紀伊半島沿岸域における 底生性渦鞭毛藻 Gambierdiscus 属の 出現動態に関する研究

武市有未

三重大学大学院 生物資源学研究科

博士前期課程

生物圈生命科学専攻

平成 24 年 3 月

			目次	
第1章	章.	諸言		1
第2章	章.	英虞湾にお	Sける Gambierdiscus 属の種同定	4
2 -	-1.	序論		4
2 -	-2.	材料及ひ	「方法	4
	2 -	2 - 1.	英虞湾の Gambierdiscus 属細胞の形態観察	4
	2 -	2 - 2.	系統分析	5
2 -	-3.	結果・考	察	8
第3章	章.	Gambierdis	cus sp.の増殖に及ぼす物理的環境要因の影響	10
3 -	-1.	序論		10
3 -	-2.	材料及ひ	方法	10
	3 —	2 - 1.	増殖速度に及ぼす水温の影響	10
	3 —	2 - 2.	増殖速度に及ぼす塩分の影響	11
	3 —	2 - 3.	増殖速度に及ぼす光の影響	12
	3 —	2 - 4.	増殖速度の測定	13
	3 —	2 - 5.	低水温における生残実験	13
3 -	-3.	結果		15
	3 —	3 - 1.	増殖速度に及ぼす水温の影響	15
	3 —	3 - 2.	増殖速度に及ぼす塩分の影響	15
	3 —	3-3.	増殖速度に及ぼす光の影響	16
	3 —	3 - 4.	低水温における生残実験	16
3 -	-4.	考察		17

第4章. 英	を 虞湾に お	らける <i>Gambierdiscus</i> sp.の出現動態	20			
4 - 1.	序論		20			
4 - 2.	材料及び	方法	20			
4 - 3.	結果		23			
4 - 3	3 - 1.	英虞湾における水温・塩分の季節変化	23			
4 - 3	3 - 2.	英虞湾における Gambierdiscus sp.の海藻各種への付着	24			
4 - 3	3 - 3.	英虞湾における Gambierdiscus sp.の季節消長	25			
4 - 4.	考察		26			
4 - 4	4 - 1.	英虞湾における Gambierdiscus sp.の海藻各種への付着	26			
4 - 4	4 - 2.	英虞湾における Gambierdiscus sp.の季節消長	27			
4 - 4	4 - 3.	英虞湾における Gambierdiscus sp.の付着密度	30			
第5章. 紀伊半島沿岸の Gambierdiscus 属の水平・鉛直分布						
5 - 1.	序論		32			
5 - 2.	材料及び	方法	33			
5 - 2	2 - 1.	紀伊半島沿岸における水平分布調査	33			
5 - 2	2 - 2.	英虞湾湾口部における鉛直分布調査	33			
5 - 3.	結果		34			
5 - 3	3 - 1.	紀伊半島沿岸における水平分布	34			
5 - 3	3 - 2.	英虞湾湾口部における鉛直分布	35			
5 - 4.	考察		35			
5 - 4	1 - 1.	紀伊半島沿岸における水平分布	35			
5 - 4	1 - 2.	英虞湾湾口部における鉛直分布	36			

第6章.	総合考察	38
謝辞		42
参考文献		45

図表

第1章

諸言

*Gambierdiscus*属は渦鞭毛藻綱ゴニオラックス目オストレオプシス科に属す る底生性の微細藻類であり、熱帯・亜熱帯域の海藻に付着して生活している。 本属には、現在までに11種が報告されており(Fraga et al. 2011)、いくつかの 種はシガトキシン(ciguatoxin: CTX)とマイトトキシン(maitotoxin: MTX) といった毒を産生する。シガトキシンは分子式 C₆₀H₈₀O₁₉で分子量 1110 のポ リエーテル化合物であり、マウスの腹腔内投与による半数致死量(LD₅₀)は、 0.45 μ g kg⁻¹ と、その毒量は低分子量の毒の中では最強の部類に属する(野口 2007)。一方、マイトトキシンは分子式 C₁₆₄H₂₅₆O₆₈S₂Na₂で分子量 3422 の非蛋 白性の毒としては最も強力な毒であり、LD₅₀は 50 ng kg⁻¹である。この値は、 猛毒で知られるテトロドトキシンの 200 倍、また非蛋白性最強の毒とされて いたパリトキシンの約 9 倍の強さである。

