

# 窒素・リン制限下において水温が有毒渦鞭毛藻Alexandrium m catenellaの麻痺性貝毒量ならびに毒成分組成に及ぼす影響

誌名	日本プランクトン学会報
ISSN	03878961
著者名	松田,篤志 西島,敏隆 深見,公雄 足立,真佐雄
発行元	日本プランクトン学会
巻/号	54巻2号
掲載ページ	p. 92-98
発行年月	2007年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 窒素・リン制限下において水温が有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* の麻痺性貝毒量ならびに毒成分組成に及ぼす影響

松田篤志<sup>1), 2)\*</sup>・西島敏隆<sup>1)</sup>・深見公雄<sup>1), 3)</sup>・足立真佐雄<sup>1), 4)</sup>

<sup>1)</sup> 高知大学農学部栽培漁業学科 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

<sup>2)</sup> 現所属: 熊本市役所水産振興課 〒860-8601 熊本県熊本市手取本町 1-1

<sup>3)</sup> 現所属: 高知大学大学院黒潮圏海洋科学研究科 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

<sup>4)</sup> 現所属: 高知大学農学部農学科水族環境学研究室 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

### Effects of water temperature on paralytic shellfish poisoning toxin content and toxin composition of *Alexandrium catenella* (toxic dinoflagellate) under nitrogen- or phosphorus-limited conditions

Atsushi Matsuda<sup>1), 2)\*</sup>, THE LATE Toshitaka Nishijima<sup>1)</sup>, Kimio Fukami<sup>1), 3)</sup> and Masao Adachi<sup>1), 4)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

<sup>2)</sup> Kumamoto City Office, Tetorihoncho, Kumamoto 860-8601, Japan

<sup>3)</sup> Graduate School of Kuroshio Science, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

<sup>4)</sup> Laboratory of Aquatic Environmental Science, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

\* Corresponding author: E-mail: matsuda.atsushi@city.kumamoto.lg.jp

**Abstract** The purpose of this study is to unveil the variation in paralytic shellfish poisoning (= PSP) toxin content and toxin composition in *Alexandrium catenella* under nitrogen- or phosphorus-limited conditions at various temperatures. An axenic clone of *A. catenella* (strain TNY7) has been grown in nitrogen- or phosphorus-limited semi-continuous culture at 10, 15 and 20°C. The dilution rate was set to 0.055 d<sup>-1</sup>. PSP toxin content and composition of the cells collected just before cell divisions were analyzed using an HPLC-fluorometric analyzer.

The cellular toxin content under nitrogen-limited condition at 15°C (5.0 fmol cell<sup>-1</sup>) was similar to that at 20°C (3.8 fmol cell<sup>-1</sup>). The cellular toxin content under nitrogen-limited condition at 10°C (19.1 fmol cell<sup>-1</sup>) was higher than that at 15 and 20 °C. The cellular toxin content under phosphorus-limited condition at 15°C (61.0 fmol cell<sup>-1</sup>) was almost the same as that at 20°C (64.1 fmol cell<sup>-1</sup>). Under phosphorus-limited condition at 10°C, cellular toxin content of 104.2 fmol cell<sup>-1</sup>, which is the highest content ever found during our studies, was obtained. Toxin composition and ratio remained constant independent of nitrogen or phosphorus limitation and water temperature.

This study shows that water temperature (15–20°C) does not have a significant effect on cellular toxin content and low water temperature (10°C) increases cellular toxin content under nutrient-limited conditions.

**Key words:** *Alexandrium*, PSP, temperature, nitrogen, phosphorus

## はじめに

*Alexandrium catenella* (Whedon et Kofoid) Balech は、麻痺性貝毒と呼ばれる強力な神経毒を生産する渦鞭毛藻である。本藻が二枚貝に摂食されると、麻痺性貝毒が二枚貝体内に蓄積し、二枚貝は毒化する (Hashimoto et al. 1976, Sekiguchi et al. 2001)。この毒化した二枚貝をヒトが喫食すると麻痺中毒症状が現れ、ときには呼吸麻痺により死亡することもあることから、本藻による貝類の毒化は、食品衛生ならびに貝類増養殖、採貝漁業上大きな問題となっている。

二枚貝に摂食された本藻の細胞数とともに本藻の細胞内の毒量は、二枚貝に蓄積される麻痺性貝毒量の増減に影響を及ぼす要因の一つとして重要であると考えられる。本藻による二枚貝の毒化機構をより詳細に解明し、貝類毒化を予測するためには、現場モニタリング調査とともに、培養系において本藻の単位細胞あたりの毒量と比毒性 (毒組成比) が環境中でどのように変動するか明らかにする必要がある。本藻は現場海域において常に栄養塩類が十分にある条件下で生息しているわけではなく、多種多様な生物 (植物プランクトン、細菌類など) と栄養塩類の利用を巡って競合しながら生息していると考えられることから、培養試験にあたっては窒素・リン栄養塩が制限された条件下での試験が欠かせない。

