DNA SPIN Kit for soil, MP Biomedicals) を用いてDNAを抽出した。*A. tamarensis* と *A. catenella* 用のプライマーセット (Nagai, 2011) を用い、SyberGreen法により両種の遺伝子量を定量した。プラスミドで増幅した標的遺伝子DNAによる検量線を作成し、シスト1個あたりの標的遺伝子保有数を測定し、この値を用いて泥試料中のシストの出現割合を推定した。さらに得られた出現割合を直接計数で得られた両種の合計シスト数に乗じて種別シストの出現数を計算し、定量PCRで直接得られた種別シスト数を比較した。

結果

***Alexandrium tamarensis* 赤潮発生前後における *Alexandrium* シストの密度**

2006年の全域調査における *Alexandrium* シストの分布状況を Fig. 2-29 に示した。*Alexandrium* シストは調査を行った17地点すべてで確認された。最も密度が高かったのは中部沿岸の Stn. 12 で 112 ± 28 (平均値 \pm 標準偏差, 以下同) cysts cm^{-3} であった。分布の中心は関西国際空港 (以下関空と称する) 以北の東部沿岸域にみられ、さらに明石海峡と紀淡海峡の中間に位置する関空から淡路島にかけての定点 (Stns. 5, 6) でも比較的高密度 (それぞれ $29 \pm 24 \text{ cysts cm}^{-3}$, $55 \pm 26 \text{ cysts cm}^{-3}$) で観察された。一方、関空以南の沿岸部から紀淡海峡の定点 (Stns. 1-4, 7, 10), 明石海峡に近い定点 (Stn. 8) では分布密度は低く、両海峡部の定点では 2 ± 5 - $13 \pm 8 \text{ cysts cm}^{-3}$ と特に少なかった。

2007年における海域および漁港における *Alexandrium* シストの分布状況を Fig. 2-30 に示した。*Alexandrium* シストは5月、10月とも調査を行った全ての定点で確認された。5月のシストは分布密度が大きく偏っており、大阪府中部の沿岸域で高密度に確認された。最も密度が高かったのは岸和田市沿岸の Stn. 12 で $5,683 \pm 631 \text{ cysts cm}^{-3}$ であった。また、泉大津市沿岸の Stn. 19 で $5,277 \pm 157 \text{ cysts cm}^{-3}$, 関空岸側の Stn. 10 でも $1,230 \pm 46 \text{ cysts cm}^{-3}$ と

沿岸部の多くの定点で 10^3 cysts \cdot cm^{-3} を超える密度となった。また、他の定点 (Stns. 1, 17, 18) でもそれぞれ 355 ± 131 cysts cm^{-3} , 407 ± 78 cysts cm^{-3} , 291 ± 125 cysts cm^{-3} と 10^2 cysts cm^{-3} を超える密度で存在し、上記の定点と比べると少ないものの、2006年のレベルを大きく上回っていた。10月のシストも海域における分布傾向は5月とほぼ同様であったが、全体的に密度は低下していた (190 ± 54 - $3,275 \pm 534$ cysts cm^{-3})。また、各漁港における調査でも *Alexandrium* シストは多く確認され、南部の田尻漁港 (Fig. 2-28B-a) で $2,115 \pm 177$ cysts \cdot cm^{-3} , 北部の堺出島漁港 (Fig. 2-28B-b) では 330 ± 48 cysts cm^{-3} といずれの調査でも 10^2 cysts cm^{-3} を超えるレベルであった。

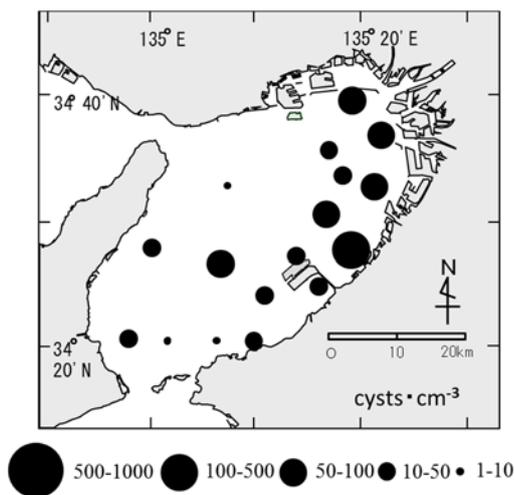


Fig. 2-29. Distribution and abundance of *Alexandrium* (*A. tamarense* and *A. catenella*) resting cysts in Osaka Bay in October 2006 (modified from Yamamoto et al. 2009b).

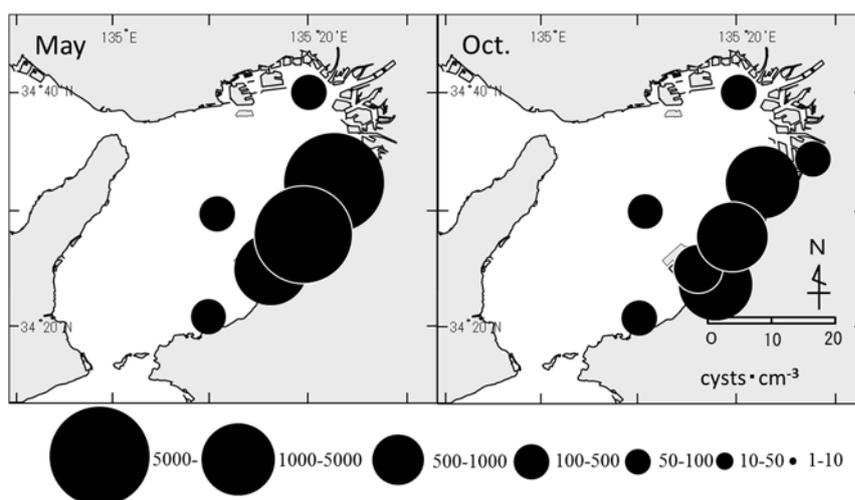


Fig. 2-30. Distribution and abundance of *Alexandrium* (*A. tamarense* and *A. catenella*) resting cysts in Osaka Bay in May 2007 (left) and October 2007 (right) (modified from Yamamoto et al. 2009b).

Table 2-1. Resting cyst densities (cysts cm⁻³) of *A. tamarense* and *A. catenella* at each station in October 2006, May and October, 2007 (modified from Yamamoto et al. 2009b).

St.	Oct. 2006	May 2007	Oct. 2007
St.1	27	355	289
St.10	31	1230	628
St.9	34		
St.18		291	190
St.12	58	5277	3275
St.15	112		
St.19		5683	2025
St.17	65	407	289

Table 2-1 に 2006 年, 2007 年に共通する定点における *Alexandrium* シストの密度の変化を示した。ただし, 2007 年の Stn. 18, Stn. 19 については 2006 年と共通する定点がなかったため, 位置が最も近い Stn. 9, Stn. 15 と比較した。2006 年から 2007 年 5 月には, 比較したすべての定点でシスト密度は増加しており, 特に岸和田市沿岸の Stn.12 では 2006 年比で 90.5 倍の密度となっていた。他にも Stn. 10 で 40.2 倍, Stn. 19 で 50.6 倍と増加傾向は中部の沿岸域で顕著であった。一方, 2007 年 5 月から 10 月についてはすべての定点でシスト密度は減少していた。特に 5 月に最も密度が高かった Stn. 12 では $2,025 \pm 343$ cysts cm⁻³ であり, 5 月調査時の 35.6% と大きく減少していた。また, Stn. 19 では $3,275$ cysts cm⁻³ で, 5 月調査時の 6 割程度となっていたが, Stn. 12 に比べると減少率は小さく, 10 月調査において最も高密度の定点となっていた。

大阪湾東部海域における *Alexandrium* シスト分布と現存量の変化

Fig. 2-31 に 2007 年から 2016 年の 5 月におけるシストの分布を示した。ただし, 2011 年の Stn. 2, および 2012 年の Stn. 4 以外の定点については欠測となったため 2012 年の分布については図示していない。また, 比重データが欠測の年があるため主に 1 g あたりの密度で表記した。2007 年は上記の通りシスト密度が大きく増加し, 湾奥の Stn. 6 以外の定点で 10^3 cysts g⁻¹ を超える密度で存在した。2008 年から 2011 年については 2007 年より減少したものの分析を行ったすべての定点で 10^1 cysts g⁻¹ 以上のシストが確認された。2013 年以降, シスト密度は再び増加し, 特に 2014 年は Stn. 4 で $33,642$ cysts g⁻¹ ($42,052$ cyst cm⁻³) と大阪湾で確認された最大値を記録した。大阪湾東部海域における *Alexandrium* シストは沿岸で多く沖合から南部で少ない傾向であり, 安定して高い密度であったのは中部の Stn. 2, Stn. 4, Stn. 6 であったが, 湾奥の Stn. 6 では年により少ないこともあった。

Fig. 2-32 に 2013 年から 2016 年の 5 月から 10 月における定点別シスト密度の変化を示

した。シストの密度は2007年と同様、5月から10月にかけて総じて減少していた。定点別にみると、中南部のStn. 1, Stn. 2, Stn. 3, Stn. 4で減少する一方、湾奥のStn. 5, Stn. 6では逆に増加する傾向があった。

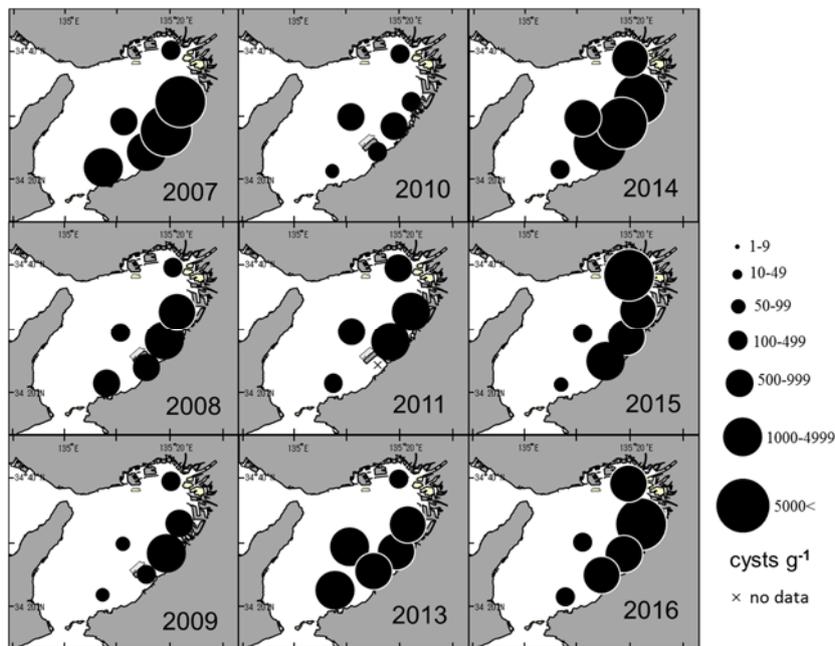


Fig. 2-31. Yearly changes in distribution of resting cysts of *Alexandrium* (*A. tamarense* and *A. catenella*) from 2007 to 2016 (note that no data in 2012).

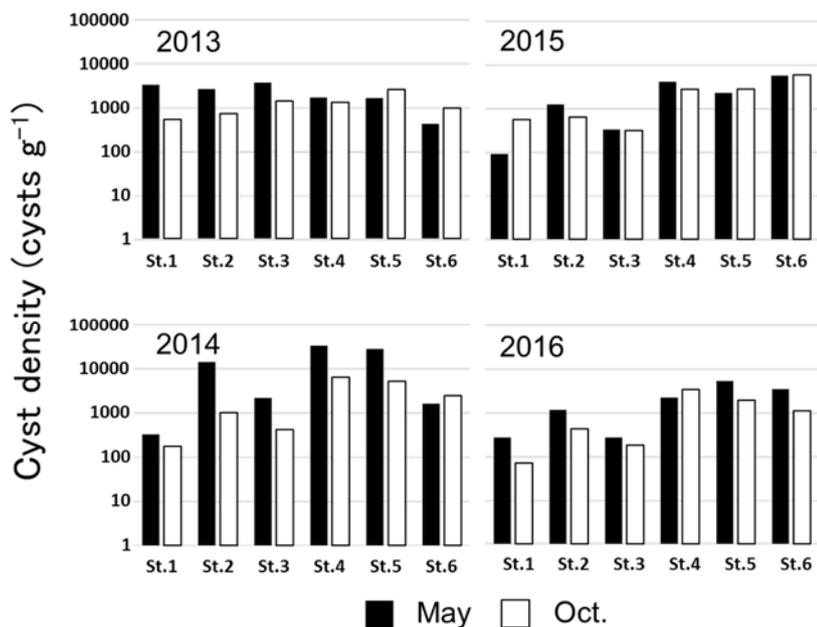


Fig. 2-32. Spatial – temporal changes in cyst density at each station in May and October of 2013 to 2016.

栄養細胞の出現および泥分率とシスト密度の関係

Fig. 2-33 に 2013 年から 2016 年のシスト調査を行った定点における栄養細胞の年間最高細胞密度とシスト密度の関係を示した。1 g 中のシスト密度、1 cm³ 中の密度とも総じて最高細胞密度の高い定点ではシスト密度も高い傾向であった (p<0.1)。しかし一方で、5 月については有意な相関がみられなかった。

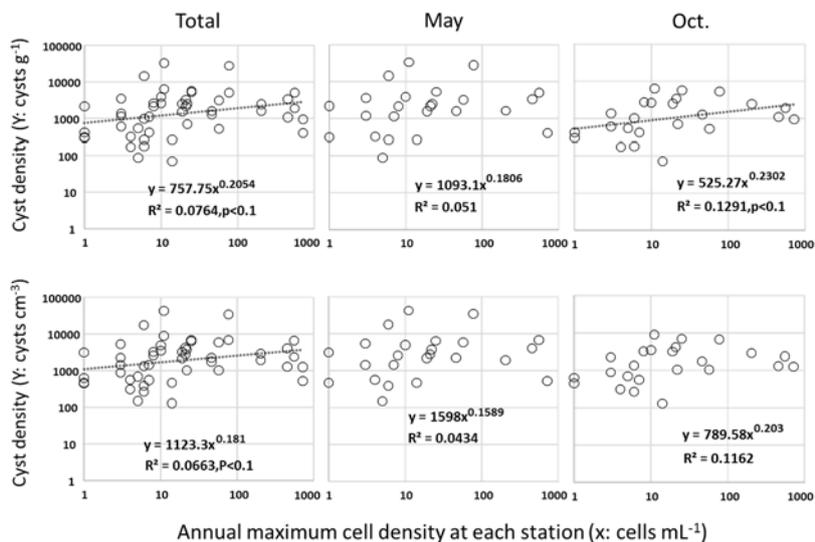


Fig. 2-33. Relationships between resting cysts density and annual maximum cell density at each sampling station. Units are cysts g⁻¹ (upper) and cysts cm⁻³ (lower). Data based on whole sampling (left), May (middle) and October (right).

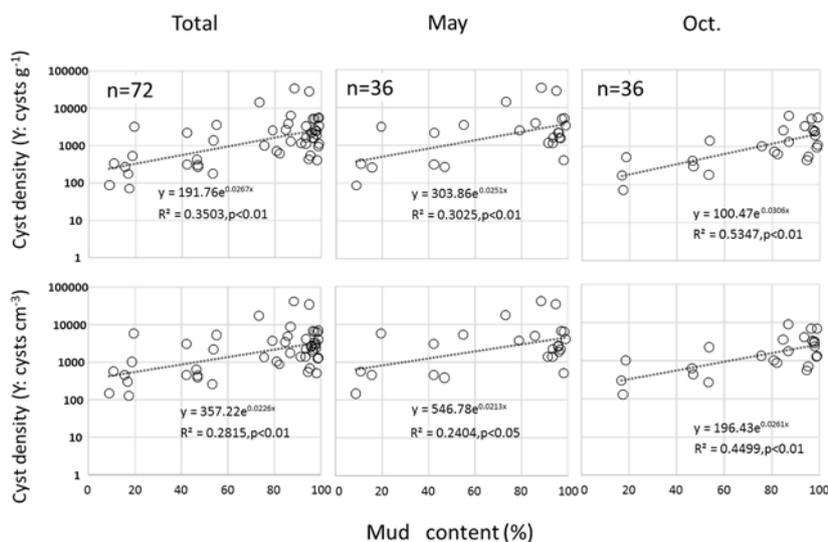


Fig. 2-34. Relationships between abundance of *Alexandrium* resting cysts and mud contents of sediments. Units are cysts g⁻¹ (upper) and cysts cm⁻³ (lower). Data based on whole sampling (left), May (middle) and October (right).

Fig. 2-34 に、2013 年から 2016 年のシスト調査を行った定点における泥分率（粒径 63 μm 以下）とシスト密度の関係を示した。1 g 中のシスト密度、1 cm^3 中の密度とも泥分率の高いところでシスト密度が高い有意な正の相関（5 月の 1 cm^3 中の密度 ($p < 0.05$) 以外で $p < 0.01$) 傾向が確認された。さらに、5 月よりも 10 月における関係がより明瞭で、高い相関係数となった。

2007 年以降のシスト密度の経年変化と栄養細胞増殖規模の関係

比較的欠測が少なくシスト密度が高い Stn. 5 における、5 月のシスト密度の経年変化と栄養細胞の定点調査における年間最高細胞密度の経年変化および相関関係を Fig. 2-35 に、10 月のシスト密度の経年変化と栄養細胞の年間最高細胞密度の経年変化および両者の相関関係を Fig. 2-36 に示した。また、Fig. 2-36 には 10 月のシスト密度と翌年の最高細胞密度の関係を併せて示した。ここで、複数点の計数結果が存在する年の平均シスト密度と Stn. 4 のシスト密度との関係を検討したところ、平均シスト密度と Stn. 4 には高い相関関係が確認された (Fig. 2-37) ことから Stn. 4 のシスト密度を代表値として用いることは妥当と判断された。

Stn. 5 における 5 月のシスト密度は赤潮発生後の 2007 年に 8,380 cysts g^{-1} であったが、2010 年まで毎年減少し、2010 年には 453 cysts g^{-1} となった。2011 年に再び増加した後 2012 年に減少し、期間中最低値である 112 cysts g^{-1} となった。その後再び増加し、2014 年に期間中最大値である 28,163 cysts g^{-1} を記録した。一方、栄養細胞の年間最大値は、2007 年の赤潮発生時には 607 cells mL^{-1} まで増殖したが、2009 年まで減少し、10 cells mL^{-1} 未満となった。その後、2011 年に $10^2 \text{cells mL}^{-1}$ のレベルで増殖したが、2012 年には再び減少し、10 cells mL^{-1} 未満となった。2013 年以降は大規模な増殖が続き、2014 年以外は $10^2 \text{cells mL}^{-1}$ のレベルで確認された。

栄養細胞の年間最高細胞密度と 5 月のシスト密度の間には有意な正の相関が確認された (Fig. 2-35: $n=10, r^2=0.49, p < 0.05$) が、10 月のシスト密度とは有意な関係ではなかった (Fig. 2-36: $n=8, r^2=0.27$)。しかしながら、5 月と同様、細胞密度が高い時シスト密度も高い傾向であった。一方で、10 月のシスト密度と翌年の最高細胞密度の間には関係性は確認されなかった。

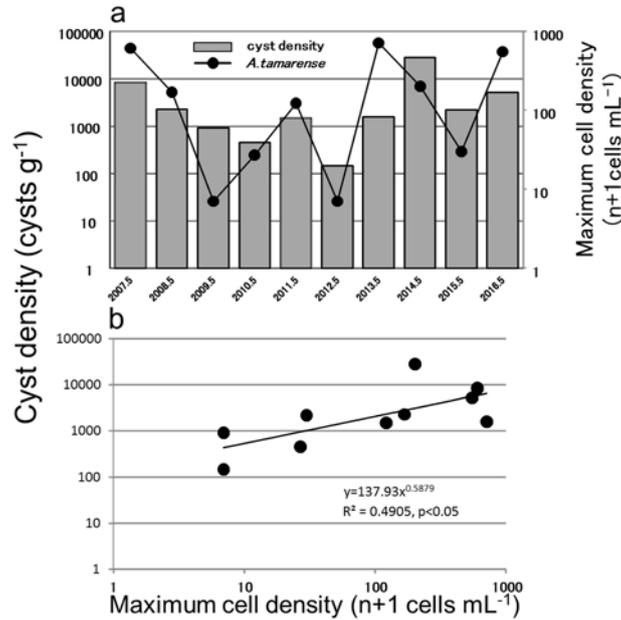


Fig. 2-35. Yearly changes in cyst density in May and annual maximum cell density of *A. tamarensis* at Stn. 4 in Osaka Bay (a). Relationship between cyst density at Stn. 4 in May (b) and annual maximum cell density in Osaka Bay.

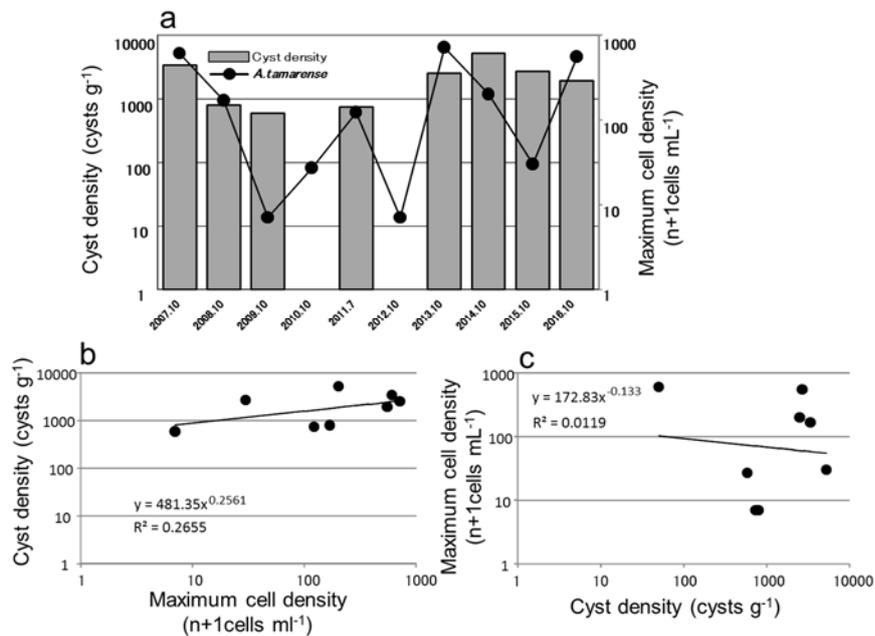


Fig. 2-36. Yearly changes of cyst density at Stn. 4 in October and annual maximum cell density of *A. tamarensis* in Osaka Bay (a). Relationship between cyst density at Stn. 4 in October and annual maximum cell density in Osaka Bay (b). Relationship between annual maximum cell density in the next year in Osaka Bay and cyst density at Stn. 4 in October (c).

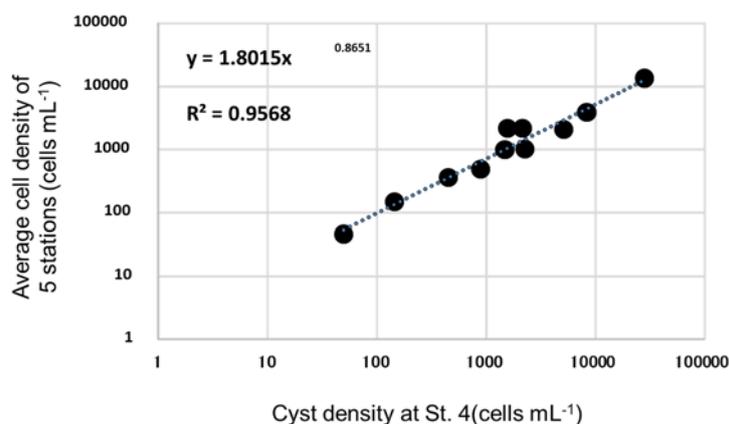


Fig. 2-37. Relationship between average density of 6 stations and cyst density at Stn.4.

Alexandrium tamarense および *A. catenella* シストの種別出現状況

Fig. 2-38 に 2013 年から 2016 年の 10 月における *A. tamarense* および *A. catenella* シストの定点別存在割合の変化を示した。2013 年から 2015 年まではすべての定点で出現した *Alexandrium* シストの 90%以上が *A. tamarense* であり、いずれの年も 6 定点中 2 定点では *A. tamarense* の割合が 100%であった。一方、2016 年は Stn. 6 を除いて *A. catenella* の割合が大きく増加し、多い点では *Alexandrium* シストの 30%が *A. catenella* となった。特に増加が顕著であったのは湾南部沿岸の Stn. 1, Stn.2, Stn.4 であった。出現割合から推定した種別分布では *A. tamarense* が中部から湾奥にかけての沿岸域で高密度に分布し、淀川河口に近い定点でも高い密度で存在したのに対し、*A. catenella* は関西空港島北部以北の沿岸に存在するものの淀川河口に近い定点での出現は *A. tamarense* に比べ少ない傾向であった (Fig. 2-39)。

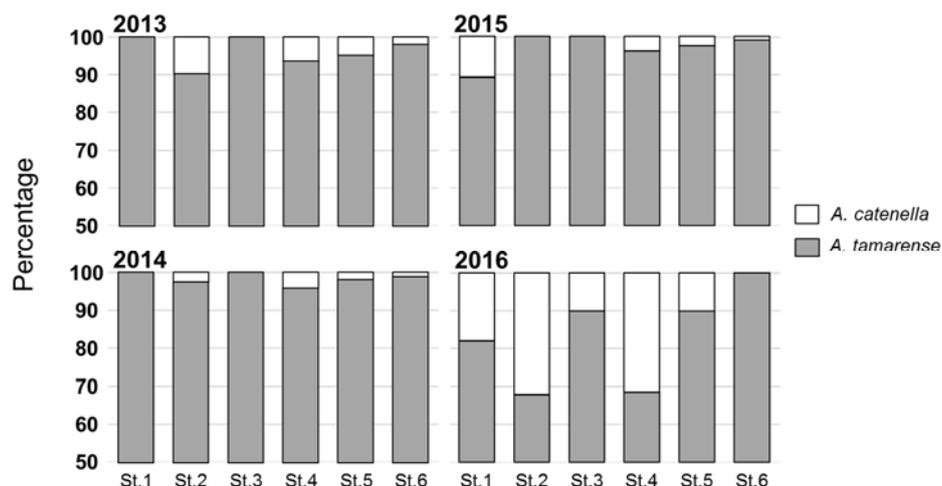


Fig. 2-38. Cyst ratio (percentage) of *A. tamarense* and *A. catenella* at each station in October from 2013 to 2016

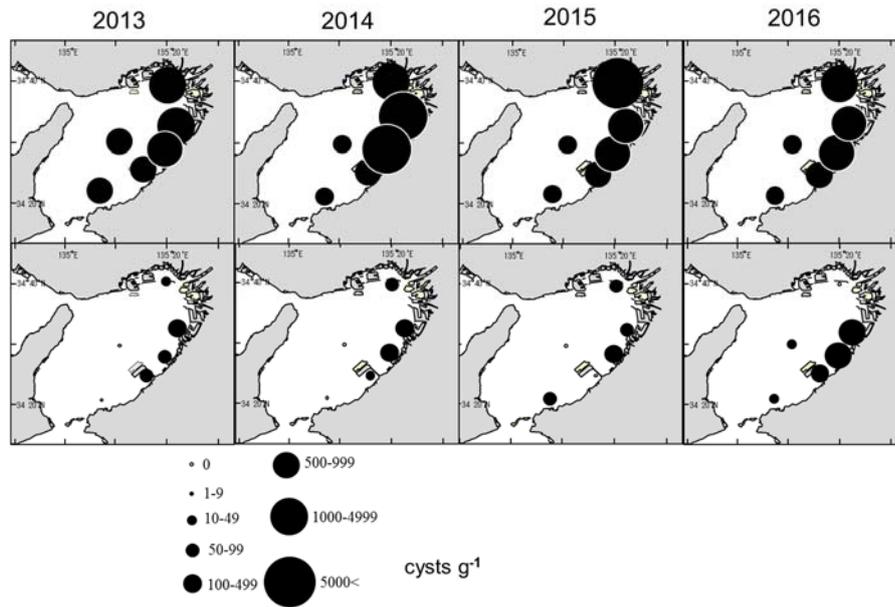


Fig. 2-39. Distribution and abundance of *A. tamarense* (upper) and *A. catenella* (lower) resting cysts in Osaka Bay in October from 2013 to 2016.

考察

大阪湾における *Alexandrium* シストの分布特性

山口ら (1995) が広島湾で行ったシスト調査の報告では、*Alexandrium* シストの高分布密度域は遊泳細胞が高密度で確認された海域と一致する傾向があるとしており、他の海域においても同様の傾向があったことが報告されている (竹内ら, 1990; 尊田ら, 2006)。大阪湾における 2006 年調査では大阪湾の東部海域に偏在し、2007 年以降のシスト分布では東部海域でも関空以北の沿岸域で高密度の分布域がみられた点で共通していた。この海域は各年のプランクトン調査でも遊泳細胞が多く確認された海域であり、遊泳細胞の出現においても主出現域の一つであるといえる。最高細胞密度とシスト密度の関係でも概ね正の傾向であったが、5 月の結果では相関関係が確認されなかった。5 月は *A. tamarense* ブルーム直後の時期であり、短期スケールで栄養細胞の細胞密度がシスト密度に反映されることが推測されたが、10 月よりも低い関係性となった。シストの形成時期については、福代 (1997) は *A. tamarense* は栄養細胞が盛んに増殖している時期に遊泳接合子が形成され、しかもその形成された遊泳接合子のうちでも初期に形成されたものだけがシストになると報告している。一方、現場海域で個体群が盛んに増殖している時期にシストの形成はほとんどなく、増殖のピークから減少期に集中して形成されるという報告もある (Ichimi et al., 2001)。後者であれば、最高細胞密度が確認されるのは個体群が盛んに増殖している時期でありシスト形成時期と異なると推測されるため、栄養細胞の出現と 5 月のシスト密度との関係性が低くなった一因となった可能性がある。加えて Ichimi et al. (2001) ではシストが形成された水温が 7.5-9°C と低く、シストの形成要因が海域により異なる可能性もあるこ

とから、大阪湾東部海域におけるシストの形成機構については更なる検討が必要であろう。

シストの分布に影響を及ぼすもう一つの要因としては流動が考えられる。シストは運動性がないため、海底泥と同じく流れの影響を受け、停滞性の高い水域に高密度域が形成される (Tyler et al., 1982)。山口ら (1995) は、シストの高密度分布域が、プランクトンが高密度で確認された海域と一致するという特徴とともに、泥分率の高いところでシスト密度が高い傾向があることを示している。同様の結果は宇和海沿岸や三河湾、伊勢湾における調査でも見られている (小谷ら, 1998; 山下・小泉, 2001; 石川ら, 2007)。大阪湾における底質の分布は、城 (1986)によると神戸港を通る南北線の東側の海域が泥分率 95%以上で、大阪湾で卓越する恒流 (藤原ら, 1989) に沿って湾西部の中央海域が泥分率 90%以上の泥質海域となっている。全域調査を行った 2006 年のシスト高密度分布域は概ねこの泥分率の高い海域と一致していた。大阪湾では 1993 年にも Yamaguchi et al. (1996)によりシスト調査が行われている。その分布状況を見ると、東部沿岸で密度が高く、海峡部で低いという傾向で 2006 年の分布傾向と酷似しており、1993 年のシスト分布や 2006 年調査のシスト分布は、大阪湾における安定的な分布パターンとしてもとらえることができよう。

2013 年-2016 年のデータで見ると、泥分率との関係は 5 月より 10 月の方がより明瞭であった。長尾ら (2001) は広島湾において風による底泥からの巻き上げりを観測するとともに、モデルによる再現を行った結果、海面近くまで底泥が巻き上げられていることを示した。また、高杉ら (1998) は台風や冬季の季節風により底泥のシストが再懸濁された場合、風による鉛直循環流により他の水域へと輸送・拡散され、潮流の微弱な領域で再び沈降、堆積することを報告している。すなわち、5 月には遊泳細胞出現とシストの形成状況によりシストの分布傾向は一定でないが、時間の経過とともに風による海底の擾乱などにより泥分率の高い停滞域に分布が安定した可能性が推察された。その一方で、湾奥の定点 (Stn. 5) では泥分率が 100%に近いにもかかわらずシストの密度が低いことがある (Fig. 2-34, 山本ら, 2009)。2007 年においては、湾奥に流入する淀川河口内で赤潮が確認された (山本ら, 2011) もの、シストの高密度な分布が確認された Stns. 12, 19 等と比較してシストの分布密度は明らかに低かった。三河湾、伊勢湾の例でも泥分率が高いからといって必ずしも *Alexandrium* 属のシスト密度が高い値であったというわけではなかったことを示し、水柱中での栄養細胞の有性生殖によるシストの供給機構が同様に重要と考察している (石川ら, 2007)。湾奥では増殖前期にも栄養細胞も多く確認されることが多いたことから、シストが比較的少なかった理由として、シストは形成したものの流れ等の作用により沈降するまでに他海域に移動した、もしくは湾奥では栄養細胞は多いもののシストが形成されなかった、などの可能性が推測される。大阪湾奥部の流れとしては湾奥に時計回りの流れとして存在する西宮沖環流や、湾奥から東岸沿いに南下する東岸恒流帯があり (藤原ら, 1989)、淀川から流れ出た河川水は河口から南の方向に舌状に流出することが知られている。大阪湾東岸の中北部海域で高い密度のシストが観察されたことは、このような恒流の状況にも合致することから、同海域では増殖した遊泳細胞からだけでなく、湾奥海域

で形成されたシストも流され、沈降した可能性が考えられる。

港の中における栄養細胞の高密度発生域とシスト分布の差異

2007年春期は大阪湾で過去最大規模に *A. tamarense* が増殖し、本種ではまれであるとされる赤潮の形成も確認された(山本ら, 2009a)。今回調査を行った2漁港はともに赤潮が確認された漁港である。これらの漁港におけるシストの出現状況は、田尻漁港では海域の密度よりも一桁高く、堺出島漁港では逆に海域の密度よりも一桁低かった。一方遊泳細胞では、両漁港ともに 10^4 cells mL⁻¹ の密度で赤潮が確認されていた。海域の定点における細胞密度は最高 10^2 cells mL⁻¹ のオーダーであり(山本ら, 2009a)、漁港内では周辺海域に比べ2-3桁高い密度の遊泳細胞が確認されていたことがわかる。遊泳細胞の出現状況とシストの分布状況が異なる理由については先にも考察したが、港の中においても港内からの流出と、水柱中での栄養細胞の有性生殖によるシストの供給機構が問題になると思われる。堺出島漁港は大阪湾堺泉北港の最奥部に位置しており、夏期には貧酸素化するなど海水交換の悪い港として知られ、田尻漁港より量的に多くシストが流出したとは考えにくい。堺出島漁港においては、増殖後期に降雨とともに急速に消滅したことが観察されており(山本ら, 2009a)、シストの形成が順調に進行しなかった可能性があることから、セディメントトラップなどの調査により漁港ごとのシスト形成過程を明らかにする必要があるだろう。

赤潮研究において、種場や初期発生域と初期個体群の出現域を究明することは極めて重要な課題と考えられ、シストの分布や量的変動の調査は、それらを明らかにするアプローチの一つとして各地で行われてきた(今井, 2012)。竹内(1994)は田辺湾における *A. catenella* の一連の研究の中で、シストの分布密度が高かった東部海域の内ノ浦で停滞域を形成しやすいこと、栄養細胞も高密度に出現することなどから、*A. catenella* の種場かつ増殖域と推定した。大阪湾においてはこのような小湾は存在しないが、沿岸部では大規模な埋め立てや人工島建設等により、閉鎖性水域の中に流動が低下したさらなる閉鎖水域が形成されている。今回調査を行った堺出島漁港はその典型的な水域と考えられ、*A. tamarense* 以外にも恒常的に赤潮が発生しているような状況が見られている。三重県五ヶ所湾での渦鞭毛藻 *Karenia (Gymnodinium) mikimotoi* の増殖においては、初期出現が見られる海域は海水交換が他の場所に比較して顕著に低く、その理由として湾外への流出による細胞の損出が少なく、より早く所定の細胞密度に到達するためと考察している(Uchida et al., 1998)。田尻漁港に比べ、より閉鎖性の高い堺出島漁港でシストの密度が低かった原因は不明であるが、高いシスト密度が確認されたこと、2007年に赤潮の発生が確認された海域が概ねこのような港湾域であったことを考えると、増殖に適した水域であり、今後これらの水域が大阪湾における種場や初期発生域として機能する可能性は高いと推察される。

ブルーム非発生期間におけるシスト密度の減少及び分布変動要因

2007年調査では5月および10月の2回定点調査を行った結果、すべての定点で5月に

比べ、10月のシスト密度が低下している状況が観察された。さらに、2013年以降の結果からも平均密度は5月から10月にかけて減少していることが確認された。他海域におけるシスト密度の経時変化を調査した例を見ると、広島湾では特に顕著な季節変動は認められないが3-4月にシスト密度の値が低下し、極小値を示していた(板倉・山口, 1999)。また、三河湾では水温下降期の12-1月と上昇期の3-4月にシスト密度の増減が観察されている(尊田ら, 2006)。これらは、その時期から発芽により影響を受けているものと考察されているが、今回の減少は10月までのものであり時期的には異なっている。前述の2海域の例では同時に天然海域から採集された *A. tamarense* シストの発芽率の季節変動を調査しており、両海域とも11月までの発芽率は極めて低い点で共通している。*A. tamarense* は内因性休眠期をもつため一度シストを形成すると発芽能を獲得するのに現場水温で約半年かかる(Anderson et al., 1987; 板倉・山口, 2001)。2007年の大阪湾における増殖のピークは4月下旬から5月上旬であり(山本ら, 2009a)、消滅期が5月中旬までと推測される。すなわち、シスト調査が行われた10月においては内因性休眠期間内であったと推定される。また、*A. tamarense* は約15℃以下の水温で比較的高い発芽率を示す一方で、15℃以上の水温ではほとんど発芽しない(板倉・山口, 1999)。大阪湾の日別平均水温データでは底層で水温が15℃を下回るのは12月以降である(中嶋, 1994)ことから、この時期までの発芽によるシストの減少は少ないと考えられる。前述の通り、5月以降、調査が行われた10月までの間には台風等の風による輸送・拡散があったと考えられる。さらに、大阪湾でシストが多く確認された海域は、ほぼ周年底曳き網などの漁業が盛んに行われている海域でもある(辻野, 2002)。これらのことから、5月から10月のシスト密度の減少は発芽によるものではなく、海域の擾乱で巻き上げられたものが発散したことや漁業による耕耘作用等で海底泥が鉛直的に希釈されたものと推察される。また、泉大津市前の Stn. 12 で周辺に比べ減少率が低かったのも、発散する一方で、流れによる湾奥からの補給もあったためと推測される。

大阪湾における *Alexandrium* シスト密度の経年変化

Yamaguchi et al. (1996) による1993年のシスト調査では、 $0.5-58 \text{ cysts cm}^{-3}$ と同時に行われた播磨灘の値 ($2-869 \text{ cysts cm}^{-3}$) と比べても低い値であった。本調査により、大阪湾の2006年のシスト密度は1993年の密度と比較して最大値で約2倍であったことが確認された。さらに2007年においては2006年と比べても共通するすべての定点でシスト密度がさらに大きく増加していた。ここで1993-2006年の増加要因について考察するため、Fig. 2-40に2002年以降の *A. tamarense* および *A. catenella* 遊泳細胞の年別出現状況を示した。

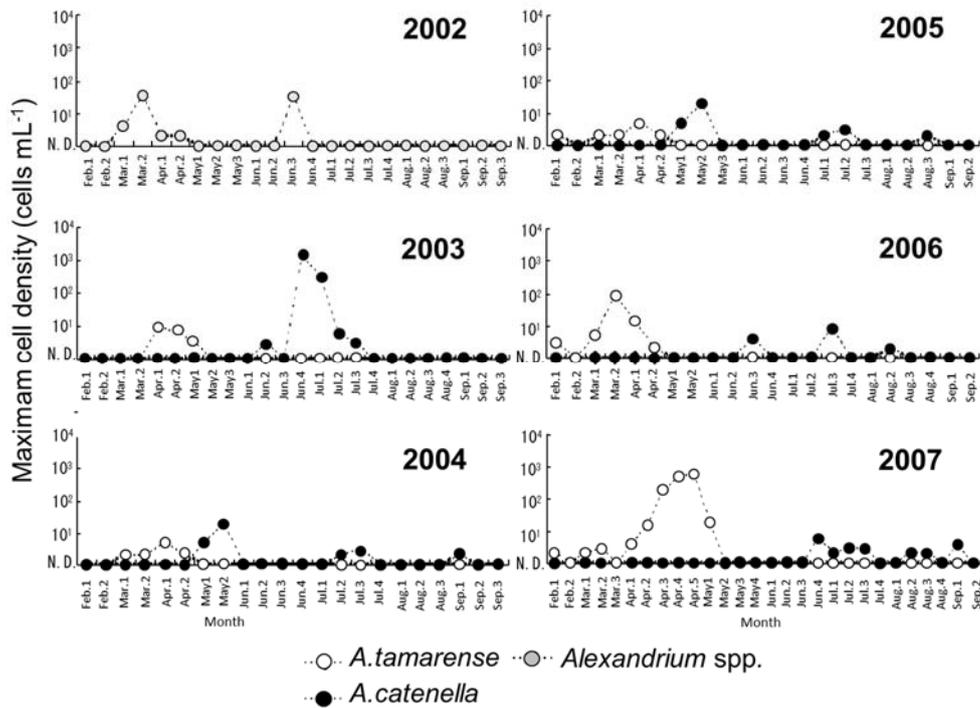


Fig. 2-40. Temporal changes in maximum cell densities (cells mL⁻¹) of *A. tamarense* and *A. catenella* (specifically *Alexandrium* spp. in 2002) in the surface waters at 20 or 14 stations from 2002 to 2007.

大阪湾では2002年に同海域で初となる規制値を超える貝毒が確認されており、このとき、*A. tamarense* が 37 cells mL⁻¹ まで増殖したことが報告されている（山本，2004）。また，2003年には *A. catenella* の赤潮が最大 1,290 cells mL⁻¹ の密度で発生し，2004年5月に行った採泥調査では，赤潮が確認された1定点（Fig. 2-28A: Stn. 12）のみの結果ではあるが，753 cysts g⁻¹ wet sediment のシストが確認されている（山口未発表）。2004年，2005年は両種とも小規模な発生にとどまり，*A. tamarense* がともに最大 4 cells mL⁻¹，*A. catenella* がそれぞれ最大 17，13 cells mL⁻¹ であった。さらに今回報告したとおり 2006年春期は *A. tamarense* が 83 cells mL⁻¹ まで増殖した一方で *A. catenella* の増殖は 8 cells mL⁻¹ に留まった。なお，2002年以前の出現については散発的に確認された模様であるがほとんど記録には残っておらず，大規模なものではなかったと推測される。このように，シストの調査が行われなかった期間も *A. tamarense*，*A. catenella* の出現は確認されている。表層泥では物理的攪乱等により鉛直的に混合されていると考えられることから2006年の調査で確認された *Alexandrium* シストはこれらの履歴を反映しているものと推察される。ただし，大阪湾の堆積速度は 0.24-1.2 cm year⁻¹ と見積もられている（城，1986）。本調査では表層 1 cm までの試料を用いたことから，2006年に新たに形成された *A. tamarense* のシストを最も反映しているものとしてよいだろう。また，2007年は *A. tamarense* の増殖は過去最大規模の大きいものであった一方で，

A. catenella の増殖は最大 5 cells mL^{-1} と小規模であったことから、増加したシストの多くが同年に形成された *A. tamarensis* のシストであることが推察される。広島湾では 1992 年に *A. tamarensis* によるカキの麻痺性貝毒が初めて問題 (Asakawa et al., 1993) となって以降、ほぼ毎年のように春期に本種による麻痺性貝毒が問題となっていた。1993 年に行われた調査では *Alexandrium* 属のシストが $10^3 \text{ cysts cm}^{-3}$ を超える密度となった点も認められており、1987 年に行われた調査と比べて 6 年間で約 30 倍のシスト密度が増加したことが報告されている (山口ら, 1995)。この増加についてはサンプルの計数方法の違いにより過大評価の可能性も指摘されているが、今回比較した結果はすべて primuline による蛍光染色法を用いた計数によるものであり、大阪湾での *Alexandrium* シストが近年増加しているという解釈は妥当なものと思われる。また、三河湾、伊勢湾においても同様に $10^3 \text{ cysts cm}^{-3}$ を超える密度と、過去の調査に比べ最大 10 倍以上の増加が確認されており (石川ら, 2007)。このように近年、西日本を中心とする麻痺性貝毒の広域化が問題になっている (Imai et al., 2006) のに比例してシストの増加傾向も各地で顕著になってきていると考えられる。2006 年から 2007 年の大阪湾の結果はこれらの海域に匹敵する増加率であり 2007 年以降も継続して高密度で確認されていることから、大阪湾における麻痺性貝毒の発生リスクは高レベルで維持されていることが明らかにされた。

以上のように大阪湾では 2002 年-2006 年の *A. tamarensis* および *A. catenella* の増殖、および 2007 年の *A. tamarensis* による赤潮形成により、大阪湾のシスト密度は急激に増加したことが明らかになった。さらにその後もほぼ毎年 10 cells mL^{-1} 以上の *A. tamarensis* 増殖が確認されており、本種の出現に応じてシスト密度の増減はあるものの、恒常的に高密度で分布していることが明らかになった。*A. tamarensis* のシストは海底泥中で長期間生存可能で、寿命は 2-10 年とされており (Keafer et al., 1992)、100 年前のシストが発芽したという報告もある (Miyazono et al., 2012)。これらのことから、今後も *A. tamarensis* の動向に注視しモニタリングを行う必要があるだろう。広島湾の研究においては底泥中のシストがすべて発芽し、放出されても現場で確認される遊泳細胞の密度より 1-2 桁低く、ブルームの形成には栄養細胞の増殖が重要と考察されており (樽谷, 1999)、シストの存在量が直ちに次の年の発生量に結びつくわけではない。本研究においても、10 月のシスト密度と翌年の栄養細胞の増殖規模の間には関係性は確認されなかった。しかし、本研究により大阪湾におけるシストの分布傾向は比較的安定して東部海域で高く、また栄養細胞の出現傾向とも概ね一致していたことが明らかになった。このことから、麻痺性貝毒発生リスクは東部海域でより高いことが推察され、麻痺性貝毒原因プランクトンのモニタリングに際してはこれらの海域を重点的に調査することで、効率的に麻痺性貝毒の発生に備えることが可能になると考えられる。

Alexandrium シストの種別出現状況

Alexandrium tamarensis と同属の *A. catenella* は出現期間に若干のずれがあるものの同所的

に発生することが多く、両種が混在して発生する海域では、種別の発生リスクを評価するためにも種別シストの出現状況を把握する必要がある。しかしながら既述の通り *A. tamarense* と *A. catenella* のシストは形態的に区別できないため、これまで行われた多くの研究事例では *A. tamarense* と *A. catenella* を併せ、*Alexandrium* 属シストとして扱われてきた（山口ら, 1995 ; Yamaguchi et al., 2002 ; 石川ら, 2015 など）。しかし、近年長井ら (2011) により両者を遺伝的に識別する方法が開発されたことから、両者を種別に扱った現場での研究事例も報告され始めている（坂見ら, 2017）。本研究ではこの手法を用いることにより、大阪湾で出現する *Alexandrium* シストの大部分が *A. tamarense* であることが明らかになった。その一方で、2016 年には *A. catenella* シストの割合が大きく増加したことが確認された。*A. catenella* は、大阪湾では 2003 年に約 $1,300 \text{ cells mL}^{-1}$ で赤潮になった後は、最大でも 30 cells mL^{-1} の低いレベルで推移していた（Fig. 2-41）。Itakura and Yamaguchi (2001) は *A. tamarense* と *A. catenella* シストの発芽特性を比較し、前者が数ヶ月から 6 ヶ月程度と比較的長い内因性休眠期間を経て発芽可能になるのに対し、後者は 1 週間程度の短い期間で発芽可能になることを示した。一般的に西日本沿岸では *A. tamarense* が低水温期の一時期に発生するのに対し、*A. catenella* では春季から秋季を中心に冬季も含んだ広い期間において発生が確認されている（板倉, 2006）。また、Ishikawa et al. (2014) は PETchamber（Ishikawa et al., 2007）を用いて現場における *A. catenella* 発芽の経時変化を調査した結果、周年シストからの発芽を確認している。大阪湾においては *A. catenella* は 2003 年に赤潮として確認された以降は、大規模な増殖には至っていない。すなわち、2003 年には *A. catenella* において高い密度でシストが形成された可能性はあるが、継続的に生じる発芽による減少を補うほどの増殖がなかったため *A. catenella* のシスト密度は低いレベルに収束したと推測される。2016 年においては *A. tamarense* のブルーム終息後、*A. catenella* が最大 $285 \text{ cells mL}^{-1}$ の赤潮レベルまで増殖した（Fig. 2-42）。このことが 2016 年の *A. catenella* シスト割合の増加に影響したと考えられた。さらに 2016 年における両種栄養細胞の最大増殖時の分布とシスト分布を比較すると、両種とも栄養細胞の出現とシストの分布傾向は共通していた（Fig. 2-43）。すなわち、種別分布からみても栄養細胞の出現とシスト分布には高い関係性を示すことが明らかとなった。

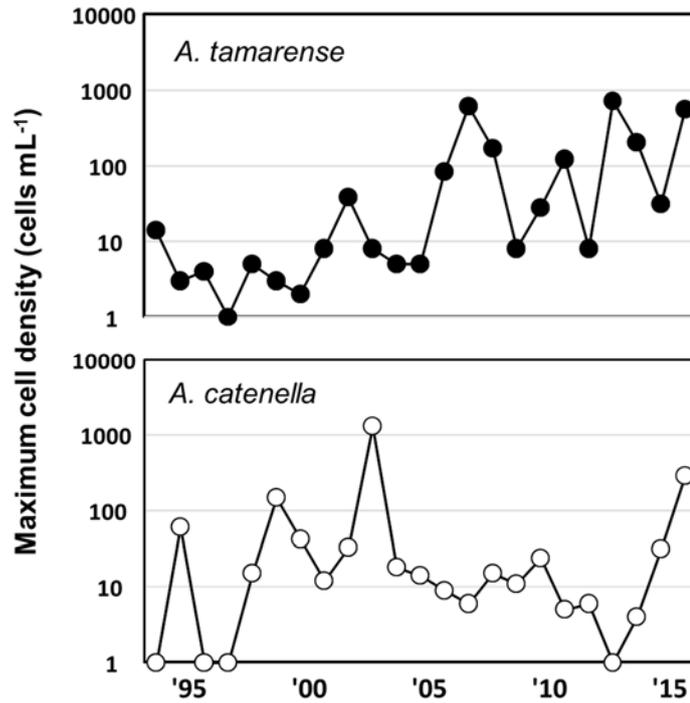


Fig. 2-41. Changes of annual maximum cell density of *A. tamarensis* (upper) and *A. catenella* (lower) in Osaka Bay from 1994 to 2016.

