

舞鶴湾における有害渦鞭毛藻Heterocapsa circularisquamaの季節的変動

誌名	北海道大学水産科学研究彙報 = Bulletin of Fisheries Sciences, Hokkaido University = Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University
ISSN	13461842
著者名	今井, 一郎 白石, 智孝 藤井, 光 広石, 伸互
発行元	北海道大学大学院水産科学研究科
巻/号	63巻1号
掲載ページ	p. 1-5
発行年月	2013年3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



舞鶴湾における有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* の季節的変動

今井 一郎¹⁾・白石 智孝²⁾・藤井 光³⁾・広石 伸互⁴⁾

(2012年12月14日受付, 2013年1月24日受理)

Seasonal Fluctuations of the Bivalve-killing Dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in Maizuru Bay, Kyoto Prefecture

Ichiro IMAI¹⁾, Tomotaka SHIRAISHI²⁾, Hikaru FUJII³⁾ and Shingo HIROISHI⁴⁾

Abstract

The noxious dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* is the most harmful species to bivalves such as oysters, Manila clams, and pearl oysters due to causing mass mortalities of these bivalves by the red tides in coastal areas of Japan. The population dynamics of *H. circularisquama* was monitored in Maizuru Bay, Kyoto Prefecture, in 1999 to 2001 with the indirect fluorescent antibody technique (IFAT) using monoclonal antibodies, which enable the species-specific detection of this species with high sensitivity detecting even at low cell densities of several cells L⁻¹. *H. circularisquama* cells were successfully monitored, and they appeared in late spring, showed maximal level in the summer and disappeared in autumn, resembling the results obtained in Ago Bay of Mie Prefecture. The water temperature is considered to be the most important factor limiting the distribution of *H. circularisquama*.

Key words : Red tide, *Heterocapsa circularisquama*, Population dynamics, Maizuru Bay, Indirect fluorescent antibody technique

緒 言

カキ, アサリ, 真珠貝等の有用二枚貝類を大量斃死させる有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* Horiguchi (Horiguchi, 1995) は, 近年, 西日本の沿岸海域において分布を拡大する傾向にあり, 頻繁に, しかもゲリラ的に赤潮を形成している(松山ら, 1995; 玉井, 1999; 本城, 2000; Imai et al., 2006; Matsuyama, 2012)。しかしながら本種はサイズが小さく, また形態の紛らわしい類似種が存在するためモニタリングが困難である。それゆえ, 水域における個体群動態の実態は三重県英虞湾(Shiraishi et al., 2007)や高知県浦ノ内湾(Shiraishi et al., 2008)等ではよく調べられているが, その他の海域では殆ど不明であり, 特に細胞密度の低い発生初期の分布の把握が困難である。

有害有毒微細藻類のあるグループのものには, 形態的特徴に基づく種の同定が困難なものがある。このような判別・同定の困難なものに関しては, 間接蛍光抗体法が

有効であり, ラフィド藻の *Chattonella* 属, 有毒渦鞭毛藻の *Alexandrium* 属や *Gymnodinium* (*Karenia*) 属等を始めとして, 有害有毒種を中心にかんりの種の微細藻類についてポリクローナル抗体やモノクローナル抗体の作成とその応用の検討がなされてきている(Hiroishi et al., 1988; Shapiro et al., 1989; Uchida et al., 1989; Nagasaki et al., 1991; Adachi et al., 1993a,b; Anderson et al., 1993; 長崎, 1993; Vrieling et al., 1993, 1994; Campbell et al., 1994; Scholin et al., 1996; Vrieling and Anderson, 1996; Lin and Carpenter, 1996; Buskey et al., 1999)。本研究の対象である *H. circularisquama* においても, 抗体が作製されている(Hiroishi et al., 2002; Shiraishi et al., 2007)。

1998年12月に京都大学舞鶴水産実験所の棧橋付近において, *H. circularisquama* が小規模なブルームを形成しているのを初めて見出した(藤井, 1999)。すなわち, 12月1日の表層で 863 cells mL⁻¹, 3 m 層で 383 cells mL⁻¹, 18日には表層で 500 cells mL⁻¹, 3 m 層では 207 cells mL⁻¹ というも

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物資源科学部門海洋生物学分野浮遊生物学領域 (E-mail: imai1ro@fish.hokudai.ac.jp) (Plankton Laboratory, Division of Marine Bioresource and Environmental Science, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