これまで、著者らは本藻の増殖に適した水温と考えられる 20°C で半連続培養試験を行い、増殖を制限する栄養塩の供給速度が低く、細胞内が窒素制限状態にあるとき、細胞内の毒量が栄養塩類の十分にある条件下と比較して低くなり (Matsuda et al. 1996)、リン制限状態にあるときに高くなる (松田ほか 2006) 傾向があることを明らかにしてきた。ところで、本藻は、現場海域において、10°C 付近での出現が確認されており (和歌山県水産試験場 1998)、15°C 程度で細胞密度が高くなり貝類を毒化させたことが報告されている (Hashimoto et al. 1976)。さらに、培養試験の結果によると、*A. catenella* および他の *Alexandrium* 属の細胞内毒量と水温との関係については、増殖に適した水温よりも低い条件下で細胞内毒量が高くなる傾向があることが、栄養塩類が十分な条件下での培養試験により報告されている (Anderson et al. 1990, Navarro et al. 2006, Ogata et al. 1987, Ogata et al. 1989)。これらのことから、本藻が 15°C で細胞内が窒素あるいはリン制限となった場合、水温が 20°C から 15°C へと低下することで細胞内毒量が上昇し、二枚貝が毒化しやすくなる可能性はないのか、また、

細胞内毒量が高くなることがわかっている低水温とリン制限とが重なることで、細胞内毒量がきわめて高くなる恐れはないのか危惧される。20°C 以下で、細胞内が窒素あるいはリン制限状態にあるときの本藻の細胞内毒量および毒組成比の変化を明らかにすることは、本藻が出現可能な水温帯、とくに 20°C よりも低い水温条件下での毒化リスクを評価するうえで欠かすことができない。

そこで、本研究では、低水温条件下で制限栄養塩の供給速度が低く、細胞内が窒素あるいはリン制限状態にある本藻の、単位細胞あたりの総毒量および毒組成比がどのように変動するか、その傾向を明らかにした。

## 材料および方法

### 供試株

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

### 培養条件

全ての培養試験は、光強度  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 14 h 明 : 10 h 暗 (6 : 00 点灯, 20 : 00 消灯) で行った。試験中の無菌状態は FeTY (Fukami et al. 1992), ST10<sup>0</sup>, ST10<sup>-4</sup> (Ishida et al. 1986) 培地を用いた培養試験および DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) 染色による直接観察法 (Porter & Feig 1980) により確認した。

### 細胞分裂時刻の確認

半連続培養時の希釈時刻および細胞分裂直前の細胞内麻痺性貝毒量の分析のための集藻を行う時刻を決定するために、本藻の細胞分裂が行われる時刻を確認した。200 ml の SWII<sub>m</sub> 培地 (Sako et al. 1990) の入った 300 ml 容三角フラスコに、対数増殖期にある *A. catenella* TNY7 を接種し、上記の培養条件下で培養を行った。一昼夜にわたり 3 時間ごとに培養液を採取し、ただちに界線入りスライドグラスを用いて倒立顕微鏡下で直接計数法により計数を行った。試験は、バッチ法により 2 本立てで行った。

### 半連続培養

窒素制限下での半連続培養 あらかじめ窒素源を欠いた metals mix SWII 培地 (Matsuda et al. 1996) で前々培養した本藻を、窒素制限 (窒素:  $10.6 \mu\text{M}$ , リン:  $9.2$

$\mu\text{M}$ , N/P 比 1.2) 培地に接種し, 本培養と同じ水温で 17 日間, バッチ培養を行い前培養とした. 前培養終了後, 水温 10, 15, 20°C において希釈率 ( $D$ )  $0.05 \text{ d}^{-1}$  にて半連続培養 (Nakamura 1985, Tilman & Kilham 1976) を行った.

**リン制限下での半連続培養** リン制限 (窒素:  $42.0 \mu\text{M}$ , リン:  $0.43 \mu\text{M}$ , N/P 比 97.7) となるように調製した metals mix SWII 培地 (リン制限培地) が 200 ml 入った 300 ml 容三角フラスコに本藻を接種し, 前培養として 20 日間, バッチ培養を行った. 20°C, 15°C での半連続培養に使用するフラスコは, 接種後, それぞれの温度で前培養を行ったが, 10°C での半連続培養に使用するフラスコは, 接種後 7 日間は 15°C で培養し, その後, 13 日間, 10°C で前培養を行った. 前培養終了後, 水温 10, 15, 20°C において希釈率 ( $D$ )  $0.05 \text{ d}^{-1}$  にて半連続培養 (Nakamura 1985, Tilman & Kilham 1976) を行った.