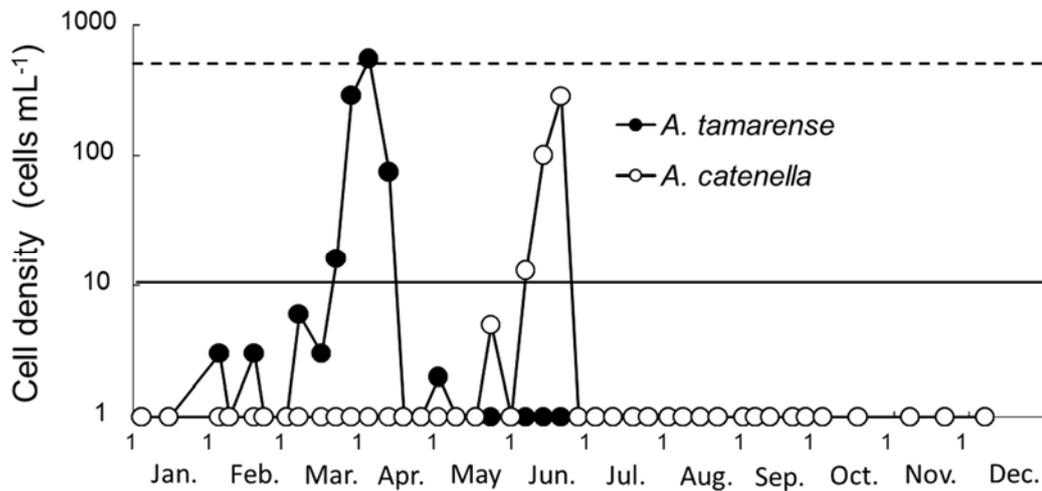


Fig. 2-42. Temporal changes in maximum cell density of *A. tamarensis* and *A. catenella* in 2016 in Osaka Bay. Horizontal line indicates alert density of *A. tamarensis* (10 cells mL⁻¹), and dotted line indicates alert density of *A. catenella* (500 cells mL⁻¹) in Osaka Bay.

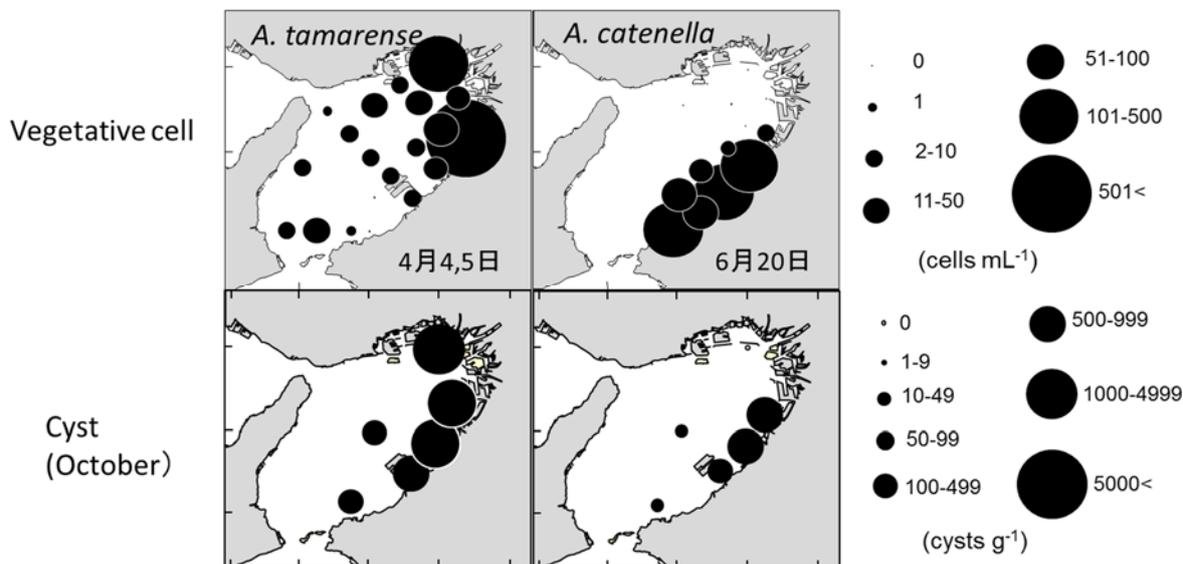


Fig. 2-43. Distribution and abundance of *Alexandrium tamarense* (left) and *A. catenella* (right) vegetative cells (upper) and resting cysts (lower) in Osaka Bay in October 2016.

第5節 赤潮の発生と魚介類の斃死 緒言

2007年春期に大阪湾東部海域の広い範囲で *Alexandrium tamarense* の大規模な増殖がみられ、沿岸の漁港では本種による赤潮が初めて観察された。この増殖と時期を同じくして、漁港内において蓄養されていた魚介類や天然のムラサキイガイで斃死が確認された。本種の魚介類に及ぼす影響については、アサリやミドリイガイ *Perna viridis* Linnaeus (Li et al., 2002), アメリカイタヤガイ *Argopecten irradians concentricus* Say (Yan et al., 2003) 等で室内実験による斃死の報告があるものの、現場海域からの報告はない。そこで本項では、本種赤潮発生機構の解明と今後の赤潮および貝毒対策に資するため、今回の赤潮の発生経過と漁業被害をとりまとめた。

材料と方法

淀川河口内において経常的にモニタリングを行っている国土交通省淀川河川事務所から、赤潮が確認された4月18日の淀川大橋 (Fig. 2-44A, Stn. I) における試水 (固定) を宅配便にて送付してもらい遊泳細胞の計数を行った。また、4月26日には大阪湾北東部に位置する堺市出島漁港 (Fig. 2-44A, Stn. II) の漁業者から赤潮情報が寄せられ、4月26, 27日および29-30日にかけて、現場海域において着色状況と漁業被害の確認、および表層水にお

ける遊泳細胞の計数を行った。淀川のサンプルと堺出島漁港のサンプルについては鏡版の観察に加え、Nagai and Itakura (2012) が開発した LAMP 法を施し、種の分子同定を行った。4月27日には、南部の田尻漁港 (Fig. 2-44A, Stn. III) において赤潮発生と被害の通報があり、翌4月28日に、堺出島漁港と同様の対応を行った。その後5月2日に大阪湾東部沿岸の漁港を巡回して、海水の着色状況と被害の確認を再度行い、5月3日以降も随時聞き取り調査を実施した。

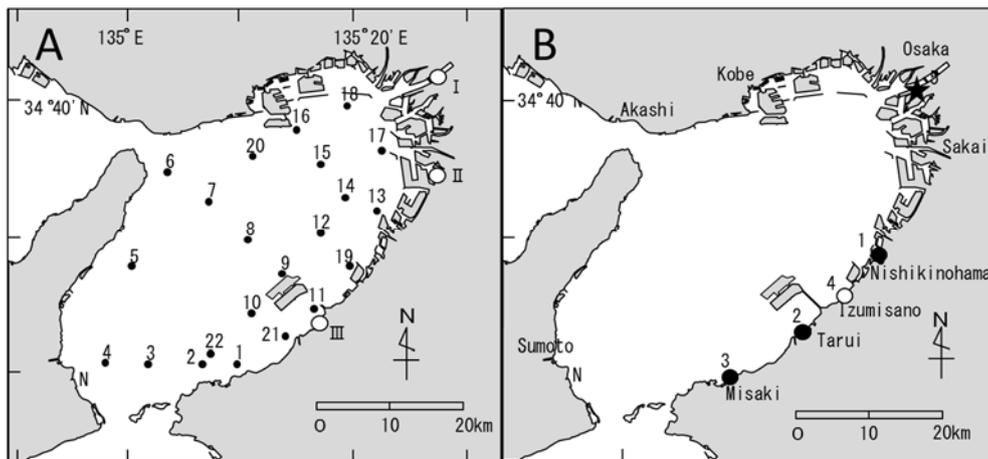


Fig. 2-44. Location of the sampling stations and observation sites in Osaka Bay. A: stations observed by research vessel (closed circles) and observation sites along the coast (open circles). B: sampling sites of bivalves; Manila clam (closed circles), Arc Shell and Japanese Cockle (open circle), Brackish water clam (star) (modified from Yamamoto et al., 2009a)

結果

Alexandrium tamarense による赤潮の発生状況

Alexandrium tamarense 赤潮が確認された地点と日付、もしくは聞き取りによる推定発生日を Fig. 2-45 に示した。赤潮が確認されたのは、淀川河口内 (a), 堺出島漁港内 (b), 浜寺水路 (c), 高石漁港内 (d), 泉大津から助松 (e), 岸和田漁港内 (f), 岸和田旧港 (g), 泉佐野食品コンビナート (h), 田尻漁港内 (i), 深日漁港 (j) と大阪湾東部沿岸の広い範囲におよんだ。そのうち、淀川河口内、堺出島漁港内、岸和田漁港内、田尻漁港内では採水、検鏡を行った結果、単独もしくは2細胞が連鎖した群体が活発に遊泳しており、鏡版観察においても腹孔が確認された。さらに、淀川のサンプルと堺出島漁港のサンプルについて LAMP 法を施したところ、処理を行ったほとんどで *A. tamarense* プライマーに反応したことにより、これらの海域で増殖したのは *A. tamarense* であるという結果が得られた。

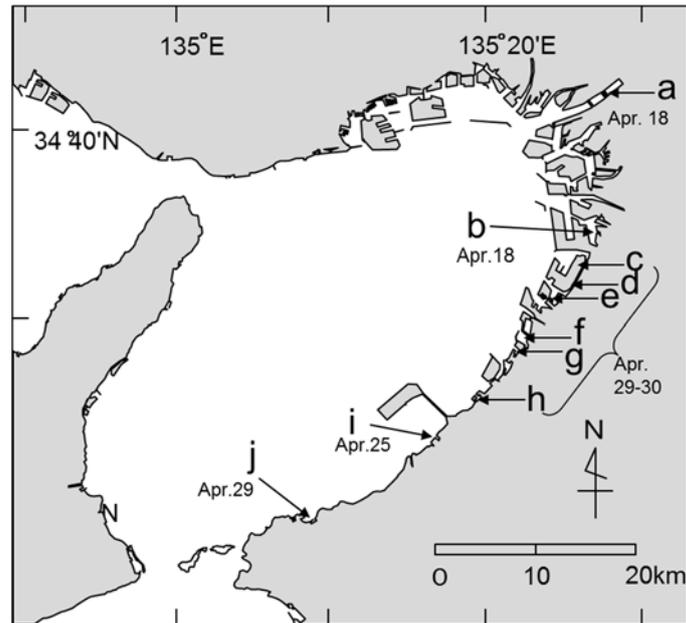


Fig. 2-45. Coastal sites with *A. tamarensis* bloom observed in 2007 and approximate dates of bloom. a: Yodo River, b: Sakai-Dejima, c: Hamadera, d: Takaishi, e: Izumiotsu to Sukematsu, f: Kishiwada Port, g: Old Kishiwada Fishing Port, h: Izumisano, i: Tajiri, j: Fuke (modified from Yamamoto et al. 2009a).



Fig. 2-46. Pictures of the red tides observed at Sakai-Dejima Fishing Port.

赤潮として初めに確認されたのは湾最奥部に位置する淀川河口内 (Fig.2-45-a) で、淀川河口域においてモニタリングを行っている国土交通省淀川河川事務所から 4 月 18 日の赤潮発生情報として報告があった。このときの細胞密度は約 $1.29 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ と過去に大阪湾で確認された中で最高値を示していた。この試水について同定と計数を行ったところ、 $1.40 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ とほぼ同様の値であった。その後の淀川河川事務所からの情報による

と、淀川内の赤潮は数日で速やかに消滅したとのことであった。

堺出島漁港 (Fig. 2-45-b, Fig. 2-46) から赤潮発生の報告があったのは 4 月 26 日であったが、4 月 27 日の堺出島漁港における聞き取り調査によると、報告の 10 日程度前から確認していたということから、発生日を淀川河口内とほぼ同時期の 4 月 18 日と推定した。この漁港は調査を行った他の漁港と同様、西方向にのみ開口する閉鎖性の高い漁港であるが、西風が吹くと赤潮が濃くなり、東風だと薄くなるとのことであった。4 月 26 日に行った観測では漁港内の細胞密度が $3.77 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ 、漁港の入り口に位置する堺 7-3 区埋立地で $4.40 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ と入り口は漁港内に比べて少なかった。続く 4 月 29 日から 30 日にかけて行った調査では $7.27 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ と期間期間中の最高値を記録した。その後、5 月 3 日頃から細胞密度は低くなり始め、7 日にはほぼ消滅した。

浜寺水路 (Fig. 2-45-c) から高石漁港 (Fig. 2-45-d)、および泉大津から助松 (Fig. 2-45-e)、岸和田旧港 (Fig. 2-45-g)、泉佐野食品コンビナート (Fig. 2-45-h) については、4 月 29-30 日の堺市出島漁港における調査へ向かう過程で赤潮の発生を確認した。さらに高石漁港については 5 月 2 日の巡回調査においても赤潮が確認された。これらの漁港においては、発生時期は不明である。

岸和田漁港 (Fig. 2-45-f) では 5 月 2 日に巡回調査を行った際に赤潮を確認した。このときの聞き取り調査では約 3 日前に着色した水が観察されたということから、4 月 29 日を発生日と推定した。5 月 2 日における表層水の検鏡では *A. tamarensis* の細胞密度は $2.93 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ であった。

田尻漁港 (Fig. 2-45-i) における 4 月 28 日の聞き取り調査では、25 日夕方から生け簀の周りが着色を始め、26-27 日にかけて着色が濃くなり、27 日朝に被害が発生したという。28 日に実施した観測の結果では、最高細胞密度は $1.43 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ であった。その後、5 月 2 日の調査時には赤潮は消滅していた。

南部の深日漁港 (Fig. 2-45-j) では 5 月 2 日の聞き取り調査において、岸和田漁港と同様 3 日前頃に赤潮であったという情報が得られたことから赤潮の発生は 4 月 29 日と推定した。

魚介類の被害状況

赤潮発生と同時同所的に、衰弱または斃死した天然魚介類の海岸部への漂着や、天然魚介類の異常行動、畜養魚介類の斃死等が確認された (Fig. 2-47)。Table 2-2 に斃死が確認された種を示した。今回斃死が確認されたのは魚類 12 種、甲殻類 2 種 (モクズガニ *Eriocheir japonicus* de Haan とイソテッポウエビ *Alpheu lobidens* de Haan)、頭足類 1 種 (マダコ *Octopus vulgaris* Cuvier)、二枚貝 1 種 (ムラサキイガイ) であった。その他、スズキ *Lateolabrax japonicus* Cuvier 稚魚や底棲性のヨコエビ類などが表層でふらふら遊泳するといった異常行動が観察された。

蓄養魚では、通常赤潮による被害を受けやすいハマチ *Seriola quinqueradiata* Temminck &

Schlegel, カンパチ *Seriola dumerili* Risso およびシマアジ *Pseudocaranx dentex* Bloch & Schneider などが比較的多く生残していた一方で、イシダイ *Oplegnathus fasciatus* Temminck & Schlegel, マダイ *Pagrus major* Temminck & Schlegel, クロダイ *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker およびマアナゴ *Conger myriaster* Brevoort などがこれらに先立って斃死する傾向が見られた。さらに、マダコで特に被害が大きく、他の魚介類で斃死がみられない場合でもマダコのみ斃死するという特徴的な現象がみられた。

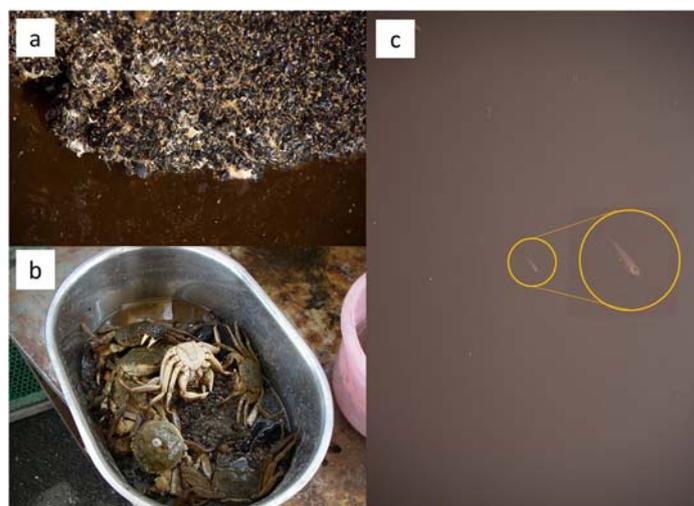


Fig. 2-47. Pictures of aquatic animals killed by the bloom of *Alexandrium tamarense* at Sakai-Dejima Fishing Port. a: Mussel, b Japanese Mitten Crab, c: Gobioid.

Table 2-2. Species list of aquatic animals killed by the bloom of *A. tamarense* in 2007 (modified from Yamamoto et al., 2009a).

Class	Scientific name	Japanese name
Osteichthyes	<i>Pagrus major</i>	Madai
	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Ishidai
	<i>Conger myriaster</i>	Maanago
	<i>Sebastes marmoratus</i>	Kasago
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Suzuki
		Suzuki (juvenile)
	<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Kurodai
	<i>Ditrema temmincki</i>	Umitanago
	<i>Seriola dumerili</i>	Kanpachi
	<i>Pseudocaranx dentex</i>	Shimaaji
	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Buri (Hamachi)
	<i>Omobranchus fasciolatoceps</i>	Tosaka-ginpo
	<i>Acanthogobius flavimanus</i>	Mahaze (juvenile)
Crustacea	<i>Eriocheir japonicus</i>	Mokuzugani
	<i>Alpheus lobidens</i>	Iso-teppouebi
Cephalopoda	<i>Octopus vulgaris</i>	Madako
Bivalvia	<i>Crassostrea gigas</i>	Magaki
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Murasakiigai
	<i>Xenostrobus securis</i>	Kouroen-kawahibari
	<i>Petricola cf. lithophaga</i>	Usukara-shiotugai

考察

Alexandrium tamarense が赤潮として確認されたのは、概ね西向きに開口する比較的閉鎖性の高い漁港内であり、定点調査がおこなわれた開けた海域では赤潮の発生は確認されなかった。赤潮発生期間においては西風が卓越していた (Fig. 2-48)。堺出島漁港では西風が吹くと赤潮が濃くなり、東風だと薄くなるとの聞き取り結果もあることなどから、開けた海域よりさらに海水交換が悪い港湾での効率のよい増殖に加え、気象による集積作用が赤潮の形成に大きく働いていたと推測される。赤潮の発生を経時的にみると、まず4月18日前後に湾奥部で赤潮が発生し、その他の地点ではそれより少し遅れて発生したことがわかる (Fig. 2-45)。赤潮が確認された地点で独立して発生した可能性も否定はできないが、大阪湾の平均流は沿岸部を南下することを考えると湾奥で発生した赤潮が4月末までに流れにより拡大し、漁港内でさらに増殖したことが推察される。さらに、赤潮の確認は東部海域の広い範囲に及んでいることから、確認できなかった他の漁港においても赤潮が出現していた可能性は高いと思われる。

今回、*A. tamarense* の赤潮発生時に魚介類の斃死が初めて確認された。これまで魚介類に対し多くの被害を与えてきた *Chattonella antiqua* (Hada) Ono, *Chattonella marina* (Subrahmanyam) Y. Hara & Chihara および *Karenia mikimotoi* Miyake & Kominami などではハマチ、カンパチ等の浮魚に斃死被害が集中していたのと異なり、通常赤潮に強いイシダイ、マダイおよびクロダイなどが斃死した一方で、弱いとされるシマアジが比較的多く生残していたことが本種による被害の特徴として挙げられる。また、マダコで特に被害が大きく、他の魚介類で斃死がみられない場合でもマダコのみ斃死するといった現象が認められた。*A. tamarense* は赤潮を形成すること自体がまれであるため、魚介類に被害を与えた事例に関する知見は見あたらない。しかし、同属の *Alexandrium catenella* は宮崎県でハマチとタイを斃死させた例がある他 (Ogata and Kodama, 1986), エゾアワビ *Haliotis (Nordotis) discus hannai* Ino の行動に影響を与え (仁木ら, 2001), 貝類を斃死させることが知られている (松山, 私信)。また、近年チリのフィヨルドにおいて養殖のサケを大量斃死させたとの報告もある (Craza, 2016)。赤潮が魚介類を斃死させる原因としては *Chattonella* 属などのように直接ダメージを与えるものの他、*Gonyaulax polygramma* Stain のように夜間に酸素を消費し、貧酸素により魚類を斃死させるものがある。今回、被害が確認された堺出島漁港と岸和田漁港においては、畜養魚には十分エアレーションを施しており、4月29日から30日にかけて堺出島漁港で行った昼夜観測においても夜間、酸素が十分にあったことが確認されていることから (山本未発表), 貧酸素による斃死の可能性はないと考えられた。本種による魚介類の斃死機構の解明については大きな課題であり、今後養殖魚類などへの被害対策についても検討する必要がある。

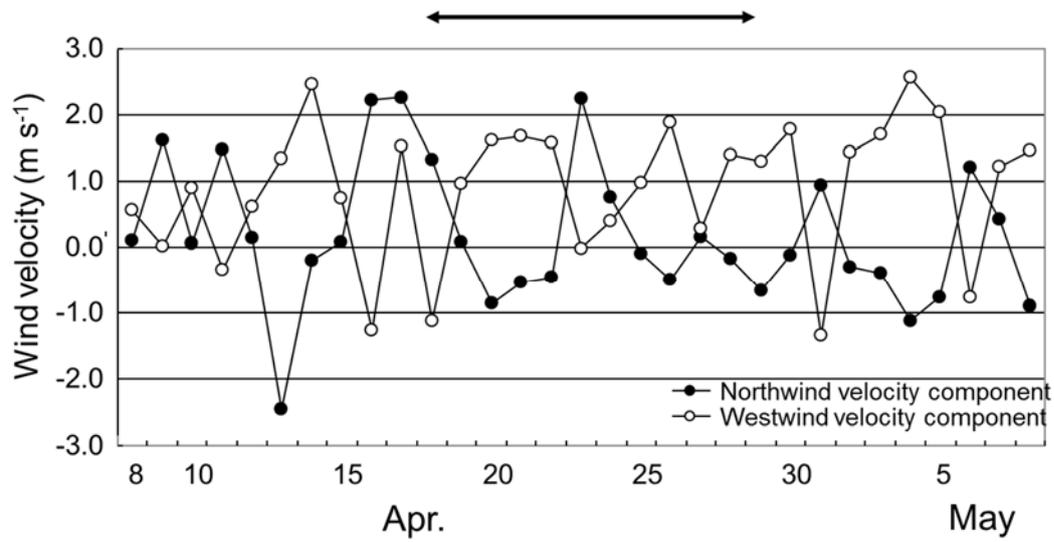


Fig. 2-48. Fluctuations of wind velocity components in Osaka City from April 8 to May 8 in 2007. Horizontal arrows at the top show the growth period of *A. tamarensis* (modified from Yamamoto et al., 2009a).

第3章 淀川感潮域における *Alexandrium tamarense* の発生

第2章において、大阪湾における *Alexandrium tamarense* の増殖が湾奥と関西国際空港北部の沿岸域で主に確認されることを示した。2007年春季は海域での増殖に加え、大阪湾奥に流入する淀川の感潮域でも赤潮状態にまで増殖した（山本ら，2010；山本ら，2011）。淀川下流の感潮域では、近年ヤマトシジミが安定して漁獲されており、地元漁協においても特産物としてブランド化を目指している。しかし、2007年の本種による赤潮発生時には、淀川感潮域のヤマトシジミにおいても規制値を大きく上回る麻痺性貝毒の蓄積が確認された（山本ら，2010）。さらに、その後の風評により地元漁協での取扱量が大きく減少しており（大美私信），同水域における麻痺性貝毒の発生が漁業に与える影響は小さくない。

本章では、大阪湾における初期発生域の一つであることが示唆される淀川感潮域での本種の増殖機構を明らかにし、大規模増殖を防ぐための方策について検討した。

第1節 感潮域における *Alexandrium tamarense* の増殖と環境要因

緒言

2007年春季に、大阪湾で初めて *Alexandrium tamarense* による赤潮の発生が確認された。同じ年に淀川感潮域においても本種赤潮が確認され、同水域で漁獲されるヤマトシジミが麻痺性貝毒により規制値を上回って毒化した（山本ら，2009a）。本項では、2007年春季に赤潮発生した翌年の2008年、2009年に淀川感潮域において *A. tamarense* 栄養細胞の出現状況、および環境項目の調査を行うとともに、2009年はELISA法による麻痺性貝毒のモニタリングを実施した結果、淀川感潮域における *A. tamarense* の出現時の環境要因、原因プランクトンの増殖とヤマトシジミの毒化の推移について得た知見を報告する。

材料と方法

プランクトン調査

調査は2008年3月-5月、および2009年2月-5月に行った。淀川感潮域の4定点および沿岸部の1定点において週1回の頻度で *A. tamarense* 栄養細胞のサンプリングを行うとともに環境項目を測定した。Stn. 1から4は河川に沿って、それぞれ水深4, 4, 2.5, 3 mの定点であり、沿岸部の定点（Stn. A）の水深は約10 mであった（Fig. 3-1）。*A. tamarense* 栄養細胞のサンプリングと環境項目の測定は、淀川感潮域では、河口堰（淀川大堰）下流の4つの橋（下流からそれぞれ伝法大橋、淀川大橋、十三大橋、長柄橋）から、沿岸部の定点では調査船「おおさか」から収集した。各定点において表層試料（-0.3m）をバケツまたは1Lの北原式採水器で、底層（底面から約0.5 mまで）から1Lの北原式採水器を用いて採水した。表層と底層の水温は、現場において棒状温度計で測定し、塩分については研究室に持ち帰り塩分計（Digi-auto Model 3-G、鶴見精機）で測定した。試水300-750 mL中の *A. tamarense* 栄養細胞を、目合い20 μm のプランクトンネットで10 mLまで濃縮した後直ちに固定し、濃縮物1 mL中の細胞数を顕微鏡下で計数した。試料の一部は calcofluor white

M2R による蛍光染色を用いて *A. tamarense* 栄養細胞の鎧板を染色し、頂孔板 (apical pore plate) の形態および腹腔 (ventral pore) の存在の有無で種を判定した (吉田, 2000)。2008 年調査では、上記の項目に加え、栄養塩濃度と *A. tamarense* 以外の植物プランクトンの細胞密度も測定した。試料を GF/C フィルターでろ過し、栄養塩 ($\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{SiO}_2\text{-Si}$) を、オートアナライザー (swAAat, BLTEC) を用いて分析した。他の植物プランクトン種についても、10%グルタルアルデヒドで固定し、濃縮されていない表層水 1mL を用いて顕微鏡下で計数した。毎日の降水量データは気象庁 (<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>) から入手した。河口堰からの流出量データおよび地形データは、国土交通省から得られたものである。平均流速は流出データと調査地域の中央に位置している Stn. 2 での断面積 ($1,186 \text{ m}^2$) から計算した。

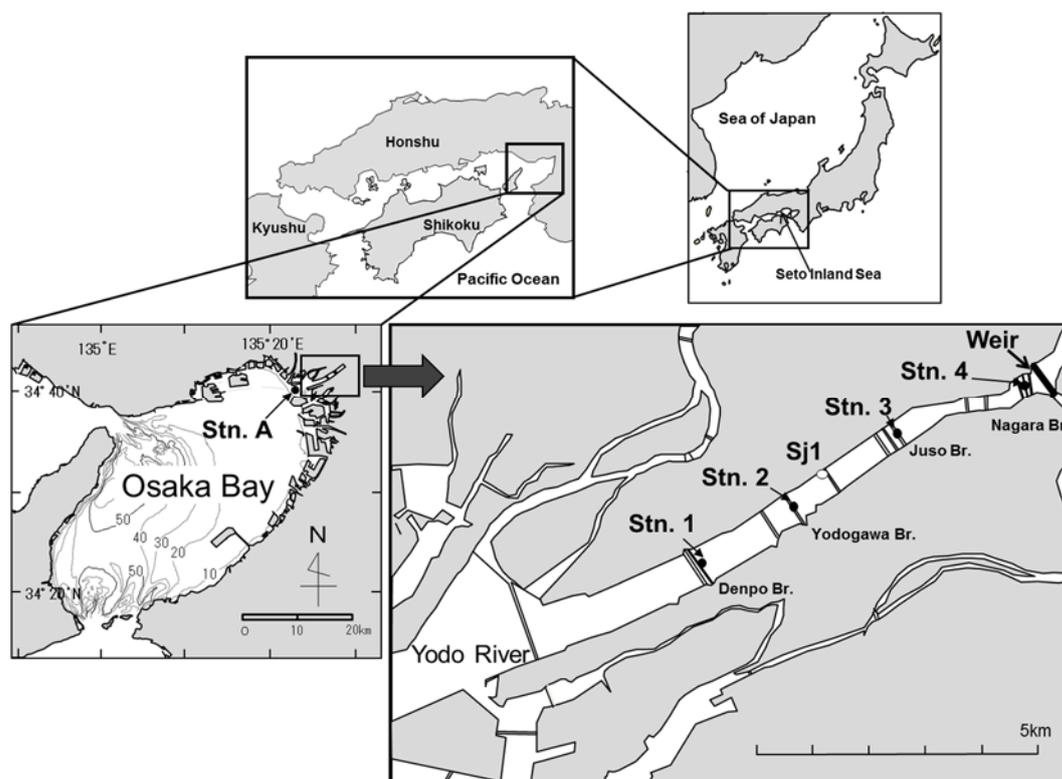


Fig. 3-1. Location of the sampling stations of water (Stns 1 to 4, Stn A) and the Brackish water clam (Stn. Sj1). Inset map shows the location in Osaka Bay at the eastern end of the Seto Inland Sea (modified from Yamamoto et al., 2013).

マウス試験および ELISA 法による麻痺性貝毒の分析

2009 年 3 月 30 日から 5 月 19 日まで、河口と河口堰の間に位置する Stn Sj1 で、麻痺性貝毒 (Paralytic Shellfish Poison: PSP) 分析のため、ヤマトシジミを毎週収集した (Fig. 3-1)。マウスバイオアッセイ AOAC 抽出手順 (Horwits, 2000) に従って、0.1 M HCl 中で軟体部

ホモジネートを抽出し、pHを2.5-4.0に調整した後、5分間煮沸し、3,000gで10分間遠心分離した。抽出物の一部をマウス試験に使用し、得られた上清をさらに15,000rpmで5分間遠心分離した上清を、ELISA（酵素免疫測定法）法に供した。本研究で用いたPSP-ELISA法は、大阪府立公衆衛生研究所（Kawatsu et al., 2002）によって開発された。GTX抗体で標識されたReacti-Bind Streptavidin コーティングプレートをTween-PBSで洗浄し、Tween-PBSで2%に希釈した50 μ Lの標準溶液または前述の二枚貝抽出液を各ウェルに添加した。PSP標準液は、(財)日本食品分析センター（東京、日本）から入手した。次いで、酵素標識dcSTX溶液50 μ Lを加え、ビオチン標識GT-13抗体50 μ Lを添加した。各ウェルを混合し、室温で30分間インキュベートした。その後、プレートを再びTween-PBSで洗浄し、100 μ Lのペルオキシダーゼ発色基質を各ウェルに添加し、アルミニウムホイルで覆って遮光し、室温で10分間インキュベートした。次に、硫酸溶液（50 μ L, 2M）を加えて反応を停止させた。各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダー（GE Healthcare UK Ltd.）により450 nmで測定し、PSP濃度を算出した。6標準濃度（0-1,440 nM）を用いて検量線を作成した。校正曲線の作業範囲は、通常軟体部1gあたり0-1,000 nmol GTXの範囲であり、毒素濃度を計算するために使用した。

結果

Alexandrium.tamarense 細胞密度と環境要因

2008年および2009年の日降水量、河口堰からの放水量、Stn. 3における*A. tamarense*の細胞密度の推移をFig. 3-2に示した。降水量は、2008年は2009年より多く、特に4月および5月に多かった。河口堰からの放水量および断面流速は、概ね降水量と正の相関があった。2008年3月上旬には、降水量が非常に少ないために河口堰からの放水量が少なかったが、3月下旬と4月の大部分では概ね放水量は多い傾向であった。対照的に、2009年は3月下旬から4月下旬にかけて、降水量と放水量は非常に少なかった。堰からの放水量が少なかった2008年3月上旬から中旬および2009年4月上旬から5月上旬にかけて、Stn. 3の栄養細胞の細胞密度は高かった。3月、4月、5月の堰からの平均放水量は、2008年にはそれぞれ131, 212, 148 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ 、2009年に156, 20, 53 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ であり、2009年の4月と5月の放水量は2008年よりも少なかった。Stn 2の断面平均流速は、2008年は3月、4月、5月にそれぞれ11, 18, 12 cm s^{-1} であり、2009年は13, 1.7, 4.5 cm s^{-1} であった。2008年3月上旬、2009年4月上旬には、堰からの放水がほとんどなかったため、断面流速は0.3, 0.6 cm s^{-1} であった（Fig. 3-3）。

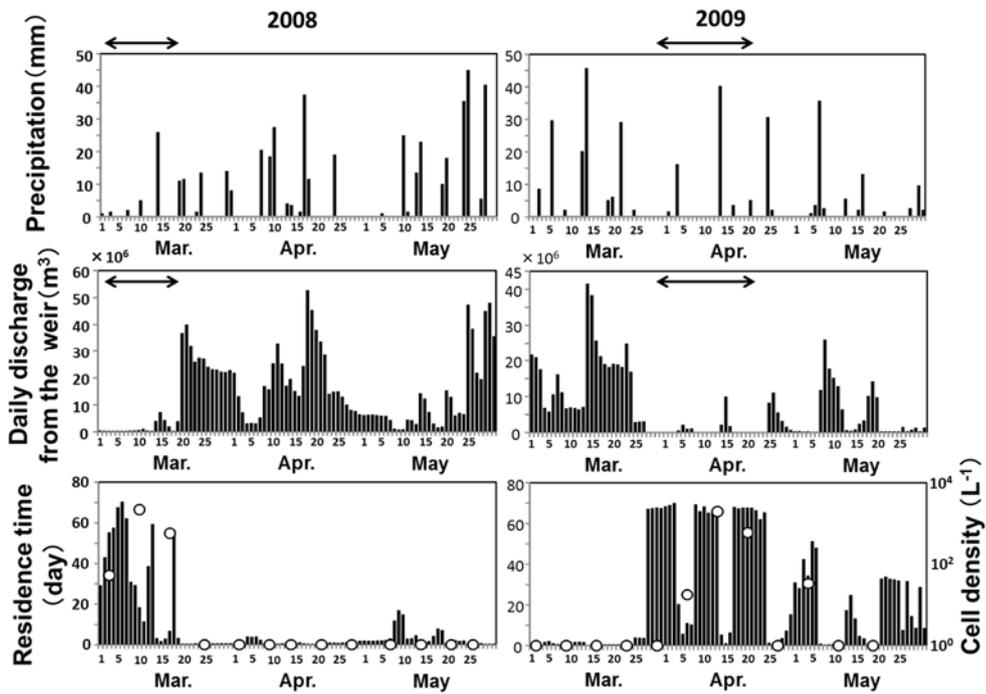


Fig. 3-2. Temporal changes in daily precipitation (mm) (upper), daily outflow rate from the weir (10^6 m^3) and *A. tamarensis* cell densities (cells L^{-1}) (open circle) at Stn. 3 (lower) in 2008 and 2009. Horizontal arrows at the top show the growth period of *A. tamarensis* (modified from Yamamoto et al., 2013).

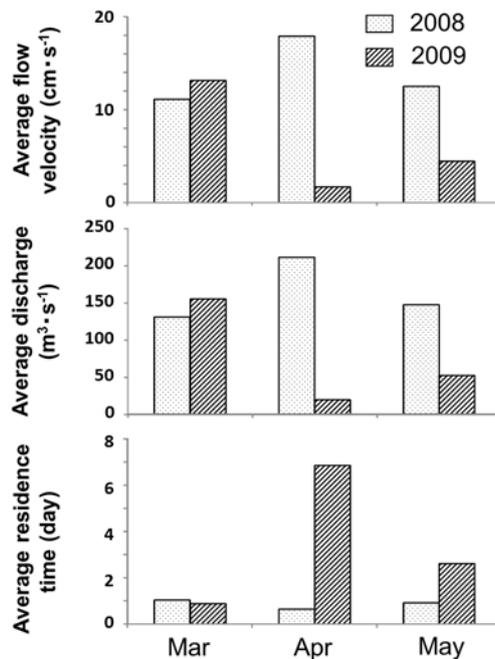


Fig. 3-3. Differences in average flow velocity (cm s^{-1}) (upper), average discharge flow ($\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$) from the weir (middle), average residence time (day) between 2008 and 2009.

2008年と2009年の各定点の表層における水温と塩分の経時変化を Fig. 3-4 に示した。2008年の水温は、河口堰からの放水が少なかったことから、3月上旬から中旬に急速に上昇し、放水量が増加する4月上旬まで約13℃で停滞した。その後、4月中旬から5月中旬にかけて20℃まで徐々に上昇した。2008年と対照的に2009年の3月の水温は、放水量が多かったことから2008年より低かったが、4月中旬には19℃に上昇した。塩分は放水量と逆相関の関係を示し、0から25まで大きく変動した。河川内の環境条件は、放水量が極めて少ない期間において、河口と同様の環境になった。2008年には、3月上旬から3月中旬にかけて、放水量が少なかったことから塩分が15以上あったが、放水量が増加した3月下旬にはすべての定点で0になった。2009年の塩分は、2月上旬には放水量が少なかったため、相対的に高かったが、2月中旬-3月中旬に放水量の増加とともに5未満となった。その後、3月下旬に再び放水量が少なくなるとともに15-25に上昇した。

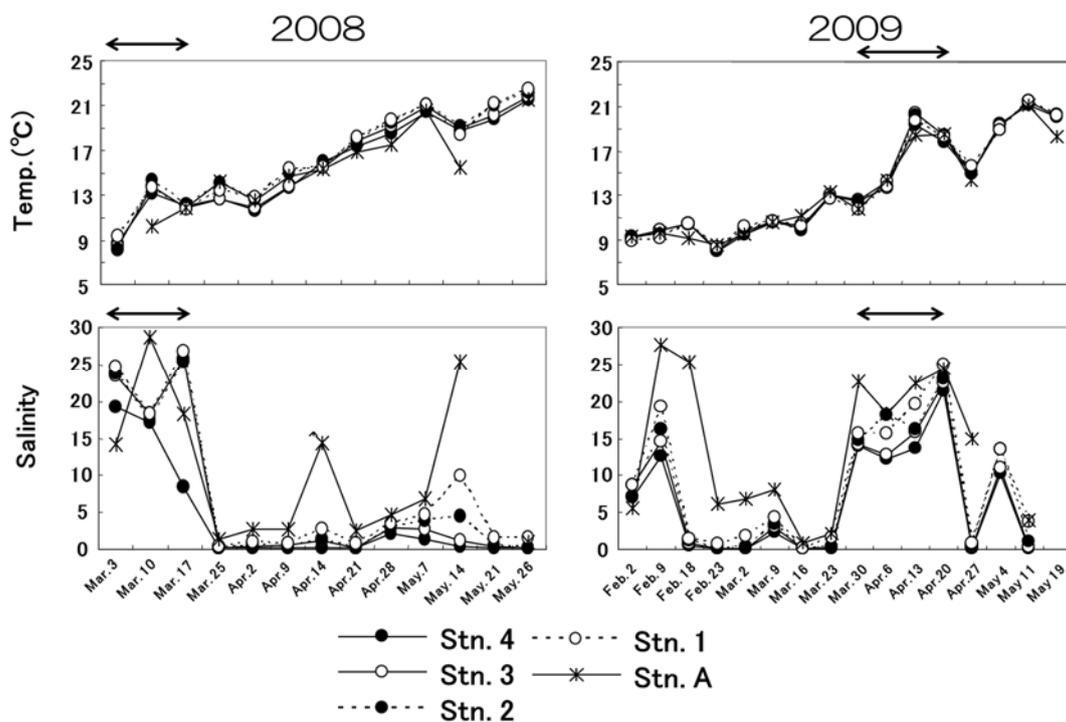


Fig. 3-4. Temporal changes in surface water temperature and salinity at five stations in 2008 and 2009. Horizontal arrows at the top show the growth period of *A. tamarensis* (modified from Yamamoto et al., 2013).

2008年の各定点における栄養塩の経時変化を Fig. 3-5 に示した。河川の溶存無機態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N} + \text{NH}_4\text{-N} = \text{DIN}$) は、3月上旬に表層、底層とも高くなったが、3月中旬には、DINは最も上流に位置する Stn 4 の表層を除いて低水準にまで低下した。3月下旬から5月下旬の DIN は $>50 \mu\text{M}$ と高濃度であった。溶存態無機リン (DIP) は、DIN と同じ変動傾向を示し、3月中旬には約 $0.1 \mu\text{M}$ に減少した。 SiO_2 は、調査開始直後は河口から3

定点 (Stns.1,2,3) の表層では低濃度 (0.8-6.1 μM) であったが、最上流の Stn.4 では比較的高濃度であった (3月中旬に約 10 μM)。3月下旬から5月中旬には、 $\text{SiO}_2\text{-Si}$ は上流の2定点 (Stns.3 および4) の表層および底層で $>50 \mu\text{M}$ と比較的高濃度であったが、下流の2定点 (Stns.1 および2) では、底層においても上流の約 50%の濃度であった。

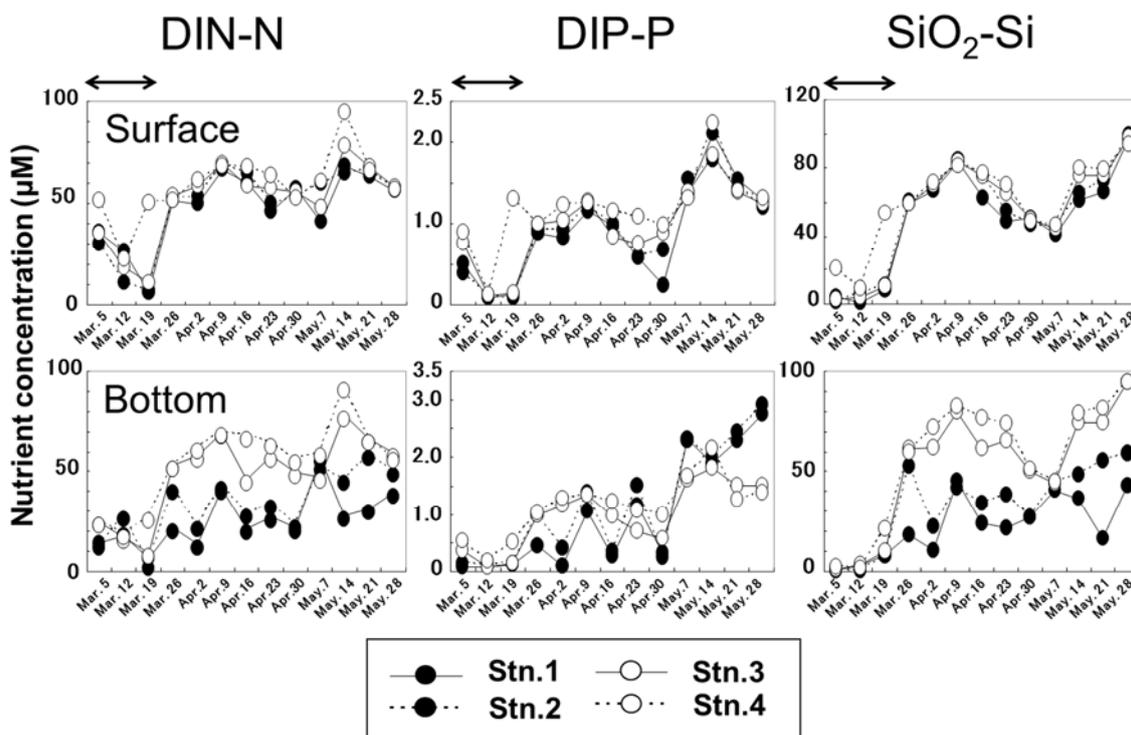


Fig. 3-5. Temporal changes in dissolved inorganic nutrients (DIN; $\text{PO}_4\text{-P}$; $\text{SiO}_2\text{-Si}$) in the surface (upper) and bottom (lower) water at five stations in 2008. Horizontal arrows show the growth period of *A. tamarensis* (modified from Yamamoto et al., 2013).

ALexandrium. tamarensis 出現量の推移

2008年および2009年の各定点における *A. tamarensis* の栄養細胞密度の変化を Fig. 3-6 に示した。2008年には3月上旬にすべての定点で栄養細胞が観察されたが、4月までに栄養細胞は海域の Stn. A, および下流の Stn.1 および2 のみの確認となった。細胞密度の最高値 ($> 10^3 \text{ cells L}^{-1}$) は3月中旬に下流の定点で確認された後、下流部の底層に低密度で存在していたが、5月中旬にはすべての定点で確認されなくなった。

2009年は2008年とは対照的に、3月下旬-4月上旬まで低密度で推移し、水温の上昇とともに河川内の Stns. 2 と4で高い密度 (約 $10,000 \text{ cells L}^{-1}$) に達した。一方、河口 (Stn. A) および河川内で最も下流に位置する Stn. 1 では、2月に低レベル ($< 10^2 \text{ cells L}^{-1}$) で確認されたものの、5月までは細胞は出現しなかったか、低いままであった。

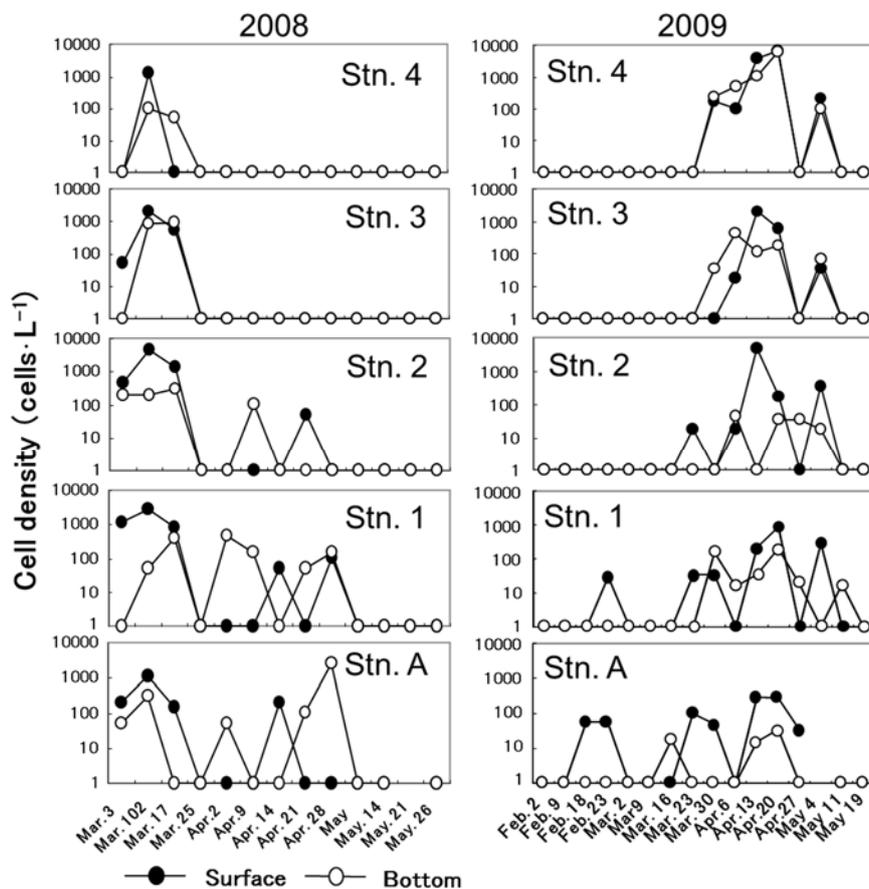


Fig. 3-6. Temporal changes in cell density (cells L⁻¹) of *A. tamarensis* in the surface and bottom waters at five stations in 2008 and 2009 (modified from Yamamoto et al., 2013).