²⁾ 和歌山県水産試験場 (Wakayama Prefectural Fisheries Experimental Station)

³⁾ 京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻 (Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

⁴⁾ 福井県立大学海洋生物資源科学部 (Faculty of Marine Bioscience, Fukui Prefectural University)

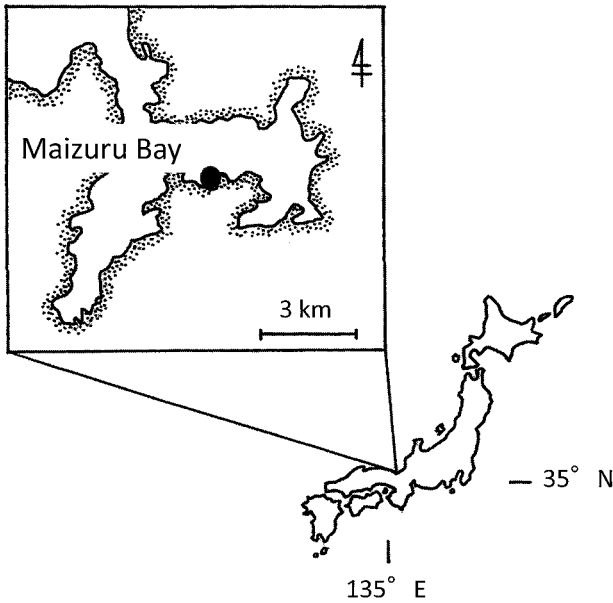


Fig. 1. Location of the sampling station (●) of Fisheries Research Station of Kyoto University in Maizuru Bay, Kyoto Prefecture.

のであった。これらの細胞は、抗体を用いて反応する事が確認されている。そこで本研究においては、形態に基づく種同定の困難な *H. circularisquama* を特異的に認識し識別できる抗体を用い、間接蛍光抗体法を応用して、本種の高感度モニタリングを京都府舞鶴湾において春～冬季の間に実施した。そして水柱における個体群動態と出現の季節的パターンを把握することを目的とした。

材料および方法

京都府舞鶴湾を対象として、*H. circularisquama* の個体群動態を調査した (Fig. 1)。京都大学大学院農学研究科舞鶴水産実験所 (現京都大学フィールド科学教育研究センター) の棧橋 (水深 6 m) において、表層、3 m 深、および海底上 1 m (B-1 m) より採水を行い、ホルマリンで固定した (最終濃度 0.37%)。調査は、1999 年と 2000 年には周年に亘り月に 1 回程度、そして 2001 年は 5 月～12 月の間に原則としておおよそ月に 1 回程度の頻度で実施した。

上述のようにして得られた固定試水の処理と間接蛍光抗体法は、Fig. 2 に示す手順に従った。以下に概略を述べる。まず、目合 30 μm のプランクトンネットで大きなゴミやプランクトンを除いた後、孔径 3.0 μm のヌクレポアフィルター上に固定試水を濾過濃縮 (1～250 mL) し、PBS (phosphate buffered saline: リン酸緩衝生理食塩水) によって洗浄を行って、一次抗体 (モノクローナル抗体) を添加して反応させた。再び PBS による洗浄の後 FITC 標識された二次抗体を反応させ、PBS による洗浄後、ヌクレポアフィルター上に吸引濾過捕集し、罫線付きスライドガラスに無蛍光イマージョン・オイルで封入を行って、観察