比増殖速度 ( $\mu$ ) と希釈率 ( $D$ ) との関係は, 以下の式 (Nakamura 1985, Tilman & Kilham 1976) で表すことができる.

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

この式から, 希釈率 ( $D$ )  $0.05 \text{ d}^{-1}$  で定常状態にあるときの本藻の比増殖速度は  $0.05 \text{ d}^{-1}$  と計算される.

対数増殖期にある *A. catenella* TNY7 を上記と同じ明暗周期, 光強度  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 20°C で培養 (バッチ培養系, 栄養塩類が十分な条件下) し, 細胞密度の変化を観察した結果, 本藻の細胞分裂は 2:00 から 11:00 の間に集中することがわかった (Fig. 1). この結果を基に, 細胞分裂が終了した 11:00-12:00 に毎日, 各フラスコから 10 ml (=  $200 \times D$  ml) の培養液を抜き取り, 等

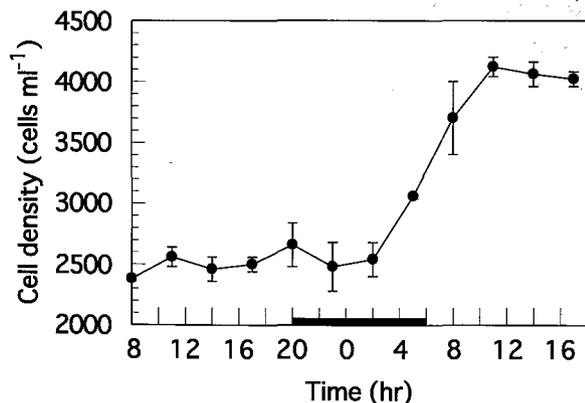


Fig. 1. Changes in cell density of *Alexandrium catenella* TNY7 during a cell cycle in batch culture under a photoperiod of 14L:10D cycle (light on at 6:00 and off at 20:00).

量の新たな窒素制限培地およびリン制限培地を添加した. 抜き取るあるいは添加する培地の量は, 電子天秤を用いて重量を測定することにより確認した. 抜き取った培養液中の細胞密度は, 界線入りスライドグラスを用いて倒立顕微鏡下で直接計数法により計数した.

窒素制限下での半連続培養では 40 日間, リン制限下での半連続培養では 34 日間培養を行い, 培養最終日の細胞分裂直前の時刻 (0:00-1:00) (Fig. 1) に試料を採取し, 細胞内毒量の分析および細胞密度の計数に供した.

### 麻痺性貝毒の分析

細胞内の貝毒分析のため, 細胞分裂直前の時刻 (0:00-1:00) に遠心分離により細胞を集藻し, 0.05 M 酢酸を加え超音波破碎により細胞内の麻痺性貝毒を抽出した後 (Sako et al. 1992), 蛍光-HPLC (L-6200 pump, F-1050 fluoromonitor, Hitachi 社), Wakosil 5C8 カラム ( $\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$ , 和光社) を用いて麻痺性貝毒の種類と量を分析した (Oshima et al. 1988). 1 細胞中に含まれるすべての麻痺性貝毒成分の和を単位細胞あたりの総毒量 ( $\text{fmol cell}^{-1}$ ) とした.

## 結 果

### 細胞分裂時刻の確認

*A. catenella* の細胞数は, 暗期開始から 6 時間後の 2:00 より増加し始め, 明期開始から 5 時間後の翌朝 11:00 以降, ほぼ一定となった (Fig. 1). このことから, 本藻の細胞分裂は, 2:00-11:00 の間に行われることが明らかになった. この結果を基に, 半連続培養における希釈時間を細胞分裂終了後の 11:00-12:00, 麻痺性貝毒分析のための集藻を細胞分裂直前の 0:00-1:00 に行うこととした.

### 窒素制限下での半連続培養試験

窒素制限下での培養終了時の細胞密度の変動は, すべての水温条件下で前日比  $\pm 5\%$  の相対誤差範囲内であった (Fig. 2).