他の植物プランクトンの出現量の変化

珪藻、渦鞭毛藻類 (*A. tamarensis* 以外) および 2008 年の各定点における優占種の細胞密度の経時変化を Figs. 3-7 に示した。珪藻の総細胞密度は 3 月中旬まで高く、3 月下旬から 4 月上旬にかけて減少し、4 月中旬に再び増加した (約 10⁴ 細胞 cells mL⁻¹)。渦鞭毛藻の細胞密度は 3 月中旬に約 10⁴ cells mL⁻¹ と高く、3 月中旬から 4 月上旬にかけて急激に減少し、珪藻類 (約 10² 細胞 mL⁻¹) の 1/10 以下の密度となった。3 月には珪藻の優占種は海産の *Thalassiora* spp., *Skeletonema* spp., *Chaetoceros* spp. であった一方、4 月以降の珪藻の優占種は淡水産の *Fragilaria* spp. と *Asterionella Formosa* Hassall となった。3 月中旬の鞭毛藻のブルームにおいて優占していたのは渦鞭毛藻の *Prorocentrum minimum* (Pavillard) J.Schiller および *Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) Stein であった。

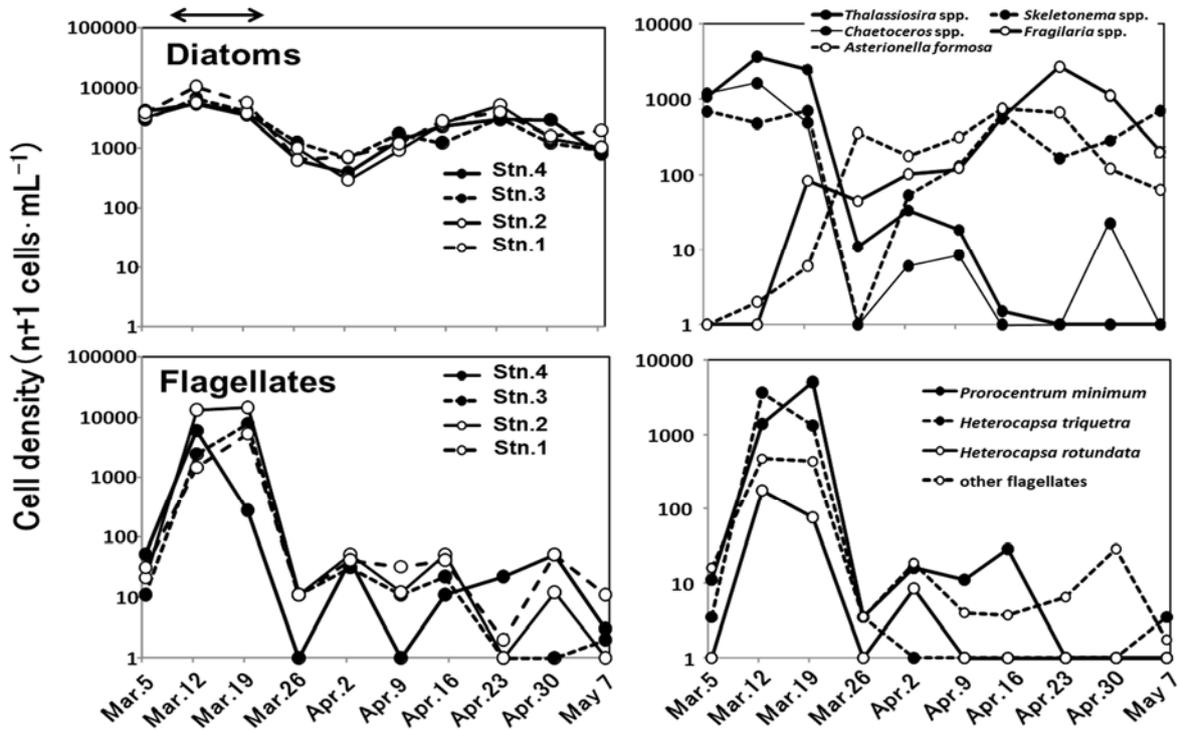


Fig. 3-7. Temporal changes in cell density (cells L^{-1}) of phytoplankton in surface water at four stations in 2008. Upper and lower left: total number of diatoms and flagellates, respectively. Upper and lower right: cell density of dominant diatoms and dinoflagellates, respectively. Horizontal arrow shows growth period of *A. tamarensis* (modified from Yamamoto et al., 2013).

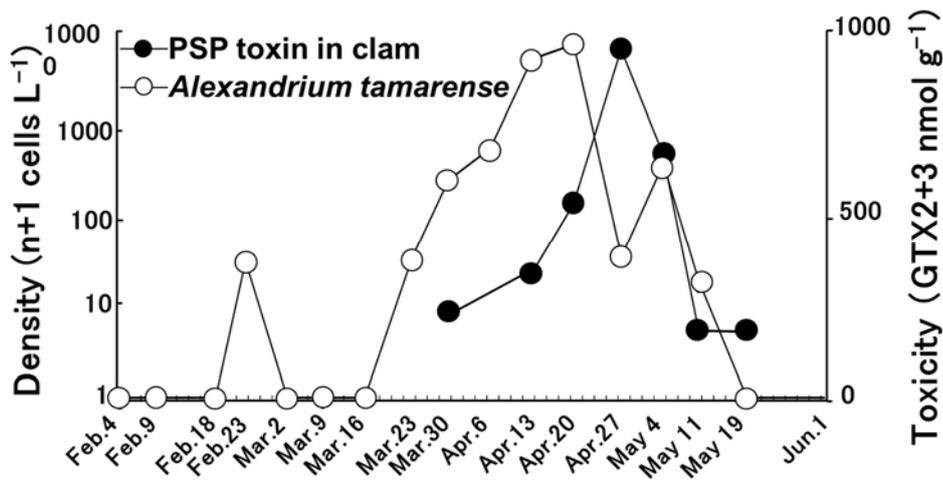


Fig. 3-8. Temporal changes in maximum cell density (cells L^{-1}) of *A. tamarensis* in the river, i.e. maximum of 4 stations (Stns. 1 to 4), and PSP toxicity in the brackish water clam in 2009 (modified from Yamamoto et al., 2013).

Alexandrium tamarense の増殖とヤマトシジミの PSP 毒性

2009 年の淀川感潮域における *A. tamarense* の最高細胞密度およびヤマトシジミの PSP 毒性の経時変化を Fig. 3-8 に示した。ヤマトシジミの可食部における PSP 毒性値 (GTX-2+3 で評価) は, *A. tamarense* が 200 cells L⁻¹ で発生した 3 月 30 日に分析を開始し, 約 200 nM (GTX2+3) であった。その後, *A. tamarense* の増加に伴い急速に毒性が増し, *A. tamarense* の密度が最大に達した 4 月 20 日の約 1 週間後の 4 月 28 日には 950 nM (GTX2 + 3) で期間中最大値となった後, 急速に減少した。同じサンプルを公定法であるマウス試験により分析した結果, すべてのサンプルがマウス試験の検出限界 (2 MU g⁻¹) 未満であった。

考察

淀川感潮域における *A. tamarense* の発生と環境要因との関係

淀川の河口堰 (淀川大堰) は河口から 10 km 上流に位置しており, 洪水の管理や上流域における様々な用途のために十分な水が確保されるように運用されている。したがって, 利水は堰からの放水よりも優先されるため, 降水量が少ない期間には, 河口堰から下流に淡水がほとんど, またはまったく放水されないことから, 堰より下流の河川内定点 (Stns.1-4) は塩分約 25 の河口部の特性を示す。逆に降水量が多い場合, この水域は塩分がほぼ 0 となり, 河川の特徴を示すようになる。

降水量は 2009 年よりも 2008 年の方が多く, 特に 4 月と 5 月に多い傾向であった。河口堰からの放水量および Stn. 2 における断面流速は, 降水量と正の相関があり, 塩分と負の相関があった。2008 年には, *A. tamarense* の細胞密度は塩分が高く, 平均流速が最低 (0.3 cm s⁻¹) であった 3 月初めに最も高く, 塩分が 5 未満で平均流速が高かった 3 月下旬から 5 月下旬にかけて, 細胞密度は非常に低くなった。対照的に, 2009 年の堰からの放水量は 3 月 25 日前後に急激に減少し, それに伴う流速の急激な低下と塩分の上昇は *A. tamarense* の劇的な増加に影響したと考えられた。

A. tamarense の増殖をみると, 2008 年は水温が 9-13°C であった 3 月初めから 3 月中旬に, 2009 年は水温が 13-19°C であった 4 月上旬-4 月中旬に確認された。三河湾および広島湾から単離された *A. tamarense* 株の培養実験では, 水温 5-20°C で増殖可能であり, 至適温度は約 15°C であることが示された (Yamamoto et al., 1995; 山本・樽谷, 1997)。同様に, 大阪湾の海域における出現事例では 11-14°C で増殖していた (山本, 2004; 山本ら, 2009)。すなわち, *A. tamarense* は広範囲の温度で生育することができ, 水温は *A. tamarense* の大規模な増殖を制御する重要な要因ではないと推測される。

培養実験において, 増殖至適塩分は 30-32 であったが, *A. tamarense* は 10-35 の広い塩分範囲で増殖できるとされている (Yamamoto et al., 1995; 山本・樽谷, 1997)。北海道のオホーツク海では, *A. tamarense* はしばしば塩分が 32.5 以下の水塊で高密度であった (Shimada et al. 2010)。同様に, カナダの St. Lawrence 川河口では, 塩分が 20-26 (Weise et al., 2002) や, 24.5 (Fauchot et al., 2005) と低塩分のときに高密度であったことが報告された。さらに,

Prakash (1967) は 19-20 の塩分でよく増殖する株を分離した。これらの報告は, *A. tamarense* の増殖に塩分 26 未満の典型的な河口塩分を好むことを示唆している。本研究では, 塩分は放水量の多い時期には 0 付近から, 放水がない場合には最大 25 まで幅広く変化した。*A. tamarense* の増殖は 2008 年には塩分 15-30 で, 2009 年には 12-25 で確認された。一般的に, 現場調査において塩分が 10 未満では栄養細胞はほとんど出現せず, 培養研究の結果を支持する出現状況となっている。すなわち, 塩分が 10 を超える状況となったことが, 河口堰より下流の定点で *A. tamarense* の増殖を引き起こす重要な要因であったことを示している。

水塊の安定性は, 渦鞭毛藻類の増殖にとって重要な要因であることが報告されている (Therriault et al., 1985; Uchida et al., 1998)。2008 年には, 他の植物プランクトン, 特に他の渦鞭毛藻類が *A. tamarense* と同時に増殖していた。この期間は河口堰からの放水がほぼ 0 となっており, 水塊の安定度が高くなった結果, *A. tamarense* だけでなく渦鞭毛藻類が全体的に増殖したものと推測される。すなわち水塊の安定性は, 同水域における *A. tamarense* の増殖のため, 少ない放水量および低塩分 (10-26) に加えて重要な因子であることが示唆される。

2008 年には, *A. tamarense* の増殖が確認された 3 月上旬は, $\text{SiO}_2\text{-Si}$ およびリン $\text{PO}_4\text{-P}$ の濃度が, 珪藻の増殖においてほぼ限界値に近い値となっていた (半飽和濃度はそれぞれ 0.4-1.3 μM , 0.5-3 μM (Paasche, 1973; Conway and Harrison, 1977; 樽谷・山本, 1994 など)) 一方, DIN は制限要因となっていなかった。2009 年には栄養素が測定されていないため, 2007 年に大阪湾で行われた調査と比較したところ, 栄養塩が欠乏している状況で, 珪藻が著しく減少した後, *A. tamarense* が赤潮を形成していた (DIN < 5 μM , DIP < 0.05 μM) (山本ら, 2009)。Itakura et al. (2002) は広島湾での調査から珪藻が栄養塩を消費した後に *A. tamarense* が増殖すると報告している。また, Maine 湾岸で確認されたような珪藻のアレロパシー効果の可能性もある (Townsend et al., 2005)。2008 年には栄養塩が 2007 年よりも高かったが, 2007 年と異なり, 珪藻と *A. tamarense* の増殖は同時に起こっていた。このように珪藻類と *A. tamarense* が同時期に増殖したことが, *A. tamarense* の密度が 2007 年よりも少なくなった理由の一つであると推測される。

***A. tamarense* のシードポピュレーション**

2008 年の *A. tamarense* の増殖を時系列で見ると, 栄養細胞は 3 月上旬に全ての定点で確認され, 次いで放水量が増加すると上流の定点から消失した。対照的に 2009 年には, 栄養細胞はまず河口付近で散発的に観察され, 河口堰からの放水量が減少した後に上流の定点で細胞密度は増加した。すなわち, 2009 年には, 河川内で増殖した *A. tamarense* のシードポピュレーションは海域から河口に進入し, 塩水くさびを通じて上流に移動した可能性がある。山本ら (2011) は, *Alexandrium* 属シストが淀川感潮域に分布しており, 河口付近のより下流の定点で密度が高くなる傾向があることを報告している。さらに *Alexandrium* 属

のシストは、河口堰の直下にも存在し、発芽率は比較的高かった（山本ら，2011）。これらのシストがこの水域におけるシードポピュレーションの役割を一部果たしている可能性が示唆される。日本の宮城県沿岸で行われた調査によると、特に大きな河川の河口で高いシスト密度が確認された（Ichimi et al., 2000）。したがって、シードポピュレーションの供給源を明らかにすることは、*A. tamarense* ブルームの制御機構をさらに理解するために重要であると考えられる。

淀川感潮域における *A. tamarense* の増殖と二枚貝の PSP による毒化

ヤマトシジミの生息に適した塩分は約 3–10 (Tanaka, 1984) である。海産植物プランクトンはこのような条件下ではほとんど繁殖しない。そのため、河口域におけるヤマトシジミの PSP による規制値 (4 MU g^{-1}) を上回る毒化は非常にまれな事例であり、2007 年の淀川感潮域におけるヤマトシジミの毒化は、日本で規制値以上の毒性を確認した最初の記録である（山本ら，2009）。2009 年の調査では PSP によるヤマトシジミの毒化は、マウス試験によって検出されなかったが、ELISA 法では PSP の蓄積が確認された。2008 年には、ELISA 法による分析を行っていないが、4 月上旬から 4 月下旬にかけてマウス試験による定期モニタリングは 5 回実施され、ヤマトシジミの毒化は検出されなかった。しかし、2009 年と比較して、*A. tamarense* の増殖の規模から推測すると、マウス試験で検出されるほどではないものの、一定レベルの二枚貝の毒化はあったと推測される。山本ら（2009）は、ヤマトシジミにおいて 2007 年に PSP による毒化が確認され、最高毒量は 46 MU g^{-1} であったことを報告している。2008 年と 2009 年には 2007 年と比較すると、*A. tamarense* の増殖と PSP による毒化は低いレベルであったと推定される。淀川のような河口堰がある徳島県の吉野川でも、ヤマトシジミにおいて低レベル ($<2 \text{ MU g}^{-1}$) ではあるが PSP による毒化が確認されている（酒井，2010）。すなわち、本研究の結果から、河口堰を有する河川においては、河口堰によって淡水流量が減少し河口域の塩分が 10 以上となることがあれば、PSP による二枚貝の毒化が起こる可能性があることを示すものである。

結論として、上流に堰を有する河口流域では、堰からの放水量の減少、塩分の上昇 (> 10)、および水域の安定が、*A. tamarense* の増殖とその後の二枚貝の PSP による毒化に関する重要な要因であることが明らかになった。したがって、水域の食の安全、安心に関する管理の観点からは、降水量や水使用量にかかわらず、この水域の PSP による二枚貝の毒化を防ぐために、堰からの一定量の出水を維持することが重要である。

第 2 節 感潮域における *Alexandrium* 属シストの分布

緒言

2007 年春季、大阪湾内の多くの海域で *Alexandrium tamarense* による赤潮が観察されたのに加え、湾奥部に位置する淀川河口内でも赤潮が確認された（山本ら，2009a）。河川感潮域における本種赤潮の発生事例はこれまで報告がなく、さらにこの赤潮時、国内では毒化

事例のなかったヤマトシジミで規制値をはるかに上回る麻痺性貝毒の蓄積が確認された（山本ら, 2009a）。海域においては麻痺性貝毒のモニタリング体制がほぼ確立しているが、河川感潮域はモニタリングの対象水域とはなっておらず、ヤマトシジミについても調査対象種ではなかった。淀川感潮域においてヤマトシジミは産業上重要種であるのみならず、遊漁として採取されることも少なくないことから、食の安全の面からも早急に対策をたてる必要がある。

そこで本項では、河川感潮域における本種の増殖機構の解明、ならびに今後の赤潮および貝毒対策に資するため、同水域で行ったシスト分布調査およびシストの発芽試験の結果について報告する。

材料と方法

調査は、2007年10月22日および2008年10月8日に大阪市漁業協同組合の小型漁船を用船して行った。2007年の調査では、Fig. 3-9に示した9定点（Stns. 1-9）およびシジミ漁場2カ所（Sj. 1, Sj. 2）において、KK式柱状採泥器（木俣ら, 1960）を用いて底泥を採取した。各定点では試料を1-3本採集し、各コアの表面から1cm深までの泥を分取して混合し、シスト計数用試料に供した。ただし、Stn. 8では砂質で採泥出来なかったため欠測とした。2008年の調査では、2007年と同様の9定点（Stns. 1-9）およびシジミ漁場（Sj 2）において、KK式柱状採泥器、もしくはエクマンバージ採泥器（採泥面積20 cm×20 cm）を用い採泥を行った。KK式柱状採泥器では2007年と同様1-3本のコア表面から1 cmの泥を、エクマンバージ採泥器では表層泥を薄く分取し試料とした。各試料を不透明なプラスチック容器に入れ、分析まで温度約10 °Cの暗所に保存した。

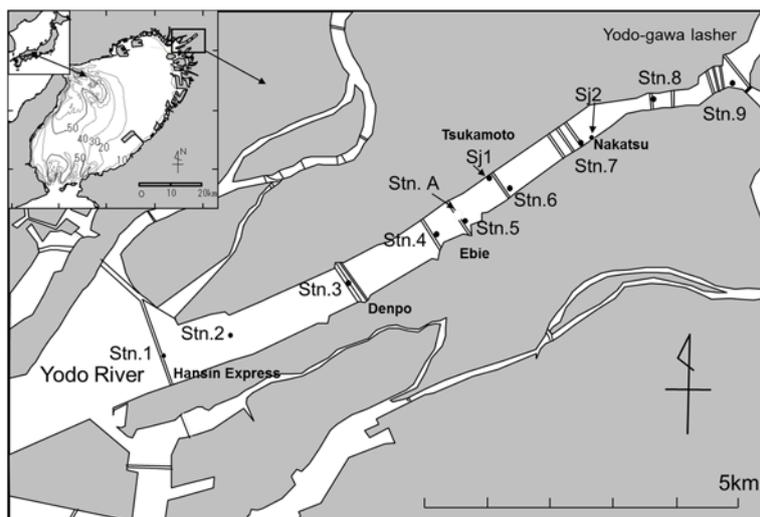


Fig. 3-9. Location of the sampling stations in Yodo River. Stns. 1-9 and Sj 1, 2: cyst sampling stations, Stn. A: plankton sampling station (modified from Yamamoto et al., 2011).

シストの計数

シストの計数は、Primuline による蛍光染色と落射蛍光顕微鏡を用いた直接計数法 (Yamaguchi et al., 1995) によった。湿泥 5 g をプランクトンネットでふるい分けし、20-150 μ m 画分を得た後、グルタルアルデヒドで固定、メタノールで脱色し、Primuline 溶液で染色した。さらに蒸留水で洗浄後、10 mL に定容したものから 0.1 mL を分取して蛍光顕微鏡下で観察した。本法で染色した *Alexandrium* 属シストは B 励起 (青色励起) 下で黄緑色の蛍光を発する (Yamaguchi et al., 1995)。蛍光が認められたシストのうち *A. tamarense* と *A. catenella* に特徴的な形状である長楕円形のシストのみについて計数を行い (以下、*Alexandrium* シストとする)、各試料について 3 回の計数を繰り返し、平均値と標準偏差を求めた。得られた値は底泥湿重あたりの数値となるため Kamiyama (1996) に従い泥の比重を測定し、単位体積あたりのシスト量 (cysts cm⁻³) を求めた。

シストの発芽試験

2008 年 11 月 1 日から 12 月 1 日にかけて発芽試験を行った。試験には 2007 年 10 月の分布調査で採泥し、10 °C で遮光保存した試料、および 2008 年 10 月に Stn. 3 で採泥した試料を用いた。滅菌ろ過海水を用いて計数と同様の処理を行い、シストを含む 20-150 μ m 画分を得た。発芽の有無の判別に加え発芽能を持つシストの密度を推測するため、試料を段階的に希釈し試験を行った。すなわち、得られた画分を滅菌ろ過海水で 10 mL にメスアップし、半分量の 5 mL を 15 mL チューブに移した後、GeO₂ が 25% 入った MP1 培地 (長井・眞鍋, 1993) で再び 10 mL にメスアップした (15 mL tube 区)。さらに GeO₂ 入り MP1 培地 5 mL を加えた 6 穴プレートに 20-150 μ m 画分の残り 5 mL から 1 mL 添加した実験区 (6 well plate 区)、および GeO₂ 入り MP1 培地 0.9 mL を加えた 48 穴プレートに 0.1 mL 添加した実験区 (48 well plate 区) を作成した。これらを 13 °C に設定したインキュベーター内で 12L:12D の光条件下で培養した。この操作で 15 mL チューブ、6 穴プレート、48 穴プレートの 1 試験区にそれぞれ底泥 2.5 g、0.5 g、0.05 g を添加したことになる。15 mL チューブと 6 穴プレートは 1 定点につき 1 区、48 穴プレートは 1 定点につき 16 区を設定した。15 mL チューブは 11 月 21 日、12 月 1 日の 2 回、6 穴プレートは 11 月 10 日、18 日、20 日の 3 回、48 穴プレートは 11 月 20-21 日に増殖の有無を確認した。

結果

淀川感潮域における *Alexandrium* シストの分布

2007 年 10 月の *Alexandrium* シストは、採泥できなかつた Stn. 8 を除くすべての定点で確認された (Fig. 3-10)。各定点におけるシストの存在密度 (平均 \pm 標準偏差) は 9.9 \pm 11.2 cysts cm⁻³ (Stn. 7) -178.9 \pm 51.2 cysts cm⁻³ (Stn. 3) の範囲にあった。シストの密度が最も高かったのは河口から約 3 km 上流の伝法大橋付近 (Stn. 3) で、この点と最下流部にあたる Stn. 1 (117.3 cysts cm⁻³) の 2 定点で 100 cysts cm⁻³ を越えていた。Stn. 3 から上流に向かうに

従ってシストの密度は低くなったが、最上流部の Stn. 9 で 65.6 ± 16.2 cysts cm^{-3} と再び高い密度で分布が確認された。中津シジミ漁場(Sj2) では 80.4 ± 17.4 cysts cm^{-3} と、すぐ近くの定点 (Stn. 7, 9.9 cysts cm^{-3}) に比べ高密度で分布していた。2008 年 10 月においては、シストは 2007 年より減少していたものの、最上流部の Stn. 9 以外のすべての定点で観察され、最下流部の Stn. 1, 2007 年に最もシストの密度が高かった Stn.3 で比較的高い密度 (それぞれ 81.0 ± 20.0 cysts cm^{-3} , 50.8 ± 25.4 cysts cm^{-3}) で確認された。また, Sj2 では 2008 年調査で最大の 102.6 ± 22.2 cysts cm^{-3} の密度でシストが確認された。

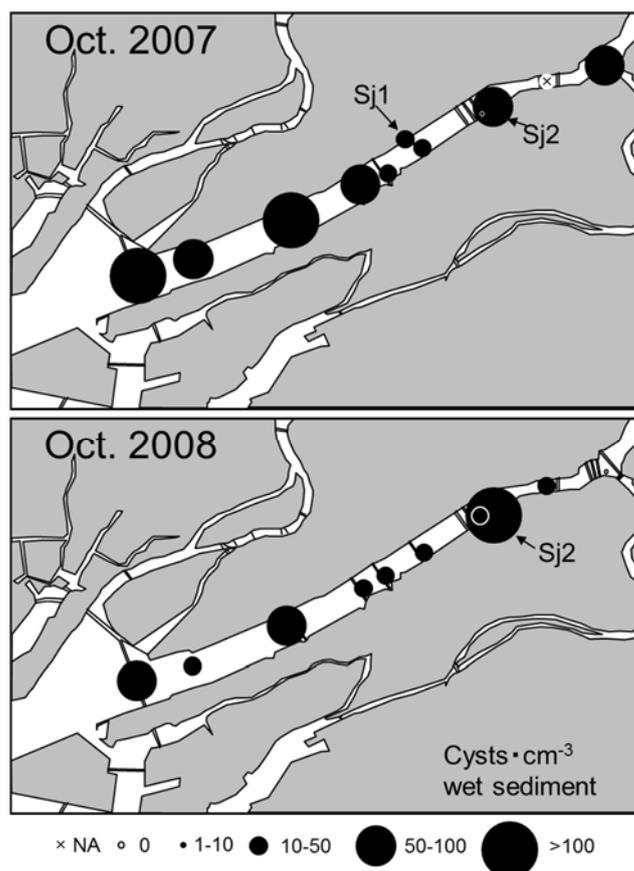


Fig. 3-10. Distributions of *Alexandrium* cysts in Yodo River. NA means not available (modified from Yamamoto et al., 2011).

淀川底泥からの *Alexandrium* シスト発芽状況

採泥できなかつた Stn. 8, および塚本シジミ漁場(Sj1)以外のすべての定点で *A. tamarensis* の発芽が確認された (Table 3-1)。48 穴プレートにおける発芽状況では、最下流の Stn. 1, 最上流部の Stn. 9 で 16 区中それぞれ 10 区, 11 区と半数を超える実験区で発芽が確認された他, 中津シジミ漁場 (Sj2) では 14 区と 9 割近く発芽した。一方で中流域の Stns. 3-6 では, 発芽状況は悪かった。発芽試験中珪藻の発芽は認められず, *Scropsiella* spp., *Gonyaulax verior* Sournia の発芽が認められたのみであった。さらに, 赤潮発生から 1 年半後の 2008 年

10月に採泥された Stn. 3 のサンプルにおいても *A. tamarense* の発芽は48穴プレート16区中3区で確認され、2007年の同地点における発芽状況（16区中2区）と同程度の発芽状況であった。

Table 3-1. Result of germination test for cysts carried out in 2008. G; Germinated, NG; Not germinated, -; No data

Sampling Date / Stn.	Number of samples with germinated cysts			Judgement	
	15mL tube (1sample)	6-well plate (1sample)	48-well plate (16samples)		
Oct. 22 2007	1	1	0	10	G
	2	0	1	8	G
	3	1	1	2	G
	4	0	1	0	G
	5	1	1	2	G
	6	1	0	0	G
	7	0	1	1	G
	8	-	-	-	-
	9	1	1	11	G
Sj 1	0	0	0	NG*	
Sj 2	1	1	14	G	
Oct. 8 2008	3	1	0	3	G

考察

シスト分布から推定される淀川感潮域の遊泳細胞出現域

海域において、*A. tamarense* 栄養細胞が多く出現した海域ではシスト密度も高くなる傾向がある（山口ら, 1995 ; 石川ら, 2007 ; 山本ら, 2009b など）。本研究におけるプランクトン調査は河口から河口堰までのほぼ中間に位置する1定点 (Stn. A) のみであったことから、同水域全体における遊泳細胞の出現状況は不明であるが、同水域においてもシストの分布から栄養細胞の出現状況を推定することが可能であると考えられる。

Primuline 染色による計数では、2007年のシストは河口から最上流部の淀川大堰近くまでほぼ全域で確認されたことから2007年春期には淀川感潮域全域にわたって遊泳細胞が増殖していた可能性が高い。また、シストは下流で高密度に出現するが、シジミ漁場や最上流部でも比較的高い密度で確認された。停滞性の高い河口堰下流ではあるものの増水時にはかなりの放水があり、海域の事例ほどシストの密度が発生した細胞密度を正確に反映していないかもしれないが、プランクトン調査を行った Stn. A より下流部、中津のシジミ漁場近辺、最上流部などで遊泳細胞が高い密度で出現していた可能性が高いと推測される。一方、シジミ漁場とシストの高密度出現域が重なることは、リスク管理上無視できない事実である。2008年のシスト調査でも他の定点で2007年に比べ概ね減少していたのに対し、シジミ漁場では増加していた。一般に河川では流深部より岸部の方が流速は緩やかで細か

い粒子が蓄積しやすい。過去の報告では、遊泳細胞との関係とともに、泥分率の高い停滞水域でシストが多く出現する傾向についても言及されている（山口ら, 1995 ; 石川ら, 2007 など）ことから、遊泳細胞の出現の多寡に関わらず流れにより漁場でシストが蓄積した可能性もある。したがって、今後は水域の流れの構造についても調査する必要がある。

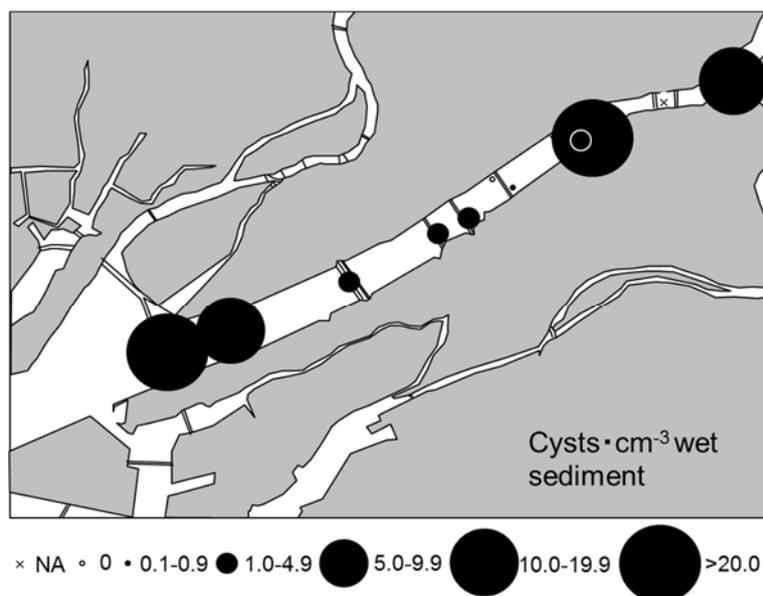


Fig. 3-11. Estimated distributions of *Alexandrium* cysts with germination ability in sediments of Yodo River in 2007. NA means not available (modified from Yamamoto et al., 2011).

発芽可能なシストの分布

Alexandrium tamarense のシストは内因性休眠期間を有し、成熟には数ヶ月-半年を必要とする（Itakura and Yamaguchi, 2001）。赤潮が確認された2007年試料のシストについては、ほとんどが同年に形成されたシストであると推測されるが、2008年春期にも遊泳細胞の出現は確認されており（Yamamoto et al., 2013）、2008年の試料については2007年に形成されたシストに2008年に形成されたシストを加えたものが含まれると考えられる。発芽試験は10℃のインキュベーター内で遮光保存したものを、2007年試料については赤潮の発生から約1年6ヶ月後、2008年試料については約6ヶ月後に行ったものであることから、試験時においては2008年の春期に形成されたシストも概ね発芽能を獲得していたと考えられる。今回の発芽試験においては、塚本のシジミ漁場（Sj1）を除き、採泥が可能であったすべての定点の底泥から発芽が確認されたことから、淀川感潮域で形成されたシストも発芽能を持ち、次年度以降の seed population となり得ることが明らかになった。本実験では段階的に試料を希釈し発芽状況を見ることで、発芽可能なシストがどの程度の密度で存在するか推定することを試みた。本実験の処理により、15 mL チューブで発芽が確認された場合は2.5 g、6穴プレートでは0.5 g、48穴プレートでは1穴あたり0.05 gの泥中に少な

くとも 1 cyst 以上の発芽可能なシストが存在していたことがわかる。さらに 48 穴プレート
の発芽した数により 0.05-0.8 g の範囲で推定が可能となる。この 3 段階の培養実験から、
底泥 1g に存在する可能性がある発芽能を持つシストの最大値を推定し、Fig. 3-11 に淀川感
潮域の 2007 年における分布を示した。発芽能を持つシストの分布は河口部の 2 定点 (Stns.
1, 2) , および中津シジミ漁場 (Sj 2) と最上流部の定点で比較的高い密度となっており、
Primuline 染色により計数したシストの分布傾向と類似した。ただし、発芽試験で推定され
たシストの密度は直接計数で確認された密度と比較して 1-2 桁低い傾向で、特に Stns. 3, 4
ではかなり低い密度であった。Primuline 染色により計数された値と発芽実験の結果から発
芽率を見積もると 4.0-47.5%となったが、海域における発芽率の季節変動を調べた研究で
は、培養水温により異なるものの 1.3%-39.2%と報告されており (尊田ら, 2006) , 海域と
同程度の発芽能を有していると推察される。

第 3 節 感潮域における赤潮の発生と、河口堰解放によるブルーム抑制

緒言

2007 年の *Alexandrium tamarense* による赤潮が確認された淀川感潮域において、2011 年に
再び本種による赤潮が確認された。本項では、2011 年の赤潮発生時に同水域で行った観測
結果を記すとともに、国土交通省が赤潮対策として行った淀川大堰における放水が *A.*
tamarense の増殖に及ぼした影響についての検討結果を述べる。

材料と方法

定期調査は 2011 年 1 月から 6 月に、月 1 回の頻度で行った。大阪市漁協に所属する漁
船を用船し、河口からおよそ 10km 上流に建設された可動式の淀川大堰までに位置する 4
つの橋 (伝法大橋, 淀川大橋, 十三大橋, 長柄橋) において、北原式採水器を用いて表層、
底層の 2 層の採水を行った。さらに環境項目として Fig. 3-12 に示した 9 定点において
compact-CTD による水温、塩分、蛍光値の測定を行った。

定期調査を補完する形で 4 月から 5 月については週 1 回の頻度で臨時調査を行った。定
期調査を行った 4 つの橋上から北原式採水器を用い、表層、底層の 2 層から採水を行った。
ただし、4 月 21 日については、国土交通省からの依頼により持ち込まれた試水を検鏡した
もので、最下流の伝法大橋のみのデータである。環境調査は採水した試水を現場で棒状温
度計により水温を測定した後研究室に持ち帰り、無固定の試水 300 mL を 10 mL に濃縮し
た 1 mL 中の細胞数を生物顕微鏡下で計数した。グルタルアルデヒドで固定した試水は
Calcofluor white で染色 (Fritz and Triemer, 1985) した細胞の鎧板観察を行い、第一頂板の腹
孔の確認により種を同定した。

水温、塩分については、毎回調査時に、バケツ採水した表層水を現場にて棒状水銀温度
計で水温を測定した後実験室に持ち帰り、サリノメーター (鶴見精機製デジオート Model3-
G または Model-5) で塩分を測定した。栄養塩濃度の分析には、400 °C で 2 時間強熱処理

したグラスファイバーフィルター (Whatman GF/C) で濾過した試水についてオートアナライザー (BLTEC 社製 swAAt) を用い、溶存無機態窒素濃度 ($\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$: なお, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ の総和を DIN として扱う), 溶存態無機リン濃度 (DIP: $\text{PO}_4\text{-P}$), 溶存態ケイ素濃度 ($\text{SiO}_2\text{-Si}$) を分析した。クロロフィル *a* 濃度はフィルター上の捕集物を 90%アセトンで 24 時間抽出し, Holm-Hansen 法 (Holm-Hansen et al., 1965) により蛍光光度計 (ターナーデザイン社製 TD700) で測定した。毎日の降水量および全天日射量データは, 気象庁 (<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>) から入手した。河口堰からの流出量データは, 国土交通省から入手した。

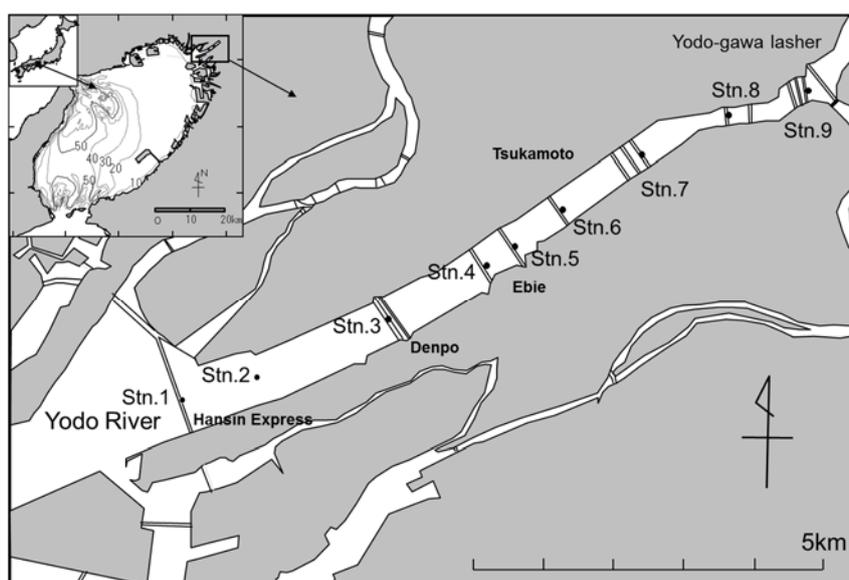


Fig. 3-12. Location of the sampling stations in Yodo River conducted by chartered fishing boat once a month. Stns. 1–9: stations for environmental factors. Stns. 3, 5, 7, 9: stations for sampling of vegetative cells. Sampling of vegetative cells were also conducted from the bridge in other weeks.

結果

淀川感潮域の 4 つの橋から得た採水試料における表層と底層の *A. tamarensis* 栄養細胞密度の推移を Fig. 3-13 に示した。*A. tamarensis* 栄養細胞が最初に確認されたのは, 2 月 3 日に最上流に位置する長柄橋表層および上流から 2 番目の十三大橋の底層であった。その後 3 月は低密度であったが, 4 月 7 日の調査で急激に密度が増加し, 各橋とも $10^5\text{-}10^6$ cells L^{-1} の密度で確認された。栄養細胞密度は, 表層では淀川大橋, 伝法大橋, 十三大橋, 長柄橋の順に, 底層では長柄橋, 十三大橋, 伝法大橋, 淀川大橋の順に低くなっていた。翌週の 4 月 13 日には表層, 底層とも長柄橋が最も栄養細胞の密度が高く, 概ね下流になるに従っ

て細胞密度は減少した。さらに4月13日には表層では上流の2橋（長柄橋，十三大橋）では減少したものの，下流の2橋（淀川大橋，伝法大橋）では増加，底層では長柄橋と伝法大橋では減少，この2橋以外では増加と，上流からの距離により異なった傾向を示した。4月21日は最下流の伝法大橋のみのデータであるが，表層では減少，底層で増加傾向を示した。その後4月25日にはすべての定点の表層で栄養細胞は確認されなかった一方，底層では大きく減少していたものの最上流の長柄橋以外の3橋で確認され，上流から下流に行くに従って細胞密度は高い傾向を示した。5月2日以降については，表層，底層ともすべての橋からの採水で栄養細胞は確認されなかった。なお，4月21日午後には国土交通省がこの赤潮対策として13時から15時まで 350 t s^{-1} の緊急放水を行ったが，21日の調査はこの放水前であった。

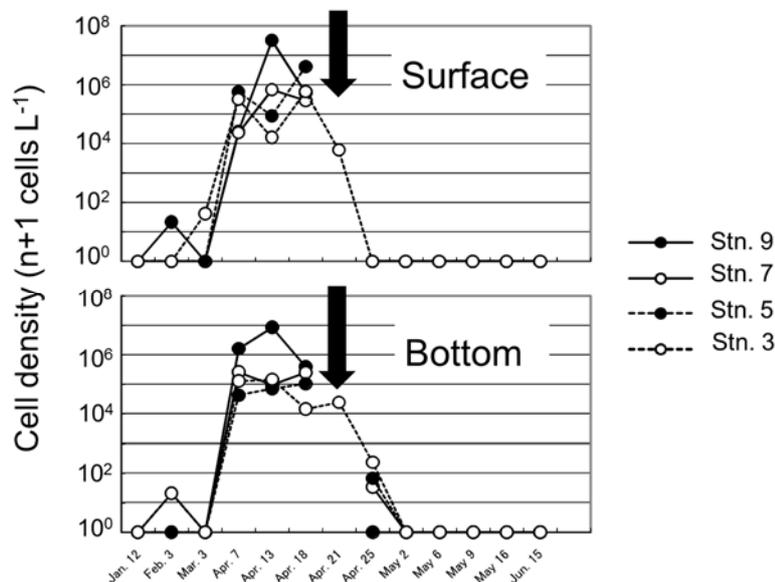


Fig. 3-13 Temporal changes in cell density (cells L^{-1}) of *A. tamarensis* at each vegetative cell sampling station in the river. Upper: Surface layer, lower: bottom layer. Arrow: provisional discharge from Yodo-Gawa lasher by Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism

同水域において最も高い密度であった4月18日の *A. tamarensis* 栄養細胞とクロロフィル a 濃度の関係を Fig. 3-14 に，4月18日および19日の流心部における水温，塩分，蛍光強度の鉛直断面を Figs. 3-15, 16 に示した。 *A. tamarensis* 栄養細胞とクロロフィル a の関係はほぼ直線の関係を示した。4月18日は淀川大橋上流の表層で高い蛍光強度を示した。淀川大橋より上流は強く成層しており，高い蛍光強度を示した水塊の水温，塩分はそれぞれ約 $17 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，20 であった。塩分の分布からは25以上の高塩分水は底層より，河口から約6 km 地点まで侵入していた。一方，19日は18日より上流の十三大橋付近の表層で高い蛍光強度を示した。この時高い蛍光強度を示した水塊の水温，塩分はそれぞれ約 $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，20 であ

った。18日と比較すると、成層は崩れており、塩分25以上であったのは河口3kmより下流であった。

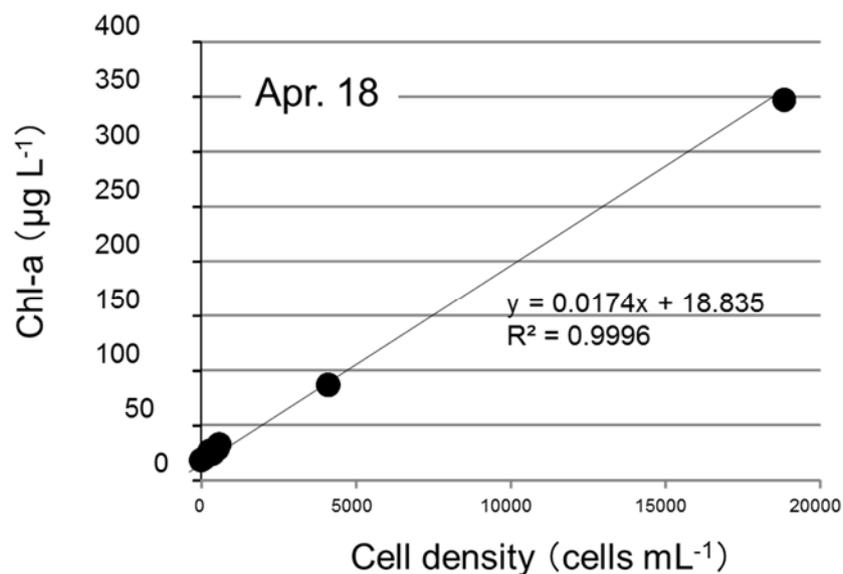


Fig. 3-14. Relationship between cell density of *A. tamarense* and Chlorophyll *a* in Yodo River on April 18th.

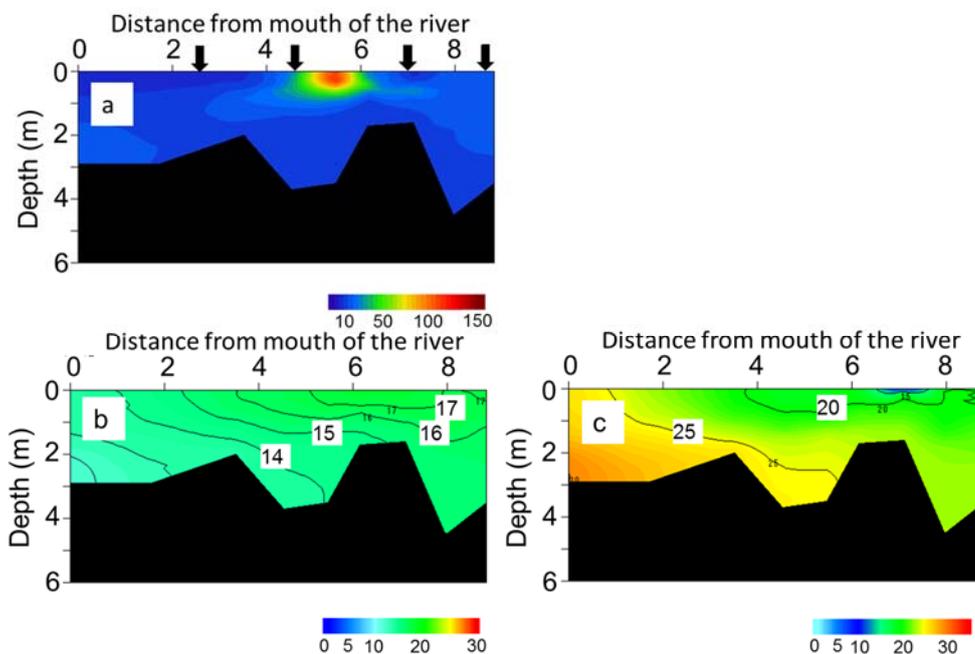


Fig. 3-15. Vertical cross-sections of raw fluorescence (a), temperature (b), and salinity (c) at center line of stream from mouth of the river to Yodo-Gawa lasher on April 18th. Arrows show sampling stations of vegetative cell of *A. tamarense*.

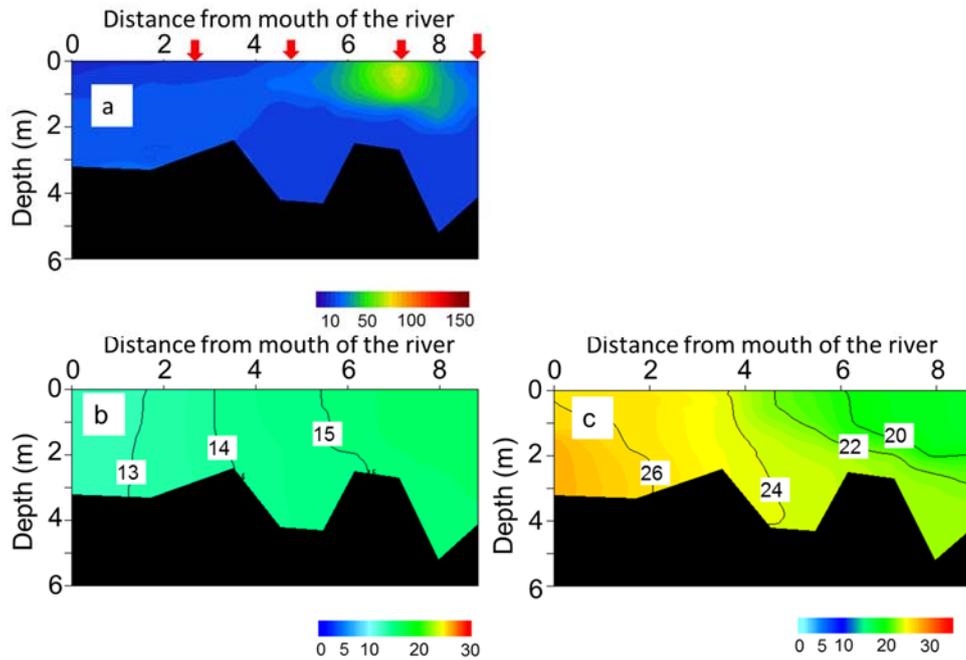


Fig. 3-16. Vertical cross-sections of raw fluorescence (a), temperature (b), and salinity (c) at center line of steam from mouth of the river to Yodo-Gawa lasher on April 19th. Arrows shows sampling Stns. of vegetative cell of *A. tamarensis*.

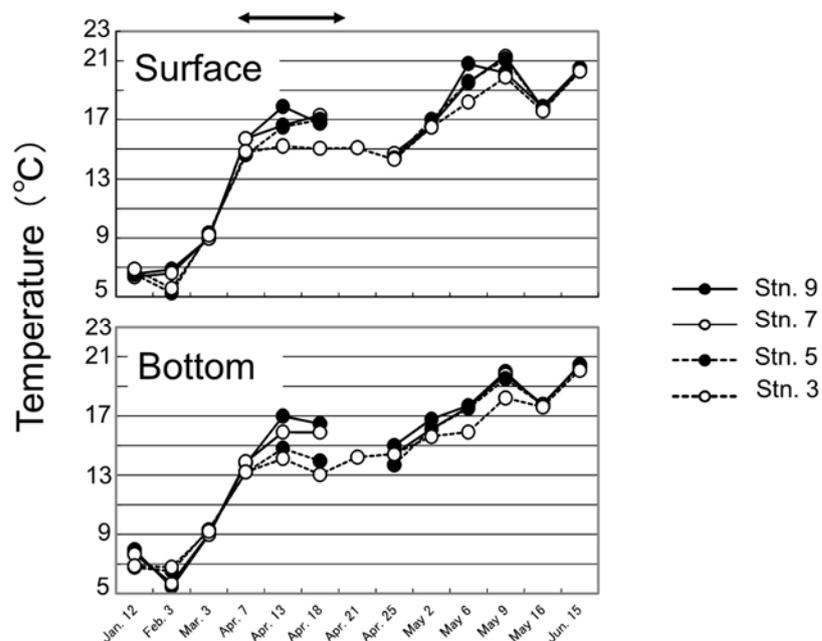


Fig. 3-17. Temporal changes in temperature at each vegetative cell sampling Stns. Upper: surface layer, lower: bottom layer. Horizontal arrows at the top show the growth period of *A. tamarensis*.

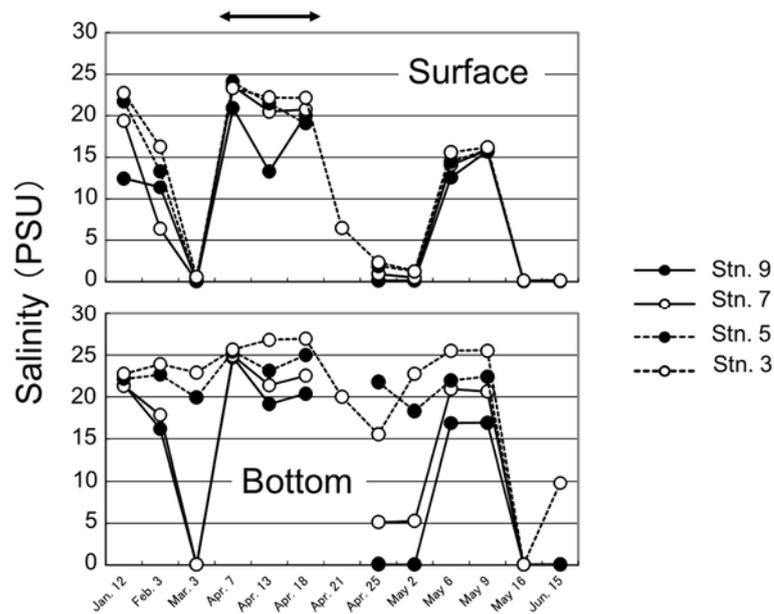


Fig. 3-18. Temporal changes in salinity at each vegetative cell sampling Stns. Upper: surface layer, lower: bottom layer. Horizontal arrows at the top show the growth period of *A. tamarensis*.