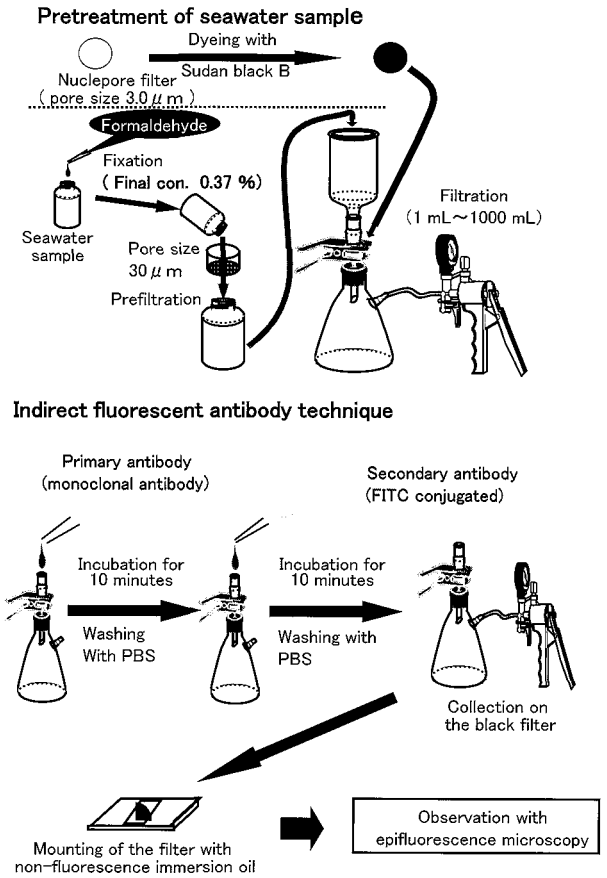


Fig. 2. Sample collection and the procedure for the indirect fluorescent antibody technique.

計数用のプレパレートを作製した。1つの海水試料につき、3枚のフィルターを用意した。以上のように作製したプレパレートは、倒立型落射蛍光顕微鏡を用いてヘテロカプサの細胞を観察計数した。

結果及び考察

間接蛍光抗体法を用い、1999年と2000年に舞鶴湾において検出計数された *H. circularisquama* の細胞数と水温の変動を Tables 1 と 2 に示した。両年共に、4月から5月にかけて増殖の初期段階が確認され、1999年は4月23日に3m層で 53 cells L⁻¹ (水温 14.6°C)、2000年では5月15日にやはり3m層で 3.7 cells L⁻¹ (水温 17.6°C) の値を記録した。以後、水温が最高となる時期に最大細胞数を示し、1999年は8月19日に0m層で 1,111 cells L⁻¹ (水温 29.4°C)、2000年では8月30日に3m層にて 556 cells L⁻¹ (水温 29.0°C) であった。これらの値は、1998年12月に比べて低密度であり、三重県英虞湾や高知県浦ノ内湾の結果に比べても低いと言える (Shiraishi et al., 2007, 2008)。本種がこのように低い細胞密度で推移した場合、通常の光学顕微鏡観察では検出と確認が困難であるが、間接蛍光抗体法を用いることによって、その動態が把握可能となった。

Table 1. Fluctuations of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in the waters of surface and 3 m depth at the pier of the Fisheries Research Station of Kyoto University facing to Maizuru Bay, Kyoto Prefecture in 1999. The dinoflagellate cells were monitored by the indirect fluorescent antibody technique using monoclonal antibodies.

Date	0 m (cells L ⁻¹)	WT (°C)	3 m (cells L ⁻¹)	WT (°C)
January 20	< 26.67	10.5	< 26.67	12.8
February 26	< 26.67	10.0	< 26.67	11.8
March 1	< 26.67	No data	< 26.67	No data
March 26	< 26.67	13.8	< 26.67	12.2
April 23	< 26.67	16.2	53.33	14.6
May 13	13.33	20.0	< 13.33	17.8
May 28	< 13.33	19.6	< 13.33	18.6
June 11	26.67	23.8	< 26.67	22.0
July 9	< 33.33	26.5	33.33	22.8
August 19	1111.11	29.4	555.56	27.2
September 30	< 16.67	26.7	< 13.33	26.6
October 31	< 22.22	20.1	< 22.22	21.6
November 26	< 13.33	19.0	< 13.33	19.2
December 29	< 13.33	12.6	< 13.33	14.1

Table 2. Fluctuations of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in the waters of surface and 3 m depth at the pier of the Fisheries Research Station of Kyoto University facing to Maizuru Bay, Kyoto Prefecture in 2000. The dinoflagellate cells were monitored by the indirect fluorescent antibody technique using monoclonal antibodies.