それぞれの水温 (10, 15, 20°C) と窒素制限の組み合わせに対する単位細胞あたりの総毒量 ( $\text{fmol cell}^{-1}$ ) を Fig. 3 に示す. 15, 20°C で窒素制限状態下にある本藻の単位細胞あたりの総毒量は, それぞれ 5.0, 3.8  $\text{fmol cell}^{-1}$  であった. 一方, 10°C で窒素制限状態下にある本藻の単位細胞あたりの総毒量は 19.1  $\text{fmol cell}^{-1}$  と, 15, 20°C で窒素制限状態下にあるときよりも高くなった. 10°C で窒素制限下にある本藻の単位細胞あたりの総毒

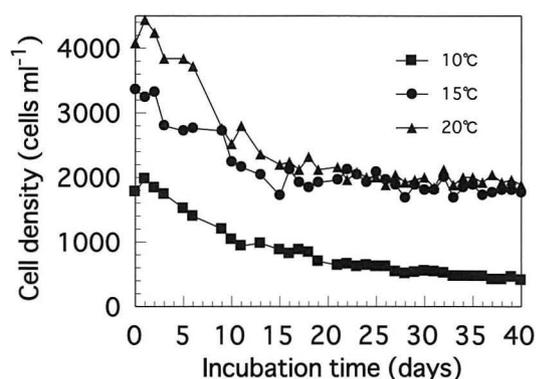


Fig. 2. Daily changes of cell concentration in nitrogen-limited, semi-continuous cultures. The dilution rates were set to  $0.05 \text{ d}^{-1}$ . Inorganic nitrogen and orthophosphate concentrations in the input medium were  $10.6 \mu\text{M}$  and  $9.2 \mu\text{M}$ , respectively.

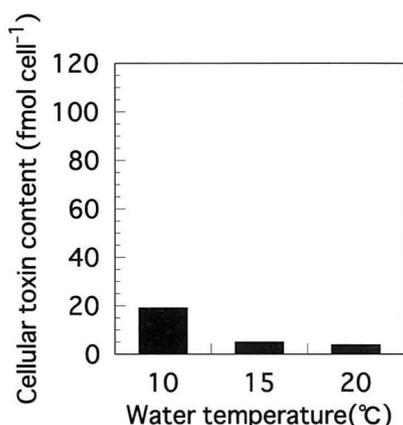


Fig. 3. Effect of water temperature on cellular toxin content of *A. catenella* in nitrogen-limited, semi-continuous cultures. The dilution rates were set to  $0.05 \text{ d}^{-1}$ .

量 ( $19.1 \text{ fmol cell}^{-1}$ ) は、 $15^\circ\text{C}$ ・窒素制限下で培養したときの約 3.8 倍、 $20^\circ\text{C}$ ・窒素制限下で培養したときの約 5.0 倍高かった。

同様に、麻痺性貝毒組成比 (mol%) を Fig. 4 に示す。細胞内の毒成分の種類とその構成比 (mol%) は、水温、希釈率にかかわらずほぼ一定であった。主要な毒成分として GTX5 (37~44%), C1+C2 (31~50%) を含んでおり、残りは GTX1+4 (6~14%), C4 (3~10%) であった。 $10^\circ\text{C}$  では、 $15^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$  と比較して C1+C2 が 50% とやや高く、GTX1+4 が 6% とやや低かった。

#### リン制限下での半連続培養

リン制限下での培養終了時の細胞密度の変動は  $15^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$  では前日比  $\pm 10\%$  の相対誤差範囲内であった (Fig. 5)。 $10^\circ\text{C}$  における培養終了時の細胞密度の変動は  $\pm 15\%$  と、系が定常状態に達していなかったが、希釈用培地を

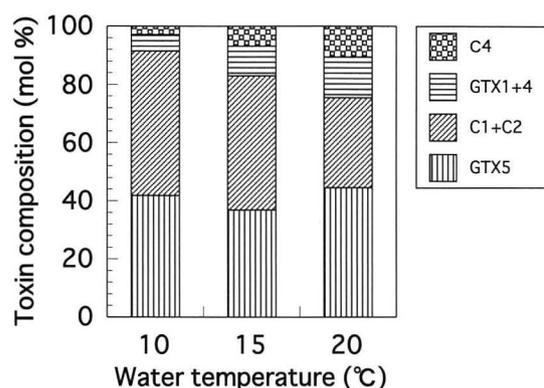


Fig. 4. Effect of water temperature on toxin composition of *A. catenella* in nitrogen-limited, semi-continuous cultures. The dilution rates were set to  $0.05 \text{ d}^{-1}$ .