食物連鎖の中でこれらの毒を蓄積、濃縮した魚類を喫食すると、"シガテラ" という食中毒症状を起こすことが知られている。シガテラの中毒症状は、消 化器系、神経系、循環器系の3つに大別される(安元・村田 1991)。消化器 系の症状としては、中毒の初期に下痢、吐き気、腹痛が見られ、神経系の症 状としては、知覚異常、関節痛、倦怠感、掻痒があげられる。また、循環器 系の障害として、脈拍と血圧の低下がみられる。症状は時間的な経過によっ ても異なる。最も特徴的な症状は、冷たいものに触れると、激痛や電気ショッ クのような刺激を感じるドライアイスセンセーションと呼ばれる温度感覚の 異常である。シガテラの潜伏期間は比較的短く、1-8 時間で発症するが、時 に2日以上経過してから発症することもある。死亡率は非常に低く、0.01% 以下と推定されるが、回復は非常に遅く、完全回復には数か月から1年を要 することもある。適切な治療薬はなく、症状に応じた対症療法がとられる。

シガテラによる被害は一般に、アメリカのフロリダとハワイ、オーストラ リアのクイーンズランド、南太平洋諸島のフランス領ポリネシア、カリブ諸 島といった熱帯・亜熱帯域で発生している(Gillespie et al. 1985、Bomber et al. 1989、Chateau-Degat et al. 2005、Parsons & Preskitt 2007)。年間 5 万-50 万人以 上が中毒を起こしているといわれているが、正確な人数は把握されていない

(Fleming et al. 1998)。日本では、沖縄や奄美地方といった南西諸島を中心に 発生しているが(野口 2007)、九州・四国地方、さらには本州においても時 として被害が報告されることがある(Table 1 & Fig. 1)。ところで、紀伊半島 沿岸においては、これまでシガテラ被害は報告されていなかったが、2007 年 に和歌山県すさみ町で、2008 年には三重県南伊勢町で釣獲したイシガキダイ によって、同中毒が発生するに至った(和歌山 2007、三重 2008)(Fig. 2)。 以上の事実は、シガテラの原因生物であるとされる Gambierdiscus 属が、日本 の温帯域において広く分布していることを示すものである。しかし、紀伊半 島だけでなく他の温帯海域においても Gambierdiscus 属の出現状況に関する 調査はほとんどなされていないのが現状である。このような中、石川・倉島

(2010)は紀伊半島東部に位置する三重県英虞湾湾口部にて Gambierdiscus 属の細胞の出現を報告した。Gambierdiscus 属はもともと熱帯・亜熱帯性の生物であることを考えると、温帯域でも水温の上昇する夏季には高密度で出現することが予想される。そのため、当該海域における将来のシガテラ発生リスクを評価することが、極めて重要であり、そのためには水産学的見地のみならず、公衆衛生学的見地に基づいて Gambierdiscus 属の分布と現存量を明らか

にすることはもちろん、その生理学的特徴や生態学的特徴を解明していくこ とが早急な課題である。

以上の背景から、本研究では三重県英虞湾より分離した株をもとに、 Gambierdiscus 属の増殖に及ぼす水温・塩分・光の影響を調べるとともに、同 湾の藻場における本属の消長を、季節を追って詳細に明らかにした。また、 紀伊半島沿岸全域における本属の分布と現存量を調査し、英虞湾湾口部では 鉛直的な分布についても調べた。これらの調査、実験により得られた成果か ら、日本各地におけるシガテラ中毒のリスクを評価する基盤として、温帯海 域に生息する底生性渦鞭毛藻 Gambierdiscus 属の生理・生態を解明することを 目的とする。さらにその成果を、温帯域で発生するシガテラ中毒の予知・予 防に資することが本研究の最大のゴールである。なお、Gambierdiscus 属は互 いに形態が酷似しているものが多く、一般的な顕微鏡観察のみからは種の同 定が困難である。そのため、本研究では英虞湾に出現する本属細胞について 分子系統学的手法による種同定も行った。