Date	0 m (cells L ⁻¹)	WT (°C)	3 m (cells L ⁻¹)	WT (°C)
February 29	< 2.67	7.0	< 2.67	9.0
March 31	< 3.70	12.4	< 3.70	11.6
April 28	< 3.70	14.0	< 3.70	14.0
May 15	< 3.70	17.9	3.70	17.6
May 30	< 10.58	21.2	< 6.67	19.4
June 29	< 33.33	23.4	133.33	22.6
July 24	24.69	28.2	< 37.04	27.7
August 30	< 111.11	29.2	555.56	29.0
September 27	100.00	25.0	44.44	25.1
October 30	16.67	21.0	< 16.67	21.2
December 1	< 3.33	15.2	< 3.33	18.4
December 29	< 6.67	9.3	< 2.22	13.5

2001年5月～12月の間、概ね月に1回、同じ定点の3層(0m, 3m, 海底上1mの5m深)の試水を得て、*H. circularisquama*のモニタリングを間接蛍光抗体法で実施した結果を、Fig. 3に水温と共に示した。2001年7月25日に初めて本種細胞の存在が確認され、11月末まで毎回の調査において検出された。細胞密度は9月26日に0m層で最高値2,800 cells L⁻¹、3m層で1,600 cells L⁻¹を記録し、その後11月29日までに徐々に減少した(0mで36.7 cells L⁻¹)。12月になると全層で本種細胞は確認できなくなった。水温は7月25日に0mと3mで各々29.8°Cと29.4°Cの

最高値を記録した。水深5mにおいては8月30日に27.8°Cの最高値となった。水温のピークよりも本種の細胞密度のピークは2ヶ月遅れており、舞鶴湾においては本種の増殖が非常に遅いか他の要因があると考えられる。

舞鶴湾においては、2001年も前年と同様*H. circularisquama*個体群は比較的低い細胞密度で推移した。舞鶴湾の*H. circularisquama*個体群は、英虞湾や浦ノ内湾のそれと比較すると低密度であると同時に、時期的にもかなり遅れて出現し推移する傾向が認められた。浦ノ内湾や英虞湾では、水温が舞鶴湾より早期に高くなるのに対し、

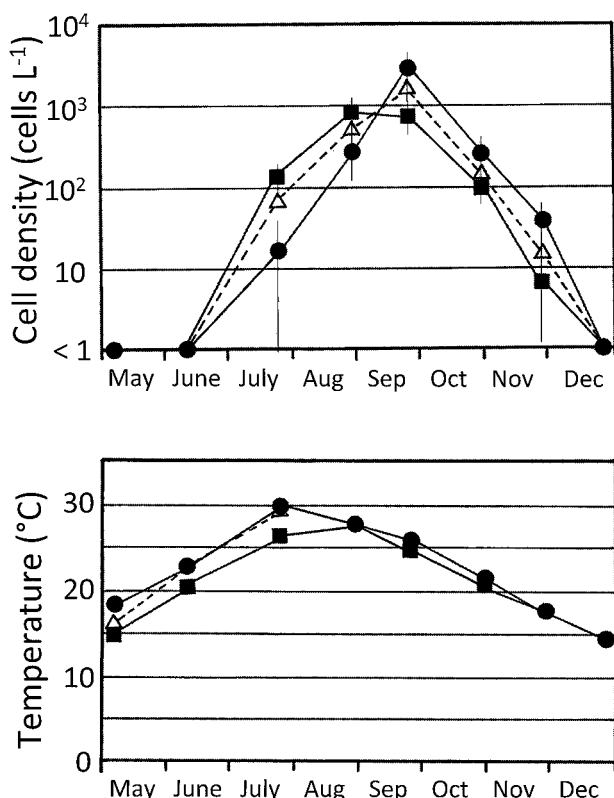


Fig. 3. Fluctuations of the water temperatures and the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in the water samples of surface (●), 3 m depth (△) and 1 m above the bottom (5 m) (■) at the pier of the Fisheries Research Station of Kyoto University facing to Maizuru Bay, Kyoto Prefecture in 2001. The dinoflagellate cells were monitored by the indirect fluorescent antibody technique using monoclonal antibodies. The bars show standard deviations.

舞鶴湾は日本海に面し、水温も低い傾向がある。ヘテロカプサは高水温を好むため (Yamaguchi et al., 1997), 舞鶴湾では浦内湾や英虞湾程には高密度には至らなかったものと考えられる。他の要因としては、珪藻類等との競争関係も重要であるので、それらの動態とも併せて考える必要がある (今井, 2012)。