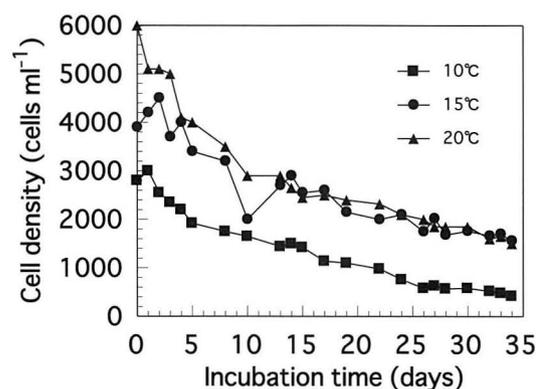


Fig. 5. Daily changes of cell concentration in phosphorus-limited, semi-continuous cultures. The dilution rates were set to  $0.05 \text{ d}^{-1}$ . Inorganic nitrogen and orthophosphate concentrations in the input medium were  $42.0 \mu\text{M}$  and  $0.43 \mu\text{M}$ , respectively.

使い果たしてしまっただため、培養 34 日目にて培養を終了した。

それぞれの水温 ( $10^\circ\text{C}$ 、 $15^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$ ) とリン制限の組み合わせに対する単位細胞あたりの総毒量 ( $\text{fmol cell}^{-1}$ ) を Fig. 6 に示す。 $15^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$  においてリン制限状態下で培養した本藻の単位細胞あたりの総毒量は、それぞれ  $61.0$ 、 $64.1 \text{ fmol cell}^{-1}$  であった。一方、 $10^\circ\text{C}$  で培養したとき、本藻の単位細胞あたりの総毒量は  $104.2 \text{ fmol cell}^{-1}$  と、 $15^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$  よりも増大した。 $10^\circ\text{C}$  でリン制限下にある本藻の単位細胞あたりの総毒量 ( $104.2 \text{ fmol cell}^{-1}$ ) は、 $15^\circ\text{C}$ ・リン制限下で培養したときの約 1.7 倍、水温  $20^\circ\text{C}$ ・リン制限下で培養したときの約 1.6 倍高かった。

同様に、麻痺性貝毒組成比 (mol%) を Fig. 7 に示す。細胞内の毒成分の種類とその構成比 (mol%) は、水温、希釈率にかかわらずほぼ一定であった。主要な毒成分として GTX5 (34~42%), C1+C2 (48~60%) を含んでお

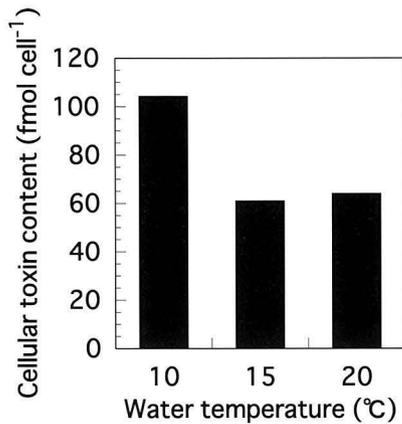


Fig. 6. Effect of water temperature on cellular toxin content of *A. catenella* in phosphorus-limited, semi-continuous cultures. The dilution rates were set to  $0.05 \text{ d}^{-1}$ .

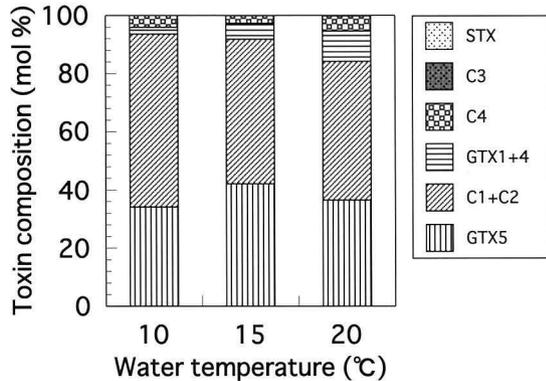


Fig. 7. Effect of water temperature on toxin composition of *A. catenella* in phosphorus-limited, semi-continuous cultures. The dilution rates were set to  $0.05 \text{ d}^{-1}$ .

り、残りは GTX1+4 (2~10%), C4 (3~5%) であった。また、STX (0~0.1%) あるいは C3 (0~0.1%) は検出されないか、ごく少量検出された。

## 考 察

窒素制限下での半連続培養では、いずれの水温条件下においても培養終了時の細胞密度の変動は±5%以内であった。このことから、すべての条件下で培養終了時、系は定常状態に達していたと考えられる。一方、リン制限下での半連続培養では、培養終了時の細胞密度の変動が15、20°Cでは±10%以内であったことから、系はほぼ定常状態に達していたと考えられる。しかし、10°Cにおける培養終了時の細胞密度の変動は±15%とやや大きく、系は定常状態に達しているとはいえなかった。なお、10°C・リン制限状態下での培養終了前の細胞密度変