第2章

英虞湾における Gambierdiscus 属の種同定

2-1. 序論

これまでに報告されている Gambierdiscus 属の 11 種は細胞の形状から大き く 2 つに分類される。すなわち、細胞の形状が球形の G. yasumotoi と G. ruetzleri、 細胞が扁平状の G. belizeanus、 G. australes、 G. pacificus、 G. toxicus、 G. polynesiensis、 G. carolinianus、 G. caribaeus、 G. carpenteri、 G. excentricus である

(Litaker et al. 2009、Fraga et al. 2011)。Litaker et al. (2009) は Gambierdiscus 属の細胞を覆う鎧板の形態学的特徴に基づき種同定のための検索図を作成し た。しかし、Litaker et al. (2009) も述べているように、Gambierdiscus 属は形 態学的に類似したものが多いため、光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡による観 察に基づいた同定には問題があることも事実である。そのため、近年は PCR 法などを用いた分子生物学的手法と合わせて Gambierdiscus 属の種同定がな されている。そこで本研究においても、英虞湾に産する Gambierdiscus 属の種 を Litaker et al. (2009) の検索図を用いて形態学的に検討するとともに、分子 系統学的手法を用いて同定した。

2-2. 材料及び方法

2-2-1. 英虞湾の Gambierdiscus 属細胞の形態観察

(i)形態観察

英虞湾の Gambierdiscus 属細胞の形態観察をするために、三重県英虞湾浜島町地先の岩礁帯(Fig. 3)にて、海藻を採集し、藻体の表面に付着している同属細胞試料を得た。海藻の採集及び細胞観察試料作製までの処理方法につい

ては本稿4-2-1.(iii)「英虞湾における季節消長調査 Gambierdiscus sp. の観察と計数」にて詳しく述べる。得られた Gambierdiscus 属の細胞の形態観 察には Calcofluor White M2R(Siguma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)を用い た蛍光染色法(Fritz & Triemer 1985)を応用した。この方法を用いると細胞の 殻が UV 励起光下で青白い蛍光を発するため、Gambierdiscus 属の鎧板の形態 及び大きさを観察することができる。検鏡時には出現した細胞を、適宜デジ タルカメラ(Nikon D90)を用いて撮影し、同時に細胞サイズも計測した。

2-2-2. 系統分析

(i)供試株

2009年10月に英虞湾浜島町地先の岩礁帯(Fig. 3)において採集した褐藻 綱アミジグサ目ウミウチワ(*Padina arborescens*)から *Gambierdiscus* 属の細胞 を単離し、それらを増殖させて5つのクローン株を確立した。これらの5つ の株を種同定のための系統分析に供した。

培地には微量元素 Se を添加した f/2 培地(Guilladrd & Ryther 1962)を用いた(本稿では、以下この培地を単に f/2 培地と呼ぶ)。それら 5 株の維持培養は 25 ℃および塩分 30、光強度 100 µmol m⁻²s⁻¹、明暗周期 12hL: 12hD の条件で行った。

(ii) DNA 抽出

DNA 抽出は TE 煮沸法に従い行った。回収した細胞に TE 緩衝液を添加し、 細胞を懸濁させた後、ブロックヒーターで 100 ℃で 10 分間加熱した。その後、 室温で冷却し、ボルテックスミキサーを用いて激しく撹拌した。これを、遠 心分離を行い (9000 rpm、5 分)、得られた情勢を DNA 抽出液として用いた。 (iii) rRNA 遺伝子の PCR 増幅

各細胞から抽出した DNA を鋳型として、rRNA 遺伝子を PCR 法にて SSU (small subunit)、ITS1-5.8S-ITS2、LSU (large subunit) D1-D2 及び D8-D10 領域を増幅させた。なお、SSU 配列は全長を3領域に分けて配列解析をした。 SSU 領域の増幅に用いたプライマー配列は、フォワードの S1 (TACCTGGTTGATCCTGCCAG), S4 (AGGGCAAGTCTGGTGCCAG), S8 (GGATTGACAGATTGAGAGCT) とリバース \mathcal{O} SR5 (ACTACGAGCTTTTTAACTGC), SR9 (AACTAAGAACGGCCATGCAC), SR12 (CCTTCCGCAGGTTCACCTAC) であった。ITS1-5.8S-ITS2 のプライマー 配列は、フォワードの ITS-A(TCGTAACAAGGTHTCCGTAGGT)とリバース の ITS-B (AKATGCTTAARTTCAGCRGG) であった。LSU D1-D2 領域のプラ イマー配列は、フォワードの D1R (ACCCGCTGAATTTAAGCATA) とリバー スの D2C (CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA) であった。LSU D8-D10 領域のプ ライマー配列は、フォワードの FD8 (GGATTGGCTCTGAGGGTTGGG) とリ バースの D10RRB(GATAGGAAGAGCCGACATCGA)であった。