淀川感潮域の水温の推移を Fig. 3-17 に、塩分の推移を Fig. 3-18 にそれぞれ示した。水温は3月には9℃前後であった。4月7日の調査では表層で約15℃、底層で約13℃-14℃となったが感潮域内の4定点の差は大きくなかった。翌13日の調査では表層、底層とも定点間の差が大きくなり、上流で高く、下流で低い傾向となった。その後、25日までは横ばいなし減少傾向となったが5月以降は順調に昇温した。塩分は3月にはすべての定点の表層および上流2定点の底層ではほぼ0となった。4月7日の調査では表層で20-25、底層で約25と海域に近い高塩分が観測された。13日の調査では最上流の長柄橋で15を下回る値であった以外は表層、底層とも20以上の値で、この傾向は18日まで続いた。21日には最下流の伝法大橋の値で、表層が約6、底層が約20であったが、25日から5月2日には表層はすべての定点で0-3、底層では上流から0、5、22、15と定点間の差が大きかった。その後塩分は再び上昇し、5月6日には表層でも15以上となった後、16日には再び低下した。

Fig. 3-19 に大阪における降水量および全天日射量の推移を示した。*A. tamarensis* が主に増殖した4月は他の月に比べ、降水量が少なく特に、10日から20日についてはほとんど降水がない状況であった。対照的に全天日射量は3月後半から4月にかけて多く、ほぼ20 MJ m⁻²を上回る状況であった。

淀川大堰における放水量の推移を Fig. 3-20 に示した。降水量に対応して、3月後半から4月はほとんど放水がなく18日までほぼ0であった。19日以降は一定量の放水があった他、21日には13:00-15:00の2時間、緊急放水として約300 m³ s⁻¹の放水がなされた。

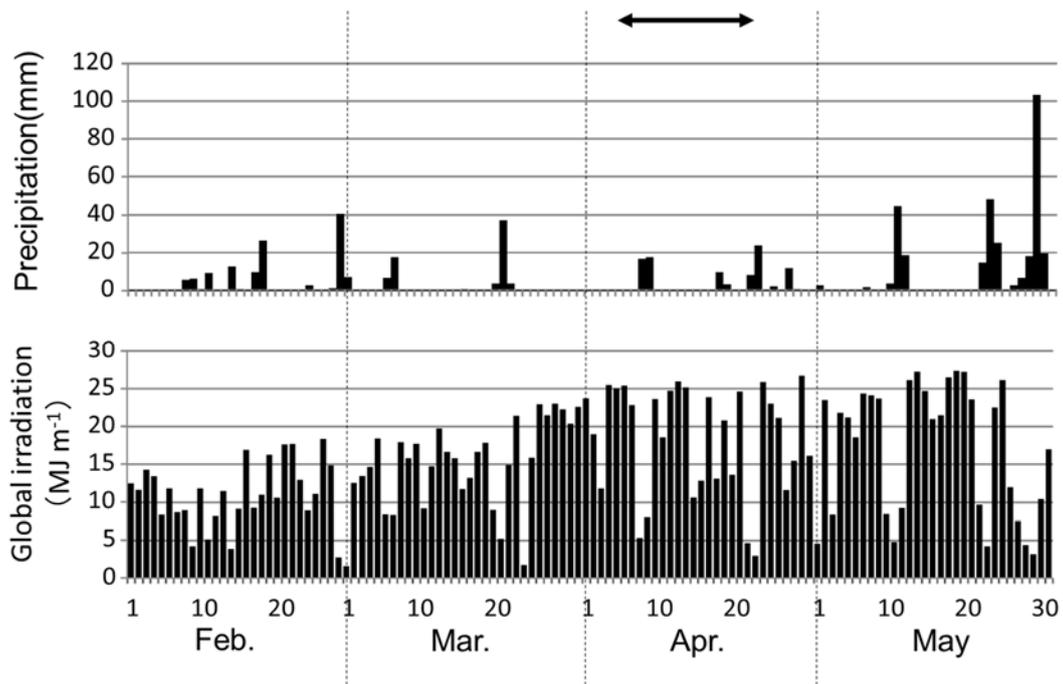


Fig. 3-19. Temporal changes in daily precipitation (mm) (upper), global irradiation (MJ m^{-2}) from February to May in 2011. Horizontal arrows at the top show the growth period of *A. tamarensis*. Data were obtained from Japan Meteorological Agency web site (<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>).

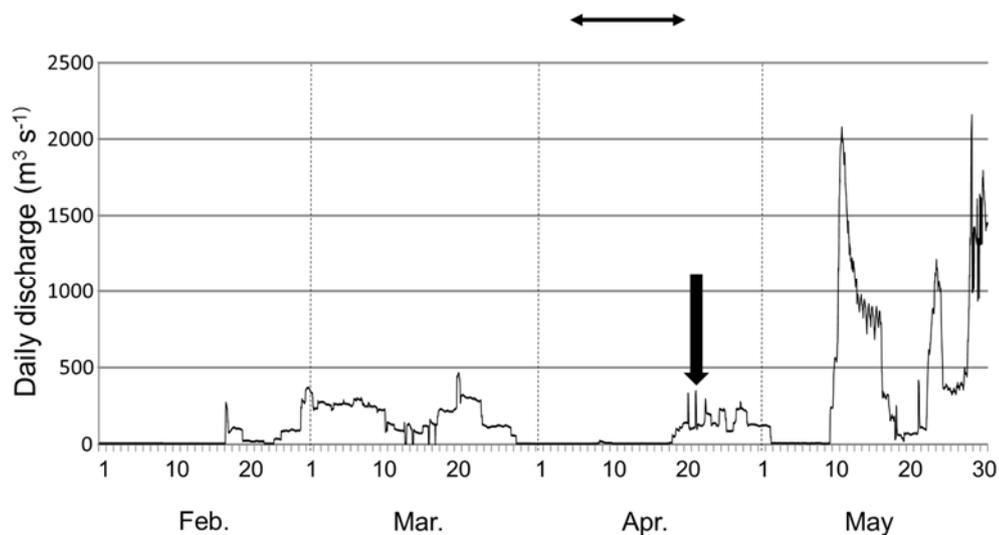


Fig. 3-20. Temporal change in daily discharge from Yodo-Gawa lasher from February to May in 2011. Vertical arrow shows provisional discharge from Yodo-Gawa lasher. Horizontal arrows at the top show the growth period of *A. tamarensis*. Data were obtained from Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism.

考察

2011年の淀川感潮域において *A. tamarense* が初認されたのは、2月に上流2橋からの採水試料であった。前項で示したとおり、シストの分布は河口堰直下でも確認されており発芽率も高かったことから、2011年においてもシストからの発芽が発生に寄与した可能性がある。一方、大規模な増殖は、4月に、表層では中流域で、底層では最上流から確認された。このときの塩分は、底層ではすべての定点で約25となっており、河口域からの塩水が最上流部まで到達していたことが伺われた。さらに表層でも塩分はすべての定点で20を上回る値で、河口堰までの水域全体が内湾のような状態であったことが推察された。水温は表層で15℃以上と培養実験（山本・樽谷，1997）や海域（山本ら，2009など）で確認される水温より高い傾向であったが、底層では13-14℃と、本種の至適水温とされる条件であった。水温はその後上流の2定点では幾分上昇したものの、4月中はほぼ横ばいで推移した。増殖盛期の18日から19日の鉛直断面を見ると赤潮は上流から2つめの定点（十三大橋）と3つめの定点（淀川大橋）の間で変化しており、中流域の至適水温帯に停滞することで大規模な増殖に繋がったと推察された。*A. tamarense* 栄養細胞は概ね表層を中心に分布していたが、成層が強かった18日の方が19日より集中的に分布していた。前述のとおり、本種は亜表層から中層に分布することが多いが、同水域においては水深が浅かったこと、さらに赤潮状態での確認であり、海域における赤潮時と同様、自己遮蔽による光量不足を補うため、表層に分布した可能性が考えられた。

2011年の3月から4月の気象条件をみると、3月から降水は少なく、全天日射量は4月以降高い値で推移した。放水は、3月には一定量維持されていた一方、4月はほぼ0の状態が継続した。前項で示した通り、この水域における *A. tamarense* の増殖に放水量の低下と塩分の上昇が大きく関わっていることが確認された。*A. tamarense* 栄養細胞は4月21日の河口堰からの緊急放水後、急激に減少した。21日の採水時刻は16:00であったことから放水から約3時間後の採水となる。放水による効果は表層で大きく、底層では遅れて現れたが10日後には全域の全層で栄養細胞は確認されなくなった。3-2と同様の方法で、放水量と淀川大橋における断面積から平均流速を求め、河川内の滞留時間を計算するとそれぞれ、 25.3 cm s^{-1} 、0.5日となった。放水と、もともと感潮域に存在した海水の塩分差から、放水は表層で先行して河口に到達すると考えられることから、伝法大橋における採水時には放水の一部が到達していたと推察される。この放水によって水温にはほとんど変化がなかったが、塩分は大きく低下した。すなわち、*A. tamarense* 栄養細胞が放水による水域からの流出の他、塩分の低下による影響を受けた可能性が推測される。*A. tamarense* 栄養細胞への塩分の影響については、次項で検証する。

第4節 淀川大堰におけるブルーム抑制に対する放流効果の検証

緒言

前項で、淀川感潮域においては河口堰からの放流により、*Alexandrium tamarense* のブル

ームを解消できることを示した。しかしながら、河口内でブルームが解消されても、放流により *A. tamarense* 栄養細胞は下流に流され海域に流出する可能性が懸念される。本項では流出した栄養細胞が海域におけるシードポピュレーションとなるか否かについて、室内実験により検証を試みた。

材料と方法

実験には淀川感潮域で採取された底泥より発芽させた培養株を用いた。放流効果の検証のため、現場調査でも放水後に大きく変化した塩分の *A. tamarense* 栄養細胞に対する影響を検討した。

低塩分水への暴露実験は増殖段階に従って2回行った。2007年10月に淀川で採泥した底泥から発芽、単離した *A. tamarense* 培養株をフラスコで Si を 1/2 強度で調整した MP1 培地（長井・眞鍋，1993）で増殖させ、容量 7 mL のねじ口試験管 6 本で培地 5 mL（塩分約 30）に培養株を 0.5 mL 接種し、初期密度 $940 \text{ cells mL}^{-1}$ で前培養を行った。各試験管について1日おきに蛍光光度計（ターナー社製 TD700）で蛍光値を測定し、増殖曲線から対数増殖期と判断された接種して1週間後（初期：Experiment 1；Exp.1）、および2週間後（中期：Experiment 2；Exp.2）にそれぞれ3本ずつ実験に供した。前培養の試験管から 6 well プレートに 1 mL, 1 mL, 0.5 mL 分注し、水温を合わせた滅菌蒸留水をそれぞれ 1 mL, 2 mL, 4.5 mL 注入、攪拌した（それぞれ 1/2 海水：塩分約 15, 1/3 海水：塩分約 10, 1/10 海水：塩分約 3）。海域に流された後再び増殖するか検討するため、これらについてそれぞれ 1.5 時間後、3 時間後、6 時間後に 1/2 SiMP1 培地 3 mL を分注した 6 well プレートに 0.5 mL ずつ戻して 24 時間後に観察を行い、遊泳している細胞の有無を確認した。さらに、同じ時間暴露したものを 1/2 SiMP1 培地 1.5 mL を分注した 48 well プレートに 1 細胞ずつ、1 実験区につき 8 細胞戻し、1 週間後の遊泳、増殖の有無を確認した。培地に戻した細胞は遊泳を停止している細胞のうち、比較的原形を保っているものとした。

結果

前培養で測定した蛍光値と細胞密度の関係を Fig. 3-21 に示した。蛍光値と細胞密度の間には明確な相関関係が確認され ($R^2=0.9918$)、その関係式は、 $y=198.6x-53.6$ であった。この関係式から計算された 1/2, 1/3, 1/10 実験区の添加細胞数は Exp.1 ではそれぞれ 3978, 3819, 1920, Exp.2 では 10929, 11008, 6140 cells であった。さらに、それぞれの実験区の細胞密度は 1989, 1273, 192 cells mL^{-1} (Exp.1)、5465, 3669, 614 cells mL^{-1} となることから、6 well プレートで培地に戻した細胞数は 995, 637, 96 cells (Exp.1)、2733, 1835, 307 cells (Exp.2) と計算された。

設定濃度に合わせ、蒸留水で希釈した直後の *A. tamarense* 栄養細胞の変化を Fig. 3-22 に示した。1/2 海水の実験区から原形質が漏出している細胞が確認され、1/3 海水ではその割合が増加した。さらに 1/10 海水では細胞が破裂し、死滅しているものが見られた。た

だし 1/10 海水でも殻を脱いだテンポラリーシスト様に変化している細胞も存在した。

Table 3-1 に 6 well プレートにおいて 1/2SiMP1 培地に戻した後、24 時間後の遊泳細胞の有無を示した。Exp. 1, 2 とも 1/3 海水の実験区までは 6 時間の暴露でも遊泳している細胞が確認された。一方、1/10 海水の実験区では、Exp. 1 では 1.5 時間の暴露でほぼ死滅していたのに対し、Exp.2 では 6 時間の暴露でも復活したのが見られた。

Table 3-2 に 48 well プレートにおいて 1/2SiMP1 培地に戻した後、1 週間後の遊泳細胞の出現割合を示した。Exp.1 では 1.5 時間暴露、6 時間暴露の実験区では 1/3 海水まで遊泳細胞に回復したが、その割合は 0.13-0.38 と低い割合であった。一方、Exp.2 ではすべての暴露区で 1/3 海水までは回復し、6 時間暴露の 1/3 海水区で 0.19 と低い値であったが、それ以外は 0.44-0.94 と高い割合で回復した。さらに、すべての暴露時間において、海水の割合が高いほど回復率も高かった。なお、1/10 海水の実験区においてはすべての暴露時間で遊泳細胞に回復しなかった。

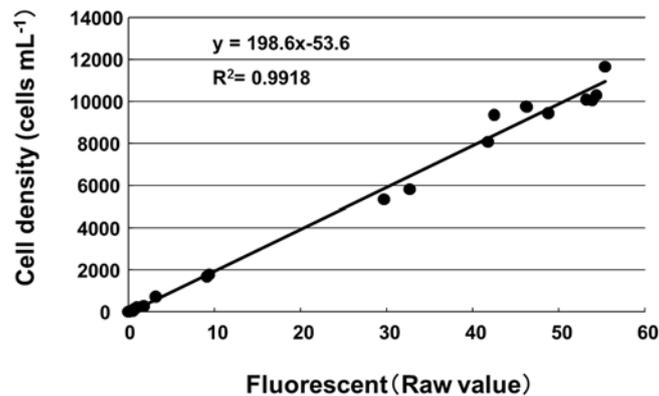


Fig. 3-21. Relationship between cell density of *A. tamarensis* and fluorescence of cultured strain.

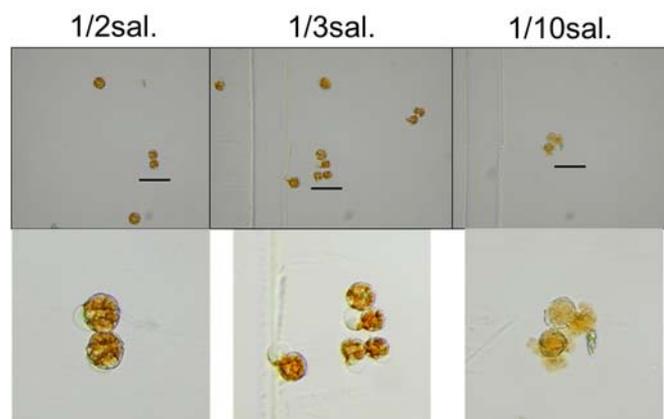


Fig. 3-22. Pictures of *A. tamarensis* vegetative cells influenced by low salinity. 1/2 salinity of original seawater diluted with distilled water (left), 1/3 salinity of original seawater (middle), 1/10 salinity of original water (right).

Table 3-1. Results of experiment 1 and experiment 2 of 6 well plate. Observation at 24 hour after back to original salinity.

Exp.1	Dilution	Judgment			Exp.2	Dilution	Judgment		
		1.5h	3h	6h			1.5h	3h	6h
No.1	1/2	○	○	○	No.1	1/2	○	○	○
	1/3	—	—	—		1/3	○	○	○
	1/10	—	—	—		1/10	○	×	×
No.2	1/2	○	○	○	No.2	1/2	○	○	○
	1/3	○	○	○		1/3	○	○	○
	1/10	×	×	×		1/10	○	○	○
No.3	1/2	○	○	○	No.3	1/2	○	○	○
	1/3	○	○	○		1/3	○	○	○
	1/10	×	×	×		1/10	○	○	○

Table 3-2. Result of experiment 1 and experiment 2 of 48 well plate. Observation at 1 week after back to original salinity.

Exposed time	Dilution	Revival cell ratio	
		Exp.1	Exp.2
1.5h	1/2	0.13	0.94
	1/3	0.25	0.81
	1/10	0.00	0.00
3h	1/2	0.00	0.75
	1/3	0.00	0.50
	1/10	0.00	0.00
6h	1/2	0.38	0.44
	1/3	0.13	0.19
	1/10	0.00	0.00

考察

Alexandrium tamarense ブルームに対する河口堰からの放水の効果

前項で示したとおり、現場海域における赤潮時の観測によると、*A. tamarense* 赤潮は中流域の表層に分布していた。このとき *A. tamarense* の存在していた水塊は概ね塩分 20 以上の海水であった。河口堰から放水された淡水は、主として比重の大きい海水の上を流れる。放水開始 3 時間後の最下流の伝法大橋における表層の塩分は約 6.5 まで低下した一方、底層は約 20、次ぐ 25 日の調査でも下流 2 定点の塩分は 15-20 とそれほど低下していない状

況であった。しかし、以降の調査において全域で底層でも細胞密度は低い値であったことから、赤潮を形成していた細胞は底層に留まることなく、表層水とともに流出したと考えるのが妥当と思われる。本実験においては 1/3 海水（塩分約 10）の実験区までは、6 時間の暴露でも通常海水に戻った場合、回復する可能性が示された。実験の設定上、塩分の低い実験区で細胞密度が低い設定になったため、6 well プレートの結果は定量性が低いと考えられるが、48 well プレートの結果と同様の傾向が確認されたことから、最小値である 96 cells 以下の細胞数では回復しないことが確認された。伝法大橋における表層水には 6,000 cells L⁻¹、底層水には 24,000 cells L⁻¹ の栄養細胞が確認されており、これらは 1/5 海水に最大 3 時間暴露されたことに相当すると考えられる。今回の実験では塩分 3 と 10 の間に閾値が存在したため、この間の塩分における回復の可否は推定となるが、塩分 6.5、3 時間の暴露では一部回復可能であった可能性が高い。放水が行われた 4 日後に行われた調査でによると塩分は表層で 0-3、底層でも上流から 2 つめの十三大橋までは 5 以下の値となった。さらにこのとき最下流の伝法大橋の底層で確認された 230 cells L⁻¹ が最大密度であった。すなわち、放水から 1 日程度で河口域から流出したものの以外は低塩分により概ね死滅したと推察される。

本実験において 2 回の試験を行った結果、両試験ともに、1/10 海水では元の培地に戻しても復活しなかった点で共通していたが、Exp.1 では 1/2 海水、1/3 海水とも回復した割合が低かったのに対し、Exp.2 では Exp.1 に比べ回復率が高く、希釈に従い回復率が下がる傾向が確認された。Exp.1 は対数増殖初期、Exp.2 は対数増殖中期を想定して実施されたものである。すなわち、この結果は増殖初期には塩分に対する耐性が、対数増殖中期に比べ低いことを示唆している。したがって、*A. tamarense* が赤潮になる前の早い時期に塩分を低下させることにより同水域における増殖をより効率的に抑制できる可能性が示された。以上のことから、河口堰からの放水は、赤潮発生時には一定の効果が期待できることが明らかになった。一方で *A. tamarense* の増殖と貝毒の予防のためには、増殖初期に一定量の放水を確保する必要があると考えられた。

河口感潮域における麻痺性貝毒のリスク管理

国内においては、ヤマトシジミの規制値（4 MU g⁻¹）を超える淀川の貝毒は初の報告であるが（山本ら，2009b），厚生労働省の HP（<http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/ihan/index.html>）では輸入されたシジミについて、食品衛生法違反事例としてたびたび報告されている（例えば平成 13 年 5 月分、活けシジミ 13.7 MU g⁻¹、下関検疫所）。また、平成 18 年には徳島県の吉野川河口域のヤマトシジミで 2.0 MU g⁻¹ の毒量が確認されている（酒井，2008）。

淀川では近年ヤマトシジミが安定して漁獲されており、地元漁協は特産物としてブランド化を目指している。しかし、2007 年の赤潮発生後には風評により、地元漁協での取扱量が大きく減少し（大美未発表）、同水域における麻痺性貝毒の発生が漁業に与える影響は

小さくない。本章で実施した調査において、2007年、2008年とも麻痺性貝毒の原因となる可能性のある *Alexandrium* 属シストが淀川大堰より下流の感潮域ほぼ全域に存在することが確認された。2008年春期の淀川河口域における *A. tamarense* の発生状況としては最大 $6.9 \text{ cells mL}^{-1}$ と前年に比べると規模は大きくなかったが、河口感潮域の広い範囲で確認されたことから (Yamamoto et al., 2013), 2008年の採泥で確認されたシストは前年蓄積したものだけではなく、2008年に形成されたものも含まれると考えられる。シストは *seed population* として次年度以降の遊泳細胞の供給源となっており (Anderson and Wall, 1978), 本研究においても発芽試験により同様の可能性が示されたことから、淀川感潮域における *A. tamarense* の増殖は単年の特異的な現象ではなく、今後は普通に起こりうるものと危惧される。さらに発芽可能なシストは1年後も同程度存在したことから、経年的に遊泳細胞の出現とシストの形成が起こることが予想され、今後も同水域において麻痺性貝毒によりヤマトシジミが毒化するリスクが存在すると想定される。前述の通り、海域においては1979年の水産庁通達に基づき貝毒プランクトンを対象としたモニタリング体制の充実が図られた結果、各都道府県において、主に採貝漁業や貝類養殖が行われている海域の貝毒モニタリングがなされているが、河口感潮域についてはモニタリング対象から除外されている。同水域に生息するヤマトシジミにおける食の安全を確保するためには、今後も感潮域におけるモニタリングを継続して行う必要がある。また、海域と同様に珪藻の圧倒的な増殖、または鉛直混合などの水域構造の変化が *A. tamarense* の増殖を制御する可能性が示唆され、さらに増殖初期ほど塩分低下の影響を受けやすいと推測されたことから、貝毒の発生が予想される時期には河口堰からの放水量を増やすことによって塩分を下げ、さらには珪藻の増殖を促すなどの手段を検討する必要があると思われる。

第4章 大阪湾における海洋環境の長期変化と *Alexandrium tamarense* の増殖

第1章でも示したとおり、大阪湾における貝毒の問題は2002年以降顕在化したもので、比較的新しい問題である。しかしながら、大阪湾においては第2章で示したとおり、世界でも例を見ない栄養細胞の大規模発生とシストの蓄積が確認されている。

本章では大阪湾で1970年代から行っている環境モニタリングデータを整理し、*Alexandrium tamarense* の主増殖期である春季における環境の長期的な変化傾向を明らかにし、*A. tamarense* の出現動態との関係を検討した。さらに周辺海域における環境変化と *A. tamarense* 出現の経年変化と比較することで、近年大阪湾で大規模増殖が頻発するようになった要因を考察した。

第1節 *Alexandrium tamarense* 栄養細胞の長期的出現状況と春季の環境変化

材料と方法

Alexandrium tamarense 栄養細胞出現の長期経年変動の検討には、1994年以降は筆者らが実計数した年間最高細胞密度を、1993年以前は大阪府立水産試験場事業報告に記載されているデータを使用した。水質項目の長期経年変動の検討は、大阪府立環境農林水産総合研究所水産技術センター（旧大阪府立水産試験場）が月1回の頻度で、各月上旬に大阪湾の20定点（Fig. 2-1A）で行っている浅海定線調査のデータを用いた。水温と塩分については、2月から5月の4ヶ月分のデータを、DIN、DIP、クロロフィル *a* については、年4回の頻度で行っている浅海定線調査の特殊項目のうち2月と5月のデータを使用した。トレンド解析は Mann-Kendall 検定法により行った。検定には R 3.0.1 (R Core Team, 2013) を使用した。その他の植物プランクトンのうち珪藻類については、2000年から2016年の湾東部のほぼ中央に位置する定点 a で、月2回から5回の頻度で計数されたデータを使用した。なお、その他の植物プランクトンについては、前述の *A. tamarense* 栄養細胞と同様に現場で25%グルタルアルデヒド水溶液を最終濃度2.5%となるように加えて固定した表層水を実験室に持ち帰り、*A. tamarense* と同様に1mL中の細胞数を生物顕微鏡下で直接計数して細胞密度を求めた。

結果

Alexandrium tamarense 栄養細胞の長期的出現状況

Fig. 4-1 に1975年から2016年の春季（2月-5月）における水温、塩分、溶存態無機栄養塩、クロロフィル *a*、定点調査における *A. tamarense* 年間最高細胞密度の経年変化をそれぞれ示した。2月と3月の水温はほとんど同様の変化を示し、ほぼ横ばいであった。また、4月と5月の水温は、それぞれ有意水準95%、99%で有意な上昇傾向を示した。塩分はいずれの月も有意な変動傾向は認められなかった。DINの2月と5月の平均値は4.02-30.93 μM で変化し、1980年代から継続して減少傾向を示したが、2000年代以降は減少傾向が顕著となった。DIPは0.13-0.82 μM で変化し、1990年代まで急激に減少した後、2000年代以

降横ばい傾向を示したが、減少傾向は2月の値において顕著であった。DIN, DIPとも2月と5月の平均は、有意水準99%で有意な減少傾向を示した。以上の値から計算したDIN:DIPは24.75–79.85で変化したが、トレンドについては一定の傾向は見いだせなかった。クロロフィル a の2月と5月の平均は、1977年以降、有意水準95%で有意に減少傾向にあった。さらに2002年以降は有意水準99%で顕著な減少傾向が認められた。大阪府立水産試験場事業報告から抽出した1993年以前の1978年と1986年のデータは、*Protogonyaulax tamarensis* 類似種として記載されており、それぞれ660 cells mL⁻¹, 4 cells mL⁻¹である。1978年の高い値は5月中旬に観察されたものであり(矢持ら, 1980), 状況(水温18.1 °C, 塩分31.15, 貝毒検査結果はNo detection)として*Alexandrium catenella* であると判断される。1993年以前の記録はこれら以外に存在しなかった。1994年以降の最高細胞密度は1994年に13 cells mL⁻¹となった後、2000年まで10 cells mL⁻¹以下のレベルで推移した。2002年に37 cells mL⁻¹まで増殖した後、2005年まで再び低レベルとなったが、その後はほぼ毎年大規模な増殖がみられた。

大阪湾における春季の環境と *A. tamarensis* 出現との関係

第2章において、*A. tamarensis* の増殖に低栄養塩と低クロロフィルが関わっていることを示した。このことから、1994年以降のデータにより、溶存無機態栄養塩(DIN, DIP), クロロフィル a , 2月から5月に最も優占していた珪藻 *Skeletonema spp.* の定点 a における平均細胞密度のそれぞれについて、*A. tamarensis* 最高細胞密度との関係を Fig. 4-2 に示した。これら4項目のうち、DIP, クロロフィル a は、本種との有意な相関は認められなかったが、どちらも低濃度の年に高い細胞密度で確認される点で共通していた。一方、溶存無機態窒素(DIN)と *Skeletonema spp.* の平均細胞密度については、ともに有意な負の相関が認められた(それぞれ $r=0.69, P<0.01, r=0.62, P<0.01$)。

考察

大阪湾における環境要因の長期経年変動と *A. tamarensis* の出現状況

大阪湾における春季の水温を見ると、2月と3月には一定の変動傾向は確認されなかったが、4月は有意な上昇傾向が認められた。*A. tamarensis* の出現は概ね季節が限られていることから、水温の季節的な変動は *A. tamarensis* の出現時期に対して広義では影響していると考えられる。一方で、水温の長期的上昇に伴う出現時期の早期化は認められず、またピーク時の水温は必ずしも一定でなかったことから(第2章第1節), 近年の規模拡大について水温は大きく関与していないと推測される。また、塩分についても長期的に一定の変動傾向を確認できなかったことから、短期間の増殖に寄与している可能性はあるが、大規模増殖への影響は小さいと推測される。栄養塩については前述の通り、短期の増殖においてはDIPの減少が増殖の引き金になっている可能性を示した。しかしながら、長期変動傾向からはDIPよりもむしろDINで *A. tamarensis* 出現との相関関係が確認された(Fig. 4-2)。

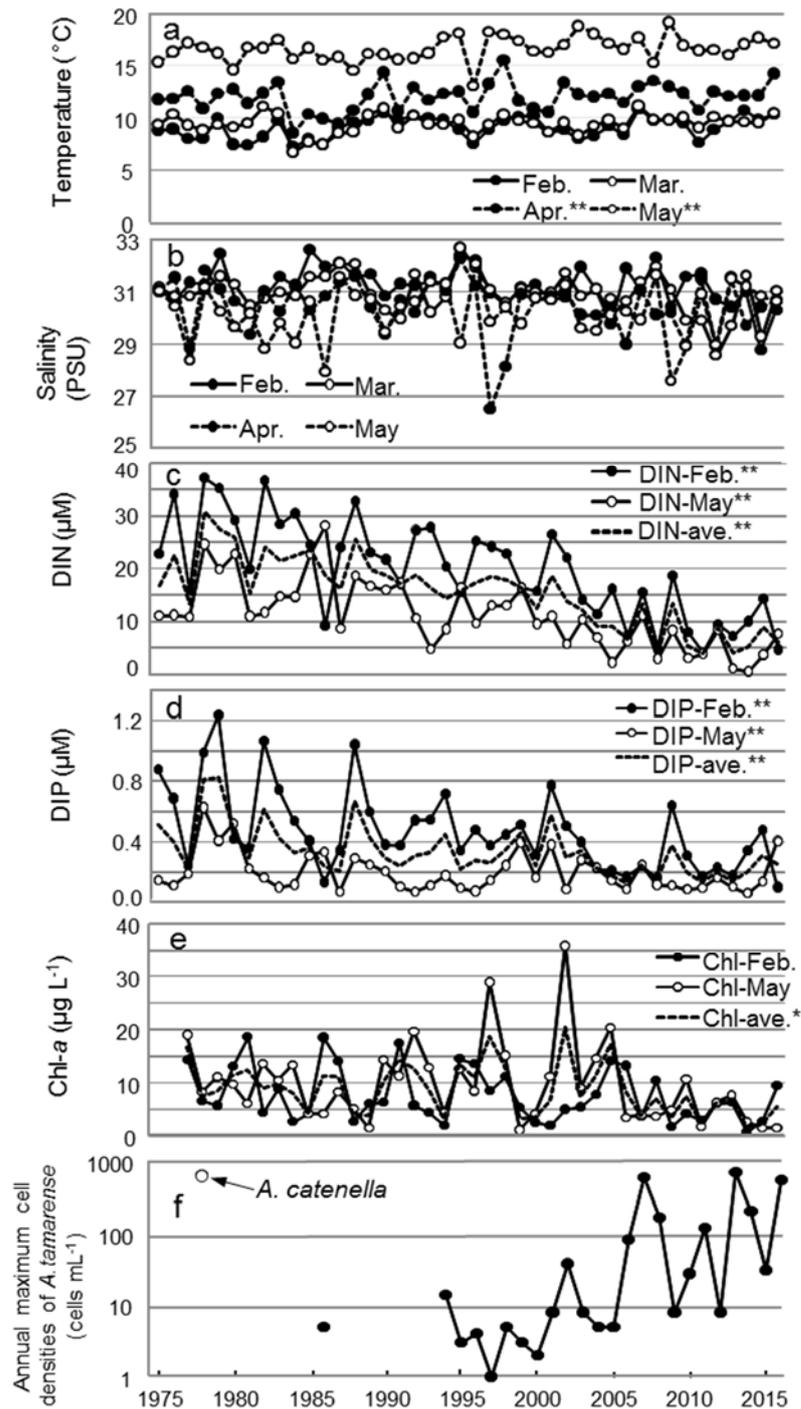


Fig. 4-1. Long term fluctuations of water temperature (a), salinity (b), DIN (c), DIP (d), Chlorophyll-a (e) and maximum cell densities of *Alexandrium tamarensis* in Osaka Bay from 1975 to 2016. Cell density in 1978 (○) have a high probability of *Alexandrium catenella* due to the bloom period of late May, and very low toxin contamination to bivalves. **: significantly increase or decrease, $p < 0.01$, *: significantly increase or decrease, $p < 0.05$ (Mann-Kendall test) (modified from Yamamoto et al., 2017).

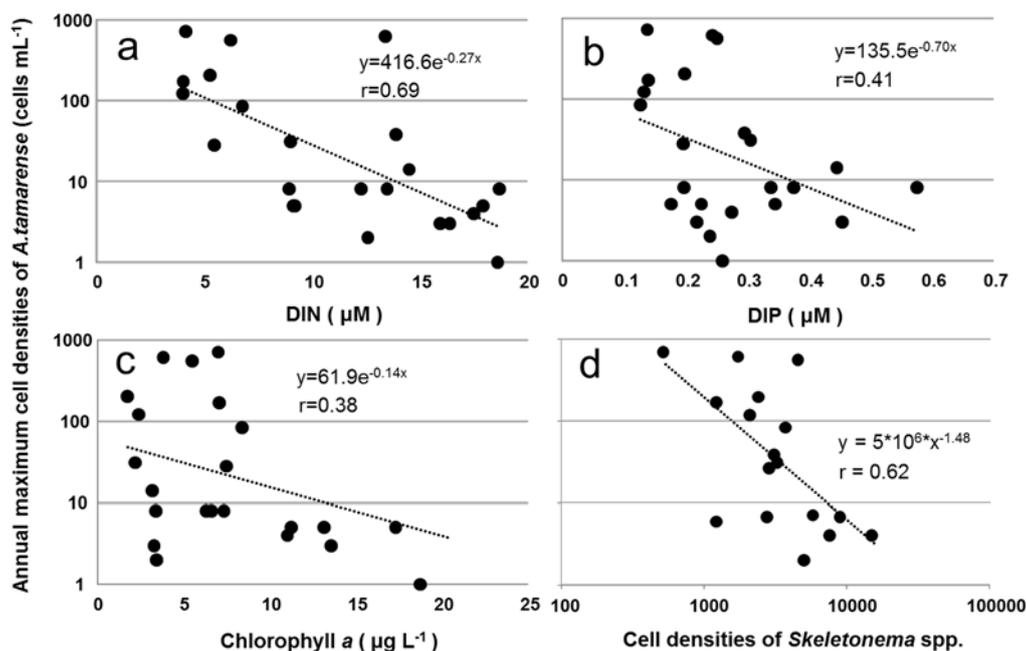


Fig. 4-2. Relationships between cell densities of *Alexandrium tamarensis* (>1 cell mL⁻¹) and DIN, DIP, chlorophyll a, cell densities of *Skeletonema* spp., respectively. Data were obtained from 1994 to 2016 (DIN, DIP, Chlorophyll a) and 2000 to 2016 (*Skeletonema* spp.). DIN, DIP, Chlorophyll a: average of February and May, *Skeletonema* spp.: Average cell densities of *Skeletonema* spp. from Feb. to May at Stn. A (modified from Yamamoto et al., 2017).

呉ら (2005) は、DIN : DIP 比から有害、有毒渦鞭毛藻類の出現を検討し、DIN : DIP 比が高い海域では渦鞭毛藻が優占するが、同比が高くても DIP の絶対濃度が依然高い大阪湾では、DIP が必ずしも制限要因にならないため珪藻が優占すると推察している。DIN : DIP が高い大阪湾においては、近年 DIN および DIP の絶対濃度が低下することにより、呉ら (2005) で示された 1990 年代当時より大阪湾が渦鞭毛藻の増殖に有利な条件となっていることが推測された。瀬戸内海では 1960 年代の高度成長に伴う水質汚濁対策として 1973 年に施行された瀬戸内海環境保全臨時措置法が、1978 年には特別措置法として恒久法化され、COD の排出規制に加え産業排水中のリンの削減指導が行われた。その結果、1980 年代には瀬戸内海域のリン濃度は急速に低下した後、近年は横ばいで推移している (藤原, 2014)。春季の大阪湾における DIP 濃度は減少傾向にあり、5 月は緩やかな減少もしくはほぼ横ばいであるが、*A. tamarensis* の増殖初期にあたる 2 月は顕著な減少傾向を示している (Fig. 4-1)。DIN も瀬戸内海、大阪湾ともに減少傾向がみられる (藤原, 2014)。リンと比較するとその傾向は緩やかであるが、1990 年代後半に窒素も総量規制が指導された結果、DIN も 2000 年以降急速な減少傾向を示した。以上から、大阪湾を含む瀬戸内海における近年の栄養塩の減少傾向は窒素で顕著であるが、春季の大阪湾の栄養塩は窒素だけでなく、リンも顕著な減少傾向にあり、DIN:DIP 比は概ね 20 以上と高いまま、栄養塩の絶対濃

度が低下することによって *A. tamarennse* の増殖しやすい環境になっていると考えられる。さらにクロロフィル *a* も 2000 年代まで変動が大きかったが、2005 年から春季のクロロフィルは低レベルで推移している。Nishikawa et al. (2010) は、播磨灘における長期のモニタリング結果から、栄養塩、特に DIN の減少に伴い珪藻の優占種が *Skeletonema* 属から *Chaetoceros* 属に変化したことを示した。また多田ら (2012) は、大阪湾における珪藻優占種は依然 *Skeletonema* spp. であるが、近年 *Chaetoceros* spp., *Leptocylindrus* spp. 等の比率が上昇してきたことを示している。本研究では、珪藻類のうち期間を通して優占する *Skeletonema* 属の細胞密度と *A. tamarennse* 増殖の関係において、比較的明確な関係性が示された。大阪湾東部海域で *A. tamarennse* の増殖が顕著になったのは 2002 年以降であり、Nishikawa et al. (2010) や多田ら (2012) の報告から判断すると、近年の *A. tamarennse* の増殖規模拡大の原因は、栄養塩の減少とそれに伴う春季の珪藻ブルーム水準の低下、さらには DIN の減少に伴い、優占種であった *Skeletonema* spp. の増殖レベルの低下が要因となっていると考えられた。

大阪湾および周辺海域における *Alexandrium tamarennse* の出現状況

2001 年以前の大阪湾東部海域では、出荷自主規制値を上回る麻痺性貝毒の二枚貝への蓄積は報告されていない。Fig. 4-1 に示したとおり、1993 年以前の大阪湾における本種の出現については散発的にしかデータが存在しない。しかし、大阪湾における増殖が確認される以前から、麻痺性貝毒原因種である本種は要注意種とされており、意識してモニタリングしていることから、記録が残っていない年については出現が確認されないか、ごく低密度の出現に留まっていたと推察される。1993 年以前の麻痺性貝毒原因プランクトンの出現記録として、矢持ら (1980) が 1978 年 5 月に大阪湾の東部海域で *Protogonyaulax tamarennsis* 類似種による赤潮 (最高細胞密度 $660 \text{ cells mL}^{-1}$) を報告している。また、1986 年 5 月には大阪湾北部沿岸に当時造成中であった (財) 大阪産業廃棄物処理公社の埋め立て処分地内水面において、*Protogonyaulax tamarennsis* 類似種として最大 $1,918 \text{ cells mL}^{-1}$ の密度で確認するとともに、定点調査時においても最大 4 cells mL^{-1} で確認していた (矢持未発表)。これらの確認時には貝毒検査を並行して行っており、いずれも麻痺性貝毒は検出されなかったが、濱野ら (1989) は 1986 年 5 月に大阪湾南部から採取したムラサキイガイから 0.6 MU g^{-1} の麻痺性貝毒を検出した。さらに Yamaguchi et al. (1996) は 1993 年に瀬戸内海東部海域で行ったシスト調査において、大阪湾内で最大 $58 \text{ cysts cm}^{-3} \text{ wet sediment}$ の *Alexandrium tamarennse* ないしは *A. catenella* のシストを確認している。これら栄養細胞の出現およびシストの蓄積はいずれも種が特定されておらず、特に 1978 年の出現についてはその時期が 5 月後半であること、高い出現密度であるにもかかわらず、毒化が確認されなかったこと、そして近年の *A. tamarennse* 出現と貝毒の発生状況から、それらは *Alexandrium catenella* であったと判断される。しかし、本研究においても 1994 年以降は *A. tamarennse* 栄養細胞の出現を確認していることから、2002 年の麻痺性貝毒発生に至る *A. tamarennse* の発生頻度増加の

兆候はいくつか確認されていたといえる。

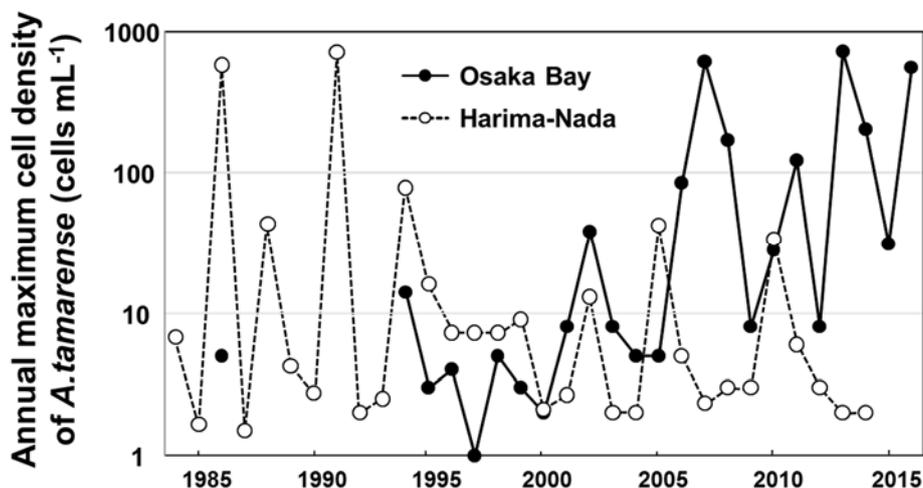


Fig. 4-3. Annual fluctuations of maximum cell densities of *A. tamarensis* in Harima-Nada and Osaka Bay from 1984 to 2016. Data of Harima-Nada was obtained from Kagawa Prefecture (modified from Yamamoto et al., 2017)

一方、大阪湾の西部に位置する播磨灘南部では、1986年4月には既に本種によりアサリで出荷自主規制値を超える麻痺性貝毒の毒化が確認されていた(香川県, 1987, 水産庁, 1992)。さらに1994年4月には大阪湾西部海域に位置する須磨海岸でアサリの毒化が確認されている(水産庁, 1995)。本研究で示したとおり、近年の *A. tamarensis* の出現は大阪湾東部から湾奥が中心となっており、関西国際空港対岸の沿岸域のアサリが最も高毒化している。このように播磨灘-大阪湾西部-大阪湾東部とおおよそ10年程度の時間差をもって、アサリで出荷自主規制値を超える麻痺性貝毒が確認されたことは興味深い。かつて、大阪湾は典型的な富栄養海域として知られ、栄養塩濃度も高く、珪藻類が優占していた(城, 1986)。しかし近年は栄養塩濃度の低下が著しく、特に2000年以降DINの急速な減少傾向が見られており、水産資源の変動との関係についても検討され始めている(樽谷・中嶋, 2011)。多田ら(2014)は北九州の洞海湾、大阪湾、播磨灘の栄養塩が減少していく過程において、海域による栄養塩レベルの違いにより、植物プランクトン優占種の遷移におおよそ10年のタイムラグが見られるとしている。Fig. 4-3に播磨灘南部に位置する香川県における *A. tamarensis* 出現の経年変化(香川県, 1985-2016)と、大阪湾における本種の出現状況を示した。Fig. 4-3に示すとおり、播磨灘において *A. tamarensis* の大増殖が終息するタイミングで、大阪湾において増殖規模が拡大したことが分かる。本研究で示した2000年以降の大阪湾東部海域における最高細胞密度の推移をみると、*A. tamarensis* の発生規模は2002年以降増大傾向に見えるが、大阪湾に先行して栄養塩の低下が著しい播磨灘(Nishikawa et al., 2009)では、2000年以降大規模な発生は確認されなくなっている。大阪湾においてさ

らに栄養塩レベルが低下した場合、播磨灘と同様、大阪湾でも *A. tamarense* の大規模な増殖は終息に向かう可能性があるが、今後も引き続き栄養塩の動向とともに *A. tamarense* の出現動態を注視する必要がある。

第5章 大阪湾における *Alexandrium tamarense* による二枚貝の毒化

Alexandrium tamarense は麻痺性貝毒原因種として世界でも広範囲に分布しており、各地で本種を原因とした麻痺性貝毒による二枚貝等の毒化が報告されている。本種は細胞あたりの毒量も多く（高田ほか2000），赤潮を形成するより遙かに低い密度で二枚貝を毒化させることから、定期的なモニタリングによる増殖の早期把握が重要である。大阪湾において、本種を原因とした麻痺性貝毒による二枚貝の毒化が初めて確認されたのは2002年であり、比較的新しい問題であるが、以降ほぼ毎年春季に本種の増殖と二枚貝の毒化が確認され、中毒被害も報告される（大阪府，2017）など、産業と食の安全・安心の両面において大きな問題となっている。本章では、大阪湾における麻痺性貝毒原因プランクトンの増殖による二枚貝の毒化機構について、大阪湾の特性を踏まえ *A. tamarense* の増殖状況とアカガイやトリガイの毒化状況を基に検討した。

第1節 *Alexandrium tamarense* の出現と二枚貝毒化の関係

緒言

大阪湾では、西日本で一般に問題となるマガキやアサリ、ムラサキイガイだけでなく、底曳き網で漁獲されるアカガイやトリガイ（山本ら，2009；山本・及川，2017），さらには淀川感潮域で漁獲されるヤマトシジミが麻痺性貝毒により毒化する（Yamamoto et al., 2013）。中でもアカガイとトリガイは大阪湾の底曳き網漁業において重要な漁業対象種であり、春季には年間で最も価格が高いこともあり、麻痺性貝毒による出荷自主規制で生じる漁業被害は大きい。そのため、両種における麻痺性貝毒の蓄積に関する知見は、生産現場において重要な情報となる。

本項では、2013年から2015年の3年間、年間を通じて麻痺性貝毒原因プランクトンを調査するとともに、春季を中心にアカガイとトリガイの毒力および毒成分組成の推移を調査し、原因プランクトンの増殖と毒組成の関係、ならびに毒量変化の両種における差異について検討した結果を報告する。

材料と方法

麻痺性貝毒原因プランクトン調査

麻痺性貝毒原因プランクトンのデータは、Fig. 5-1の定点で2013年1月から2015年12月に月2回から4回の頻度で行ったモニタリング調査（第2章）の結果を用いた。

二枚貝の試料採取と処理

アカガイとトリガイはFig. 5-1bに示した大阪府中部に位置する泉佐野漁港において、底曳き網の一種である石桁網で漁獲された漁獲物を入手した。調査は *Alexandrium tamarense* による毒化盛期である2月-5月は週1回、その他の月は月1回としたが、毒量が規制値を上回った場合、6月以降についても行政による安全宣言が出るまで毎週サンプリングを行

った。2月-5月および規制期間においては石桁網を用いて漁業を行っている漁業者1統に依頼し、漁場の聞き取りを行った上でサンプルを入手した。その他の時期については、市場に水揚げされた漁獲物をランダムにサンプリングした。ただし、サンプルを入手した漁業者からは可能な限り漁場の状況について聞き取りを行った。入手したサンプルは原則的に軟体部重量 100 g 以上になるように複数の個体を処理したが、漁獲が著しく少なかった場合は1個体のみからなる試料ないしは欠測となることもあった。マウス試験による毒力の測定は公定法（（社）日本食品衛生協会，2005）に従い、サンプルをホモジナイズ後、酸性条件で煮沸し4℃で 3000 rpm, 10 min.の遠心分離を行い、上清をマウス試験用の抽出液とした。

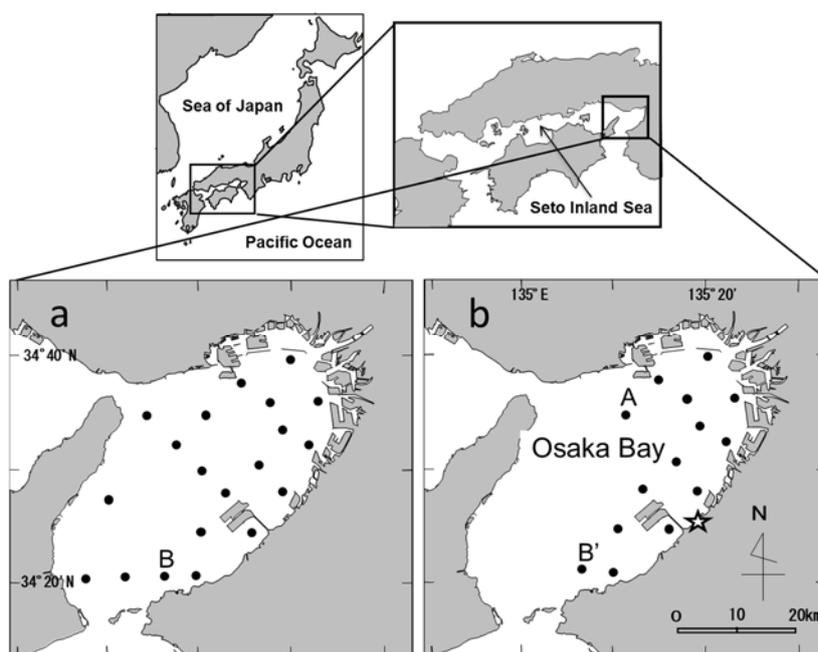


Fig. 5-1. Location of the sampling stations for monitoring of causative paralytic shellfish poisoning dinoflagellate (closed circle) and sampling port for bivalves (star) in Osaka Bay. a: stations for the samplings on every first Monday to Tuesday in each month. b: stations for the samplings on other days of Monday. A: station for samplings usually on every third Monday (middle of month). B and B' : nearby stations, so treated as the same station (modified from Yamamoto and Oikawa, 2017).