化は、わずかに減少傾向にあったことから、培養系内の本藻は、定常状態となったときの比増殖速度  $0.05 \text{ day}^{-1}$  よりもやや低い速度で増殖していたと考えられる。したがって、10°C・リン制限状態下での培養容器内の、培養終了時の細胞内は、設定した希釈率で培養系が定常状態となったときよりもわずかに厳しいリン制限状態にあったと推測される。

15°Cで窒素制限下にある本藻の単位細胞あたりの総毒量 ( $5.0 \text{ fmol cell}^{-1}$ ) は、20°Cで窒素制限下にある本藻の総毒量 ( $3.8 \text{ fmol cell}^{-1}$ ) よりもやや高かったが、大差はなかった。また、15°Cでリン制限下にある本藻の単位細胞あたりの総毒量 ( $61.0 \text{ fmol cell}^{-1}$ ) は、20°Cでリン制限下にあるとき ( $64.1 \text{ fmol cell}^{-1}$ ) と、ほぼ同じであった。このことから、細胞内が窒素制限状態、リン制限状態どちらの場合も、水温が20°Cから15°Cへと低下することにより単位細胞あたりの総毒量に大きな差が出ることはないと考えられる。本藻 (*A. catenella* TNY7) の増殖速度は15°Cよりも20°Cでやや高いものの、最大細胞収量は20°Cよりも15°Cでわずかに大きいことから (Matsuda et al. 1996)、15°Cは20°Cに匹敵する増殖に適した水温であると考えられる。本藻の増殖に大きな変化がない15~20°Cでは、細胞内の窒素・リン制限の程度など、水温以外の要因が細胞内の総毒量を大きく変動させていると推察される。

窒素制限下、リン制限下ともに、10°Cにおける単位細胞あたりの総毒量は、15°C、20°Cのそれと比較して高くなった。栄養塩類が十分にある条件下で培養した *Alexandrium* 属の単位細胞あたりの総毒量は、増殖に適した水温条件下よりも低水温条件下で高くなる傾向があることが報告されている (Anderson et al. 1990, Ogata et al. 1987, Ogata et al. 1989)。今回の試験結果から、栄養塩類が十分にある条件下と同様に、窒素あるいはリンが制限された条件下においても、増殖に適した水温よりも低水温条件下で単位細胞あたりの総毒量が高くなる傾向があることがわかった。

今回の試験では、前述のとおり10°C・リン制限状態下での培養系では十分な定常状態が得られておらず、設定した比増殖速度  $0.05 \text{ day}^{-1}$  よりも厳しいリン制限となっていたと推察される。本藻の単位細胞あたりの総毒量は、細胞内リン含量が低く、比増殖速度が遅くなるにつれて高くなることが明らかになっている (松田ほか2006) ことから、10°C・リン制限状態下において比増殖速度  $0.05 \text{ d}^{-1}$  で十分な定常状態が得られた場合、単位細胞あたりの総毒量は、今回の試験で得られた値 ( $104.2 \text{ fmol cell}^{-1}$ ) よりも低くなると予想される。10°C・リン

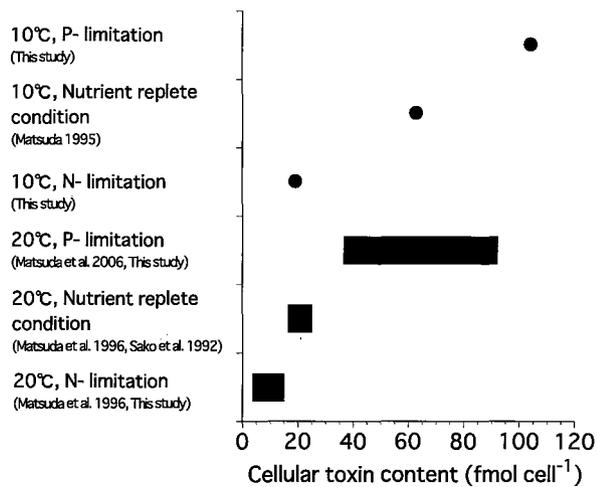


Fig. 8. Comparison of cellular toxin content of *A. catenella* TNY7 in phosphorus- and nitrogen-limited cultures at 10°C with those of previous studies.