PCR は DNA ポリメラーゼ (TAKARA Ex Taq: TAKARA) を用いて次の反 応条件で行った。すなわち、初期熱変性 (94 $\,^\circ$ 、1 分間) の後、熱変性 (94 $\,^\circ$ 、 30 秒間)、アニーリング (55 $\,^\circ$ 、30 秒間)、伸長 (72 $\,^\circ$ 、1 分間) を 35 サイ クル繰り返し、その後伸長反応 (72 $\,^\circ$ 、5 分間) を行った。

(iv) PCR 増幅産物のサブクローニング

PCR 産物の確認および精製のために、1.5%アガロースゲル電気泳動(10mM Tris-0.5mM EDTA 緩衝液: TAE 緩衝液) で電気泳動を行い、ゲルをエチジウ

ムブロマイドで 15 分染色した後、UV 照射下で PCR 産物のバンドを確認した。 次に、バンド部分のゲルを切り出し、ウルトラフリーCG 0.22 μ m (Millipore) を用いてゲルから PCR 産物を回収した。得られた PCR 産物をエタノール沈 澱法により精製した後、pGEM-T Easy Vector (Promega)および大腸菌 DH5 α を 用いて得られた PCR 産物のサブクローニングを行った。

(v) 塩基配列解析

各 PCR 産物あたり任意の 4 つのサブクローンを選抜し、プライマーCU19 (GGT TTT CCC AGT CAC GAC G) および M13R (CAG GAA ACA GCT ATG AC)を用いてコロニーPCR を行うことにより、ベクターに組み込んだ配列を 増幅した。得られた PCR 産物を 1.5%アガロースゲル電気泳動で確認した後、 PCR 産物を ExoSAP-IT (GE ヘルスケアバイオサイエンス)で精製した。精製し た PCR 産物を DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE ヘルスケア バイオサイエンス)を用いて蛍光ラベルした後、DNA アナライザー(ABI Prism 3100)を用いて塩基配列を解析した。

(vi)アライメント及び分子系統解析

分子系統解析には本研究で得られた塩基配列および GenBank 上で公開され ている塩基配列を引用した。配列のアライメントは GENETYX7(ゼネティッ クス社)および ClustalW を用いて行い、分子系統解析には MEGA4 を用いた。 なお、以上の系統分析は全て、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 環境保全研究センター 有害・有毒藻類グループにおいて行わ れた。 2-3. 結果·考察

英虞湾において確認された *Gambierdiscus* 属の細胞を Fig. 4-1、2 に示す。細胞は上面(上殻)から見ると円形(Fig. 4-1A)、腹面から見ると上下にやや扁平である(Fig. 4-1B)。細胞の背腹長は 47.5-100.0 µm(平均 77.1 µm、n=121)、 体幅は 50.0-100.0 µm(平均 81.0µm、n=121)、体長は 30.0-60.0 µm(平均 47.1 µm、n=121)であった(Table 2)。主鎧板配列は Po、3'、7"、5"、1p、2""で *Gambierdiscus* 属の配列を示した(Fig. 4-2)。また、鎧板の細部を観察したところ全ての個体で 1p は広く、2'は手斧状、さらに 1p の先端はとがっていた。これらの特徴 を Litaker et al. (2009)の図(Fig. 5)に従って種同定する *と G. toxicus* と判定 された。なお、石川・倉島(2010)で報告された *Gambierdiscus* 属の細胞も同 様の形態をしている。