二枚貝の毒成分分析

アカガイ、トリガイにおける毒成分の分析は Oshima (1995)が報告したポストカラム蛍光化法により行い、分析用標準品は gonyautoxin 1 (GTX1), GTX2, GTX3, GTX4, decarbamoyl GTX2 (dcGTX2), dcGTX3, N2 1-sulfocarbamoylgonyautoxin 2 (C1), N2 1-sulfocarbamoylgonyautoxin 3 (C2), neosaxitoxin (neoSTX), decarbamoylsaxitoxin(dcSTX), GTX5,

GTX6 , saxitoxin (STX)の計 13 成分を用いた。HPLC 分析装置は Hitachi 製の L-7250 オートサンプラー, L-7100 送液ポンプ, L-7300 反応槽 (65°C) , L-7480 蛍光検出器 (励起波長 330 nm, 蛍光波長 390 nm) を使用し, 分析用カラムは Inertsil C8-3 (GL サイエンス, 4.6 mm id × 250 mm) を用いた。なお, HPLC 分析値から毒力を求めたが, 毒力の算出には Oshima (1995)が報告した比毒性値 (以下, HPLC 毒力とする) を用いた。

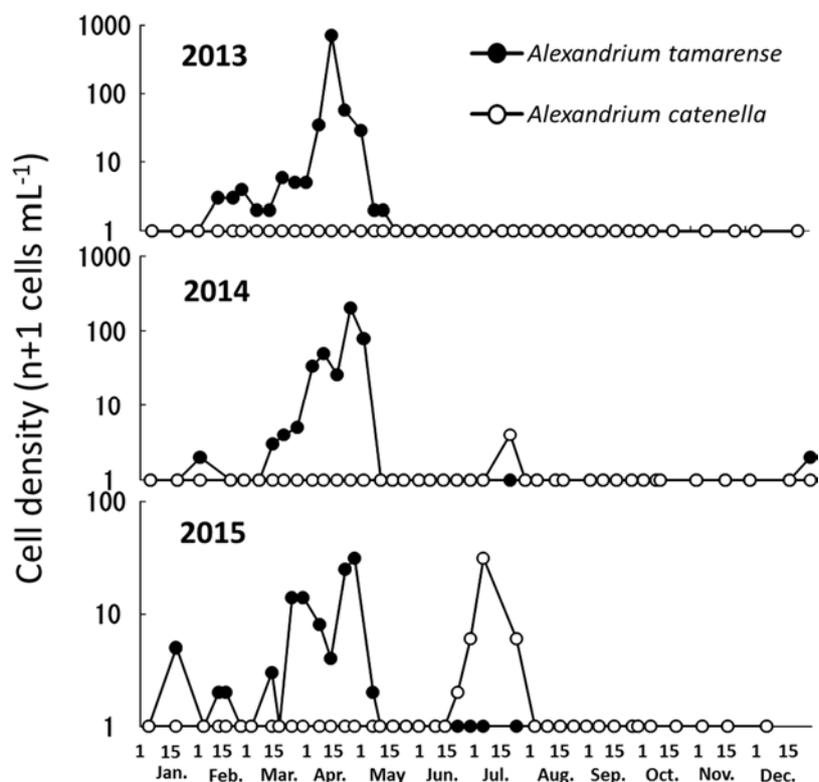


Fig. 5-2. Changes in cell densities of *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* in Osaka Bay from 2013 to 2015. In order to display the logarithmic graph, 1 is added to the density to obtain the value on the vertical axis (modified from Yamamoto and Oikawa., 2017).

結果

麻痺性貝毒原因プランクトン栄養細胞の年別出現状況

2013 年から 2015 年のプランクトン調査で確認された麻痺性貝毒原因種は *A. tamarense* と *Alexandrium catenella* であり, これまで大阪湾で確認事例 (大阪府立環境農林水産相総合研究所, 2016) のある *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium tamiyavanichii* は本調査期間中に確認されなかった。Fig. 5-2 に 2013 年から 2015 年における *A. tamarense* および *A. catenella* の年別出現状況を示した。

2013 年の *A. tamarense* は 2 月中旬から出現が確認され, 4 月上旬まで 10 cells mL⁻¹ 未満で推移したが, 4 月中旬にかけて急速に増殖し, 4 月 15 日に 714 cells mL⁻¹ で最大となった後

減少し、5月下旬には確認されなくなった。2014年は2月上旬に確認された後、3月上旬まで確認されず、その後も3月下旬まで低密度であった。4月上旬から急速に増殖し、4月中旬にいったん減少したが、4月22日に202 cells mL⁻¹で最大となった。その後、急速に減少し5月上旬には確認されなくなった。2014年はさらに12月下旬にも出現が確認された。2015年は過去2年より早く1月中旬に確認され、3月中旬まで低密度で推移した。3月下旬に10 cells mL⁻¹を超えたが、4月上旬から中旬にかけていったん減少した。その後、4月下旬に再び増加して4月下旬に30 cells mL⁻¹で最大となった後急速に減少し、5月中旬には確認されなくなった。

一方 *A. catenella* は、2013年は確認されず、2014年は7月中旬に3 cells mL⁻¹で確認されたのみであった。2015年は6月下旬に確認され、7月上旬に30 cells mL⁻¹で最大となった後、8月上旬には確認されなくなった。

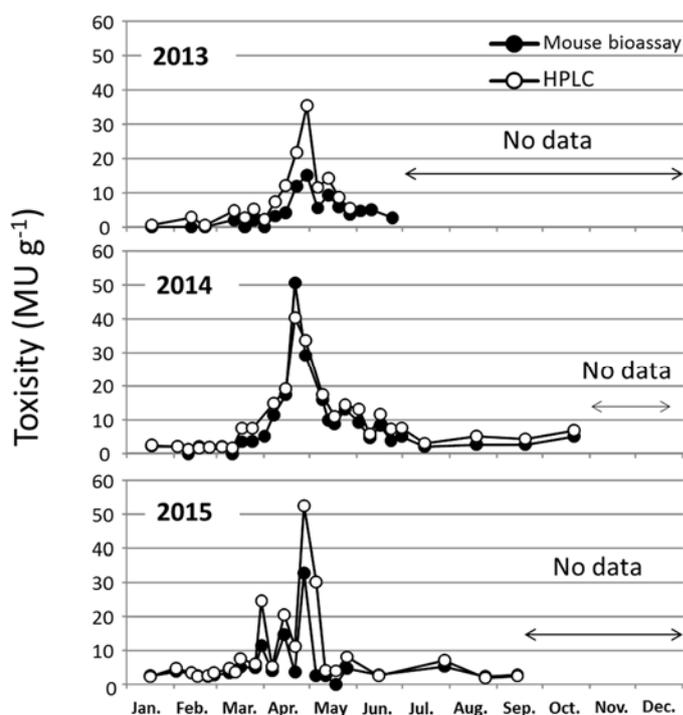


Fig. 5-3. Changes of toxicity in Arc Shell analyzed by mouse bioassay and high performance liquid chromatograph (HPLC) from 2013 to 2015 (modified from Yamamoto and Oikawa, 2017).

アカガイの毒量および毒成分の経時変化

Fig. 5-3 に2013年から2015年のアカガイにおけるマウスアッセイ毒力（以下マウス毒力とする）並びにHPLCによって測定した毒力（以下HPLC毒力とする）の推移を示した。

2013年のマウス試験では3月上旬のサンプルから検出限界（2 MU g⁻¹）を超え、4月上旬までは検出限界近くで推移したが、4月下旬にかけて上昇し4月29日に期間最大の15.2

MU g⁻¹となった。HPLC 毒力はマウス毒力より常に高めの傾向を示し、同日に 35.4 MU g⁻¹ で最大となった。2014 年はマウス毒力で 1 月から検出限界を超えており、HPLC でも同程度の値を示していた。その後、毒力はともに 3 月上旬まで 2 MU g⁻¹ 前後で推移した後徐々に上昇し、4 月 21 日に期間最大の毒力を示し、マウス毒力と HPLC 毒力でそれぞれ 50.6 MU g⁻¹、40.3 MU g⁻¹ となった。その後 5 月上旬にかけて毒力は急速に減少したが、中旬以降 6 月上旬まで 10 MU g⁻¹ 前後を維持し、7 月上旬まで規制値 (4 MU g⁻¹) を上回った。さらに 7 月中旬以降 9 月までは規制値以下の濃度であったが、8 月および 10 月のサンプルにおいてマウス毒力、HPLC 毒力とも濃度が再び上昇した。このように、マウス毒力と HPLC 毒力は期間を通じて概ね同様の値であった。2015 年は 2014 年と同様、1 月にはマウス毒力で陽性となった。マウス毒力は HPLC 毒力と同様の毒力を示し、3 月上旬まで 2-3 MU g⁻¹ で推移した。その後 3 月中旬から毒力は上昇傾向となったが、1 週ごとに増減し 4 月 27 日に最大となった。このときマウス毒力と HPLC 毒力はそれぞれ 32.8 MU g⁻¹ と 52.4 MU g⁻¹ を示した。5 月上旬以降は急速に減少したが、9 月のサンプルまでおおむねマウス試験の検出限界である 2 MU g⁻¹ を上回る値であった。

以上のように、アカガイの毒力は 3 年ともマウス毒力、HPLC 毒力ともに同様の変動傾向を示したが、2013 年の 1 月-3 月を除き、調査を行ったほぼすべてのサンプルでマウス試験の検出限界を下回ることはなかった。

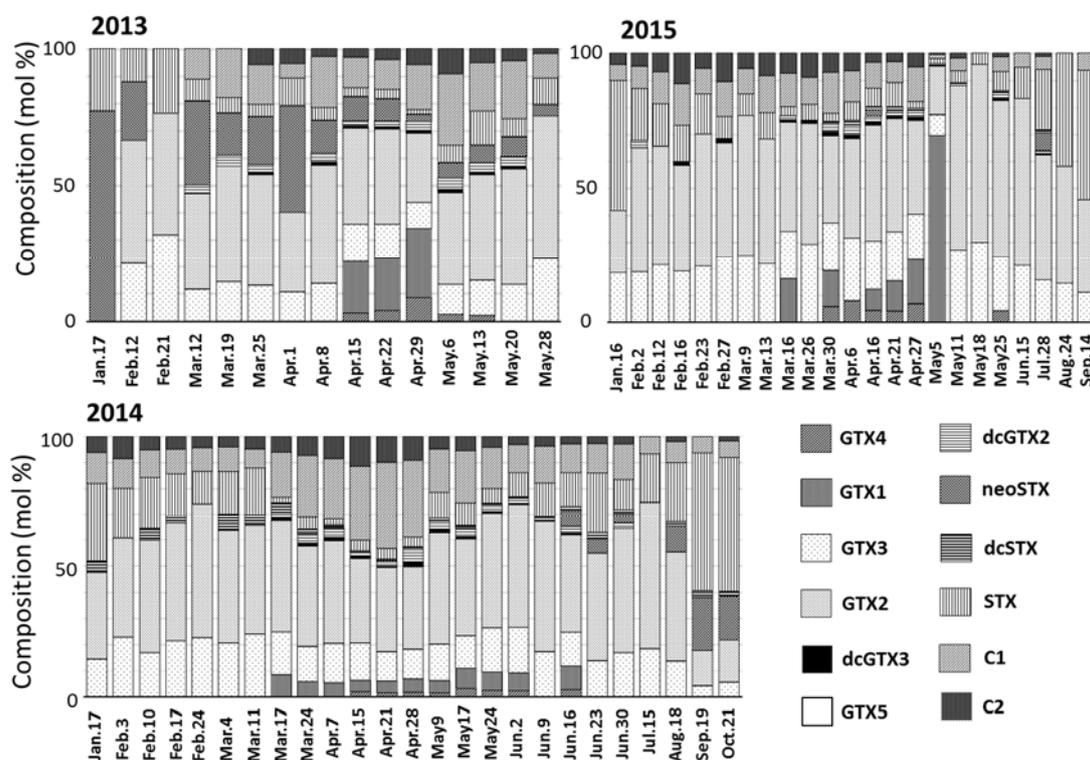


Fig. 5-4. Changes in composition of toxin components in Arc Shell from 2013 to 2015 (modified from Yamamoto and Oikawa, 2017).

Fig. 5-4 に 2013 年から 2015 年のアカガイにおける各年の毒成分組成の変化を示した。3 年間の調査期間を通じて最も高い割合（平均約 55%）を占めたのは GTX2 および GTX3 であった。また、弱毒成分である C1, C2 も一定割合で（15-20%）検出された。GTX1 および GTX4 は 2013 年には 4 月 15 日から 5 月 13 日のサンプルで、2014 年は 3 月 17 日から 6 月 2 日のサンプルおよび 6 月 16 日のサンプルで、2015 年は 3 月 16 日、5 月 25 日および 3 月 30 日から 5 月 5 日のサンプルでそれぞれ検出された。GTX1 および GTX4 が増加する期間は C1, C2 の割合も増加する傾向がみられ、GTX1 および GTX4 の増減傾向は C1, C2 の増減傾向と類似していた。STX は GTX1 および GTX4 と異なる推移を示し、GTX1,4 の割合が低くなると STX は高い割合を占める傾向があった。すなわち、毒化ピークから離れるに従い全体に占める STX の割合は高くなった。neoSTX は 2013 年には比較的高い割合で検出され、他の年は 2014 年の後半を除くとほとんど検出されなかった。dcGTX3, dcGTX2, dcSTX は検出されたがいずれも低い値であった。また、GTX5 および GTX6 は調査期間中まったく検出されなかった。

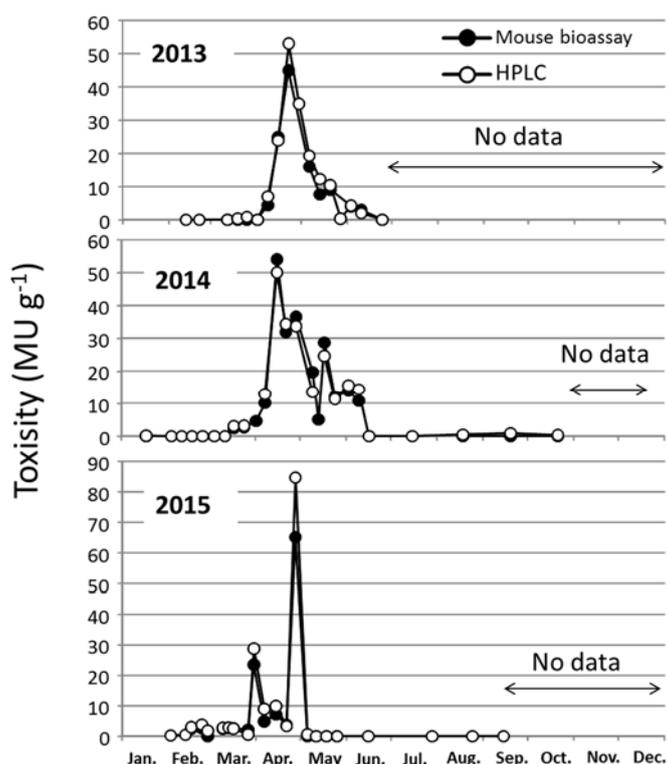


Fig. 5-5. Changes of toxicity in Japanese Cockle analyzed by mouse bioassay and high performance liquid chromatograph (HPLC) from 2013 to 2015 (modified from Yamamoto and Oikawa, 2017).

トリガイの毒量および毒成分の経時変化

Fig. 5-5 に 2013 年から 2015 年のトリガイにおけるマウス試験による毒力推移と、HPLC の分析結果から Oshima (1995) が示した比毒性に従いマウス毒性値に換算したもの (HPLC 毒力) を併せて示した。2013 年はマウス試験、HPLC 毒力とも 3 月下旬までマウス試験の検出限界 (2 MU g^{-1}) 以下で推移していたが、4 月上旬のサンプルでマウス毒力、HPLC 毒力とも規制値 (4 MU g^{-1}) を上回った。その後、4 月下旬まで毒力は大きく増加し、4 月 22 日のサンプルで最大となった。そのときのマウス毒力、HPLC 毒力はそれぞれ 44.8 MU g^{-1} 、 52.9 MU g^{-1} であった。その後毒力は速やかに減少し、6 月上旬に規制値を下回り、下旬には検出されなくなった。2014 年は 3 月上旬までマウス試験は実施しなかったが、HPLC 分析では麻痺性貝毒成分は全く検出されなかった。しかし、3 月中旬のサンプルでマウス毒力、HPLC 毒力とも 2 MU g^{-1} を上回った後に大きく増加し、4 月 15 日に最大の毒力を示し、マウス毒力で 54.0 MU g^{-1} 、HPLC 分析からの換算値で 50.0 MU g^{-1} となった。その後、毒力は 5 月中旬まで速やかに減少したが、5 月 17 日のサンプルで再び増加した。なお、5 月下旬以降は急速に減少し 6 月中旬以降は検出されなくなった。2015 年はマウス毒力、HPLC 毒力とも 2 月中旬のサンプルで 2 MU g^{-1} を上回った。3 月下旬まで 2 MU g^{-1} 前後で推移した後、3 月 30 日に濃度上昇がみられたが、すぐに減少し、4 月 21 日にはマウス毒力、HPLC 毒力とも規制値を下回った。その後、4 月 27 日のサンプルで再び急増し、期間最大の毒力 (マウス毒力、HPLC 毒力でそれぞれ 65.2 MU g^{-1} 、 84.7 MU g^{-1}) を示したが 1 週間後の 5 月 5 日のサンプル以降、マウス毒力、HPLC 毒力とも検出限界以下の低濃度となった。

以上のように、トリガイの毒力は 3 年ともマウス毒力、HPLC 毒力とも同様の変動傾向を示し、アカガイより両分析の値は近似していた。また、アカガイとは異なり、春季の原因プランクトンが出現する時期以外は、麻痺性貝毒成分は検出されないことが多かった。

Fig. 5-6 に 2013 年から 2015 年のトリガイにおける各年の毒成分組成の変化を示した。3 年間の調査期間を通じて最も高い割合 (約 30–60%) を占めたのは弱毒成分の C1 および C2 であった。GTX1 および GTX4 は 2013 年には 4 月 8 日から 5 月 20 日のサンプルで、2014 年は 3 月 17 日から 6 月 9 日までのサンプルで、2015 年は 2 月 16 日から 3 月 16 日および 3 月 30 日から 4 月 27 日のサンプルで高い割合 (GTX1+4 で約 20–40%) で検出された。GTX2 および GTX3 の検出期間は GTX1 および GTX4 とほぼ同様であったが、GTX1,4 よりも長期間にわたり検出される傾向があった。STX は毒化した期間の後半に検出されることが多く、2014 年の 10 月についてはほぼ 100% となった。neoSTX は 2013 年には比較的高い割合で検出されたが他の年については低い割合にとどまった。dcGTX2 および dcGTX3 は低い割合ではあるが、GTX1, 4 と同様の時期に検出された。dcSTX は検出されたがいずれも低い割合であった。また、アカガイ同様、GTX5 および GTX6 は調査期間中まったく検出されなかった。

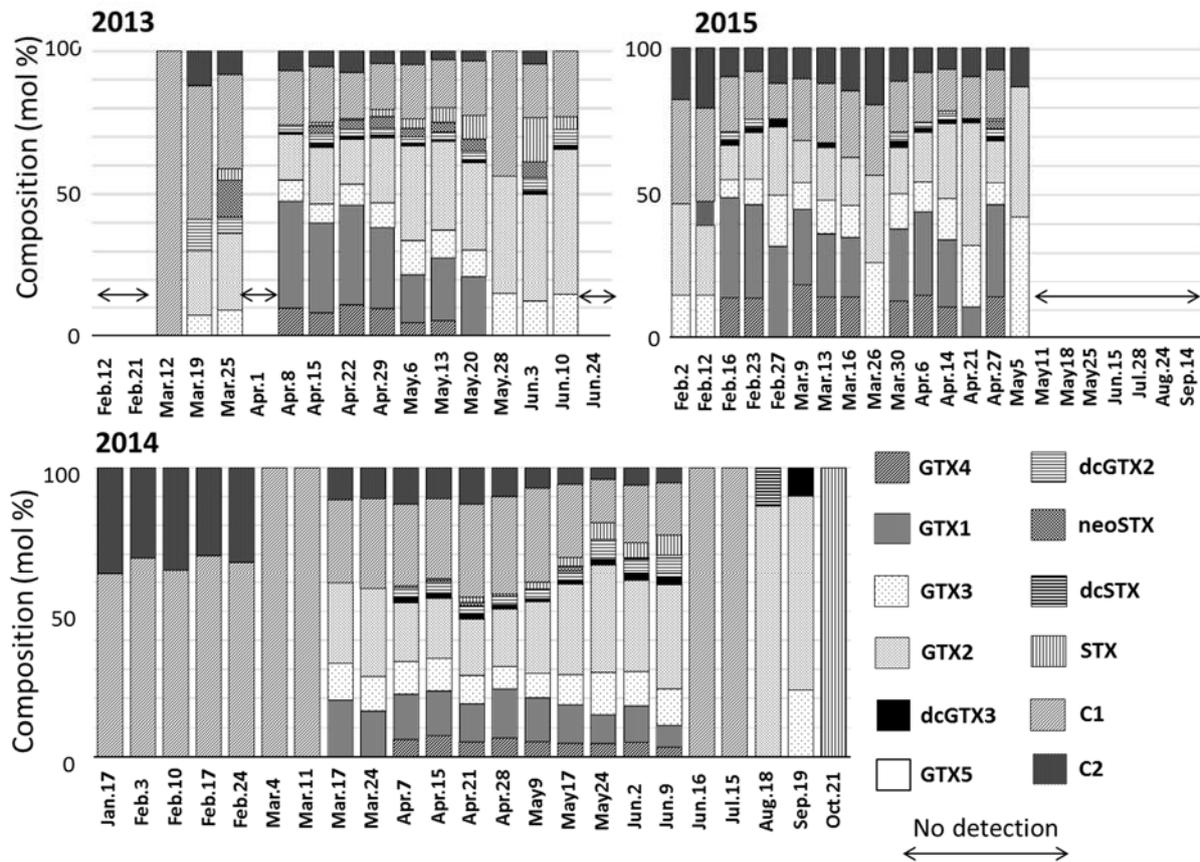


Fig. 5-6. Changes in composition of toxin component in Japanese Cockle from 2013 to 2015 (modified from Yamamoto and Oikawa, 2017).

考察

大阪湾における麻痺性貝毒原因プランクトンの増殖と麻痺性貝毒の発生レベル

2013年から2015年において、麻痺性貝毒原因プランクトンは *A. tamarense* が3年間共通で3月から4月後半にかけて出現した。一方、*A. catenella* は7月を中心に増殖した。また、この2種以外の麻痺性貝毒原因種はモニタリング調査では確認されなかった。このことから、本研究期間における麻痺性貝毒原因種としては *A. tamarense* および *A. catenella* であると推察された。*A. tamarense* は、いずれの年も、大阪府における警戒密度である 10 cells mL^{-1} を超えて確認された。山本ら (2017) は2002年から2016年まで15年間の *A. tamarense* 出現状況をまとめ、本研究期間3年間すべてを貝毒発生年、うち2013年、2014年を最高細胞密度が $100 \text{ cells mL}^{-1}$ を超える大規模発生年に分類している。一方、マウス試験の最高毒力はアカガイで2013年、2015年、2014年の順に高く、トリガイでは2013年、2014年、2015年の順に高くなっていった。過去に麻痺性貝毒に暴露された二枚貝は有毒プランクトンに対する摂餌抵抗性を増し、今まで汚染されたことのないものよりも高いレベルまで毒を

蓄積しうることが報告されていることから (Twarog, 1974) , *A. tamarense* の増殖レベルが他の2年より低かった2015年にも高い毒力を示した可能性が考えられる。一方, *A. catenella* は最大で 30 cells mL⁻¹であり, 大阪府の警戒密度である 500 cells mL⁻¹ を大きく下回り低密度の発生にとどまった。したがって, 本研究期間におけるアカガイ, トリガイの毒化に対する影響は大きくなかったと推察される。ただし, *A. catenella* の最高細胞密度は増加傾向であり, 今後本種の増殖期間である夏季にも貝毒の発生リスクが高くなる可能性がある。

調査期間中, *G. catenatum* および *A. tamiyavanichii* の出現は確認されなかった。この2種の毒成分として, 栄養細胞では GTX5 が多く検出されることが報告されている (Oshima et al., 1990; 相良ら, 2010) 。本調査期間中, GTX5 は全く検出されていないことから, 毒組成の観点からも2013年から2015年の毒化原因種は *A. tamarense* ないしは *A. catenella* であったと推察される。

麻痺性貝毒原因プランクトンの出現とアカガイの毒量, および毒成分組成の関係

アカガイを3年にわたり調査したが, 最も高い割合で存在した麻痺性貝毒成分は GTX2 および GTX3 であった。坂本・小谷 (1998) は吳湾における *A. tamarense* 栄養細胞の毒量および毒成分を調査し, C1+C2 および GTX1+GTX4 の4成分で80%以上を占めることを示した。さらに, 山本ら (2010) も大阪湾で発生した *A. tamarense* 赤潮において同様の結果を示している。GTX1, GTX4 は主に3月中旬から5月上旬に検出されたが, この期間は *A. tamarense* の増殖期間に一致する。このことから, この期間の GTX1, GTX4 の増加は原因プランクトンの取り込みを反映したものと思われる。二枚貝体内では C1, C2 は中性以上で dcGTX2, 3 に変化する (村上・野口, 2000) 。しかし, 今回の結果ではいずれの年も dcGTX2, 3 の割合は低く推移しており, *A. tamarense* の増殖期間以外ではほとんど検出されないことから, C1, C2 からの変換能は弱く, さらに変換された dcGTX2, 3 は速やかに排出されたと考えられた。一方, N1-OH 基は還元反応により N1-H 基へ変換することで毒成分が変化し, GTX1, GTX4 は GTX2, GTX3 に変化する (Sato et al., 2000) 。さらに Sato et al. (2014) はヘムタンパクの存在によりこの還元反応が触媒されることを報告している。アカガイは通常の軟体動物と異なり, 血液中にヘム色素を持つエリスロクルオリンを含むことは広く知られている。すなわち, GTX1, GTX4 がヘムタンパクにより触媒され, 速やかに還元されることで GTX2, GTX3 が主成分になったと推測される。さらに前述の還元反応により, 最終的に最も安定的な STX に変化する (Shimizu and Yoshida, 1981) が, 本調査研究においても毒化期間の後半になるほど STX の割合は増加した。この傾向は他の二枚貝類でも確認されており, 長期に毒を蓄積する Alaska butter clam *Saxidomus giganteus* では水管に毒が蓄積し STX が毒の主成分となっている (Kevitek and Beitler, 1991) 。本研究において, 2014年10月にはアカガイでマウス毒力の増加が確認されたが, 比毒性の高い STX の割合が増加することにより, 毒力の増加が確認されたと考えられる。

Alexandrium tamarense の出現が確認されなかった6月以降の毒力データが存在する2014

年の8月および10月、2015年の7月においてわずかながら毒力の上昇がみられた。比較的高密度に*A. catenella*が確認された2015年の同種の出現時期は上述の通り7月であった。この時のアカガイの毒組成をみると neoSTX が他のサンプルに比べ多く検出されている。加賀ら (2006) は岩手県沿岸に出現する *Alexandrium* 属数種の毒成分を分析した結果、*A. catenella* では neoSTX が C1+C2 に次いで高い割合を占めることを示した。これらのことから、2015年の毒量の上昇は *A. catenella* によるものであったと考えられる。一方、2014年については同様に6月以降 neoSTX の割合が増加しているが、*A. catenella* は出現しているが極めて低密度であったこと、*A. catenella* の出現時期と毒力の上昇時期が一致しないことから、別の要因が考えられる。このうち、10月の増加は前述のとおり、毒成分が STX へ変換することによる毒性値の上昇の可能性があるが、6月の毒力増加時には栄養細胞出現時期と同様に GTX1 および GTX4 が検出されていた。山本ら (2009b) は大阪湾において *A. tamarense* ないし *A. catenella* のシストを調査したところ、多くの海域で 10^3 cysts cm^{-3} を超える密度で存在することを明らかにした。シストは栄養細胞に比べ、約6倍の高い毒量を持つとされている (Oshima et al., 1992)。Persson et al. (2006) は、*Alexandrium fundyense* シストをカキに捕食させる室内実験を行った結果、シストによる二枚貝の毒化の可能性を示唆している。すなわち、原因プランクトンの増殖が確認されない時期における毒量の上昇についてはシストの捕食による毒化の可能性を考慮する必要があるだろう。

麻痺性貝毒原因プランクトンの出現とトリガイにおける毒量、および毒成分組成の推移

2015年のトリガイにおいて最も高い割合を示した麻痺性貝毒成分は C1 および C2 であった。トリガイにおいてもアカガイ同様、*A. tamarense* 増殖期間に GTX1 および GTX4 の濃度の上昇が確認された。さらに、*A. tamarense* 出現の後半には STX の割合が増加していたが、アカガイほど顕著ではなかった。また、GTX2 および GTX3 は GTX1 および GTX4 の検出前後から検出され始めた。これまで大阪湾以外でのトリガイの毒化事例は少ないが、長谷川ら (2015) は愛知県海域で2014年にトリガイが毒化したことを報告している。このときの原因プランクトンは本研究と同様、*A. tamarense* であったが、本研究と同様毒の主成分は C 群であり、C1+C2 で80%を占めていた。すなわち、トリガイでは C1, C2, GTX1, GTX4 のいずれの成分も変換される割合は低く、残存したものが高い割合で検出されたと考えられた。一方、京都府海域で毒化したトリガイにおける毒成分は C1+C2 が約40%であったが、次いで GTX5 および GTX6 が高い割合を占めていた (尾崎ら, 2016)。京都府の事例は原因プランクトンが *A. tamarense* ではなく *G. catenatum* であった。*G. catenatum* 栄養細胞は GTX5, および GTX6 を主成分として持つことから、これを直接反映したのと考えられる。これらの事例を併せて考えるとトリガイは体内での毒成分の変換が弱く、おおむね現場プランクトンの毒成分を反映した毒成分になると考えられた。

Alexandrium tamarense の出現が確認されなかった6月以降の毒力データが存在する2014年、および2015年のトリガイにおけるマウス毒力は、ほぼ検出限界以下の値で推移した。

2015 年はこの時期 HPLC 分析においても毒成分は検出されなかったが、2014 年の試料では毒成分が検出されていた。この時の検出された毒成分は C1 および GTX2, GTX3, dcSTX, dcGTX3 であり、10 月のみ STX が検出された。ただし、これらはいずれもごく微量であり、プランクトンが消失した後は、短期間でマウス毒力あるいは HPLC で検出される毒成分が減少した。以上のことから、トリガイにおいて毒成分は比較的速やかに排出されると推測され、強毒成分への変換が弱いことと併せ、アカガイより毒力の低下が早いと推察された。

アカガイとトリガイにおける毒化、及び減毒の差異

アカガイとトリガイにおける毒化過程において、本研究期間における主たる麻痺性貝毒原因種と考えられる *A. tamarense* の出現のピークとアカガイ、トリガイの毒化のピークを比較した。*A. tamarense* の出現時期は、2013 年は4月中旬に1回ピークが、2014 年は4月上旬と下旬、2015 年は3月下旬と4月下旬に2回のピークがあった。これに対し、マウス毒力のピークはアカガイでは2013 年は4月下旬、2014 年は4月中旬に1回、2015 年は3月下旬、4月中旬、4月下旬の3回、トリガイでは2013 年が4月中旬に1回、2014 年4月中旬、5月中旬、2015 年が3月下旬、4月下旬の2回とトリガイでは概ね *A. tamarense* のピークと毒化のピークが同時期であったが、アカガイでは1週間から10日のタイムラグがあった。このようにアカガイについては高毒化するまでに比較的日数を要すると考えられることから、毒化初期の対応として、原因プランクトンの増加を指標にリスクを管理することは可能であろう。ただし、後述のとおり年を通して毒化が継続している可能性もあることから漁期前の毒化レベルを確認するといった処置も必要と思われる。トリガイについては、これまでは現行の警戒密度 (10 cells mL^{-1}) で問題が起きていないが、原因プランクトンの増殖ピークと毒化のピークがほぼ同時期であるといった特性を考慮すると、プランクトンの増加と同時に毒化が進行する可能性がある。したがって、アカガイより一段低い密度を警戒値に設定し早期に対応する必要があると考えられる。

一方、減毒過程において最も顕著な違いは原因プランクトンが消滅した後の毒成分の保持期間であった。すなわち、アカガイでは原因プランクトンが確認されなくなった後も低いレベルではあるが麻痺性貝毒が検出されるのに対し、トリガイではほぼ検出されなくなっていた。Fig. 5-7 に2002 年から2016 年に大阪府が実施したアカガイ、トリガイおよびアサリのマウス試験のデータ (<http://www.pref.osaka.lg.jp/shokuhin/shokutyuudoku/kai.html>, 2016 年12月8日) を用いて、それぞれの貝種の年間最高毒量と規制日数の関係を解析した結果を示した。回帰直線の傾きはアサリで最も小さく、トリガイ、アカガイの順に大きくなった。このことはすなわち、同じ二枚貝であっても、アサリ、アカガイ、トリガイでは高毒化しても減毒する速度が貝種によって異なるため規制日数の期間に差が出てくることを示している。以上から、アサリでは高毒化しても速やかに減毒するため規制日数が短く、逆にアカガイでは低い毒量でも減毒が遅く、規制日数が長くなると考えられる。上述のと

おり、アカガイではトリガイに比べ毒成分の変換能が高く、強毒成分である GTX2, GTX3, および STX が原因プランクトン消滅後も長期間検出される。このことがアカガイにおいて長期間毒を保持し続ける要因の一つと考えられる。さらに、アカガイ、トリガイで毒化後期に部位別に毒量を検討した結果、アカガイでは筋肉部分に毒が多く存在したのに対し、トリガイでは内臓にほとんどの毒が存在していた（山本未発表；5-2）。また愛知県におけるトリガイの毒化事例でも可食部である斧足の毒量は低いことが示されている（長谷川ら，2015）。一般的には、有毒プランクトンが最初に取り込まれる消化管や中腸腺に総毒量の過半が含まれることはよく知られている（村上・野口，2000）が、アカガイでは摂取した毒成分が筋肉部にも蓄積され、筋肉部に蓄積した毒成分は排出が遅いことが推測された。このことにより、アカガイについては原因プランクトンの消滅後も一定の警戒レベルを維持する必要があると考えられる。アカガイと比較するとトリガイでは減毒も早く、毒がほぼ完全に消滅する傾向が確認されたため、これまで同様原因プランクトンの動向に注意しつつ、原因種が減少した場合警戒レベルを下げられる可能性も考えられる。ただし、京都府におけるトリガイでは原因プランクトン消滅後も約1か月半程度毒化が継続し他例がある（尾崎ら，2016）。トリガイについては、いまだ事例が少ないこともあり、今後も知見を蓄積する必要がある。

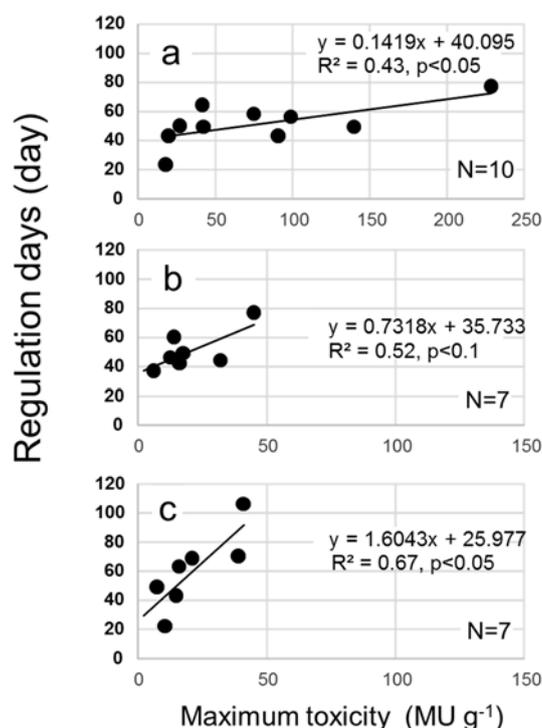


Fig. 5-7. Relationships between regulation days in bivalves from 2002 to 2016 and annual maximum toxicity in each bivalve. a: Manila clam, b: Japanese Cockle, c: Arc Shell. Data is obtained from Osaka Prefectural Fisheries Division (modified from Yamamoto and Oikawa, 2017b).

第2節 アカガイとトリガイにおける麻痺性貝毒の部位別分布と毒成分

緒言

ホタテガイでは中腸腺に麻痺性貝毒が偏在することが、これまでの研究で明らかになっている。ホタテガイ生産が重要な海域においては、この特性を考慮し、生産物として重要な貝柱においては一定の手続きを経ることで、麻痺性貝毒の原因プランクトンの出現とホタテガイの毒化が確認される時期においても出荷を可能としている。また、前出の *Alaska butter clam* では水管に毒が蓄積するなど、貝種ごとに毒の蓄積部位が異なる事例が見られる。加えて、前項においてアカガイとトリガイでは毒化と減毒の過程が異なることが明らかになった。本項では、2014年に *Alexandrium tamarense* により毒化したアカガイとトリガイについて、毒化の後期において部位別の毒量分析と毒成分を調査し、二枚貝体内における麻痺性貝毒の分布状況および毒組成の両種における差異について検討した結果を報告する。なお、本項の結果については、前項においても考察の材料とした。

材料と方法

二枚貝の試料採取と処理

二枚貝試料は Fig. 5-1b に示した大阪府中部に位置する泉佐野漁港において、底曳き網の一種である石桁網で漁獲された漁獲物を入手した。部位別毒量分析用アカガイ、トリガイは2014年5月13日にサンプリングした。このサンプルは毒化ピーク後の後期ものに相当した (Fig. 5-8)。アカガイ、トリガイとも入手したサンプルはそれぞれ、筋肉、ひも+貝柱、鰓、内臓に分け (Fig. 5-9)、それぞれについて毒量および毒成分の分析に供した。アカガイとトリガイは生の状態でそれぞれ8個体、10個体について部位の分割を行った。麻痺性貝毒の抽出はマウス試験による公定法 (社団法人日本食品衛生協会, 2005) に従い、サンプルをホモジナイズ後、酸性条件で煮沸し4℃で3000 rpm, 10 min.の遠心分離を行った後、上清を HPLC 分析用の抽出液とした。

二枚貝の貝毒成分分析

アカガイ、トリガイにおける毒成分の分析は Oshima (1995) が報告したポストカラム蛍光法により行い、分析用標準品は農林水産省消費安全局から配布された gonyautoxin 1 (GTX1), GTX2, GTX3, GTX4, decarbamoyl GTX2 (dcGTX2), dcGTX3, N2 1-sulfocarbamoylgonyautoxin 2 (C1), N2 1-sulfocarbamoylgonyautoxin 3 (C2), neosaxitoxin (neoSTX), 東北大学名誉教授大島泰克博士より分与いただいた decarbamoylsaxitoxin (dcSTX), 水産研究・教育機構中央水産研究所渡邊龍一博士より分与いただいた GTX5, GTX6, 水産研究・教育機構中央水産研究所瀬戸内海区水産研究所にて製造し広島大学浅川学教授に定量していただいた saxitoxin (STX) の計 13 成分を用いた。HPLC 分析装置は Hitachi 製の L-7250 オートサンプラー, L-7100 送液ポンプ, L-7300 反応槽 (65℃), L-7480 蛍光検出器 (励起波長 330 nm, 蛍光波長 390 nm) を使用し、分析用カラムは Inertsil C8-3 (GL サイ

エンス, 4.6 mm id × 250 mm) を用いた。なお, HPLC 分析値から毒力を求めたが, 毒力の算出には Oshima (1995) が報告した比毒性値 (以下, HPLC 毒力とする) を用いた。

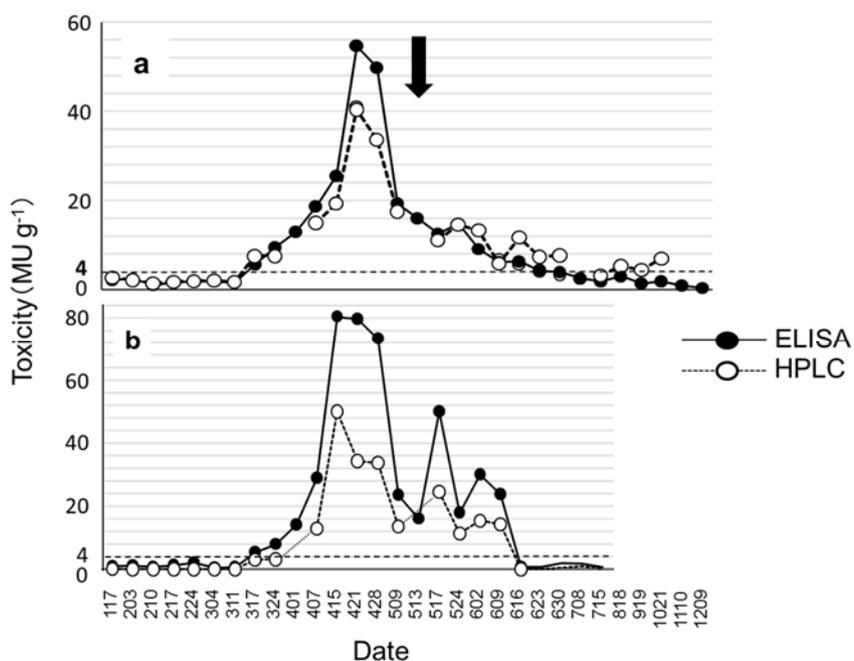


Fig. 5-8. Temporal changes in toxicity of Arc Shell (a) and Japanese Cockle (b) in 2014. Vertical arrow shows sampling day of bivalves. Horizontal dot line shows regulation limit (4MU g^{-1}).

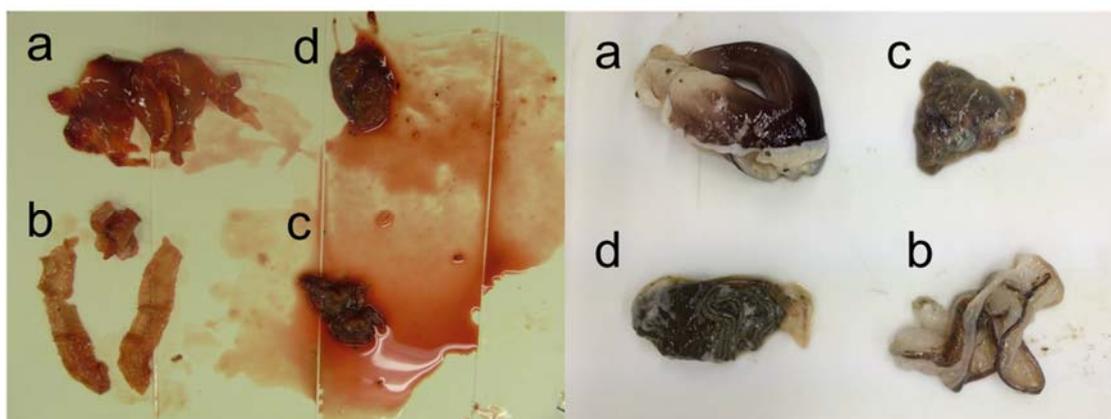


Fig. 5-9 Partition splitting for site-specific toxicity measurement. Left: Arc Shell, right: Japanese Cockle. a: muscle, b: mantle edge and adductor muscle, c: gill, d: viscera.

結果

アカガイにおける部位別毒量と毒成分組成

アカガイ各個体における部位別の毒量の存在割合を Fig. 5-10 に、毒組成を Fig. 5-11 に示した。アカガイの各部位における毒力はひも+貝柱と内臓で最も高い傾向を示したが、重量に応じた毒量割合では可食部の筋肉とひも+貝柱で約 50-85%を占めた。部位別の毒成分割合では各部位とも C1, C2 はほとんど検出されず、GTX2,3 が最も高い割合で、特に鰓では GTX2,3 のみ検出された。加えて、筋肉やひも+貝柱では GTX1 が個体によっては高い割合で出現した。GTX1 が検出される個体では筋肉、ひも+貝柱ともに検出され、どちらかの部位で検出されることはなかった。また、内臓については STX が 20-50%と高い割合を占めており、ひも+貝柱や筋肉においても STX が高い割合で存在する個体が認められた。

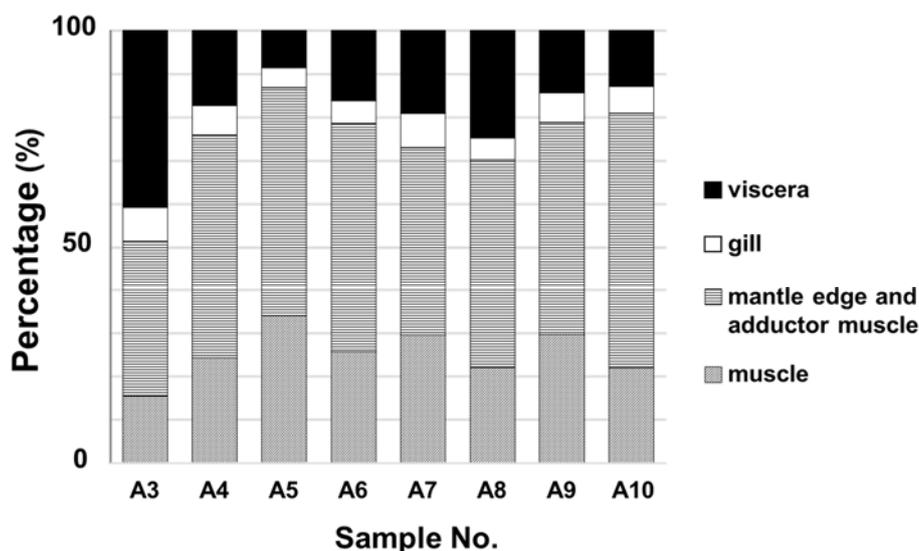


Fig. 5-10 Distribution of toxicity by part in Arc Shell contaminated with PSP toxin.

トリガイにおける部位別毒量と毒成分組成

トリガイの各個体における部位別の毒量の存在割合を Fig. 5-12 に、毒組成を Fig. 5-13 に示した。トリガイの各部位における毒力は内臓で最も高く、鰓、ひも+貝柱、筋肉の順に低くなった。重量に応じた部位ごとの毒量割合では、全毒量の 80-100%が非可食部である内臓と鰓に蓄積されていた。毒成分は C1, C2 および GTX2, 3 が高い割合で検出されたが、内臓ではこれらの成分の他に GTX1, 4 が高い割合で検出された。また、内臓に比べ毒量は低い、鰓やひも+貝柱においては個体によっては STX が比較的高い割合で検出された。

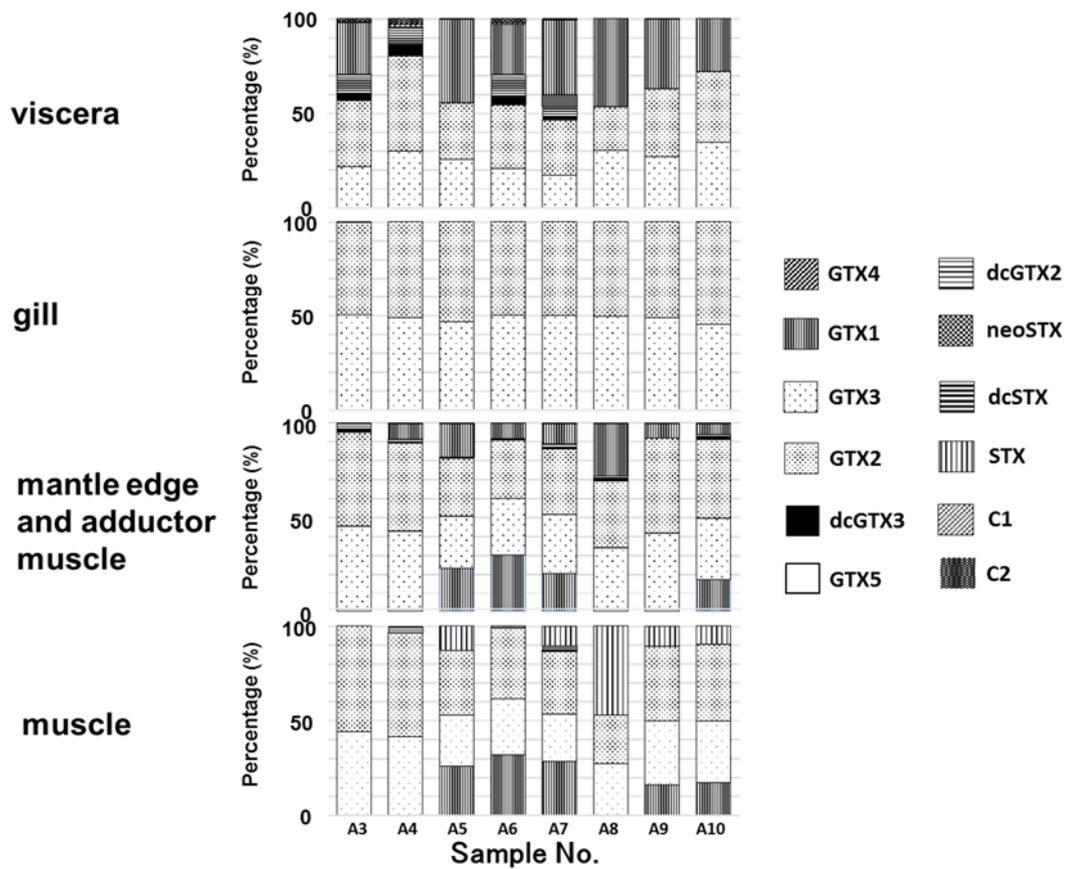


Fig. 5-11 Toxin profiles of Arc Shell at each part.