H. circularisquama は、水温 10~15°C の間に低温限界を持ち (Yamaguchi et al., 1997), 舞鶴湾においては冬期に水温が 10°C 以下にまで低下するので (Tables 1, 2), もしも本湾で本種が継続的に生息するのであれば、耐久シスト等の越冬手段を生活史の中で持つ必要がある。しかし本種の耐久シストはこれまで確認されていない (Matsuyama, 2012)。本城ら (2002) や Matsuyama et al. (2010) が報じているように、本種の新たな発生において、生息可能な水温に達した春以降に本種の細胞が、他の越冬海域より貝類等と共に舞鶴湾へと持ち込まれた可能性が考えられる。舞鶴湾では、春~秋季の暖かい季節にアコヤガイの養殖が行われていたこともあり、注意が必要である。

本研究で示したように、濾過捕集法と間接蛍光抗体法

を組み合わせ用いた方法によって、*H. circularisquama* の個体群動態を周年に亘って追究する事により、本種の越冬に関する基礎的知見が得られると考えられる。事実、高知県浦内湾においては、栄養細胞による越冬が確認されている (Shiraishi et al., 2008)。また、日本海側においては新潟県佐渡島において本種の赤潮により養殖のカキに甚大な被害を与えられており (近藤ら, 2012), 今後も貝類の養殖が行われている海域においては、日本海側でも継続的な注意深い調査が重要である。

要 約

二枚貝を殺滅する有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* の細胞を特異的に高感度で検出する為の方法として、濾過捕集法とモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法を工夫開発して用いた。本法により、舞鶴湾において本種のモニタリングを 1999 年から 2001 年にかけて実施した結果、最高 2,800 cells L⁻¹ と比較的低い値であるが増殖している事が明らかとなった。出現動態は水温の影響が大きく、夏期に最高値を示した。日本海側では出現の報告があまりないが、舞鶴湾でも注意が必要であることが判明した。

謝 辞

本研究の遂行に協力をいただいた、西谷 豪博士 (現東北大学大学院農学研究科) と幡野真隆氏 (現滋賀県立水産試験場) に心から感謝の意を表します。本研究は、水産庁赤潮対策技術開発試験ヘテロカプサ赤潮等緊急対策事業の一貫で実施された。

文 献

- Anderson, D.M., Keafer, B.A., Kulis, D.M. and Waters, R.M. (1993) An immunofluorescence survey of the brown tide chrysophyte *Aureococcus anophagefferens* along the northeast coast of the United States. *J. Plankton Res.*, **15**: 563-581.
- Adachi, M., Sako, Y. and Ishida, Y. (1993a) The identification of conspecific dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from Japan and Thailand by monoclonal antibodies. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**: 327-332.
- Adachi, M., Sako, Y. and Ishida, Y. (1993b) Application of monoclonal antibodies to field samples of *Alexandrium* species. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**: 1171-1175.
- Buskey, E.J., Villareal, T.A. and Lopez-Barreiro, T. (1999) Reconstructing the initiation of the Texas brown tide bloom of *Aureocoumbra lagunensis* from archived samples using an immunofluorescence assay. *Plankton Biol. Ecol.*, **46**: 159-161.
- Campbell, L., Shapiro, L.P. and Haugen, E. (1994) Immunochemical characterization of eukaryotic ultraplankton from the Atlantic and Pacific oceans. *J. Plankton Res.*, **16**: 35-51.
- 藤井 光 (1999) 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* の高感度モニタリング法の開発。京都大学卒業論文, 26p, 京都大学。