一方、rDNA LSU D8-D10 領域の分子系統学的解析(MP 法)の結果、英虞 湾から得られた *Gambierdiscus* 属の5株の細胞は全て同じクレードに入ったが、 形態学的に種同定された *G. toxicus* とは全く別のクレードに分かれた(Fig. 6)。 遺伝的には世界の熱帯・亜熱帯域に広く生息していると言われる *G. caribaeus*

(Litaker et al. 2010) と近かったが、これとも完全には一致しなかった。また、 同領域を調べた NJ 法によっても同様であった。さらに、rDNA SSU の遺伝子 解析 (NJ 法) による結果も全く同様であった (Fig. 7)。このことは、英虞湾 に生息する Gambierdiscus 属は、今までに記載されていない新種であることを 示唆している。そのため、本研究では以降、英虞湾に産する Gambierdiscus 属 細胞を Gambierdiscus sp.として扱うこととする。なお、Kuno et al. (2010) は、 日本沿岸 (潮岬、牟岐、室戸岬、大月、阿嘉島、西表島) に生息する Gambierdiscus 属の SSU を解析した結果、遺伝的に 2 つのタイプ (Gambierdiscus sp. Type 1: 亜熱帯域に生息、Gambierdiscus sp. Type 2: 温帯域に生息) に分けられること を報告している。本研究でも同様に英虞湾産の Gambierdiscus sp.の SSU につ いて解析したところ、本種は Kuno et al. (2010) の Gambierdiscus sp. Type 2 と 同様のクレードに出現した (Fig. 7-2)。すなわち、英虞湾産 Gambierdiscus sp. は Kuno et al. (2010) の Gambierdiscus sp. Type 2 と同種である。ところで、近 年、日本沿岸に出現する Gambierdiscus 属の系統解析が精力的に進められてお り、足立 (私信) によると、Kuno et al. (2010) の Gambierdiscus sp. Type 1 と Gambierdiscus sp. Type 2 の他に新たに別のタイプ 3 種 (Gambierdiscus sp. Type 3、 Gambierdiscus sp. Type 4、Gambierdiscus sp. Type 5) も生息していることが明ら かになっており、日本沿岸に分布する Gambierdiscus 属は想像以上に多様性に 富んでいると言える。

ところで、これまで報告されている Gambierdiscus 属 11 種の全てが毒を産 生するわけではない。分子系統学的解析の結果、英虞湾の Gambierdiscus sp. に遺伝的に最も近いとされた G caribaeus では毒産生能が報告されていな かった(Litaker et al. 2009)。しかし、最近になり Parsons et al. (2010)が同種 におけるシガトキシン産生を報告している。実際に、紀伊半島沿岸ではシガ テラ被害が起きていることから考えても、英虞湾の Gambierdiscus sp.も毒を産 生している可能性は極めて高い。

第3章

Gambierdiscus sp.の増殖に及ぼす物理的環境要因の影響

3-1. 序論

一般に現場の植物プランクトンの増殖には、水温、塩分、光強度などの物 理的要因、栄養塩濃度などの化学的要因が影響を及ぼしている(Lalli & Parsons 1993)。そのため、これらの環境要因に対する生理的応答を明らかに することは、現場における種の季節消長を把握する上で極めて重要である。 これまでに、熱帯・亜熱帯に生息する Gambierdiscus 属の株の増殖に及ぼす水 温、塩分、光強度の影響については、いくつかの研究事例があるが(Bomber et al. 1988a、Morton et al. 1992、Persons et al. 2010)、それらの結果をそのまま温 帯域の種に適用することは無理があるはずである。そこで本研究では、英虞 湾産の Gambierdiscus sp.の株を用い、水温、塩分、光が増殖に及ぼす影響を明 らかにすることとした。

なお、英虞湾は冬季には水温が 10 ℃程度まで低下する(服部 2005)。本研 究では英虞湾の冬季の水温に近い 10 ℃という低水温下における *Gambierdiscus* sp.の生残耐性についても明らかにした。

3-2. 材料及び方法

3-2-1. 増殖速度に及ぼす水温の影響

増殖に及ぼす水温の影響を明らかにするための培養実験には、2-2-2. (i)「系統分析 試供株」で述べた培養株のうち4株(株①、②、⑤、⑥) を用いた。 実験水温は10、15、20、25、30、32、35 ℃の7段階に設定した。培養株を 各水温へ馴致させるために、水温25 ℃、塩分30、光強度150 µmol m⁻²s⁻¹で 40 mL容キャップ付き試験管にて維持培養した株を24時間ごとに5 ℃ずつ上 昇あるいは下降させ、目的の温度に馴致させた。以上の操作を前培養とした。