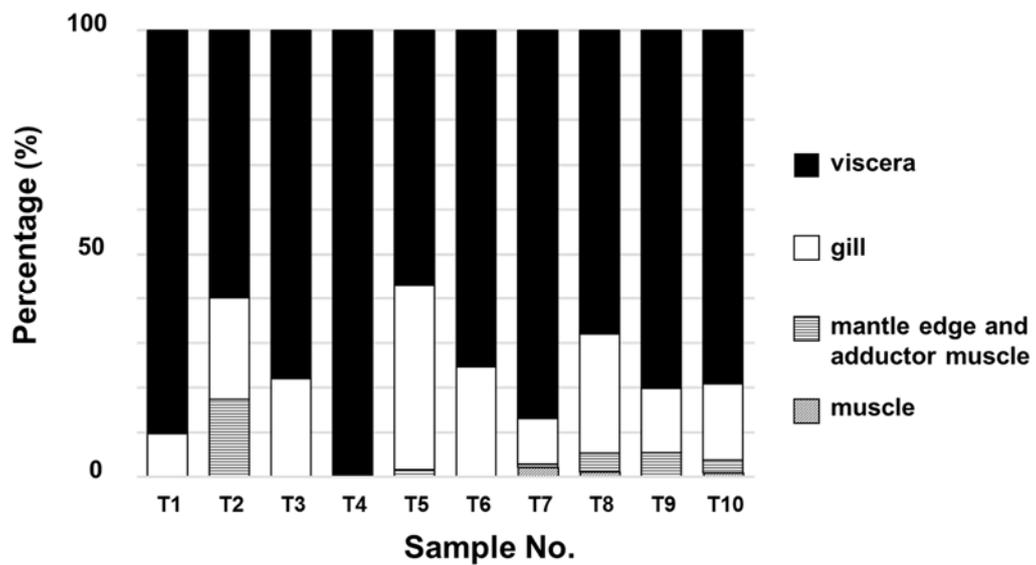


Fig. 5-12 Distribution of toxicity by part in Arc Shell contaminated with PSP.

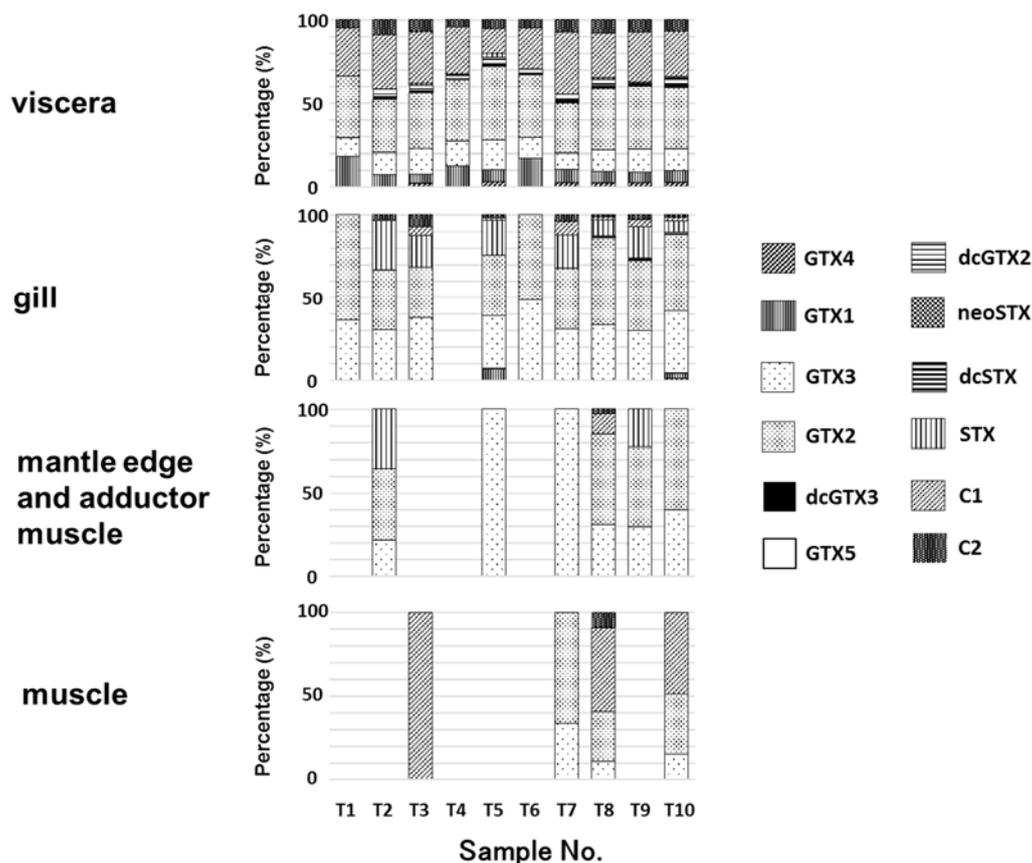


Fig. 5-13 Toxin profiles of Japanese Cockle at each part.

考察

二枚貝における麻痺性貝毒の蓄積部位は、貝種により多様であることが報告されている。例えば前述の通り、ホタテガイでは中腸腺に (Maruyama et al., 1983) , Alaska butter clam では水管に蓄積する (Kvitek and Beitler, 1991) 他、バカガイ科の *Spisula solidissima* では毒化初期には鰓で高い毒を示す (Shumway et al., 1994) 。一方で、運動器官 (閉殻筋や斧足) では毒量比率は低い傾向がある (村上・野口, 2000) 。本研究において、アカガイの部位別の毒力は、閉殻筋 (貝柱) + 外套膜縁辺 (ひも) で最も高く検出された。ホタテガイなどのイタヤガイ科と異なり、アカガイの貝柱は小さく、ひもと合わせて分析したため、ひもでより高い毒が存在した可能性はあるが、アカガイにおいては、一般的には低いこれら部位にも高い毒力が存在する可能性がある。さらに、内蔵に次いで筋肉でも高い毒力が検出された。筋肉は重量では最も高い割合を占めることから、各部位の重量で補正した毒量の存在割合では、ひも+貝柱と合わせて半分以上が可食部 (ひも、貝柱および筋肉) に存在した (Fig. 5-14) 。したがって、アカガイについてはホタテガイ等とは異なり、可食部のみの出荷も困難であると考えられた。一方、トリガイにおける部位別毒力は内臓で最も高い

値で検出された。トリガイにおいては筋肉ではほとんど毒が検出されず、ひも+貝柱でも低い濃度に留まった。したがって、体内における毒の分布からは、トリガイでは可食部のみの出荷は可能と判断される。ただし、ホタテガイよりも内臓の除去に手間がかかることから、現実問題として実施するかは検討を要する。

C1, C2 および GTX1, 4 は *A. tamarense* 栄養細胞の持つ毒成分の主体である（第2章第3節, Asakawa et al., 1995 など）。アカガイにおいては、C1, C2 および GTX4 は、まず毒が通過する内臓でもほとんど検出されず、筋肉およびひも+貝柱で GTX1 が検出されたのみであった。第4章第1節でも考察したとおり、C1, C2 が貝体内で変換した結果生じる dcGTX2, 3 はほぼ内臓でのみ検出されたが、その濃度は低かったことから、これについては速やかに排出されたと推察される。一方 GTX1, 4 は内臓ではほとんど検出されず、GTX1 のみ筋肉、ひも+貝柱では検出されたことから、内臓から筋肉に速やかに毒成分が移行したと推測される。内臓と筋肉、ひも+貝柱における変換速度は、アカガイでは色素としてヘムを持つエリスロクルオリンが触媒の役目を果たし (Sato et al., 2014), GTX1, 4 は GTX2, 3 に変換されるため、内臓でより早い変換が起こると推察された。一方、トリガイでは内臓で C1, C2 および GTX1, 4 が検出されており、最終産物である STX は鰓とひも+貝柱で散見される程度であったことから、アカガイに比べ毒が変換蓄積しにくく、内臓から筋肉等に毒が移行することなく速やかに排出されるものと推察された。

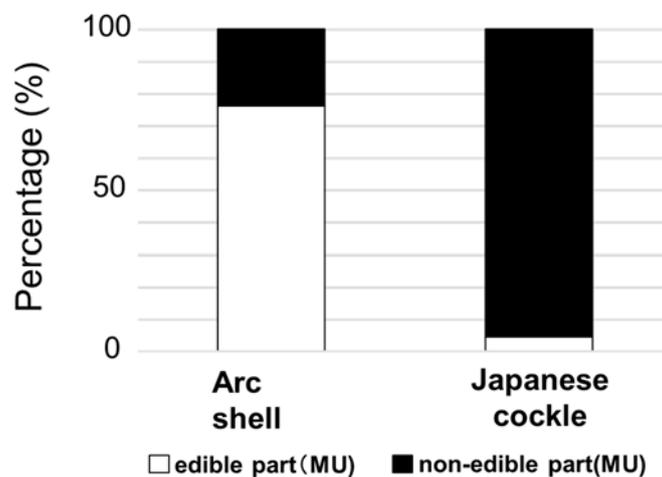


Fig. 5-14. Percentage of toxin in edible and non-edible parts.

第3節 同一海域の二枚貝毒量における麻痺性貝毒の個体間のばらつき、および同一調査日における海域間のばらつき

緒言

大阪湾における麻痺性貝毒は、他の海域で問題となるホタテガイやカキといった養殖二

枚貝ではなく、主に底曳き網のアカガイ、トリガイ、遊漁のアサリ、汽水域のヤマトシジミといった天然二枚貝で問題となるのが大きな特徴である。養殖二枚貝においては養殖漁場が特定されることから、サンプリング地点も絞ることができるのに対し、天然魚介類では漁場の特定が困難であることから、対象海域における個体間の毒量のばらつきや、漁場間の毒量差、漁場内でのばらつきの把握が重要と考えられる。本項では同一日にサンプリングされたアカガイ、トリガイにおいて個体別に毒量を分析し、毒量のばらつきを把握するとともに、妥当な毒量評価を行うため統計的に必要な個体数を推定した。

材料と方法

漁場を考慮しない個別別サンプリング

大阪湾全域からの海域を特定しないサンプリングを想定した個別別毒量の検討は 2010 年に取得したサンプルを用いて行った。二枚貝試料は前項と同様 Fig. 5-1 に示した大阪府中部に位置する泉佐野漁港において、底曳き網の一種である石桁網で漁獲された漁獲物を入手した。2010 年 5 月 8 日にアカガイを、5 月 17 日にトリガイをサンプリングした。毒化期間は麻痺性貝毒の蓄積による出荷自主規制中のため、漁連による補償として集められた漁獲物を市場で回収し、サンプルとして使用した。

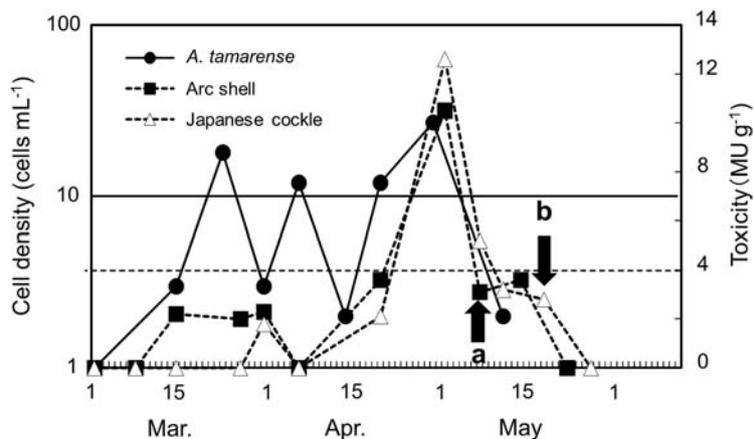


Fig. 5-15. Temporal changes in cell density of *A. tamarensis*, toxicity of Arc Shell and Japanese Cockle in 2010. Vertical arrows show sampling days of Arc Shell (a: May 8th) and Japanese Cockle (b: May 17th). Horizontal line shows alert density of *A. tamarensis* (10 cells mL⁻¹) and dotted line shows regulation limit (4MU g⁻¹).

Fig. 5-15 に示すとおり、サンプリング時期はピークを越えた直後の毒化後期にあたる。5-1, 5-2 と同様、アカガイ、トリガイにおける毒成分の分析は Oshima (1995) が報告したポストカラム蛍光法により行い、各成分の比毒性によりマウス毒量に換算した。さらに、第 3 章第 1 節でヤマトシジミの毒化モニタリングで用いた ELISA 法による簡易分析を併用して行った。ここでは標準列に大阪湾で毒化したアカガイ、トリガイの抽出液を使用し、マウス毒性値相当量とした。

漁場別サンプリング

漁場別の毒量の差は、アカガイについて検討した。アカガイ試料は上記と同様 5-1-Fig. 1 に示した大阪府中部に位置する泉佐野漁港において、底曳き網の一種である石桁網で漁獲された漁獲物を入手した。2015 年 4 月 14 日に、漁場の聞き取りが可能な標本船 3 統から 20-30 個を目安にサンプリングを行った。ただし、標本船 A の漁業者はアカガイの漁獲が少なく、6 個体のみサンプリングとなった。2015 年は *Alexandrium tamarese* が 3 月下旬と 4 月下旬に 2 峰型の増殖を示したことから、サンプリング時期は毒化中期にあたるが (Fig. 5-16) , 毒化については後半のピークの方が大きいことから、ピーク前に相当すると判断される。毒力の評価は ELISA 法による簡易分析で行った。公定法に準じて貝毒を抽出したのち 15000 rpm, 5 min. の遠心分離を行い、大阪公衛研が開発した PSP-ELISA キットにより毒量を分析した。個体数の多い標本船 B, C のサンプルについては漁場内での毒力のばらつきを確認するため個別別に分析を行った。

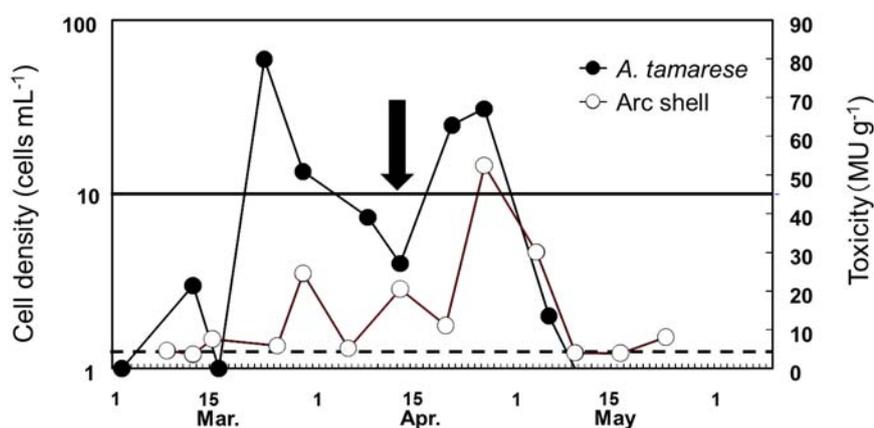


Fig. 5-16. Temporal changes in cell density of *A. tamarese*, toxicity of Arc Shell in 2015. Vertical arrow shows sampling day of Arc Shell (April 14th). Horizontal line shows alert density of *A. tamarese* (10 cells mL⁻¹) and horizontal dotted line shows regulation limit (4MU g⁻¹).

ブートストラップ法による平均誤差範囲の算出

漁場が不明な同日採取のアカガイ、トリガイそれぞれ 30 個体の分析結果から得られたサンプルのばらつきから、ブートストラップ法 (汪ら, 2003) により平均誤差範囲を算出し、サンプルサイズを検討した。条件としては重複ありの無作為抽出で、サンプリング個体数ごとにパソコン上で 10,000 回の試行を行い、それぞれの平均値のばらつきを計算した。計算には R 3.0.1 (R Core Team, 2013) を使用した。さらに、漁場別の検討で個体数が確保できた標本船 B と C についても同様の処理を行った。

結果

漁場が特定されないアカガイ，トリガイにおける個体間の毒量のばらつき

Fig. 5-17 にアカガイにおける HPLC マウス毒性換算値と ELISA 法による分析値の関係を示した。アカガイにおいて，2 手法の分析結果は概ね正の相関があったが，幾分ばらつきが大きかった。アカガイにおいては HPLC 法，ELISA 法とも殻長と毒力には明確な関係は確認されなかった (Fig. 5-18)。Fig. 5-19 に HPLC 法と ELISA 法による分析結果の頻度分布を示した。両方法とも値の低いところの頻度が高く，正規分布を示さなかった。また平均値は 2.18 と 2.74 と大きな差はなかったが，分析値のばらつきをみると ELISA 法で最大と最小で 7.48 倍，HPLC 法では 16.07 倍と，サンプル間，及び分析法間で大きな差があった。

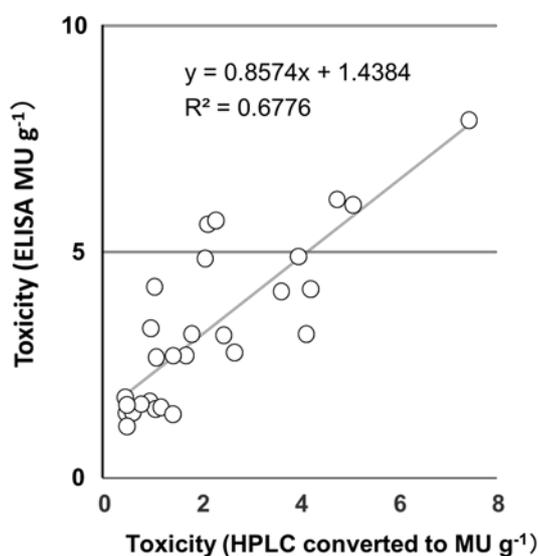


Fig. 5-17. Relationship between toxicity of ELISA analytical value (MU g⁻¹) and HPLC analytical value converted to MU g⁻¹ in Arc Shell.

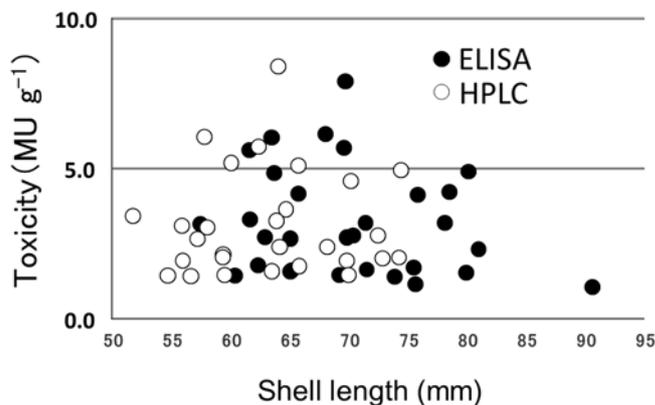


Fig. 5-18. Relationship between shell length of Arc Shell and toxicity quantified by two methods (ELISA and HPLC).

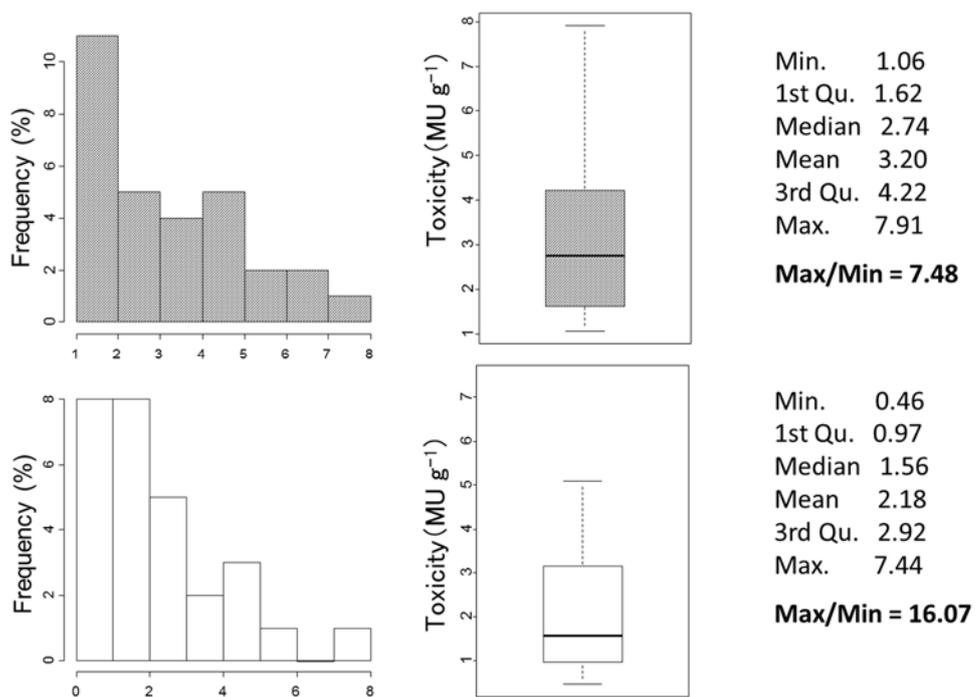


Fig. 5-19. Comparison of results of ELISA method and HPLC method in Japanese Cockle by frequency distribution (left) and box plot of analysis (right). Upper two graphs: ELISA, lower two graphs: HPLC.

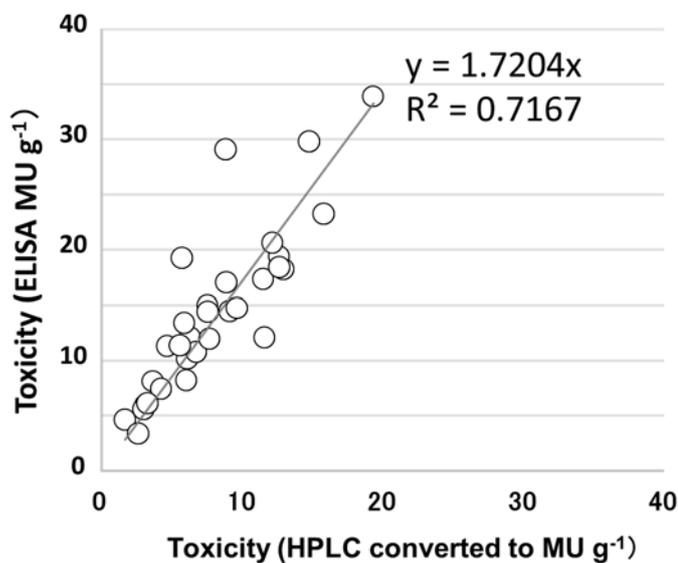


Fig. 5-20. Relationship between toxicity of ELISA analytical value (MU g^{-1}) and HPLC analytical value converted to MU g^{-1} in Japanese Cockle.

Fig. 5-20 にトリガイにおける HPLC マウス毒性換算値と ELISA 法による分析値の関係を示した。トリガイにおいて、2 手法の分析結果はアカガイより高い正の相関を示し、ばらつきも少なかった。また、ELISA 分析値が HPLC マウス毒性換算値より高い傾向があった。トリガイにおいても HPLC 法、ELISA 法とも殻長と毒力には明確な関係は確認されなかった (Fig. 5-21)。Fig. 5-22 に HPLC 法と ELISA 法による分析結果の頻度分布を示した。HPLC 法の方が低いところにピークがあったが、概ね正規分布を示していた。また平均値は 8.10 と 14.46 と若干差が大きかったが、分析値のばらつきをみると ELISA 法で最大と最小で 11.67 倍、HPLC 法では 11.65 倍とサンプルのばらつきは大きいものの分析法間のばらつきは小さかった。

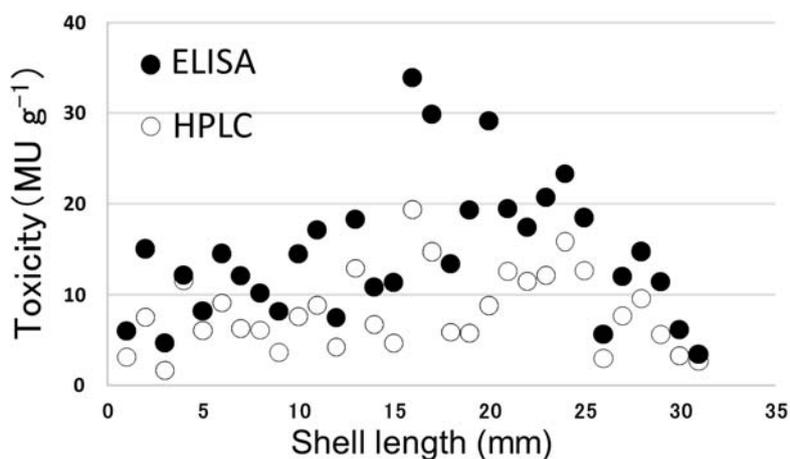


Fig. 5-21. Relationship between shell length of Japanese Cockle and toxicity quantified by two methods.

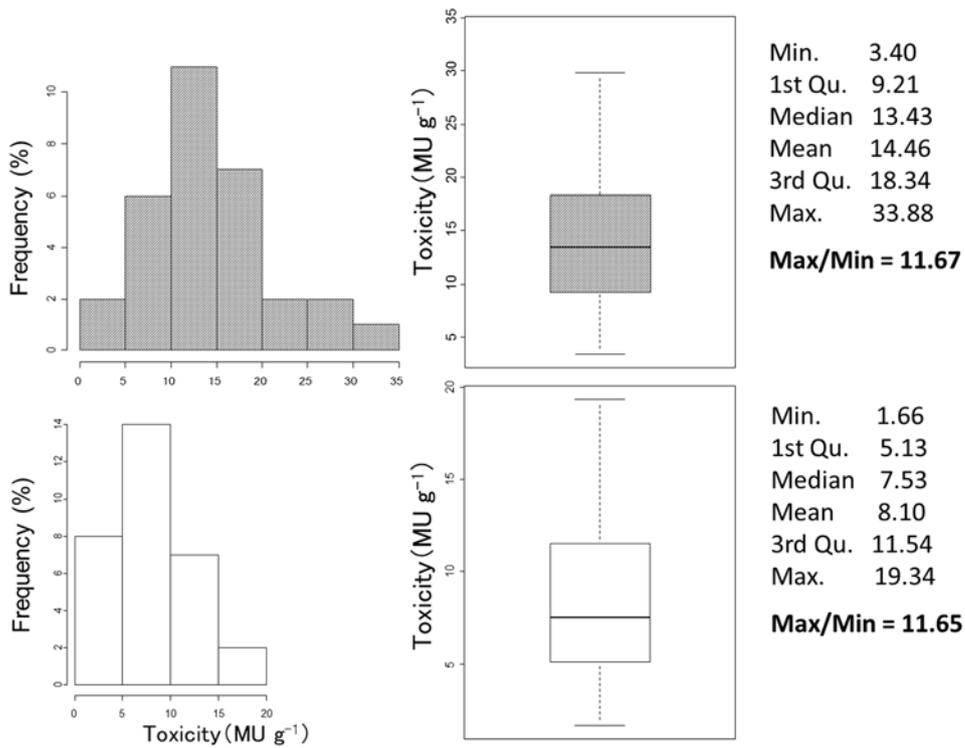


Fig. 5-22. Comparison of results of ELISA method and HPLC method in Japanese Cockle by frequency distribution (left) and box plot (right) of analysis. Upper: ELISA, lower: HPLC.

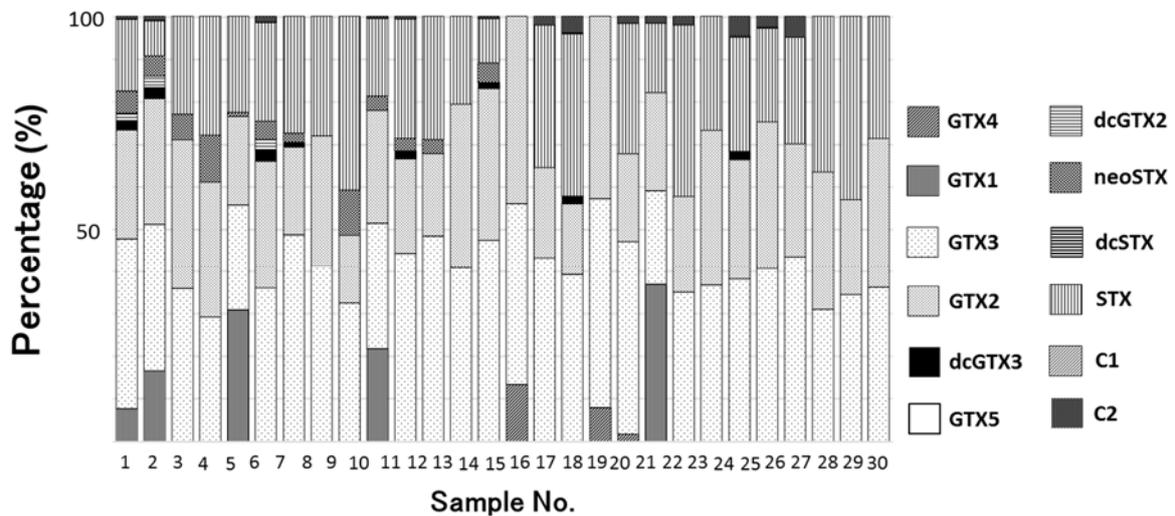


Fig. 5-23 Individual toxin profiles in Arc Shell collected on the same day (May 8th 2010) in Osaka Bay.

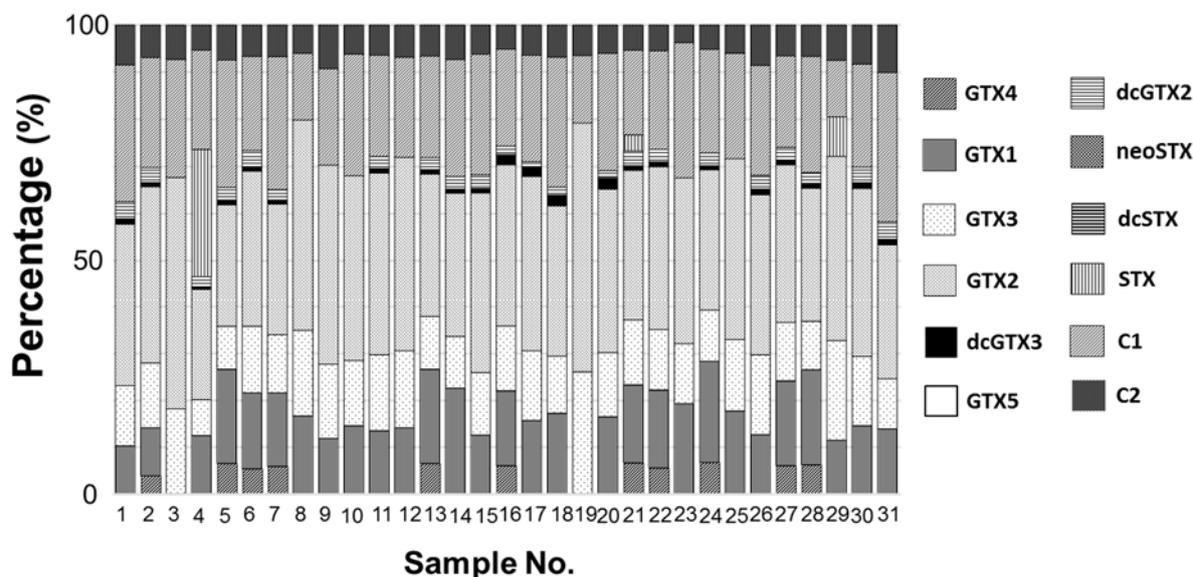


Fig. 5-24 Individual toxin profiles in Japanese Cockle collected on the same day (May 17th 2010) in Osaka Bay.

同一日にサンプリングされたアカガイ，トリガイの個体別の毒組成を Figs. 5-23, 24 に示した。両種とも毒組成は概ね類似したものであったが，組成の異なるものも散見された。アカガイでは GTX2, 3 主体であることでは共通しており，ほとんどの個体で STX が高い割合で検出された。一方，約 1/3 のサンプルで GTX1 ないし 4 が比較的高い割合で検出された。トリガイではアカガイ同様 GTX2, 3 主体であり，ほとんどの個体で GTX1, GTX4, C1, C2 が高い割合で検出された一方，STX の検出は 3 個体のみであった。

同一調査日における海域間のばらつき

3 統の底曳き網漁業者の漁場はそれぞれ関西国際空港北東（標本船 A），大阪湾中央部（標本船 B），関西国際空港南西（標本船 C）であった(Fig. 5-25)。Fig. 5-26 にそれぞれ標本船から得られたサンプルの ELISA 法による毒力の平均値と標準偏差を示した。ただし，標本船 A については，サンプルを混合して抽出，分析を行ったため平均値のみとした。サンプル毒力の平均値は，標本船 A で最も高く（18.2 MU g⁻¹），標本船 B（2.6 MU g⁻¹），C（1.8 MU g⁻¹）の 7-10 倍の値となった。標本船 B と C では平均値に大きな差はなかったが，統計的には差があることが確認された (Fig. 5-27)。一方で，個体数を確保できた 2 漁場の毒力のばらつきは，漁場が特定されないサンプリングの結果と比較すると小さいものとなった。

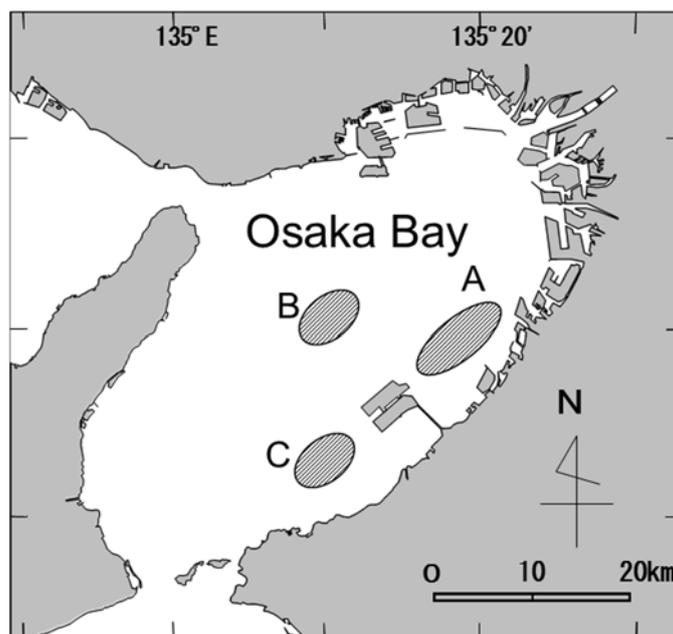


Fig. 5-25. Fishing ground of each sample fishing boat. A: offshore of Kishiwada City, B: central part of Osaka Bay, C: offshore of Hannan City.

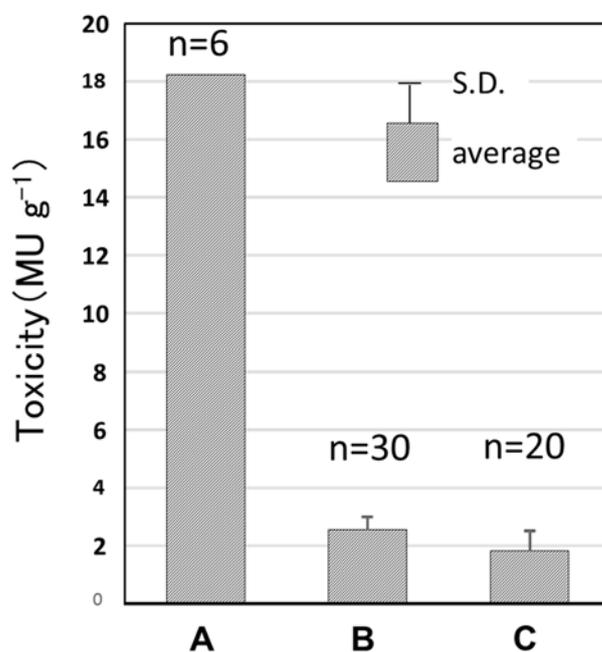


Fig. 5-26. Toxicity difference among fishing grounds. A: offshore of Kishiwada City, B: central part of Osaka Bay, C: offshore of Hannan City.

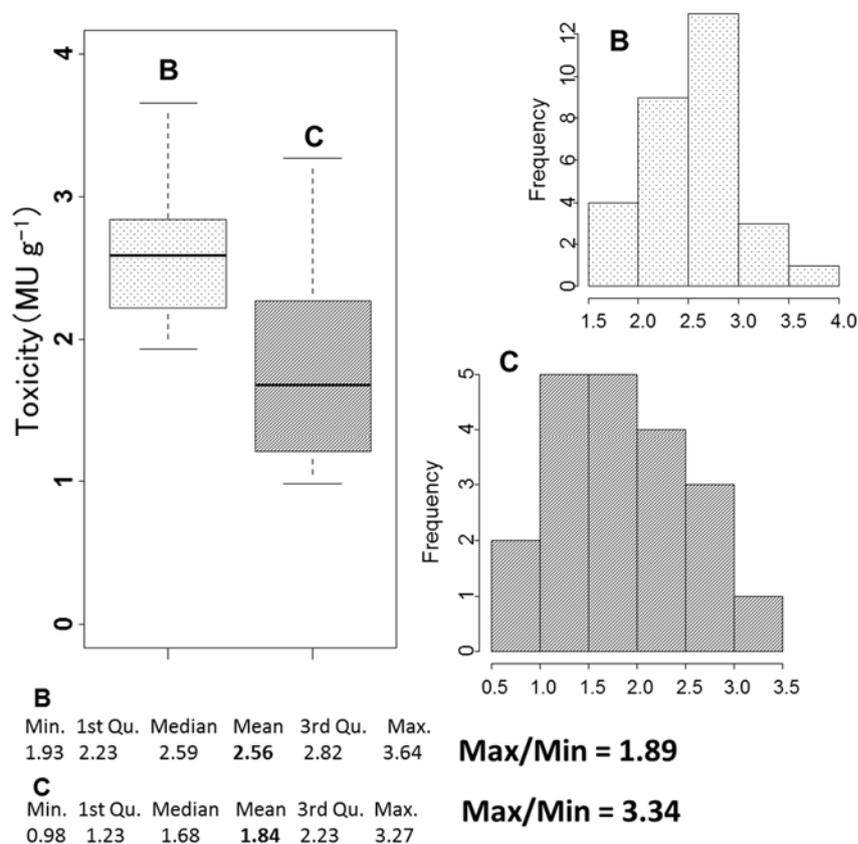


Fig. 5-27. Comparison of analysis results from two sample fishing boats (B, C) by box plot (right) and frequency distribution (left) in Arc Shell.

サンプルサイズの検討

漁場が特定されないサンプリングでは、アカガイにおけるサンプリング回数ごとの平均誤差範囲を Table 5-1 に、トリガイにおけるサンプリング回数ごとの平均誤差範囲を Table 5-2 に示した。条件としては重複ありの無作為抽出で、サンプリング回数ごとにパソコン上で 10,000 回の試行を行い、それぞれの平均値のばらつきを計算した。一例として誤差の許容範囲を上下 30% と仮定した場合、アカガイではばらつきが大きく、95% の確率で基準値を管理しても 17 個体必要と算出された。また、トリガイでは 95% の確率で基準値を管理すると 8 個体、99% では 15 個体必要と算出された。

漁場別のサンプリングにおいて、標本船 B の サンプリング回数ごとの平均誤差範囲を Table 5-3 に、標本船 C のサンプリング回数ごとの平均誤差範囲を Table 5-4 に示した。標本船 B ではばらつきが少なく、誤差の許容範囲を上下 20% と仮定しても、99% の確率で基準値を管理しても 5 個体で条件を満たす結果となった。また標本船 C では標本船 B よりばらつきは大きかったが、誤差の許容範囲を上下 30% と仮定すると、95% の確率で基準値を管理すると 5 個体、99% では 7 個体必要と算出された。

Table 5-1. Variance of average toxicity values for each number of extracted individuals in Arc shell caught from unidentified fishing ground. Toxicity analyzed by HPLC method was simulated on a personal computer by bootstrap method.

N	Mean	5 percentile	1 percentile	0.1 percentile	Error5 (M-5p)	Error1 (M-1p)	Error0.1(M-0.1p)	Error5/Mean	Error1/Mean	Error0.1/Mean
5	2.2	1.1	0.8	0.6	1.1	1.4	1.6	50.7%	62.6%	70.8%
6	2.2	1.2	0.9	0.7	1.0	1.3	1.5	47.3%	59.5%	67.9%
7	2.2	1.2	1.0	0.7	1.0	1.2	1.4	44.3%	56.1%	65.9%
8	2.2	1.3	1.0	0.8	0.9	1.1	1.3	42.2%	52.5%	61.6%
9	2.2	1.3	1.1	0.9	0.9	1.1	1.3	39.5%	51.7%	60.9%
10	2.2	1.4	1.1	0.9	0.8	1.1	1.3	37.8%	49.7%	59.3%
11	2.2	1.4	1.2	1.0	0.8	1.0	1.2	36.0%	46.8%	56.4%
12	2.2	1.4	1.2	1.0	0.7	1.0	1.2	34.2%	44.1%	53.3%
13	2.2	1.5	1.2	1.0	0.7	1.0	1.2	33.4%	43.6%	53.8%
14	2.2	1.5	1.2	1.0	0.7	0.9	1.2	32.4%	42.9%	53.0%
15	2.2	1.5	1.3	1.1	0.7	0.9	1.1	30.8%	41.2%	51.5%
16	2.2	1.5	1.3	1.1	0.7	0.9	1.1	30.3%	40.9%	50.6%
17	2.2	1.6	1.3	1.2	0.6	0.9	1.0	28.9%	39.2%	47.2%
18	2.2	1.6	1.4	1.1	0.6	0.8	1.0	28.5%	37.4%	47.3%
19	2.2	1.6	1.4	1.2	0.6	0.8	1.0	28.2%	37.1%	43.8%
20	2.2	1.6	1.4	1.2	0.6	0.8	1.0	27.0%	37.1%	46.7%
21	2.2	1.6	1.4	1.2	0.6	0.8	1.0	27.0%	35.9%	45.1%
22	2.2	1.6	1.4	1.2	0.6	0.8	0.9	25.6%	34.6%	43.5%
23	2.2	1.6	1.4	1.3	0.6	0.7	0.9	25.7%	34.1%	41.6%
24	2.2	1.6	1.4	1.2	0.5	0.7	1.0	25.0%	34.0%	43.7%
25	2.2	1.6	1.5	1.3	0.5	0.7	0.9	24.6%	32.6%	42.6%

Table 5-2. Variance of average toxicity values for each number of extracted individuals in Japanese cockle caught from unidentified fishig ground. Toxicity analyzed by HPLC method was simulated on a personal computer by bootstrap method.

N	Mean	5 percentile	1 percentile	0.1 percentile	Error5 (M-5p)	Error1 (M-1p)	Error0.1(M-0.1p)	Error5/Mean	Error1/Mean	Error0.1/Mean
5	8.1	5.1	4.2	3.3	3.0	3.9	4.8	36.9%	47.6%	59.7%
6	8.1	5.4	4.5	3.6	2.7	3.6	4.5	33.7%	44.2%	55.3%
7	8.1	5.6	4.7	3.9	2.5	3.4	4.2	31.4%	41.8%	51.4%
8	8.1	5.7	4.8	4.2	2.4	3.2	3.9	29.3%	40.1%	48.4%
9	8.1	5.9	5.1	4.3	2.2	3.0	3.8	27.5%	36.8%	46.8%
10	8.1	6.0	5.2	4.3	2.1	2.9	3.8	26.1%	35.5%	46.9%
11	8.1	6.0	5.3	4.6	2.0	2.7	3.5	25.2%	33.8%	43.0%
12	8.1	6.2	5.5	4.8	1.9	2.6	3.3	23.7%	32.4%	40.6%
13	8.1	6.2	5.5	4.9	1.9	2.6	3.2	23.1%	31.9%	39.3%
14	8.1	6.3	5.7	4.9	1.8	2.4	3.2	22.3%	30.2%	39.0%
15	8.1	6.4	5.7	5.0	1.7	2.4	3.0	21.3%	29.6%	37.6%
16	8.1	6.4	5.8	5.1	1.7	2.3	3.0	21.3%	28.9%	37.6%
17	8.1	6.4	5.8	5.2	1.7	2.3	2.9	20.6%	28.2%	36.1%
18	8.1	6.5	5.9	5.3	1.6	2.2	2.7	19.4%	26.6%	33.9%
19	8.1	6.5	5.9	5.4	1.6	2.2	2.7	19.5%	26.8%	33.5%
20	8.1	6.6	6.0	5.4	1.5	2.1	2.7	18.9%	25.6%	33.7%
21	8.1	6.6	6.1	5.5	1.5	2.0	2.6	18.3%	25.2%	32.6%
22	8.1	6.7	6.1	5.5	1.4	2.0	2.6	17.9%	24.7%	32.5%
23	8.1	6.7	6.1	5.7	1.4	2.0	2.4	17.3%	24.4%	30.0%
24	8.1	6.7	6.2	5.7	1.4	1.9	2.4	17.2%	23.7%	30.2%
25	8.1	6.7	6.2	5.6	1.4	1.9	2.5	16.7%	23.2%	31.0%

Table 5-3. Variance of average toxicity values for each number of extracted individuals in Arc shell caught by sample fishing boat B. Toxicity analyzed by ELISA method was simulated on a personal computer by bootstrap method.

N	Mean	5 percentile	1 percentile	0.1 percentile	Error5 (M-5p)	Error1 (M-1p)	Error0.1(M-0.1p)	Error5/Mean	Error1/Mean	Error0.1/Mean
5	2.6	2.3	2.2	2.0	0.3	0.4	0.5	11.9%	15.9%	20.2%
6	2.6	2.3	2.2	2.1	0.3	0.4	0.5	10.8%	15.0%	19.2%
7	2.6	2.3	2.2	2.1	0.3	0.4	0.5	10.2%	14.0%	18.1%
8	2.6	2.3	2.2	2.1	0.2	0.3	0.4	9.5%	13.0%	16.9%
9	2.6	2.3	2.3	2.2	0.2	0.3	0.4	8.8%	12.1%	15.7%
10	2.6	2.3	2.3	2.2	0.2	0.3	0.4	8.4%	11.7%	14.9%
11	2.6	2.4	2.3	2.2	0.2	0.3	0.4	8.0%	10.9%	13.8%
12	2.6	2.4	2.3	2.2	0.2	0.3	0.4	7.7%	10.8%	14.1%
13	2.6	2.4	2.3	2.2	0.2	0.3	0.3	7.4%	10.2%	12.9%
14	2.6	2.4	2.3	2.2	0.2	0.3	0.3	7.1%	9.7%	13.1%
15	2.6	2.4	2.3	2.2	0.2	0.2	0.3	6.9%	9.7%	12.5%
16	2.6	2.4	2.3	2.3	0.2	0.2	0.3	6.6%	9.0%	11.9%
17	2.6	2.4	2.3	2.3	0.2	0.2	0.3	6.6%	9.0%	11.7%
18	2.6	2.4	2.3	2.3	0.2	0.2	0.3	6.4%	8.8%	11.7%
19	2.6	2.4	2.3	2.3	0.2	0.2	0.3	6.1%	8.5%	11.2%
20	2.6	2.4	2.4	2.3	0.1	0.2	0.3	5.8%	8.2%	10.3%
21	2.6	2.4	2.4	2.3	0.1	0.2	0.3	5.8%	8.0%	10.2%
22	2.6	2.4	2.4	2.3	0.1	0.2	0.3	5.7%	7.8%	10.3%
23	2.6	2.4	2.4	2.3	0.1	0.2	0.3	5.6%	8.0%	10.1%
24	2.6	2.4	2.4	2.3	0.1	0.2	0.2	5.4%	7.6%	9.5%
25	2.6	2.4	2.4	2.3	0.1	0.2	0.2	5.4%	7.3%	9.4%

Table 5-4. Variance of average toxicity values for each number of extracted individuals in Arc shell caught by sample fishing boat C. Toxicity analyzed by ELISA method was simulated on a personal computer by bootstrap method.