- Hiroishi, S., Uchida, A., Nagasaki, K. and Ishida, Y. (1988) A new method of identification of inter- and intra-species of the red tide algae *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae) by means of monoclonal antibodies. *J. Phycol.*, **24**: 442-444.
- Hiroishi, S., Nakai, R., Seto, H., Yoshida, T. and Imai, I. (2002) Identification of *Heterocapsa circularisquama* by means of antibody. *Fisheries Sci.*, **68** Supplement-1: 627-628.
- 本城凡夫 (2000) 有害プランクトンによる漁業被害の発生状況とその問題点. pp. 4-17, 石田祐三郎・本城凡夫・福代康夫・今井一郎 (編), 有害・有毒赤潮の発生と予知・防除, 日本水産資源保護協会, 東京.
- 本城凡夫・今田信良・永井清仁・郷 譲治・芝田久士・長副 聡 (2002) *Heterocapsa circularisquama* 赤潮発生水域の拡大防止. pp. 30-42, 広石伸互・今井一郎・石丸隆 (編), 水産学シリーズ 134, 有害・有毒藻類ブルームの予防と駆除, 恒星社厚生閣, 東京.
- Horiguchi, T. (1995) *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae): A new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycol. Res.*, **43**: 129-136.
- 今井一郎 (2012) シヤットネラ赤潮の生物学. 184p, 生物研究社, 東京.
- 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.
- 近藤伸一・中尾令子・岩滝光儀・坂本節子・板倉 茂・松山幸彦・長崎慶三 (2012) 有害赤潮藻ヘテロカプサの分布域北上現象：佐渡島加茂湖での赤潮によるマガキの大量死. 日本水産学会誌, **78**: 719-725.
- Lin, S. and Carpenter, E.J. (1996) An empirical protocol for whole-cell immunofluorescence of marine phytoplankton. *J. Phycol.*, **32**: 1083-1094.
- Matsuyama, Y. (2012) Impacts of the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* bloom on shellfish aquaculture in Japan and some experimental studies on invertebrates. *Harmful Algae*, **14**: 144-155.
- 松山幸彦・永井清仁・水口忠久・藤原正嗣・石村美佐・山口峰生・内田卓志・本城凡夫 (1995) 1992年に英虞湾において発生した *Heterocapsa* sp. 赤潮発生期の環境特性とアコヤガイ斃死の特徴について. 日本水産学会誌, **61**: 35-41.
- Matsuyama, Y., Nishitani, G. and Nagai, S. (2010) Direct detection of harmful algae from the oyster spat and live fish transporting trailer. pp. 185-189, Ho, K.C., Zhou, M.J., Qi, Y.Z. (eds.), *Harmful Algae 2008*, International Society for the study of Harmful Algae and Environmental Publication House, Hong Kong and Copenhagen.
- 長崎慶三 (1993) モノクローナル抗体を用いた *Chattonella* 属藻類の識別に関する研究. 南西水研研報, **26**: 133-190.
- Nagasaki, K., Uchida, A. and Ishida, Y. (1991) A monoclonal antibody which recognizes the cell surface of red tide alga *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**: 1211-1214.
- Scholm, C.A., Buck, K.R., Britschgi, T., Cangelosi, G. and Chavez, E.P. (1996) Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycologia*, **35**: 190-197.
- Shapiro, L.P., Campbell, L. and Haugen, E.M. (1989) Immunochemical recognition of phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **57**: 219-224.
- Shiraishi, T., Hiroishi, S., Nagai, K., Go, J., Yamamoto, T. and Imai, I. (2007) Seasonal distribution of the shellfish-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in Ago Bay monitored by an indirect fluorescent antibody technique using monoclonal antibodies. *Plankton Benthos Res.*, **2**: 49-62.
- Shiraishi, T., Hiroishi, S., Taino, S., Ishikawa, T., Hayashi, Y., Sakamoto, S., Yamaguchi, M. and Imai, I. (2008) Identification of overwintering vegetative cells of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in Uranouchi Inlet, Kochi Prefecture, Japan. *Fisheries Sci.*, **74**: 128-136.
- 玉井恭一 (1999) *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の発生と被害の現状. 日本プランクトン学会報, **46**: 153-154.
- Uchida, A., Nagasaki, K., Hiroishi, S. and Ishida, Y. (1989) The application of monoclonal antibodies to an identification of *Chattonella marina* and *Chattonella antiqua*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**: 721-725.
- Vrieling, E.G. and Anderson, D.M. (1996) Immunofluorescence in phytoplankton research: Applications and potential. *J. Phycol.*, **32**: 1-16.
- Vrieling, E.G., Gieskes, W.W.C., Colijn, F., Hofstraat, J.W., Peperzak, L. and Veenhuis, M. (1993) Immunochemical identification of toxic marine algae: first results with *Prorocentrum micans* as a model organism. pp. 925-931, Smayda, T.J. and Shimizu, Y. (eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, New York.
- Vrieling, E.G., Peperzak, L., Gieskes, W.W.C. and Veenhuis, M. (1994) Detection of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium* (cf) *aureolum* and morphologically related *Gymnodinium* species using monoclonal antibodies: a specific immunological tool. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **103**: 165-174.
- Yamaguchi, M., Itakura, S., Nagasaki, K., Matsuyama, Y. and Imai, I. (1997) Effects of temperature and salinity on the growth of the red tide flagellates *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae). *J. Plankton Res.*, **19**: 1167-1174.