制限状態下での単位細胞あたりの総毒量については、再度、十分な定常状態下での試験を行う必要がある。

今回の試験で得られた 10°C・リン制限下での本藻の単位細胞あたりの総毒量 (104.2 fmol cell<sup>-1</sup>) は、これまで *A. catenella* TNY7 を用いて行った培養試験 (Matsuda et al. 1996, Sako et al. 1992, 松田 1995, 松田ほか 2006) の中で最も高かった (Fig. 8)。しかし、10°C・リン制限下での本藻の増殖速度は、0.05 d<sup>-1</sup> 以下と推察されることから、風や潮流などの物理的要因あるいは本藻自身の遊泳や走光性等の生物学的要因による集積のために細胞密度が高くなった場合、10°C・リン制限下で二枚貝が毒化する可能性が考えられる。

試験を行ったいずれの水温でも、窒素制限下ではリン制限下よりも明らかに細胞内毒量が低くなった。麻痺性貝毒成分は、その分子構造内に多くの窒素原子を含んでおり、藻類の細胞内での毒生合成には 3 分子のアルギニンが必要であると言われている (Shimizu 1993)。このことから、窒素制限下では毒生合成に必要な窒素源が不足し、細胞内で作り出される麻痺性貝毒の量が少なくなったために細胞内毒量も低くなったのではないかと考えられる。一方、リン制限下で細胞内毒量が高くなったことが細胞内の窒素代謝と関係があるのかどうかについては、今回の試験結果からは不明である。

細胞内の毒量は、培養液あるいは細胞内の N/P 比により変動し、リン制限下では N/P 比が高くなるにつれて細胞内の毒量が高くなる傾向にあることが *Alexandrium minutum* で報告されている (Maestrini et al. 2000)。本藻についても、今回の試験と同一条件下 (20°C・リン制限下・希釈率 0.05 d<sup>-1</sup>) で培養液の N/P

比が 219.5 の場合に 84.9 fmol cell<sup>-1</sup> (松田ほか 2006) であった細胞内毒量が、培養液の N/P 比が 97.7 と低い今回の試験では 64.1 fmol cell<sup>-1</sup> と低くなっている。培養液の N/P 比が 97.7 よりも高い培養液を用いて、10°C あるいは 15°C で今回同様の試験を行った場合、細胞内毒量は今回の試験で得られた値よりも高くなる可能性がある。一方、窒素制限下については、20°C・窒素制限下 (希釈率 0.05 d<sup>-1</sup>, 培養液の N/P 比=1.2) での今回の結果が 3.8 fmol cell<sup>-1</sup> と、N/P 比=0.16 において今回と同一条件下で試験を行った場合の 4.23 fmol cell<sup>-1</sup> (Matsuda et al. 1996) とほぼ同じであった。このことから、N/P 比=1.2 よりも低い培養液を用いて 10°C あるいは 15°C で今回同様の試験を行った場合、細胞内毒量は今回の試験結果とほぼ同じか、あるいは、細胞内の窒素制限が厳しくなることでさらに低くなると考えられる。

今回の試験での細胞内の毒成分・毒組成比は、これまでの *A. catenella* TNY7 の培養試験結果と大差はなかった (Matsuda et al. 1996, Sako et al. 1992, 松田ほか 2006)。*Alexandrium* 属の細胞内の毒成分・毒組成比は、培養条件にかかわらず変動がないことは、これまでも指摘されており (Boyer et al. 1987, Boyer et al. 1986, Kim et al. 1993, Ogata et al. 1987, Parkhill & Cembella 1999), 今回の結果はこれらと一致する。

以上のように、15~20°C では、水温よりも細胞内の窒素・リン制限の程度が本藻の単位細胞あたりの総毒量を大きく変動させており、細胞内がリン制限状態にあるとき、単位細胞あたりの総毒量が高くなる傾向にあることが明らかになった。また、10°C での単位細胞あたりの総毒量は、窒素・リン制限ともに、20°C よりも高く、さらに、窒素制限下よりもリン制限下で高くなる傾向にあることが明らかになった。とくに、10°C・リン制限下にあるとき、単位細胞あたりの総毒量がこれまでの培養試験の中で最も高くなることがわかった。一方、細胞内の毒成分・毒組成比は、制限栄養塩の種類・水温条件により大きく変動することはなく、ほぼ一定であることが明らかとなった。

今回得られた試験結果から、本藻の細胞密度が減少傾向にあるときに二枚貝の毒量が増加する (和歌山県水産試験場 1998) といった本藻の出現・細胞密度と貝類毒化との複雑な関係は、現場海域に生息する本藻の単位細胞あたりの総毒量が、環境要因により変動することがその原因の一つであると考えられる。今後、現場海域に生息する本藻の単位細胞あたりの総毒量と、細胞内の窒素・リン含量を直接測定し、本藻細胞内の窒素・リン制