N	Mean	5 percentile	1 percentile	0.1 percentile	Error5 (M-5p)	Error1 (M-1p)	Error0.1(M-0.1p)	Error5/Mean	Error1/Mean	Error0.1/Mean
5	1.8	1.4	1.2	1.1	0.5	0.6	0.7	25.4%	34.0%	40.4%
6	1.8	1.4	1.3	1.1	0.4	0.6	0.7	23.2%	30.9%	38.1%
7	1.8	1.4	1.3	1.2	0.4	0.5	0.7	22.0%	29.0%	35.8%
8	1.8	1.5	1.3	1.2	0.4	0.5	0.6	20.0%	27.2%	33.8%
9	1.8	1.5	1.4	1.3	0.3	0.5	0.6	18.8%	25.4%	30.8%
10	1.8	1.5	1.4	1.3	0.3	0.5	0.6	18.0%	24.7%	30.4%
11	1.8	1.5	1.4	1.3	0.3	0.4	0.5	17.4%	23.4%	29.9%
12	1.8	1.5	1.4	1.3	0.3	0.4	0.5	16.6%	22.1%	27.9%
13	1.8	1.5	1.4	1.3	0.3	0.4	0.5	15.8%	21.7%	27.5%
14	1.8	1.6	1.5	1.4	0.3	0.4	0.5	15.2%	20.6%	25.8%
15	1.8	1.6	1.5	1.3	0.3	0.4	0.5	14.8%	20.8%	26.6%
16	1.8	1.6	1.5	1.4	0.3	0.4	0.5	14.4%	19.9%	26.0%
17	1.8	1.6	1.5	1.4	0.3	0.4	0.4	14.0%	19.3%	24.1%
18	1.8	1.6	1.5	1.4	0.3	0.4	0.4	13.6%	19.2%	24.0%
19	1.8	1.6	1.5	1.4	0.2	0.3	0.4	13.2%	18.2%	24.0%
20	1.8	1.6	1.5	1.4	0.2	0.3	0.4	13.0%	18.0%	22.2%

考察

漁場が特定されないサンプリングにおいて、アカガイ、トリガイとも個体毒力のばらつきは非常に大きなものとなった。アカガイ、トリガイとも底曳き網の漁場は関西国際空港空港周辺から神戸にかけて大阪湾東部に広く存在する (Figs. 5-28, 29)。本研究において漁場間で麻痺性貝毒の蓄積に差が確認されたことから、一義的には個体間の毒力の差は漁獲海域の違いによるものと推察される。このばらつきを認めた上で、分析に必要な二枚貝の個体数をブートストラップ法により検討した。下痢性貝毒の精度管理基準は 70–120%とされていることから、誤差の許容範囲を上下 30%と仮定した場合、アカガイで特にばらつきが大きく、95%の確率で基準値を管理しても 17 個体必要と算出された。また、トリガイでは 95%の確率で基準値を管理すると 8 個体、99%では 15 個体必要と算出された。公定法による分析方法 (日本食品衛生協会, 2005) では、むき身の混和試料 100 g をビーカー内に秤取り用いるとされている。アカガイやトリガイの大きい個体では、数 10 g を上回るものもあり、数個で必要量に達してしまうことが多い。今後管理水準をどこにおくかの議論は必要であるが、これらの結果から、大阪湾全域からの漁獲を仮定すると精度を維持するためにはトリガイでも最低 10 個体程度は必要と推定された。ただし、ここで用いたサンプルは漁場が特定できないサンプルで、かつ採取時期は毒化のピークを超えた後期という限定されたものであり、あくまでも一例であることを留意する必要がある。

分析法によるばらつきはアカガイで大きかった。アカガイ、トリガイとも個体別の毒組成は概ね同様であったが、個体によっては組成の異なるものも散見された。第 5 章第 1 節で示した通り、二枚貝体内の毒組成は時期により変化する。すなわち、毒化時期の異なるアカガイ、トリガイとも概ね同じ時期に毒化が始まったと推定されるが、個体によっては毒化時期の異なるものも混在していると推定される。一方で、アカガイとトリガイでは毒組成に大きな違いがあった。トリガイでは GTX2, 3 主体に C1, C2, GTX1, GTX4 の割合が高いのに対し、アカガイでは STX の割合が高かった。第 5 章第 1 節に示したようにアカガイでは毒の変換能が高く、短期間に高毒成分に変換すると考えられる。アカガイにおいてトリガイより個体間、分析法間のばらつきが大きかった一因として、個体により強毒成分への変換の速度に差があったことで検出される毒力に差が生じた可能性も考えられる。

同一調査日における海域間の比較において、全ての海域で麻痺性貝毒の毒力に差のあることが確認された。最も毒力が高かった関西国際空港北東の海域は、第 2 章で示した通り、*A. tamarense* 栄養細胞が高密度で確認され、さらにシストも高密度で蓄積される事が確認される海域である。シストの存在と二枚貝の毒化については今後明らかにしなくてはならない課題であるが、同海域で二枚貝も高毒化する可能性が示されたことから、二枚貝の毒化モニタリングについても同海域近辺で実施することで効率化を図ることができると考えられる。この結果から、限定された漁場において分析に必要な二枚貝の個体数をブートストラップ法により検討した。漁場間の毒力差の検討では同一漁場内でのばらつきはより小さいものであり、漁場を限定すると 99%の確率でも 10 個以下で条件を満たしたことから、

高毒化する漁場を高い精度で特定できれば、毒の分析に必要なサンプリングの個体数を減らすことも可能と思われる。

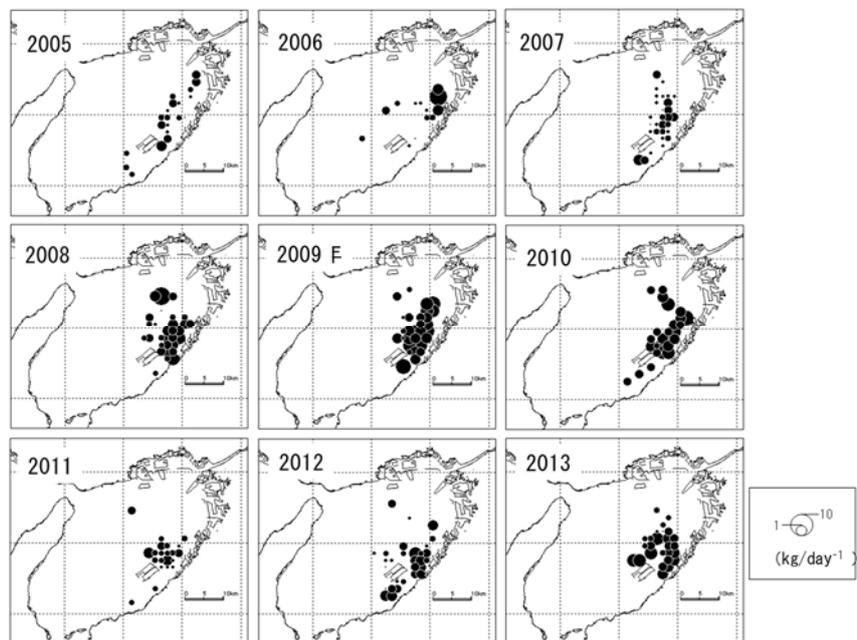


Fig. 5-28. Distributions of fish catches (kg day^{-1} sample fishing boat $^{-1}$) of Arc Shell caught by trawl fishing from 2005 to 2013 in Osaka Bay.

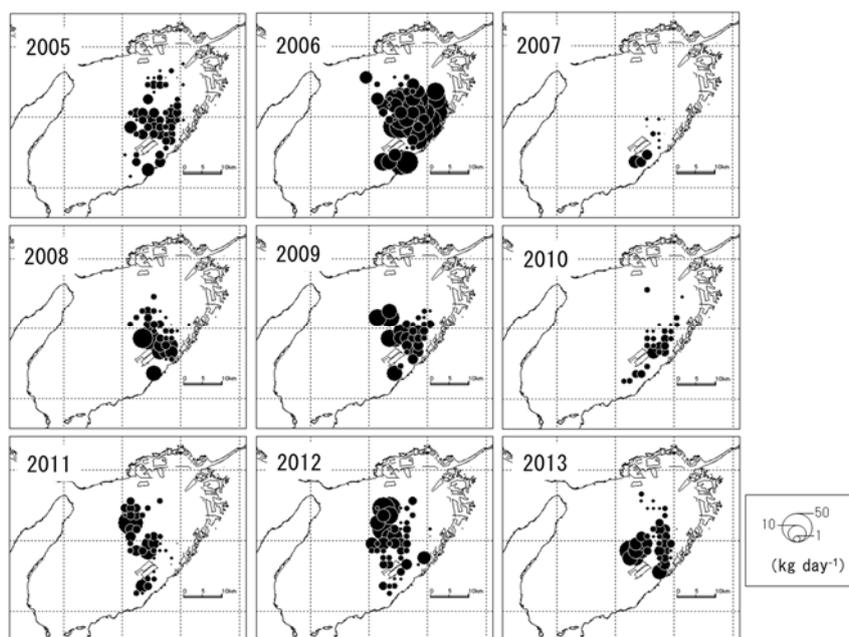


Fig. 5-29. Distributions of fish catches (kg day^{-1} sample fishing boat $^{-1}$) of Japanese Cockle caught by trawl fishing from 2005 to 2013 in Osaka Bay.

第6章 プランクトン調査と ELISA 法の併用による麻痺性貝毒モニタリング

第1章で既に示したとおり、大阪湾における貝毒の特徴は、問題となる生物がすべて天然で採取される魚介類であり、大阪湾においては主に原因プランクトンのモニタリングを主体としたリスク管理体制を取っている。これまで市場に流通する二枚貝の中毒事例はないが、出荷自主規制後、遊漁として採取されたムラサキイガイで2008年と2013年に、アサリでは2016年に中毒が発生した（大阪府，2017）。*Alexandrium tamarense* の細胞密度が警戒密度（ 10 cells mL^{-1} ）を超えたときの貝種ごとの二枚貝毒量を2002年-2016年について示した（Fig. 6-1）が、特にアサリにおいては、警戒密度を超えた直後でも既に規制値を大きく上回っていることが多いことがわかる。さらに原因プランクトンにおいても1週間まで警戒密度以下であっても、翌週には高い密度になり得ることが見て取れる。これまで、市場での流通という点ではリスク管理は滞りなく進行しているといえるが、今後中毒を起ささないため、より高精度で効果的なモニタリング体制の強化が必要と考えられる。近年、麻痺性貝毒の簡易分析法として ELISA 法（酵素免疫測定法；Enzyme-linked Immunosorbent assay）が麻痺性貝毒のスクリーニング法として利用される事例が報告されるようになった（篠崎ら，2013 など）。ELISA 法は検出力が高く、大量の試料を短時間に処理できる一方で、測定に使用する抗体は類縁体ごとに反応性が異なることから、モニタリングに使用する場合現場海域で対象二枚貝の毒組成や公定法（マウス試験）との相関を確認する必要がある。本章では、現在のプランクトンのモニタリングによる貝毒リスク管理体制を補完するため、大阪府立公衆衛生研究所が開発した PSP-ELISA キット（Kawatsu et al., 2002）を用いた簡易分析法による毒化モニタリングについて、実用性を検討した結果について述べる。

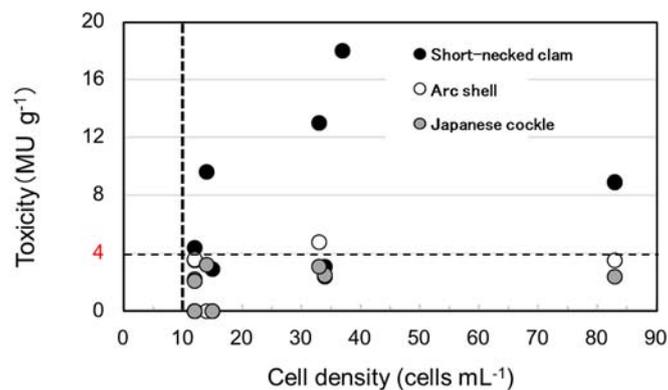


Fig. 6-1. Toxicity of three bivalves (Manila clam, Arc Shell, Japanese Cockle) when the cell density of *A. tamarense* exceeded alert density of *A. tamarense* in Osaka Bay from 2002 to 2016. Vertical dotted line shows alert density of *A. tamarense* (10 cells mL^{-1}) in Osaka Bay and horizontal dot line shows regulation limit (4 MU g^{-1}). (modified from Yamamoto 2017)

材料と方法

調査は2013年1月-2015年12月にかけて行った。大阪湾における毒化盛期である2月から5月は概ね週1回、その他の時期は月1回の頻度で、大阪湾中部に位置する漁業組合 (Fig. 5-1) にてアカガイとトリガイを、漁獲位置を確認した上でサンプリングした。ただし、5月以降であっても麻痺性貝毒による出荷自主規制期間中は調査を継続した。試料は公定法に準じて貝毒を抽出した後、大阪府立公衆衛生研究所が開発したPSP-ELISAキットにより毒量を分析した。ELISA法の詳細は第3章第1節で示した。さらに、試料の一部についてはマウス毒性試験およびHPLCによる貝毒成分の分析に供した。原因プランクトン出現との比較には、第2章で示したモニタリングで得られた調査日ごとの最高密度のデータを利用した。なお、柱状採水の細胞密度が表層より高い場合は柱状採水のものを最高密度とした。

結果

ELISA法による大阪湾におけるアカガイ、トリガイの麻痺性貝毒モニタリング

Fig. 6-2に2013年から2015年における標本船の漁場を示した。2013年は1月から5月まで概ね関西国際空港周辺を漁場としていた。2014年は2月まで関西国際空港北部の海域で操業していたが、3月から5月については空港岸側から南部沿岸にかけて漁場としていた。2015年は1月から2月は空港岸側に漁場があったが、3月から5月には空港周辺の外、大阪湾中央や堺市沖を漁場としていた。

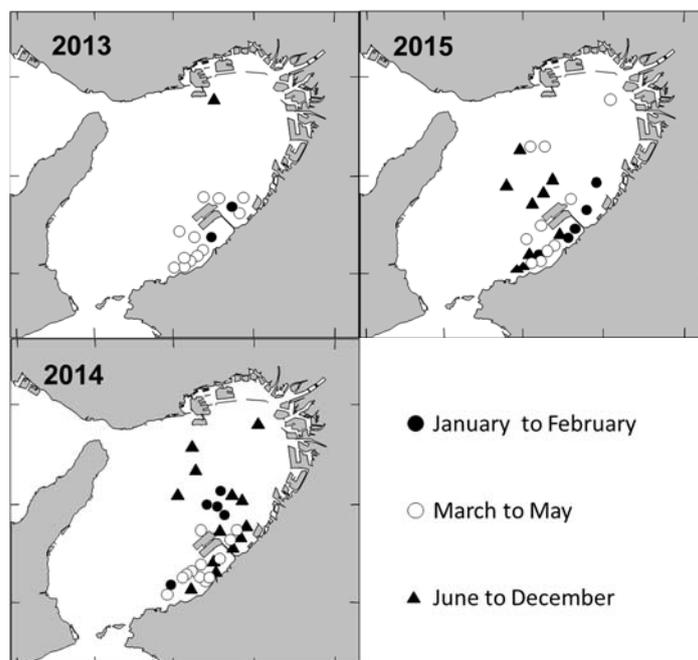


Fig. 6-2. Fishing points for collecting samples using fishing boats. Arc Shell and Japanese Cockle samples were obtained.

Alexandrium tamarense の増減と ELISA 法による毒力の増減は3年とも概ねよい対応を示した (Fig. 6-3)。2013 年は *A. tamarense* の最高密度がおよそ $700 \text{ cells mL}^{-1}$ と調査を行った3年間で最も高密度で確認された一方で、二枚貝の毒力は中程度で、アカガイで最大約 20 MU g^{-1} 、トリガイで最大約 40 MU g^{-1} であった。2014 年は *A. tamarense* の最高密度はおよそ 200 cell mL^{-1} と2013年の1/3程度であったが、アカガイで約 50 MU g^{-1} 、トリガイで約 80 MU g^{-1} と3年間で最も高い毒力を示した。2015 年は *A. tamarense* の増殖レベルが3年間で最も低く、最大 60 cells mL^{-1} に留まり、最大毒力はアカガイで約 30 MU g^{-1} 、トリガイで約 50 MU g^{-1} であった。アカガイとトリガイでは、最大毒量はトリガイで高い傾向を示した。2015 年は期間を通じて貝毒原因プランクトンの発生は低レベルであったが、5月上旬にアカガイ、トリガイとも顕著な毒量の上昇が確認された。また、3カ年ともプランクトンの増殖に1-2週遅れて毒力は上昇したが、両種とも概ねプランクトン密度に対応した毒力は変動していた。

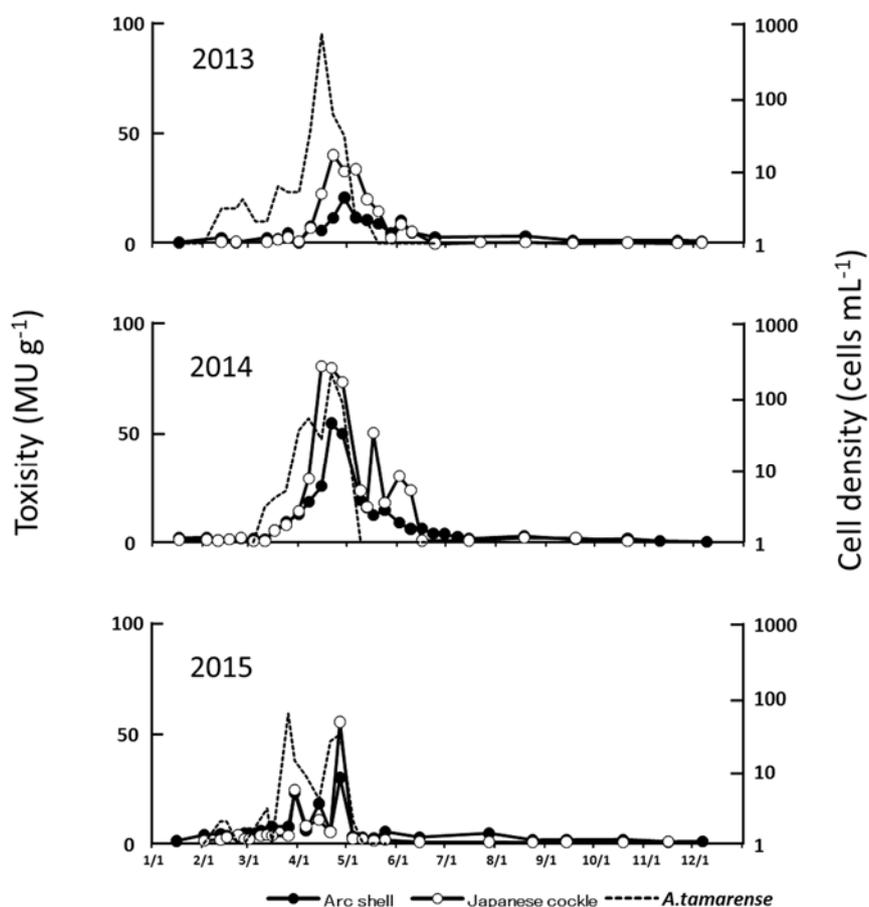


Fig. 6-3. Temporal changes of toxicity quantified by ELISA method and cell density of *A. tamarense* from 2013 to 2015

ELISA 法分析値とマウス試験分析値および HPLC 法分析値の相関

3つの分析法のデータが周年存在する2014年について、アカガイとトリガイにおける分析法別の毒力の推移を示した (Fig. 6-4)。ELISA 法, HPLC 法, マウス試験とも両種で増減の傾向は一致していた。分析法間の差はトリガイで大きかったが, マウス試験, HPLC 法, ELISA 法の順に値は高くなる傾向があり, その差は毒力が高いサンプルで大きい傾向を示した。

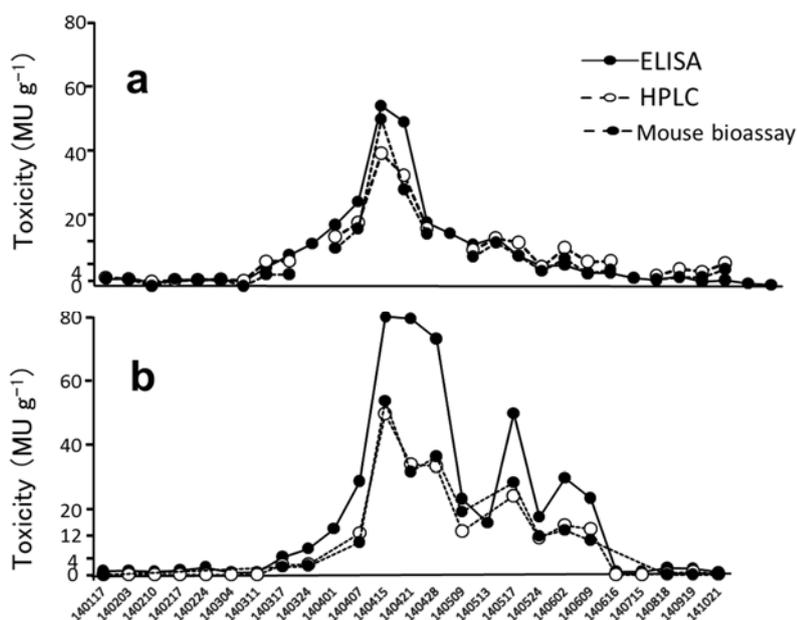


Fig. 6-4 .Temporal changes in toxicity in 2014. a: Arc Shell, b: Japanese Cockle. Toxicities were quantified by 3 different methods. HPLC value ($\mu\text{mol g}^{-1}$) were converted to mouse bioassay value (MU g^{-1}) according to Oshima (2005).

すべてのサンプルによるマウス試験分析値と ELISA 分析値の関係を見ると, アカガイ, トリガイとも R^2 はそれぞれ 0.89, 0.77 と比較的高い相関関係が得られた (Fig. 6-5)。これを規制値前後の値を想定し, マウス試験で 6 MU g^{-1} 未満のサンプルで再び相関を取ると, アカガイ, トリガイで R^2 はそれぞれ 0.52, 0.67 と低くなったが, トリガイではすべて $Y=X$ の直線より高い値であった (Fig. 6-6)。一方, アカガイでは $Y=X$ の直線に対し上下に大きくばらつき, 偽陰性 (マウス試験分析値で 4 MU g^{-1} 以上かつ ELISA 分析値で 4 MU g^{-1} 未満) は 51 検体中 2 検体であった。アカガイ, トリガイそれぞれについてすべての ELISA 分析値が上方に位置するように原点から直線を延ばし, $X=4$ (マウス試験分析値 4 MU g^{-1}) との交点を求めたところ, アカガイでは約 1 MU g^{-1} , トリガイで約 4 MU g^{-1} となった。HPLC マウス毒性換算値 (以下, HPLC 分析値とする) と ELISA 分析値の関係においては, すべてのサンプルで R^2 はそれぞれ 0.70, 0.70 とマウス試験分析値との関係より低くなっており, アカガイでは全毒力の範囲でばらつきがある一方, トリガイでは毒力の高いところ

で ELISA 分析値が高いものと低いものに 2 極化する傾向がみられた (Fig. 6-7)。規制値前後の値では R^2 は 0.63, 0.75 であり, マウス試験との関係より高い値となったが, マウス試験と同様アカガイで $Y=X$ の直線を挟んでばらつくのに対し, トリガイでは概ね $Y=X$ 上部に値が存在した (Fig. 6-8)。ばらつきが大きかったアカガイについては, 毒力の上昇期のみについて, HPLC 分析値との相関を確認したところ, 若干ばらつきが収束し, R^2 が 0.75 に増加した (Fig. 6-9)。

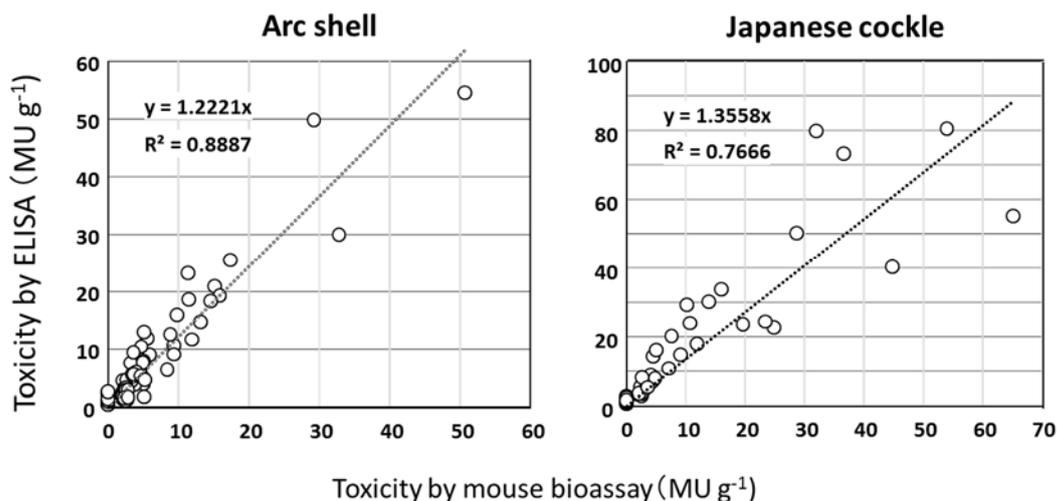


Fig. 6-5. Relationship between ELISA analysis value and mouse bioassay analysis value in Arc Shell (left) and Japanese Cockle (right) from 2013 to 2015.

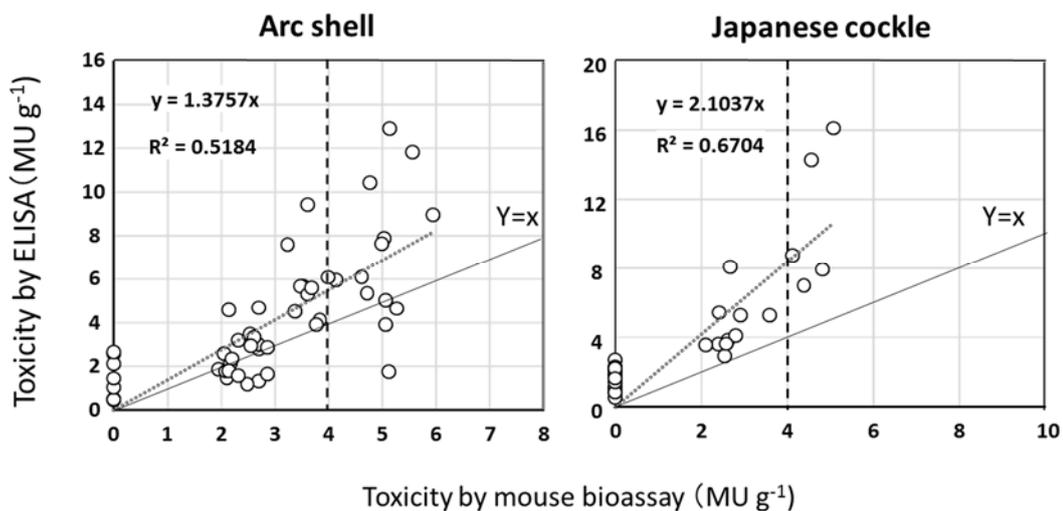


Fig. 6-6 Relationship between ELISA analysis value and mouse bioassay analysis value in Arc Shell (left) and Japanese Cockle (right) from 2013 to 2015. Samples were selected near the value of regulation limit (4MU g^{-1}). Vertical dot line shows regulation limit.

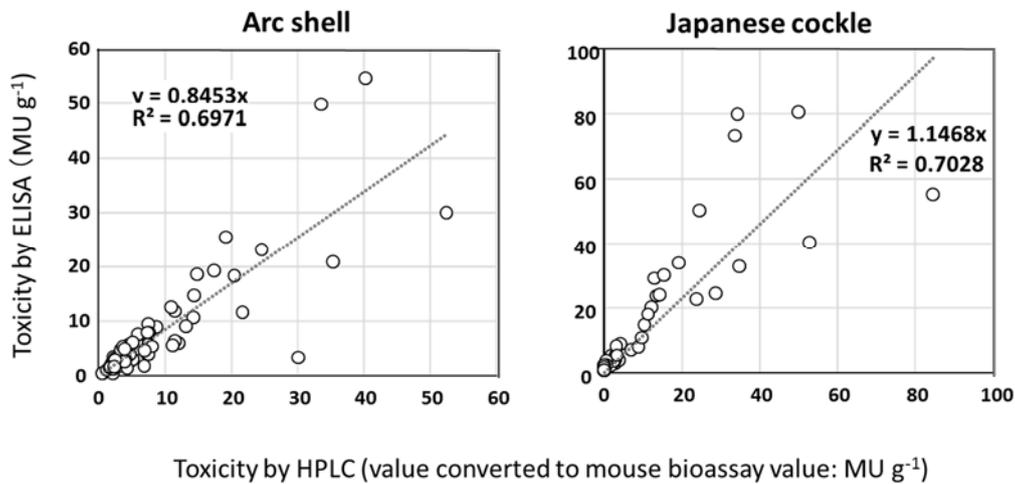


Fig. 6-7. Relationship between ELISA analysis value and HPLC analysis value in Arc Shell (left) and Japanese Cockle (right) from 2013 to 2015. HPLC value ($\mu\text{mol g}^{-1}$) converted to mouse bioassay value (MU g^{-1}) according to Oshima (1995).

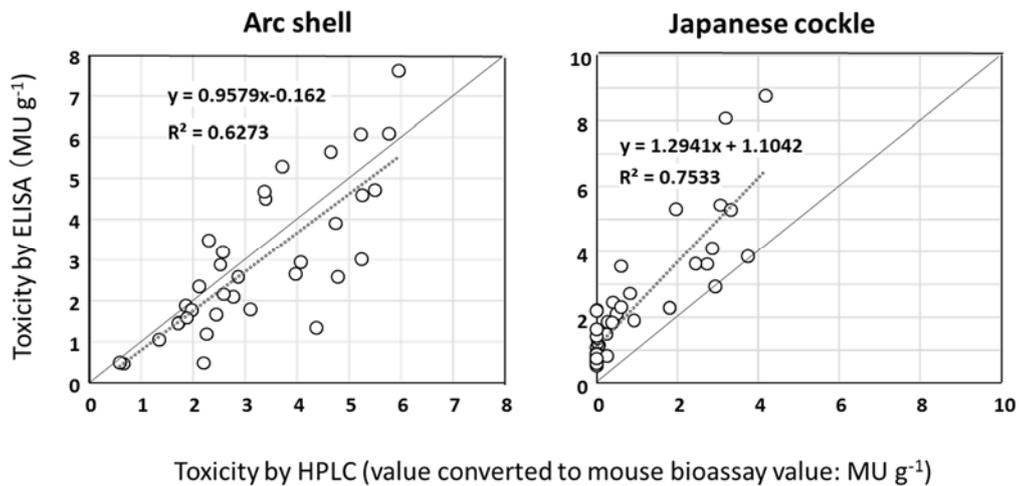


Fig. 6-8. Relationship between ELISA analysis value and HPLC analysis value in Arc Shell (left) and Japanese Cockle (right) from 2013 to 2015. Samples were selected near the value of regulation limit (4 MU g^{-1}). HPLC value ($\mu\text{mol g}^{-1}$) converted to mouse bioassay value (MU g^{-1}) according to Oshima (1995).

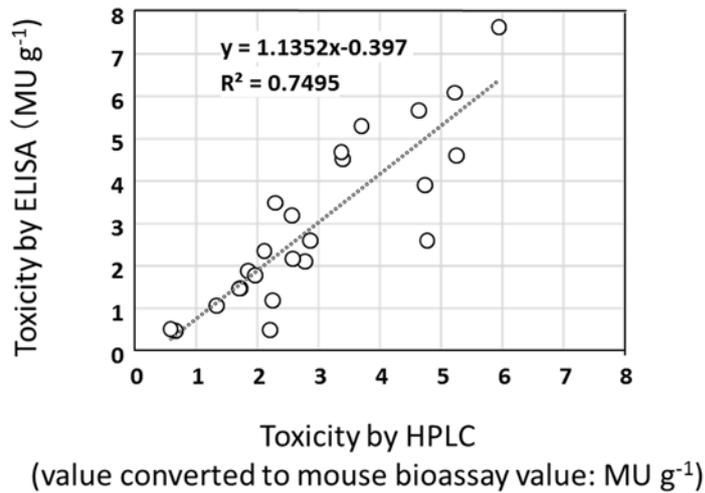


Fig. 6-9. Relationship between ELISA analysis value and HPLC analysis value in Arc Shell (left) and Japanese Cockle (right) from 2013 to 2015. Samples were selected for the period during the increase of toxicity. HPLC value ($\mu\text{mol g}^{-1}$) converted to mouse bioassay value (MU g^{-1}) according to Oshima (1995).

毒成分からの検討

2014年のアカガイ、トリガイにおける貝毒成分組成の推移とHPLC分析による毒力(mol濃度)の推移をFig. 6-10, 11に示した。毒力が上昇する期間に両種に共通して、GTX1, 4が特異的に検出されていた。そこでHPLC分析値からGTX1, 4の毒性値を除去した、ELISA分析値との相関を示した(Fig. 6-12)。すべてのサンプルによる相関関係ではアカガイ、トリガイとも決定係数(R^2)は増加し、それぞれ0.86 (0.70), 0.91 (0.70) (()内はGTX1, 4を含む決定係数)となった。また規制値前後の値でも、0.64 (0.63), 0.83 (0.75)とアカガイでの増加は小さいものの、ともに増加した(Fig. 6-12)。

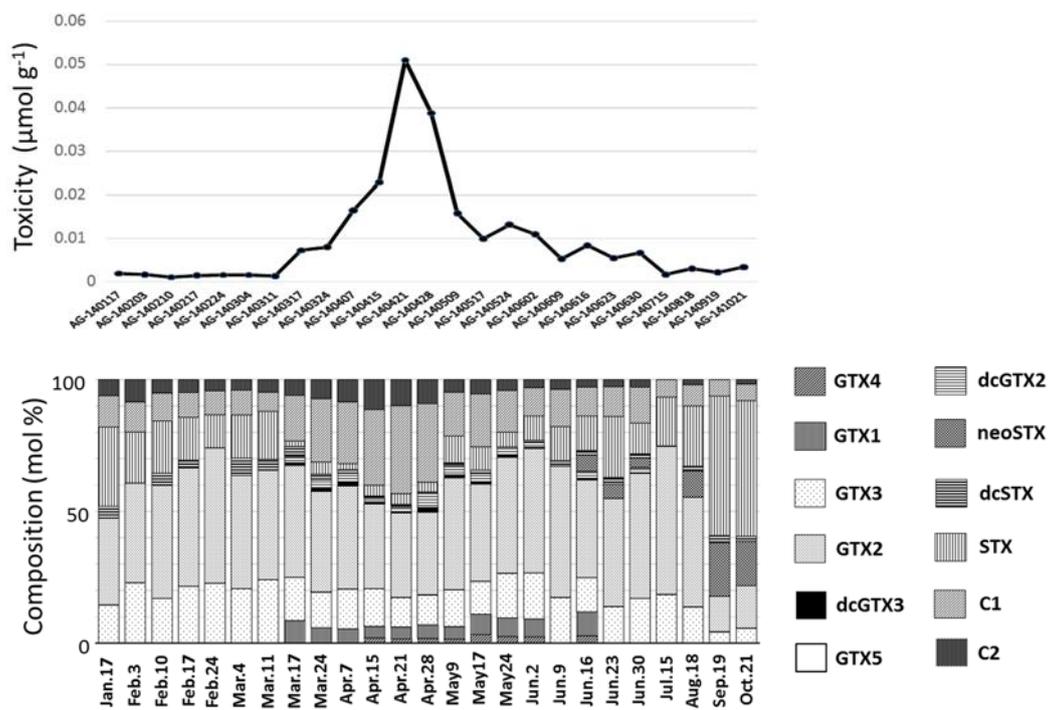


Fig. 6-10. Temporal changes in toxicity (upper) and in composition of toxin components (lower) in Arc Shell in 2014 (modified from Yamamoto and Oikawa, 2017).

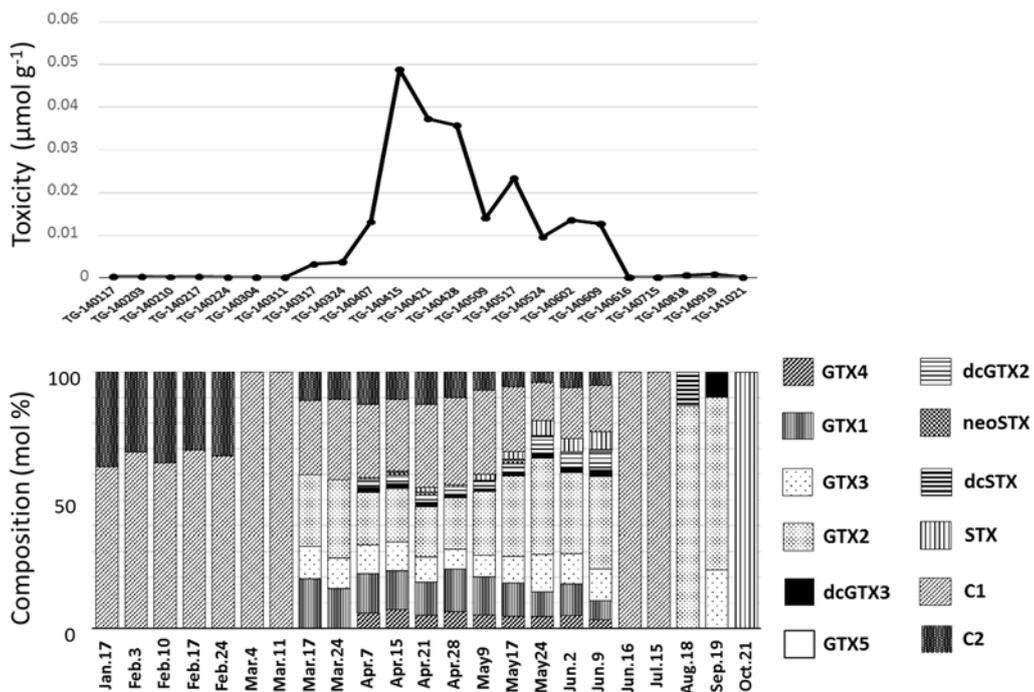


Fig. 6-11. Temporal changes in toxicity (upper) and in composition of toxin components (lower) in Japanese Cockle in 2014 (modified from Yamamoto and Oikawa, 2017).

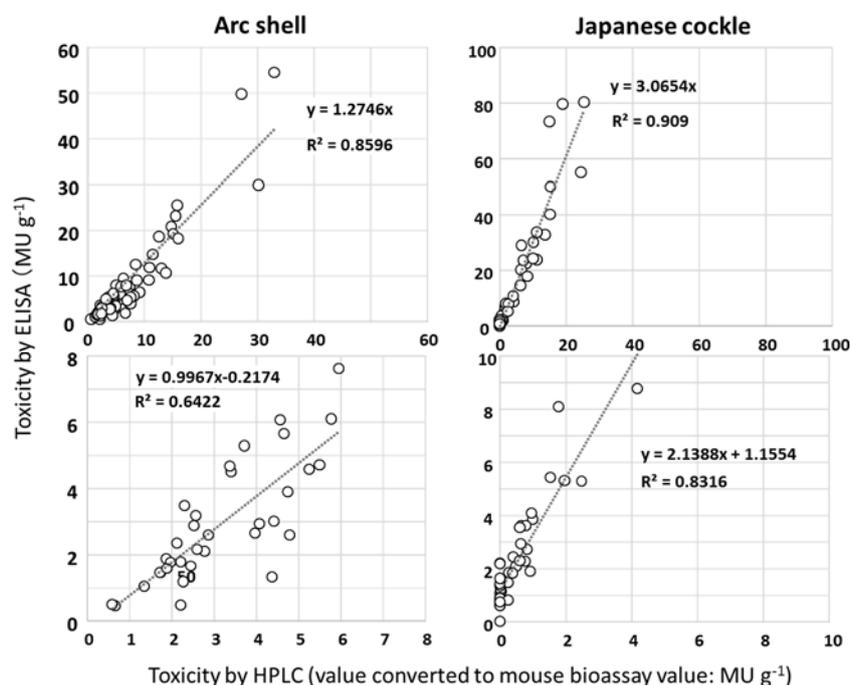


Fig. 6-12. Relationship between ELISA analysis value and HPLC analysis value in Arc Shell (left) and Japanese Cockle (right) from 2013 to 2015. Upper: all samples, lower: near regulation limit. HPLC value ($\mu\text{mol g}^{-1}$) converted to mouse bioassay value (MU g^{-1}), except for GTX1 and GTX4.

考察

麻痺性貝毒の検査法は、現在マウス試験法が公定法となっている。しかし、マウス試験法については、動物を用いた試験法であるため、多くの検体を処理するには労力がかかる上に、動物愛護の観点から倫理的に批判が多い。一方、機器分析による分析法としてHPLC法があるが、高価な設備や高度の専門技術が要求されることから、いずれもモニタリング手法として使用するのには問題がある。ELISA法を利用した麻痺性貝毒モニタリングは、近年各地で実施されるようになってきた（尾崎・中西，2015；島田，2017など）。Kasuga et al. (1996) は貝毒のスクリーニング法としてELISA法でマウス試験を置き換えることはできないとしていたが、近年反応性のよい抗体（Kawatsu et al., 2002）や、新しいメソッド（佐藤，2015）の開発が進み、運用次第では実用的なものとなってきている。篠崎ら（2013）は熊本県海域において、マガキにおけるスクリーニング検査法としての有効性を検討した結果、 2MU g^{-1} をスクリーニング基準値とすることにより、PSP-ELISAがスクリーニング法として有効であるとした。本研究において使用したキットは、篠崎ら（2013）と同じ大阪府立公衆衛生研究所が開発したキットであり、主要なPSP成分であるGTX2/3, dc-GTX2/3, C1/C2, GTX1/4, STX及びneoSTXのうちneoSTX以外の全てを安全基準値以下の濃度で検出可能であることが示されている（Kawatsu et al., 2002）。本研究においても、ELISA法

による毒力の分析値はアカガイ、トリガイとも *A. tamarense* の増殖に概ね良好に対応しており、ELISA 法を用いて本種による二枚貝毒化の推移をモニタリングすることの妥当性が確認された。

アカガイとトリガイで ELISA キットの反応性には差が認められた。毒力の高いサンプルを含むすべてのサンプルにおいては、アカガイ、トリガイとも高い相関関係が得られたが、トリガイでは毒力の高いところではばらつきが大きかった。一方、規制値である 4 MU g^{-1} に近い毒力のサンプルの場合はアカガイで大きくばらつく傾向があり、偽陰性となったサンプルも 51 検体中 2 検体あった。3 種類の分析方法を比較すると、概ねマウス試験法、HPLC 法、ELISA 法の順に高い値が得られた。麻痺性貝毒の公定法はマウス試験法であるため、簡易分析法をモニタリングないしスクリーニングに使用する場合、マウス試験より高い反応性が確保されることが望ましい。トリガイにおいてはマウス試験分析値と ELISA 分析値の関係をみると、 $Y=X$ の直線より上方にすべてのサンプルの値が存在し、偽陰性となったサンプルもなかったことから十分に条件を満たしていると考えられる。安全係数をどの程度設定するかは今後の課題であるが、今後モニタリング、スクリーニング手法として利用可能と判断される。アカガイにおいては、すべての ELISA 分析値が上方に位置するように原点から直線を延ばし、 $X=4$ との交点を求めたところ、約 1 MU g^{-1} となった。すなわち、ELISA 分析値 1 MU g^{-1} をスクリーニングレベルに設定することで最低限の安全性が確保されることが考えられた。

HPLC 分析値と ELISA 分析値の関係では、アカガイにおいても毒力の高いサンプルではばらつきが大きい傾向があった。また、トリガイにおいては毒力の高いところで ELISA 分析値が高いものと低いものに 2 極化する傾向がみられた。ELISA 法は検出力が高く、大量の試料を短時間に処理できる一方で、測定に使用する抗体は類縁体ごとに反応性が異なる(濱野, 2010)。本研究で使用している ELISA キットについて、抗体の各成分の反応性を比較したところ、GTX1, 4 の反応性が他の成分に比べて低い傾向が認められた(松嶋私信)。第 5 章の結果、および Figs. 6-10, 11 からはアカガイ、トリガイとも毒力が上昇する期間において GTX1, 4 が特異的に検出され、特にトリガイにてその傾向が顕著であった。そこで、HPLC 分析値から GTX1, 4 の毒性値を基に比毒性により計算したマウス毒性換算値を除去した毒力と、ELISA 分析値との相関をとると、サンプル全体、及び規制値前後のサンプルのどちらにおいても、トリガイで顕著に相関係数の増加が確認された。以上のことから、トリガイにおいては、本キットでモニタリングないしスクリーニングを行う際には、GTX1, GTX4 の割合が高い毒化ピーク時のサンプルを扱う場合、誤差が大きいことを念頭におく必要がある。

トリガイと比較して、アカガイでは全体的にばらつきが大きい傾向が認められた。これらが観察されたのは時系列的には主に期後半のサンプルであった。そこで、毒力の上昇期のみで相関を求めたところ、相関係数は増加した。前述の熊本県海域のマガキでは、毒化期および減毒期にかかわらず、毒成分組成はほぼ一定の比率であったとしている。第 5 章

第1節および第5章第2節で示した通り、アカガイでは内臓から筋肉等に毒が移行する。アカガイではこれにより長期間毒が保持され、さらにトリガイに比べ高い割合で弱毒成分が強毒成分に変換されて毒組成は変化する。したがって、ELISA法で毒力を定量するためには標準品の毒組成が試料の毒組成に類似することが必要である。本キットにおいては標準列を現場で毒化した二枚貝の抽出液を用いているが、本研究で用いたアカガイの標準列は2009年の毒化初期にサンプリングしたものであることから、後半のサンプルについては、標準列に用いる試料の毒組成によりELISA法で得られる分析値が影響を受けた可能性が考えられた。現在の標準列でも、毒化初期の動向を把握することは可能と推測されるが、毒化後期に強毒成分が増加することが想定されるアカガイにおいては、毒化時期を通してのモニタリングには前半と後半でそれぞれの時期に抽出した標準列を用いるなどの工夫が必要と思われる。さらに、両貝種とも各時期の毒力を的確に捉えるため、標準列に用いる試料の毒組成に注意する必要があると考えられた。

第7章 総括

本論文では、大阪湾における麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の個体群動態、および本種による二枚貝の毒化機構について調査研究の成果を述べた。そこで現在のモニタリング体制を再検討するにあたって、プランクトンモニタリングと二枚貝モニタリングの両面から検討を加えた。

まず、*A. tamarense* の出現環境として水温、塩分、栄養塩、競合プランクトンなどの各要因との関係を検討したところ、低栄養塩と競合種である珪藻類の動向と特に高い関係性があることが明らかになった。これらの情報を総合的に検討した結果、大阪湾における本種の出現に、近年瀬戸内海で問題となっている貧栄養化と珪藻の春期ブルーム規模の低下が関係している可能性が示唆された。すなわち過去の大阪湾では競合種である珪藻類が周年高密度に増殖していたため、*A. tamarense* のような有毒プランクトンの発生が抑制されていたが、近年栄養塩レベルは低下してきたことに伴い、珪藻のブルームの間隙を縫って本種が優占してきたものと推察された (Fig. 7-1)。

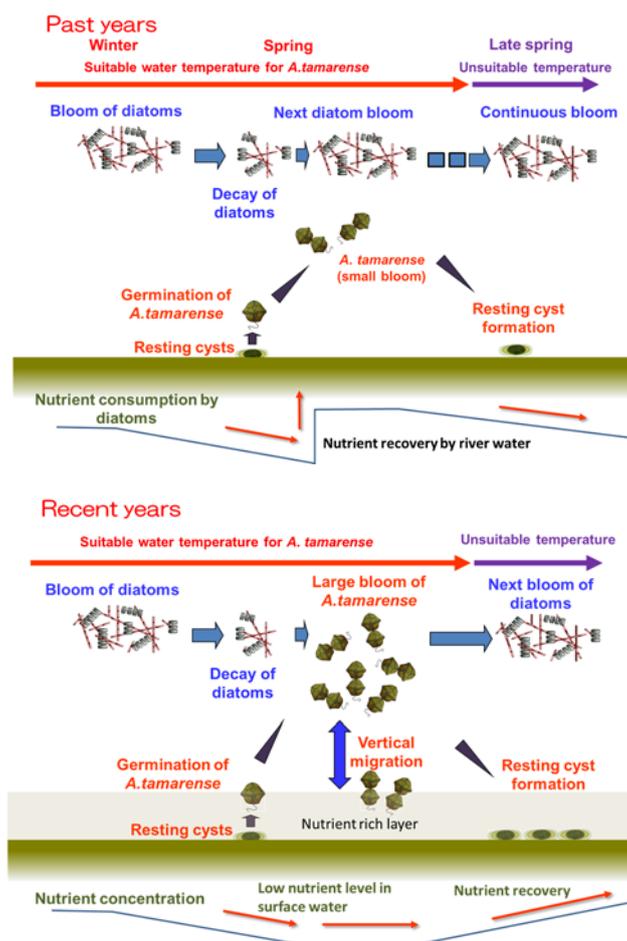


Fig. 7-1. Schematic illustrations of *A. tamarense* growth in Osaka Bay in the past and present years explaining larger blooms in recent years.

今井・各務（2017）は海底耕耘により珪藻の休眠期細胞の発芽を促すことで、有害赤潮プランクトンの増殖を抑制する研究を進めているが、大阪湾の *A. tamarensis* 増殖にも技術の応用の可能性が考えられる。本種の水平、鉛直分布の検討では、大阪湾では湾奥と中部沿岸域で高い密度を示すことが多く、中部沿岸域の増殖にはシストの高密度存在と深く関わっていることが推察された。中部海域の増殖域は、大阪湾において毒化で特に問題となる底曳き網のアカガイやトリガイの好漁場となっていることから、この水域を特に注意してモニタリングすることによって効率的に貝毒の発生を把握可能と考えられる。また、湾奥で早期に出現が確認され、特に高密度化する傾向があったが、その大規模増殖に淀川感潮域での増殖が関わっていること、淀川感潮域の増殖に可動式河口堰の運用が影響すること、すなわち河口堰から安定的に放水を行うことによって同水域における本種の増殖を抑制できることを明らかにした。本研究では同水域における増殖水温も明らかにしていることから、増殖に適した水温期限定で、一定量の放水を行うことで大阪湾における *A. tamarensis* 大規模増殖要因のおよそ半分は解消できると考えられる。*A. tamarensis* は日周鉛直移動を行うが、昼間は 5m から 10m 層に相対的に高い密度で分布することが明らかになった。これまでのモニタリングでは表層水中の細胞密度を指標に行われてきたが、最低でも前述の初期発生ないし大規模増殖が推測される海域においては表層水だけでなく、この鉛直分布を考慮したモニタリングを行う必要がある。現在、本研究の結果を基に湾奥海域と中部沿岸域の 4 定点を選定し、第 2 章で行った柱状採水を実施すること (Fig. 7-2) によって、より高い精度でプランクトンの発生を把握できる体制を整えつつある。さらに、二枚貝の貝種による毒化の違いを明らかにしたことから、毒化しやすいアサリにおいてはアカガイやトリガイより低密度での警戒値を提案している。

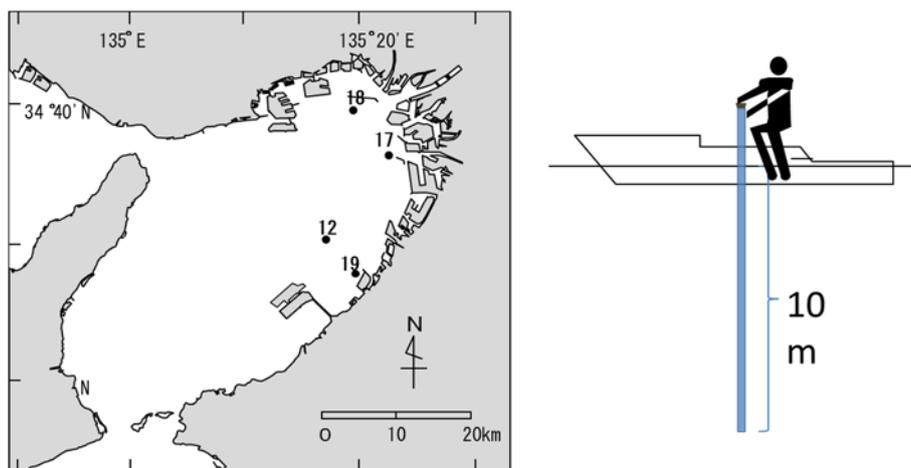


Fig. 7-2. Location of the priority stations for monitorings of *A. tamarensis* vegetative cells. Column samplings were carried out at the priority stations in addition to conventional surface water samplings (with illustration).

大阪湾の底曳き網で漁獲され、漁業の重要性が大きいアカガイ、トリガイについて主に毒化機構を検討した。まず、大阪湾におけるアカガイ、トリガイの毒化原因が *A. tamarense* であることを示し、本種が持つ毒成分に注目することによって毒成分の変化と部位別毒量、毒成分から両種の毒化、減毒課程を明らかにした。すなわち、トリガイでは内臓から他の部位に毒がほとんど移行することなく排出されるのに対し、アカガイでは筋肉部分に毒が移行し長期間保持することを通じて強毒成分に変換するため、高い毒力が維持されることを明らかにした。さらに、トリガイではほとんどの毒が内臓に存在することを示し、毒化部位の除去による出荷の可能性を提示した。また、個体ごとの毒のばらつき、海域差を明らかにすることで二枚貝モニタリングに必要な個体数を試算した。すなわち、漁場が特定できない大阪湾全域からのサンプリングを想定した場合、現状要件を満たしている3-5個体ではなく、最低でも10個体程度は必要と判断されたが、高毒化が推定される海域を特定すれば個体数を抑えられると考えられた。最後にプランクトンモニタリングを補完するためELISA法による簡易毒化モニタリングを試行した結果、トリガイにおいては本手法が有効であることが示された。

以上の対策を総合的に行うことで、現状のモニタリングの精度を飛躍的に向上できると考えられる。さらにこれらの情報を積極的に発信することを通じて、漁獲される流通二枚貝だけでなく、市民が遊漁等で採集する二枚貝の毒化にも対応できるリスク管理を進めていきたい。

要 約

大阪湾東部（大阪府）海域は、かつては典型的な富栄養海域として知られ、植物プランクトンの異常な増殖（赤潮）が問題になっていたが、1990年代まで麻痺性貝毒が問題となることはなかった。しかし2002年に有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* による規制値を超える貝毒が確認されて以来、ほぼ毎年のように春季に本種が増殖し、二枚貝が規制値を超えて毒化するようになった。*A. tamarense* は一般には大規模に増殖することは少ないとされるが、大阪湾では頻繁に赤潮状態を呈し、その規模は拡大傾向にある。大阪湾における貝毒問題の特徴は、対象が天然貝のみで、特に底曳き網の主要な漁獲物であるアカガイやトリガイにおいては貝毒の発生が魚価の高い時期に重なることにより大きな経済的損失となっていることである。さらに、2000年以降発生した中毒事例4件のうち3件が大阪湾におけるものであり、健康問題としても深刻な問題となっている。本研究は、麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *A. tamarense* の大阪湾における出現メカニズムを解明し、近年大規模に増殖するようになった要因を明らかにするとともに、二枚貝の毒化機構を解明することにより、高精度で効果的な麻痺性貝毒原因プランクトンおよび二枚貝毒化モニタリング体制を構築し、麻痺性貝毒による経済損失および中毒被害を未然に防ぐことを目的として行われたものである。

大阪湾における麻痺性貝毒原因種 *A. tamarense* 栄養細胞出現状況を2002年から2016年まで調査した。その結果、本種は3月から4月（水温12–15℃）に集中的に増殖することが明らかとなった。2011年から2015年に栄養塩およびその他プランクトンとの関係を調査した結果、溶存態無機窒素（DIN）、溶存態無機リン（DIP:PO₄-P）が低く、珪藻類の増殖が低調となった時期に *A. tamarense* が増殖していた。栄養細胞の出現には淀川河口沖、ないしは中部沿岸を中心に増殖する2つのパターンが認められた。鉛直的には主に5–10mの中層に分布していたが、2007年の赤潮発生時に堺出島漁港において昼夜観測を行ったところ、日周鉛直移動が確認された。大阪湾全域における *Alexandrium* 属シストの分布調査を2006年に行ったところ、大阪湾東部から湾奥にかけて高い密度で確認された。さらに東部海域で2007年以降、年2回の頻度でシストのモニタリングを行った結果、湾中部沿岸で高い密度で存在することが明らかになった。ここで行った Primuline 染色による計数では、*A. tamarense* と *Alexandrium catenella* のシストを区別することは困難であったため、2013年から2016年の試料について定量PCRにより両種の存在割合を推定したところ、2016年までは90%以上が *A. tamarense* シストであった。このことから、中部沿岸における出現は、同海域に高密度に分布するシストをシードポピュレーションとする増殖であることが推察された。

2007年に *A. tamarense* の赤潮が確認された淀川感潮域において、2008年から2009年に *A. tamarense* 増殖と環境要因について調査した。その結果、淀川における増殖に河口堰からの放水量が深く関わっていることが明らかになった。すなわち、降水量が少ない春季に河

口堰からの放水がほとんどなくなると、流動が少なく滞留時間の長い内湾のような状況になって塩分が上昇し、*A. tamarense* が活発に増殖すると考えられた。また、この2カ年の調査では河口で増殖し、上流に広がっていくパターンと、上流で増殖し下流に広がるパターンが観察された。そのため、同水域でシストの分布調査を行った結果、2007年にはほぼ全域でシストの分布が確認され、河口堰直下においても高い密度でシストが存在していた。すなわち、淀川感潮域においては海域から進入したシードポピュレーションによる増殖の他にシストの発芽から増殖するパターンが想定された。同水域においては海域と比較して大規模に増殖することが多く、2016年までに4例赤潮として確認されている。河口沖での高密度の出現は、感潮域に侵入ないし感潮域内で発芽したシードポピュレーションが、感潮域内で爆発的に増殖し、流出したものと推測された。これらの結果を元に、2011年の調査中に発生した赤潮では、国土交通省が河口堰より緊急放水を行った結果、赤潮を消滅させることに成功した。このような放流の効果を検証するため、培養株を用いて急激な塩分低下の影響を調べる実験を行ったところ、増殖初期においては1/10海水（約3psu）で処理すると海水に戻してもほとんど復活しないが、1/3海水（約10psu）で処理した場合は海域で復活すると考えられた。一方で、対数増殖期では増殖初期より生残率が高かったことから発生初期における対応が重要と考えられた。

以上の結果を考慮し、近年本種が大規模に増殖するようになった要因について検討した。大阪湾における栄養塩と植物プランクトンの長期変動を解析した結果、年間平均、*A. tamarense* の増殖が活発な春季とも栄養塩、特にDINが低下傾向にあることが明らかになった。また、春季のクロロフィルaは2000年代以降減少傾向にあること、珪藻の構成種は *Skeletonema* spp.主体であるが *Chetoceros* spp.や *Leptocylindrus* spp.の割合が増加するなど、生物環境にも変化が確認された。これらのことから、近年の栄養塩、特にDINレベルの低下とそれに伴う珪藻の春季ブルーム規模の縮小により、これまで競合により増殖が抑制されていた *A. tamarense* が大規模増殖できるようになったことが推察された。

プランクトン調査に加え、*A. tamarense* の増殖時におけるアカガイとトリガイの毒化状況を2013年から2015年に調査した。その結果、トリガイは本種の減少後比較的速やかに毒力が減少して無毒になるのに対し、アカガイでは本種減少後も毒力がほぼ周年残存することが明らかになった。この時の毒成分を調査したところ、アカガイ、トリガイとも *A. tamarense* 増殖時には GTX1,4 が増加する点で共通していたが、トリガイが *A. tamarense* の出現期以外は弱毒成分の C1,C2 主体であるのに対し、アカガイでは強毒成分の GTX2,3 主体で *A. tamarense* 減少後は STX の割合が増加していた。さらに2014年の毒化中期にそれぞれの貝種で部位別の毒量分布を調べた結果、トリガイでは内臓にほとんどの毒が存在するのに対し、アカガイでは筋肉、外套膜、貝柱といった可食部に毒が多く存在していた。これらのことから、アカガイでは体内で内臓から筋肉等に毒が移行することにより長期間毒を保持することとなり、さらに毒成分が強毒成分に変換するため長期間にわたって毒力が低下しないと考えられた。天然貝の毒力を評価するにあっては、海域におけるばらつき

がどの程度あるか明らかにすることが重要であることから、2010年の出荷自主規制中に漁獲場所が不明なサンプルを入手し、個体別毒量のばらつきを調査した。その結果、アカガイで7.5倍、トリガイで11.7倍と大きなばらつきが確認された。この時の毒成分を分析した結果、組成には大きな違いはなかったことから、このばらつきは毒化時期より、海域差によるものであると推測された。そこで、2015年に漁場別に分析した結果、*A. tamarense*の増殖およびシストの分布が多い中部沿岸で漁獲されたもので顕著に毒力が高い傾向が見いだされた。さらに、同一漁場内ではばらつきが比較的小さい傾向を示した。

本研究の結果、以上のように大阪湾における麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *A. tamarense* の出現生態、および本種による二枚貝の毒化機構について多くが明らかになった。そこでこれらの成果を元にして、より高い精度の麻痺性貝毒モニタリング体制の構築を提案した。まずプランクトンモニタリングにおいては本種の大阪湾における分布特性を考慮し、大規模増殖が確認され、かつシスト密度が高い海域を重点海域として長さ10mのホースを用いたカラム採水を提案し、2016年より運用されている。次に、貝種による毒化、減毒過程を考慮し、貝種ごとに原因プランクトンの警戒密度を設定する必要がある。最後に二枚貝の簡易分析法（ELISA法）により、麻痺性貝毒原因プランクトンモニタリングを補完することを提案する。以上により、大阪湾における麻痺性貝毒の被害防止の一助となることを期待する。

Summary

The eastern part of Osaka Bay (Osaka prefecture) was previously known as a typical eutrophicated sea, and huge growth of phytoplankton (red tide) was a serious problem, but paralytic shellfish poisoning (PSP) has not been a problem until the 1990s. However, PSP exceeding the regulation level by the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* was detected for the first time in this area in 2002, since then this species appeared and grew in the spring season almost every year. The bivalves were contaminated with PSP toxins beyond the regulation value. Although *A. tamarense* is generally regarded to rarely grow on a large scale in Osaka Bay, it frequently forms red tides and the scale tends to expand. The characteristic of the shellfish poisoning problem in Osaka Bay is that the natural shellfish is solely targeted. Especially in the Arc shell and the Japanese cockle, which are the main catch of the trawl fisheries, the season of the occurrence of PSP overlaps with the period of high fish price, resulting in a large economic loss. In addition, 3 out of 4 cases of poisoning by PSP that occurred since 2000 have been in Osaka Bay and it is a serious problem for health. We clarified the population dynamics of the PSP causative dinoflagellate *A. tamarense* and the factors which allow *A. tamarense* to grow on a large scale in recent years in Osaka Bay, and then clarified the poisoning mechanism of bivalves. This study aimed at establishing a highly precise and effective monitoring system for PSP causative plankton and bivalves poisoning to prevent economic loss and health damage caused by PSP.

We investigated the appearance of *A. tamarense* vegetative cells causing PSP in Osaka Bay from 2002 to 2016. It became clear that *A. tamarense* intensively proliferated from March to April (water temperature 12–15 °C). From the relation with nutrients or densities of other phytoplankton from 2011 to 2015, at the time dissolved inorganic nitrogen (DIN) and dissolved inorganic phosphorus (DIP: PO₄-P) showed low concentrations and the growth of diatoms became low, fewer *A. tamarense* was proliferating. Horizontally, two patterns of growth were observed in the occurrences of vegetative cells. One is at around the mouth of the Yodogawa estuary, the other the central east coast of Osaka Bay. Vegetative cells were mainly distributed in the middle layer (5–10 m), but from the day and night observations at the Sakai Dejima fishing port at the time of red tide occurrence in 2007, diel vertical migration was observed. We investigated a distribution of *Alexandrium* cysts in the whole area of Osaka Bay in 2006 and it was confirmed that high density area from the eastern part of the bay. Furthermore, as results of cyst monitorings twice a year since 2007 in the eastern part of Osaka Bay, it also became clear that *Alexandrium* cysts were abundantly distributed on the mid coast of the bay. As it was difficult to distinguish between *A. tamarense* and *A. catenella* cysts with primuline staining method, we estimated the proportions of the both species by quantitative PCR from 2013 to 2016 samples, 90% or more were *A. tamarense* cysts until 2016. This fact suggests that the bloom at the central east coast of the bay is a proliferation with cysts distributed densely in the same area, as a seed population.

In estuarine basin of Yodo River, where a red tide of *A. tamarensis* was confirmed for the first time in 2007, we investigated *A. tamarensis* dynamics and environmental factors from 2008 to 2009. It was found that the discharge of water from the weir was deeply involved in the growth of *A. tamarensis* in the Yodo River. When there was almost no discharge from the weir in the spring season due to little rainfall, salinity rose in the inner bay with less flow and longer residence time. And it is thought that *A. tamarensis* actively proliferated in estuarine-like water. In 2008 and 2009, a pattern growing upstream in the estuary and spreading upstream, and a pattern growing upstream and spreading downstream were observed. The distribution of cysts was confirmed in almost the whole area in Yodo River in 2007, and cysts also existed with high densities even at just under the estuary weirs. In the estuarine basin of Yodo River, it was thought that *A. tamarensis* blooms were initiated not only by seed populations entering from the sea area, but also by germination from the cysts in Yodo River basin. It was confirmed four red tides until 2016. It was consequently presumed that seed populations which were transferred to the river estuarine basin or germinated from the cysts within the river estuarine basin, explosively proliferated there, and resultant of high density population were carried to the offshore estuary. Based on these results, the Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism made an emergency water discharge from the estuary weir as a countermeasure for the red tide occurred during the survey in 2011, and succeeded in disintegrating the red tide. Laboratory culture experiments were conducted to clarify the effects of rapid salinity reduction on the cultivated strains of *A. tamarensis*. As a result, in the early stage of growth, it was hardly recovered by returning *A. tamarensis* to sea water which was once exposed at 3 psu. and at about 10 psu.. On the other hand, in the logarithmic growth phase, the survival rate of *A. tamarensis* was better after the same treatments than the initial stage of growth. An analysis of the long-term fluctuation of nutrients and phytoplankton in Osaka Bay revealed that nutrients and phytoplankton blooms tended to be lower in the spring season than past years. Chlorophyll *a* in spring actually had a declining trend since the 2000s, and proportion of *Chetoceros* spp. or *Leptocylindrus* spp. in diatom communities increased, even *Skeletonema* spp. are still dominant. The clear change in the biological environments was also confirmed as described above. It is also revealed that *A. tamarensis* bloom was observed in the years in which diatom growth was weak with low nutrients, especially DIN. From these facts, it was inferred that large-scale proliferation has occurred in *A. tamarensis* due to the recent reduction in nutrients, especially DIN level, accompanying shrinkage of diatom spring bloom scale. In the past years, big scale diatom blooms had occurred early spring, and diatom always over whelmed flagellates in Osaka Bay.

In addition to the plankton research, we investigated the contamination by PSP toxins in Arc shell and Japanese cockle during the period of growth of *A. tamarensis* from 2013 to 2015. The contamination and detoxification in the Arc Shell with paralytic shellfish toxins (PSTs) were slower than those in the Japanese Cockle, and slight amounts of PSTs remained in the Arc Shell through a year. The dominant toxins of Arc Shell were GTX2 and GTX3 and relative ratio of STX in the Arc

Shell increased with the metabolism of toxins. The dominant toxin in Japanese cockle were C1 and C2 in contrast. The proportion of GTX1 and GTX4 usually increased during the bloom of *A. tamarense* in both species. Furthermore, it was revealed that most toxins exist in visceral organs in the Japanese Cockle, whereas the Arc Shell kept the most toxins in edible parts such as muscle, mantle edge and adductor muscle. These facts suggest that toxins are transferred from internal organs to muscles in Arc Shell, so that toxins are retained for a long time in the muscles. Because the toxin component is converted into a virulent component, the toxicity does not decrease over a long period. Therefore in evaluating the toxicity of natural shellfish, it is important to clarify the toxicity variations in the fishing ground. Variations of shellfish toxicity were investigated during the voluntary shipping regulation period in 2010. It was confirmed that the variation was as large as 7.5 times for the Arc Shell and 11.7 times for the Japanese Cockle. Since there was no significant difference in toxin composition, it was inferred that this variations are due to the differences in fishing area than the period of toxin contamination. There was a tendency by the investigation in 2015 that the toxicity remarkably increased in the central east coast of Osaka Bay, where *A. tamarense* forms larger blooms and density of cysts is usually high. Furthermore, the toxicity tended to be stable within the same fishing ground.

This study has revealed the population dynamics of the PSP causative dinoflagellate *A. tamarense* in Osaka Bay and the intoxicating mechanism of bivalves by this species. Based on the results, we here propose the construction of a more precise paralytic shellfish monitoring system. Considering distribution characteristics of this species in Osaka Bay, we propose a column sampling using a hose with a length of 10 m in key area where vegetative cell are observed with a large scale and cysts existed with high densities. This sampling has pear operated from 2016. It is necessary to fix the warning density of PSP causing plankton for each shellfish species considering the feature of poisoning and metabolism processes by each shellfish species. Finally, we propose a simple analysis method for the toxicities of bivalves (ELISA method) complementing PSP causative plankton monitoring. Hopefully, this study would contribute to minimize the damage of PSP in Osaka Bay.

謝 辞

本研究の遂行およびとりまとめにあたり、終始懇切なるご指導ならびに叱咤激励いただいた北海道大学水産科学研究院特任教授 今井一郎博士並びに水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所 山口峰生博士（現北里大学）に深甚なる感謝の意を表します。北海道大学水産科学研究院教授 今村 央博士，同教授 笠井亮秀博士，同准教授 山口 篤博士には本論文をご校閲いただき、貴重なコメントを賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さり、懇篤なるご指導をいただきました大阪府立環境農林水産総合研究所水産研究部長 日下部敬之博士，前水産研究部長 有山啓之博士，辻野耕實元水産研究部長，安部恒之元大阪府立水産試験場長，長田凱夫元場長，城 久博士に衷心より感謝します。

本研究に対し、多くの有益なご教示とご鞭撻賜りました水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所 板倉 茂博士（現東北区水産研究所），同 長崎慶三博士（現高知大学），同 坂本節子博士，同 松山幸彦博士（現西海区水産研究所），同 外丸裕司博士，同 長井 敏博士（現中央水産研究所）をはじめとする赤潮環境部（現環境保全研究センター）の皆様には、有害・有毒プランクトンの生理・生態に関して有用なご助言をいただきました。ここに深く御礼申し上げます。また、水産研究・教育機構東北区水産研究所（現水産教育・研究機構本部）坂見知子博士には定量 PCR によるシストの種判別について大変お世話になりました。東北大学名誉教授 大島泰克博士，水産研究・教育機構中央水産研究所鈴木敏之博士，及川寛博士をはじめとする水産物応用開発センターの皆様には貝毒成分の分析から結果の考察など多くのご指導をいただきました。深く感謝いたします。三重大学教授 石川輝博士にはプランクトンおよびシストの生態について、香川大学教授 多田邦尚博士，故 Paul J. Harrison 博士にはプランクトンの長期変動と環境について多くのご教示とご指導いただきました。ここに記して心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり有益な情報とご助言をいただきました兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センター西川哲也博士，ならびに宮原一隆博士，香川県赤潮研究所元所長 吉松定昭博士，山口県水産研究センター内海研究部 馬場俊典専門研究員をはじめとする各県の赤潮・貝毒調査担当者の皆様に感謝します。

二枚貝の調査を行うにあたり、サンプリングにご協力頂いた泉佐野漁業協同組合高倉智之前組合長，大伍健一氏，大和谷孝義氏，大和谷忠和氏，岡田壮史氏をはじめとする泉佐野漁協の底曳き網漁業者の皆様，淀川調査でお世話になりました大阪市漁協の北村光弘氏，北村泰規氏にはこの場を借りて御礼申し上げます。

大阪府立公衆衛生研究所 濱野米一博士，同 川津健太郎博士には ELISA 法のご指導，およびキットを供給いただきました。ここに記して深く感謝いたします。フィールド調査を実施するにあたり，海洋観測等にご協力頂いた大阪府環境農林水産総合研究所水産技術

センター調査船「おおさか」の大道英次船長，辻 利幸前船長，榊昭彦元船長をはじめとする乗組員各位に心から御礼を申し上げます。同センター職員の方々には調査にご協力いただきとともに，多くの有益な議論をさせていただきました。ここに記して深く感謝の意を表します。

最後に私の研究を進めるにあたって叱咤激励と安らぎを与えてくれた妻，寧子，息子圭樟に感謝します。

引用文献

- Anderson, D.M. and Stolzenbach, K.D. (1985) Selective retention of two dinoflagellates in a wall-mixed estuarine embayment: the important of diel vertical migration and surface avoidance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **25**, 39-50.
- Anderson, D.M. and Wall, D. (1978) Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *G. excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms. *J. Phycol.* **14**, 224-234.
- Anderson, D.M., Taylor, C.D. and Armbrust, E.V. (1987) The effect of darkness and anaerobiosis on dinoflagellate cyst germination. *Limnol. Oceanogr.*, **32**, 340-351.
- Asakawa, M., Miyazawa, K., Takayama, H. and Noguchi, T. (1993) Dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* as the source of Paralytic Shellfish Poison (PSP) contaminated in bivalves from Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Toxicon*, **33**, 691-697.
- Ault, T.R. (2000) Vertical migration by the marine dinoflagellate *Prorocentrum triestinum* maximises photosynthetic yield. *Oecologia*, **125**, 466-475.
- Carson, R.L. (1977) *われらをめぐる海* (日下実男訳) , 早川書房, 東京.
- Conway, H.J. and Harrison, P.J. (1977) Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. IV. Transient response of *Chaetoceros devilis*, *Skeletonema costatum*, and *Thalassiosira gravida* to a single addition of the limiting nutrient. *Mar. Biol.*, **43**, 33-43.
- Craza, M. (2016) <https://www.undercurrentnews.com/2016/08/17/chile-salmon-industry-lost-million-by-needlessly-throwing-away-fish-after-algal-bloom/>, 17 Sep. 2017)
- Cullen, J.J. and Horrigan, S.G. (1981) Effects of nitrate on the diurnal vertical migration, carbon to nitrogen ratio, and the photosynthetic capacity of the dinoflagellate *Gymnodinium splendens*. *Mar. Biol.*, **62**, 81-89.
- Eppley, R.W., Holm-Hansen, O. and Strickland, J.D.H. (1968) Some observation on the vertical migration of dinoflagellates. *J. Phycol.*, **4**, 330-340.
- 江崎恭志・片山幸恵・長本 篤 (2002) 豊前海における麻痺性貝毒原因プランクトンの発生と水温との関係. *福岡水技セ研報*, **12**, 123-126.
- Fauchot, J., Levasseur, M., Roy, S., Gagnon, R. and Weise, A.M. (2005) Environmental factors controlling *Alexandrium tamarensis* (DINOPHYCEAE) growth rate during a red tide event in the St. Lawrence estuary (CANADA). *J. Phycol.*, **4**, 263-272.
- Fauchot, J., Levasseur, M. and Roy, S. (2005) Daytime and nighttime vertical migrations of *Alexandrium tamarensis* in the St. Lawrence estuary (Canada). *Mar Ecol Prog Ser* **296**: 241-250.
- Fritz, L. and Triemer, R.E. (1985) A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates1. *J. Phycol.*, **21**, 662-664.
- 藤原建紀 (2014) 内湾の貧酸素化—窒素・リン負荷量削減が海域の COD, 栄養塩レベルにおよぼす影響—. *沿岸海洋研究*, **52**, 11-27.
- 藤原建紀・肥後竹彦・高杉由夫 (1989) 大阪湾の恒流と潮流・渦. *海岸工学論文集*, **36**,

209-213.

- 福代康夫 (1982) 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.
- Fukuyo, Y. (1985) Morphology of *Protogonyaulax tamarensis* (Lebour) Taylor and *Protogonyaulax catenella* (Whedon and Kofoid) Taylor from Japanese coastal waters. *Bull Mar Sci* **37**: 529-537.
- 福代康夫 (1997) 赤潮種と発生環境—アレキサンドリウム—. 「赤潮の科学」岡市友利編, 恒星社厚生閣, 東京, 278-282.
- 濱野米一 (2010) 魚介毒性食中毒における最近の動向と今後の課題. *食衛誌* **51**: 302-310.
- 濱野米一・川津健太郎・塚本定三 (2002) 大阪湾における麻痺性貝毒による二枚貝の毒化. *大阪府立公衛研所報*, **40**, 11-18.
- 長谷川晶子・早川大輔・中村瑞那・秦 眞美・山下照夫・皆川洋子 (2015) 2014年シーズン愛知県においてマウス法規制値を超えた麻痺性貝毒の分析. *愛知県衛生研究所報*, **65**, 23-30.
- Heaney, S.I. and Eppley, R.W. (1981) Light, temperature and nitrogen as interacting factors affecting diel vertical migrations of dinoflagellates in culture. *J Plankton Res* **3**: 331-344.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R. and Strickland, J.D.H. (1965) Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, **30**, 3-15.
- Honjo, T., Yamamoto, S., Nakamura, O. and Yamaguchi, M. (1990) Annual cycle of motile cells of *Gymnodinium nagasakiense* and ecological features during the period of red tide development. In: Graneli E, Sundstrom B, Edler L, Anderson DM (eds) *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier Science Publishing, New York. 165-170.
- Horwits, W. (Ed.) (2000) AOAC, Official Method 959.08 Paralytic Shellfish Poison, biological method. In: *Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 17th ed. AOAC international, Gaithersburg, MD, pp. 59-61.
- 一見和彦・山崎 誠・鈴木敏之 (2000). 宮城県沿岸における *Alexandrium* 属シストの分布. *東北水研研報*, **63**, 119-124.
- Ichimi, K., Yamazaki, M., Okumura, Y. and Suzuki, T. (2001) The growth and cyst formation of a toxic dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*, at low water temperatures in northern Japan. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **261**, 17-29.
- 飯塚昭二・平山和次 (1980) 赤潮の生長 群生長と分裂時間. 赤潮に関する近年の知見と研究の問題点, 赤潮研究会編集委員会, 水産研究叢書 33, 日本水産資源保護協会, 東京, pp. 74-81.
- 今井一郎・板倉茂 (2006) 我が国における貝毒発生の歴史的経過と水産業への影響. *水産学シリーズ*, **153**, 9-18.
- 今井一郎・各務彰記 (2017) 現場珪藻類休眠期細胞の有効活用による有害赤潮防除対策. 平成28年度赤潮貧酸素対策推進事業「瀬戸内海等での有害赤潮発生機構解明と予察・被

- 害防止等技術開発」報告書. 瀬戸内海赤潮共同研究機関, 220-227.
- Imai, I., Yamaguchi, M. and Hori, Y. (2006) Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton Benthos Res.*, **1**, 71-84.
- 石川 輝・服部真由子・宮間秀樹・今井一郎 (2007) 伊勢湾および三河湾の海底泥表層における *Alexandrium* 属シストの現存量と分布. *水産海洋研究*, **71**, 183-189.
- Ishikawa, A., Hattori, M. and Imai, I. (2007) Development of the “plankton emergence trap/chamber (PET Chamber)”, a new sampling device to collect in situ germinating cells from cysts of microalgae in surface sediments of coastal waters. *Harmful Algae*, **6**, 301-307.
- Ishikawa, A., Hattori, M., Ishii, K., Kulis, D.M., Anderson, D.M. and Imai, I. (2014) In situ dynamics of cyst and vegetative cell populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Ago Bay, central Japan. *J. Plankton Res.*, **36**, 1333-1343.
- 石田基雄・尊田佳子 (2003) 三河湾における *Alexandrium tamarense* の増殖とアサリの毒化について. *愛知水試研報*, **10**, 25-36.
- 板倉茂 (2006) 1. 現場海域における *Alexandrium* 属の個体群動態 (III-1. 麻痺性貝毒原因プランクトンの生理生態, III. 有毒プランクトンの生理生態, 日本水産学会水産環境保全委員会, 懇話会ニュース). *日本水産学会誌* **72**: 1137.
- 板倉 茂 (2007) “現場海域における *Alexandrium* 属の個体群動態”. 貝毒研究の最先端—現状と展望 (今井一郎・福代康夫・広石伸互編), pp. 76-84. 恒星社厚生閣. 東京.
- 板倉 茂・山口峰生 (1999) 広島湾における *Alexandrium tamarense* シストの存在密度と発芽率の季節変動. パイオニア特別研究 麻痺性有毒プランクトンの発生予察手法の開発, 平成 10 年度研究報告, 瀬戸内海区水産研究所, 12-17.
- 板倉 茂・山口峰生 (2001) 栄養細胞の増殖特性とシストの休眠・発芽生理の解明. パイオニア特別研究 麻痺性有毒プランクトンの発生予察手法の開発, 平成 12 年度推進評価会議資料, 瀬戸内海区水産研究所, 5-6.
- Itakura, S. and Yamaguchi, M. (2001) Germination characteristics of naturally occurring cysts of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Hiroshima Bay, Inland Sea of Japan. *Phycologia*, **40**, 263-267.
- Itakura, S. and Yamaguchi, M. (2005) Morphological and physiological differences between the cysts of *Alexandrium catenella* and *A. tamarense* (Dinophyceae) in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton Biol. Ecol.* **52**, 85-91.
- Itakura, S., Yamaguchi, M., Yoshida, M. and Fukuyo, Y. (2002) The seasonal occurrence of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) vegetative cells in Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.* **68**, 77-86.
- 城 久 (1986) 大阪湾における富栄養化の構造と富栄養化が漁業生産におよぼす影響について. *大阪水試研報*, **7**, 1-174.
- John, U., Litaker, R.W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M.L. and Anderson, D.M. (2014a)

- Formal revision of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. *Protist*, **165**, 779-804.
- John, U., Litaker, R.W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M.L. and Anderson, D.M. (2014b) Proposal to reject the name *Gonyaulax catenella* (*Alexandrium catenella*) (Dinophyceae). *Taxon*, **63**, 932-933.
- 加賀新之助・関口勝司・吉田誠・緒方武比古 (2006) 岩手県沿岸に出現する *Alexandrium* 属とその毒生産能. *日水誌*, **72**, 068-1076.
- 香川県 (1985)-(2016) 重要貝類等毒化対策事業 (昭和 58 年度-平成 26 年度) . 香川県赤潮研究所年報. 香川県赤潮研究所. 高松.
- 海洋観測指針 (気象庁編) . 日本気象協会. 東京. 1990: 257-261.
- Kamiyama, T. (1996) Determination of the abundance of viable tintinnid cysts in marine sediments in Hiroshima Bay, the Seto Inland Sea of Japan, using a modified MPN method. *J. Plankton Res.*, **18**, 1253-1259.
- Kamykowski, D., Milligan, E.J., Reed, R.E. and Liu, W. (1999) Geotaxis/phototaxis and biochemical patterns in *Heterocapsa* (= *Cachonina*) *illdefina* (Dinophyceae) during diel vertical migrations. *J. phycol.* **35**, 1397-1403.
- Kasuga, F., Hara-Kudo, Y. and Machii, K. (1996) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for paralytic shellfish poisoning toxins. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, **37**, 407-410.
- Kawatsu, K., Hamano, Y., Sugiyama, A., Hashizume, K. and Noguchi, T. (2002) Development and application of an enzyme immunoassay based on a monoclonal antibody against gonyautoxin components of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Food Protection*, **65**, 1304-1308.
- Keafer, B.A., Buesseler, K.O. and Anderson, D.M. (1992) Burial of living dinoflagellate cysts in estuarine and nearshore sediments. *Mar. Micropaleont.* **20**, 147-161.
- Kim, C.H., Sako, Y., Ishida, Y. (1993)a Variation of toxin production and composition in axenic cultures of *Alexandrium catenella* and *A. tamarense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 633-639.
- Kim, C.H., Sako, Y. and Ishida, Y. (1993)b Comparison of toxin composition between populations of *Alexandrium* spp. from geographically distant areas. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 641-646.
- 木俣正夫・河合 章・石田祐三郎 (1960) 海底泥土の採集法. *日水誌*, **26**, 1227-1230.
- Koizumi, Y., Uchida, T., Honjo, T. (1996) Diurnal vertical migration of *Gymnodinium mikimotoi* during the red tide in Hokutsu Bay, Japan. *J. Plankton Res.*, **18**, 289-294.
- 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**, 131-134.
- 小谷祐一・小山晃弘・山口峰生・今井一郎 (1998) 四国西部および九州沿岸海域における有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* と *A. tamarense* のシストの分布. *水産海洋研究*, **62**,

104-111.

- Kvitek, R.G. and Beitler, M.K. (1991) Relative insensitivity of butter clam neurons to saxitoxin: A pre-adaptation for sequestering paralytic shellfish poisoning toxins as a chemical defense. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **69**, 47-54.
- Li, S.C., Wang, W.X. and Hsieh, D.P.H. (2002) Effect of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Mar Env Res* **53**: 145-160.
- MacIntyre, J.G., Cullen, J.J. and Cembella, A.D. (1997) Vertical migration, nutrition and toxicity in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **148**, 201-216.
- Maruyama, J., Noguchi, T., Onoue, Y., Ueda, Y. and Hashimoto, K. (1983) Anatomical distribution and profiles of the toxins in highly PSP-infested scallops from Ofunato Bay during 1980-1981. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 233-235.
- 松山幸彦・内田卓志・小谷祐一 (2000) *Alexandrium tamarense* 栄養細胞の増殖特性と環境要因との関係. パイオニア特別研究 麻痺性有毒プランクトンの発生予察手法の開発, 平成11年度研究報告. 瀬戸内海区水産研究所, 広島, 5-11.
- 松山幸彦・内田卓志・小谷祐一・長井 敏 (2002) 栄養細胞の増殖特性と緩急要因との関係. 運営費交付金プロジェクト研究 麻痺性有毒プランクトンの発生予察手法の開発, 事後評価会議資料. 瀬戸内海区水産研究所, 広島, 3-5.
- 宮村和良・松山幸彦・呉 碩津 (2007) 大分県猪串湾における有毒渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* の出現と海水懸濁物中の麻痺性貝毒量およびヒオウギガイ *Chlamys nobilis* の毒化予察. *日水誌*, **73**, 32-42.
- Miyazono, A., Nagai, S., Kudo, I. and Tanizawa, K. (2012) Viability of *Alexandrium tamarense* cysts in the sediment of Funka Bay, Hokkaido, Japan: Over a hundred year survival times for cysts. *Harmful algae*, **16**, 81-88.
- 村上りつ子・野口玉雄 (2000) 麻痺性貝毒 最近の知見を中心に. *食衛誌*, **41**, 1-10.
- 長井 敏 (2007) ” *Alexandrium* 属の個体群構造と分布拡大要因の解明” . 水産学シリーズ 153, 貝毒研究の最先端—現状と展望 (今井一郎・福代康夫・広石伸互編), pp. 85-99. 恒星社厚生閣. 東京.
- Nagai, S. (2011) Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of six *Alexandrium* species (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **47**, 703-708.
- 長井 敏・眞鍋武彦 (1993) 培養条件下における大型珪藻類 *Coscinodiscus wailesii* の増大胞子形成. *日本プランクトン学会報*, **40**, 151-167.
- Nagai, S. and Itakura, S. (2012) Specific detection of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* from single vegetative cells by a loop-mediated isothermal amplification method. *Marine genomics*, **7**, 43-49.
- 長尾正之・橋本英資・吉田みゆき・高杉由夫 (2001) 広島湾・呉湾における有毒プランクトンシストの発芽要因と海域攪乱. *海岸工学論文集*, **48**, 1081-1085.

- 中嶋昌紀 (1994) 大阪湾の水温平年変動. 平成4年度大阪府立水産試験場事業報告, 23-28.
- 仁木佳男・大嶋雄治・今田信良・本城凡夫・松山幸彦・内田卓志・瀬川進・高田浩二 (2001) 有毒プランクトンによる数種無脊椎動物の行動等への影響. *日水試*, **67**, 506.
- Nishikawa, T., Hori, Y., Nagai, S., Miyahara, K., Nakamura, Y., Harada, K., Tanda, M., Manabe, T. and Tada, K. (2009) Nutrient and phytoplankton dynamics in Harima-Nada, eastern Seto Inland Sea, Japan during a 35-year period from 1973 to 2007. *Estuaries and Coasts*, **33**, 417-427.
- 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.
- Ogata, T. and Kodama, M. (1986) Ichthyotoxicity found in cultured media of *Protogonyaulax* spp. *Mar. Biol.* **92**, 31-34.
- 呉 碩津・松山幸彦・山本民次・中嶋昌紀・高辻英之・藤沢邦康 (2005) 近年の瀬戸内海における有害・有毒渦鞭毛藻の分布拡大とその原因: 溶存態有機リンの生態学的重要性. *沿岸海洋研究*, **43**, 85-95.
- Oh, S.J., Matsuyama, Y., Nagai, S., Itakura, S., Yoon, Y.H. and Yang, H.S. (2009) Comparative study on the PSP component and toxicity produced by *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) strains occurring in Japanese coastal water. *Harmful Algae*, **8**, 362-368.
- 汪金芳・手塚 集・上田修功・田栗正章・樺島祥介・甘利俊一・竹村彰通・竹内啓・伊庭幸人 (2003) 計算統計 I-確率計算の新しい手法. *統計科学のフロンティア* 11, 岩波書店, 東京.
- 大阪府 (2017) <http://www.pref.osaka.lg.jp/shokuhin/shokutyuudoku/kai.html>
- 大阪府立環境農林水産総合研究所 (2016) <http://www.kannousuiken-osaka.or.jp/suisan/gijutsu/kaidoku/mahi.html>
- 大阪府立公衆衛生研究所 (2008) <http://www.iph.pref.osaka.jp/topics/kaidoku.html>
- Oshima, Y., Bolch, C.J. and Hallegraeff, G.M. (1992) Toxin composition of resting cysts of *Alexandrium tamarensis* (Dinophyceae). *Toxicon*, **30**, 1539-1544.
- 大島泰克・濱野米一 (2007) 麻痺性貝毒のモニタリング. 「貝毒研究の最先端—現状と展望」 (今井一郎, 福代康夫, 広石伸互編) 恒星社厚生閣, 東京, 19-29.
- Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirota, M. and Yasumoto, T. (1990) Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Graneli E, Sundstorm B, Edler L, Anderson DM (eds). *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, Amsterdam, 391-396.
- Oshima, Y. (1995) Post-column derivatization HPLC methods for paralytic poisons. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD, Enevoldsen HO (eds). *Manual on Harmful Marine Microalgae*, IOC Manuals and Guides No.33, UNESCO, 81-94.
- 尾崎 仁・中西雅幸 (2015) ELISA 法を用いた麻痺性貝毒プランクトンの毒量測定. *京都府農林水産技術センター海洋センター研究報告*, **37**, 11-15.
- 尾崎 仁・中西雅幸 (2016) ELISA 法を用いて測定したトリガイ軟体部毒量と公定法毒力

- との関係. 京都府農林水産技術センター海洋センター研究報告, **38**, 13-18.
- Paashe, E. (1973) Silicon and the ecology of marine plankton diatoms. II. Silicate-uptake kinetics in five diatom species. *Mar. Biol.* **19**, 262-269.
- Persson, A., Smith, B.C., Wikfors, G.H. and Quilliam, M. (2006) Grazing on toxic *Alexandrium fundyense* resting cysts and vegetative cells by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae*, **5**, 678-684.
- Prakash, B.A. (1967) Growth and toxicity of a marine dinoflagellate, *Gonyaulax tamarensis*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **24**, 1589-1606.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- 相良剛史・谷山茂人・吉松定昭・高谷智裕・橋本多美子・西堀尚良・西尾幸郎・荒川 修 (2010) 瀬戸内海播磨灘で発生した有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamiyavanichii* と毒化ムラサキイガイの毒性と毒成分. *食衛誌*, **51**, 170-177.
- 酒井基介 (2008) 近年の麻痺性貝毒の発生について. *徳島水研だより*, **67**, 1-3
- 酒井基介 (2010) 平成 22 年異例の貝毒発生. *徳島水研だより*, **74**, 5-6.
- 坂見知子・石川哲朗・宇田川徹 (2017) 宮城県から千葉県にかけての沿岸で採取した堆積物からの *Alexandrium tamarensis* と *A. catenella* の遺伝子検出. 平成 28 年度東北ブロック水産業関係研究開発推進会議分科会報告書. P18. 国立研究開発法人, 水産研究・教育機構, 東北水産研究所.
- 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. *南西海区水産研究所研究報告*, **31**, 45-52.
- 佐藤 繁 (2015) 麻痺性貝毒の生物化学的変換に基づいた簡易分析法の開発. *日水誌*, **81**, 792-795.
- Sato, S., Sakai, R. and Kodama, M. (2000) Identification of thioether intermediates in the reductive transformation of gonyautoxins into saxitoxins by thiols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 1787-1789.
- Sato, S., Takata, Y., Kondo, S., Kotoda, A., Hongo, N. and Kodama, M. (2014) Quantitative ELISA kit for paralytic shellfish toxins coupled with sample pretreatment. *Journal of AOAC International*, **97**, 339-344.
- 関口勝司 (2003) 麻痺性貝毒による貝類の毒化機構に関する研究. *岩手県水技セ研報*, **3**: 25-61.
- Shimada, H. and Miyazono, A. (2005) Horizontal distribution of toxic *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) resting cysts around Hokkaido, Japan. *Plankton Biol Ecol* **52**: 76-84.
- Shimada, H., Sawada, M., Kuribayashi, T., Nakata, A., Miyazono, A. and Asami, H. (2010) Spatial distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* in summer in the Okhotsk Sea off Hokkaido, Japan. *Plankton and Benthos Res.*, **5**, 1-10.
- 島田小愛 (2017) I -5. 熊本県海域における ELISA 法による天然二枚貝の麻痺性貝毒モ

- ニタリング. *日水誌*, **83**, 223-223.
- Shimizu, Y. and Yoshioka, M. (1981) Transformation of paralytic shellfish toxins as demonstrated in scallop homogenates. *Science*, **212**, 547-549.
- 篠崎貴史・渡邊龍一・川津健太郎・櫻田清成・高日新也・上野健一・松嶋良次・鈴木敏之 (2013) 麻痺性貝毒簡易検出キット (PSP-ELISA) を用いた貝毒モニタリングシステムの有効性. *食衛誌*, **54**, 397-401.
- Shumway, S.E., Sherman, S.A., Cembella, A.D. and Selvin, R. (1994) Accumulation of paralytic shellfish toxins by surfclams, *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1897) in the Gulf of Maine: seasonal changes, distribution between tissues, and notes on feeding habits. *Natural toxins*, **2**, 236-251.
- 尊田佳子・石川雅章・松澤忠嗣 (2006) 三河湾における *Alexandrium tamarense* シストの堆積密度及び発芽率の季節変動について. *愛知水試研報*, **12**, 13-17.
- Su, H.M. (1993) Role of temperature, salinity and ammonia on the occurrence of the Taiwanese strain of *Alexandrium tamarense*, pp. 837-842. In *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea* (eds. Smayda, T. J. & Y. Shimizu). Elsevier, Amsterdam.
- 水産庁 (1992) 平成3年 瀬戸内海の赤潮, p. 15. 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所. 神戸.
- 水産庁 (1995) 平成6年 瀬戸内海の赤潮, p. 58. 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所. 神戸.
- 社団法人日本食品衛生協会 (2005) 食品衛生検査指針理化学編, 3, 673-680.
- 多田邦尚・山本圭吾・一見和彦・山田真智子・西川哲也・樽谷賢治・山口一岩 (2012) 大阪湾の植物プランクトンの季節・経年変動とその要因. *瀬戸内海*, **64**, 75-77.
- 多田邦尚・西川哲也・樽谷賢治・山本圭吾・一見和彦・山口一岩・本城凡夫 (2014) 瀬戸内海東部海域の栄養塩低下とその低次生物生産過程への影響. *沿岸海洋研究*, **52**, 39-47.
- 高田久美代・山田圭一・小川博美 (2000) 広島湾海域における麻痺性貝毒原因プランクトン *Alexandrium catenella* の毒組成. *広島県保健環境センター研究報告*, **8**, 1-5.
- 高田久美代・妹尾正登・東久保靖・高辻英之・高山晴義・小川博美 (2004) マガキ, ホタテガイおよびムラサキイガイにおける麻痺性貝毒の蓄積と減毒の差異. *日水誌*, **70**, 598-606.
- 高杉由夫・埜口英昭・安田秀一 (1998) 広島湾における風による鉛直循環流と底泥プランクトンシスト分布. *水産海洋研究*, **62**, 187-198.
- 竹内照文 (1985) *Protogonyaulax catenella* (Dinophyceae) の日周鉛直移動. *日本プランクトン学会報*, **35**, 149-157.
- 竹内照文 (1992) 主要赤潮種の増殖動態—田辺湾におけるアレキサンドリウムの増殖動態. *月刊海洋*, **24**, 17-24.
- 竹内照文 (1994) 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. *和歌山県水試特別研報*, **2**, 1-88.
- 竹内照文・小久保友義・福代康夫 (1990) 田辺湾における *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) の栄養細胞とシストの分布. *日本プランクトン学会報*, **37**, 157-165.

- 田中弥太郎 (1984) ヤマトシジミの塩分耐性について. *養殖研究所研究報告*, **6**, 29-32.
- Therriault, J.C., Painchaud, J. and Levasseur, M. (1985) Factors controlling the occurrence of *Protogonyaulax tamarensis* and shellfish toxicity in the St. Lawrence estuary: freshwater runoff and stability of the water column. In: Anderson D. M, A. W. White & D. G. Baden (Ed.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York, pp. 141-146.
- 樽谷賢治 (1999) 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarensis* の増殖機構に関する生理生態学的研究. *瀬戸内水研報*, **1**, 63-96.
- 樽谷賢治・中嶋昌紀 (2011) 閉鎖性内湾域における貧栄養化と水産資源. *水環境学会誌*, **34**, 47-50.
- Townsend, D.W., Pettigrew, N.R., Thomas, A.C. (2005) On the nature of *Alexandrium fundyense* blooms in the Gulf of Maine. *Deep Sea Res., II* **52**, 2603-2630.
- 辻野耕實 (2002) 漁場の現状と変遷. 「大阪湾の海域環境と生物生産」(水産研究叢書 49), 日本水産資源保護協会, 東京, 62-86.
- Twarog, B.M. (1974) "Immunity" to paralytic shellfish toxin in bivalve molluscs. *In Proceedings of the Second International Symposium on Coral Reefs*, **1**, 505-512
- Tyler, M.A., Coats, D.W. and Anderson, D.M. (1982) Encystment in a dynamic environment: Deposition of dinoflagellate cysts by a frontal convergence. *Mar Ecol Prog Ser* **7**: 163-178.
- Uchida, T., Toda, S., Nakamura, O., Abo, K., Matsuyama, Y. and Honjyo, T. (1998) Initial site of *Gymnodinium mikimotoi* blooms in relation to the seawater exchange rate in Gokasyo Bay, Japan. *Plankton Biol. Ecol.*, **45**, 129-137.
- Weise, A., Levasseur, M., Saucier, F., Senneville, S., Bonneau, E., Roy, S., Sauve, G., Michaud, S. and Fauchot, J. (2002) The link between precipitation, river runoff, and blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* in the St. Lawrence. *Can J Fish Aquat Sci* **59**: 464-473.
- Yamaguchi, M., Itakura, S., Imai, I. and Ishida, Y. (1995) A rapid and precise technique for enumeration of resting cysts of *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) in natural sediments. *Phycologia*, **34**, 207-214.
- 山口峰生・板倉 茂・今井一郎 (1995) 広島湾海底泥における有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarensis* および *Alexandrium catenella* シストの現存量と水平・鉛直分布. *日水誌*, **61**, 700-706.
- Yamaguchi, M., Itakura, S., Nagasaki, K. and Imai, I. (1996) Distribution and abundance of resting cysts of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarensis* and *A. catenella* in sediments of the eastern Seto Inland Sea, Japan. In: *Harmful and Toxic Algal Blooms*, eds. Yasumoto, T., Y. Oshima and Y. Fukuyo, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, 177-180.
- 山本圭吾 (2004) 2002 年春期に大阪湾東部海域で発生した麻痺性貝毒について. *大阪水試研報*, **15**, 1-8.
- 山本圭吾・中嶋昌紀・田渕敬一・濱野米一 (2009) 2007 年春期に大阪湾で発生した

- Alexandrium tamarense* 新奇赤潮と二枚貝の高毒化. 日本プランクトン学会報, **56**, 13-24.
- 山本圭吾・松山幸彦・大美博昭・有山啓之 (2010) ブルーム盛期における麻痺性貝毒原因プランクトン *Alexandrium tamarense* の日周鉛直移動, 環境要因および細胞毒量の変化. 日水誌, **76**, 877-885.
- 山本圭吾・大美博昭・佐野雅基 (2011) 2007 年春期に淀川感潮域で発生した有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* 赤潮とシストの分布. 日本プランクトン学会報, **58**, 136-145.
- Yamamoto, K., Tsujimura, H., Nakajima, M. and Harrison, P.J. (2013) Flushing rate and salinity may control the blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in a river/estuary in Osaka Bay, Japan. *J. Oceanogr.*, **69**, 727-736.
- 山本圭吾・中嶋昌紀・今井一郎 (2017) 長期モニタリングデータからみた大阪湾における環境変化と有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* ブルーム規模の拡大. 日本プランクトン学会報, **64**, 11-21.
- 山本圭吾・及川寛 (2017) 大阪湾で麻痺性貝毒により毒化したアカガイ, トリガイにおける毒量および毒成分の経時変化と種間の差異. 日水誌, **83**, 589-598.
- 山本民次・樽谷賢治 (1997) 広島湾産有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖に及ぼす水温, 塩分及び光強度の影響. 藻類, **45**, 95-101.
- 山本民次・樽谷賢治・松田治 (2000) 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* ブルーム発生メカニズムとその予知および防除の可能性. pp.150-176. 有害・有毒赤潮の発生と予知・防除, 日本水産資源保護協会.
- Yamamoto, T. (2003) The Seto Inland Sea—eutrophic or oligotrophic?. *Marine Pollution Bulletin*, **47**, 37-42.
- 山下垂純・小泉喜嗣 (2001) 宇和海沿岸域における有毒渦鞭毛藻赤潮の発生記録と *Alexandrium catenella* 及び *Alexandrium tamarense* シストの分布. 愛媛水試研報, **9**, 35-40.
- Yamochi, S. and Abe, T. (1984) Mechanisms to initiate a *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay II. Diel vertical migration. *Mar. Biol.*, **83**, 255-261.
- 矢持 進・安部恒之・城 久 (1980) 赤潮発生状況調査. 昭和 53 年度大阪府水産試験場事業報告, 32-43.
- Yan, T., Zhou, M., Fu, M., Yu, R., Wang, Y. and Li, J. (2003) Effect of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on early development of the scallop *Argopecten irradians concentricus*. *Aquaculture*, **217**, 167-178.
- 吉田 誠 (2000) 渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の分類学的研究. 博士論文, 東京大学, 東京.
- 結城勝久 (2008) 三重県的矢湾における渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* と *A. tamarense* の出現量の長期変化. 日本プランクトン学会報, **55**, 33-40.