限状態が単位細胞あたりの総毒量および貝類に供給・蓄積される麻痺性貝毒量にどのような影響を及ぼしているか検討する必要がある。

## 謝 辞

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

## 引用文献

- Anderson, D. M., D. M. Kulis, J. J. Sullivan, S. Hall & C. Lee 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Mar. Biol.* **104**: 511-524.
- Boyer, G. L., J. J. Sullivan, R. J. Andersen, P. J. Harrison & F. J. R. Taylor 1987. Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* **96**: 123-128.
- Boyer, G. L., J. J. Sullivan, R. J. Andersen, F. J. R. Taylor, P. J. Harrison & A. D. Cembella 1986. Use of high-performance liquid chromatography to investigate the production of paralytic shellfish toxins by *Protogonyaulax* spp. in culture. *Mar. Biol.* **93**: 361-369.
- Fukami, K., T. Nishijima & Y. Hata 1992. Availability of deep seawater and effect of bacteria isolated from deep sea water on mass culture of food microalga *Chaetoceros ceratosporum*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**: 931-936.
- Hashimoto, Y., T. Noguchi & R. Adachi 1976. Occurrence of toxic bivalves in association with the bloom of *Gonyaulax* sp. in Owase Bay. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **42**: 671-676.
- Ishida, Y., M. Eguchi & H. Kadota 1986. Existence of obligately oligotrophic bacteria as a dominant population in the South China Sea and the West Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **30**: 197-203.
- Kim, C.-H., Y. Sako & Y. Ishida 1993. Variation of toxin production and composition in axenic cultures of *Alexandrium catenella* and *A. tamarensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**: 633-639.
- Maestrini, S. Y., C. Bechemin, G. Grzebyk & C. Hummert 2000. Phosphorus limitation might promote more toxin content in the marine invader dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Plankton Biol. Ecol.* **47**: 7-11.
- 松田篤志. 1995. 無菌培養系における *Alexandrium catenella* の増殖生理及び麻痺性貝毒生産の特性. 修士論文, 高知大学, 南国. pp. 74.
- Matsuda, A., T. Nishijima & K. Fukami 1996. Effects of nitrogen deficiency on the PSP production by *Alexandrium catenella* under axenic cultures, pp. 305-308. In *Harmful and Toxic Algal Blooms* (eds. Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo). Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
- 松田篤志・故西島敏隆・深見公雄・足立真佐雄 2006. リン制限下における *Alexandrium catenella* の増殖の動力学および麻痺性貝毒生産. *日本水産学会誌* **72**: 193-200.
- Nakamura, Y. 1985. Kinetics of nitrogen- or phosphorus-limited growth and effects of growth conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Japan* **41**: 381-387.
- Navarro, J. M., M. G. Munoz & A. M. Contreras 2006. Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* **5**: 762-769.
- Ogata, T., T. Ishimaru & M. Kodama 1987. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxin change in *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* **95**: 217-220.
- Ogata, T., M. Kodama & T. Ishimaru 1989. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxin production of toxic dinoflagellates, pp. 423-426. In *Red tides: Biology, environmental science, and toxicology* (eds. Okaichi, T., D. M. Anderson & T. Nemoto). Elsevier, New York.
- Oshima, Y., K. Sugino & T. Yasumoto 1988. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins, pp. 319-326. In *Mycotoxins and Phycotoxins '88* (eds. Natori, S., K. Hashimoto & Y. Ueno). Elsevier, Amsterdam.
- Parkhill, J.-P. & A. D. Cembella 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* from north-eastern Canada. *J. Plankton Res.* **21**: 939-955.
- Porter, K. G. & Y. S. Feig 1980. The use DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 943-948.
- Sako, Y., C.-H. Kim & Y. Ishida 1992. Mendelian inheritance of paralytic shellfish poisoning toxin in the marine dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 692-694.
- Sako, Y., C. H. Kim, H. Ninomiya, M. Adachi & Y. Ishida 1990. Isozyme and cross analysis of mating populations in the *Alexandrium catenella/tamarensis* species complex, pp. 320-323. In *Toxic Marine Phytoplankton* (eds. Graneli, E., B. Sundstrom, L. Edler & D. M. Anderson). Elsevier, New York.
- Sekiguchi, K., T. Ogata, S. Kaga, M. Yoshida, Y. Fukuyo & M. Kodama 2001. Accumulation of paralytic shellfish toxins in the scallop *Patinopecten yessoensis* caused by the dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Otsuchi Bay, Iwate Prefecture, northern Pacific coast of Japan. *Fish. Sci.* **67**: 1157-1162.
- Shimizu, Y. 1993. Microalgal metabolites. *Chem. Rev.* **93**: 1685-1698.
- Tilman, D. & S. S. Kilham 1976. Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semi-continuous culture. *J. Phycol.* **12**: 375-383.
- 和歌山県水産試験場 1998. 平成9年度 貝毒被害防止対策事業報告書. p. 8. 和歌山県水産試験場.