前培養を終了した細胞を、f/2 培地(塩分 30)を2 mL 満たした 24 穴マルチ ウェルプレート(Becton Dickinson)の3 つの穴にそれぞれ初期細胞密度が20 cells mL⁻¹になるように接種した。この操作を4 つの株に対して行った。その 後、光強度 150 μ mol m⁻²s⁻¹、12hL:12hDの明暗周期の条件のもと、実験の設 定温度である 10、15、20、25、30、32、35 ℃の7 段階の水温で増殖速度を求 める培養実験を行った。

3-2-2. 増殖速度に及ぼす塩分の影響

増殖に及ぼす塩分の影響を明らかにするための培養実験の水温条件は、上 記 3 - 2 - 1.「増殖速度に及ぼす水温の影響」で明らかとなった *Gambierdiscus* sp.の増殖速度が最大値を得た水温(30 °C)で行った。塩分は 20、25、30、35、40の5段階に設定した。培地作成の際に、基となる海水(2010 年 5 月 SE1008 航海の際、金州の瀬にて採水。塩分 34)を蒸留水で希釈、も しくは 50°Cに設定した恒温槽中にて濃縮することで塩分調整を行った。培養 株の各塩分への馴致は、以下の手順で行った。まず、25°C、塩分 30で培養 した維持培養株を 30°Cに馴致させた後、やはり、30°Cに設定した塩分 25 と 35の 20 mLのf/2培地を入れた 40 mL容のキャップ付き試験管に摂取した。 塩分 20 と 40 の株については、塩分 25 と 35 における栄養細胞の増殖を確認 した後、そこからそれぞれ塩分 20 と 40 の同培地を入れた同試験管へ接種を 行い馴致させた。

これらの前培養が完了した後、本実験の設定塩分である塩分 20、25、30、 35、40 の 5 段階で増殖速度を求める実験を行った。本実験も 3 - 2 - 1.「増 殖速度に及ぼす水温の影響」で述べた方法と同様に、各塩分の f/2 培地を 24 穴マルチウェルプレートの 3 つの穴にそれぞれ 2 mL ずつ入れ、各塩分に馴致 した細胞を各穴に初期細胞密度 20 cells mL⁻¹になるように接種した。ただし、 株⑤と⑥については維持培養での状態が悪かったため、本実験で用いた株は 2 株(株①、②)である。なお、光強度と明暗周期は上記 3 - 2 - 1.「増殖速 度に及ぼす水温の影響」と同様に 150 μ mol m⁻²s⁻¹ と 12hL : 12hD とした。

3-2-3. 増殖速度に及ぼす光の影響

増殖に及ぼす光の影響を明らかにするための培養実験の水温条件はやはり、 上記 3 - 2 - 1.「増殖速度に及ぼす水温の影響」で明らかとなった増殖速度 が最大値を得た水温(30 °C)とした。維持培養株を 30 °C(塩分と光強度は 維持培養と同じそれぞれ 30 と 150 µmol m⁻²s⁻¹)に馴致したものを前培養とし た。この培養株を用いて 25、50、100、150、200、250、300、350 µmol m⁻²s⁻¹ の 8 段階の光条件下で培養実験を行った。やはり、3 - 2 - 1.「増殖速度に 及ぼす水温の影響」で述べた方法と同様に、各光強度において f/2 培地を 24 穴マルチウェルプレートの 3 つの穴にそれぞれ 2 mL ずつ入れ、各穴に初期細 胞密度 20 cells mL⁻¹になるように接種した。ただし、用いた株はここでも 2 株(株①、②) である。なお、塩分と明暗周期は上記 3 - 2 - 1.「増殖速度 に及ぼす水温の影響」と同様に 30 と 12hL: 12hD とした。

3-2-4. 増殖速度の測定

本研究では全ての実験において落射蛍光倒立型顕微鏡(Nikon Eclipse TE300)を用いて毎日、細胞を直接計数することで増殖を追跡した。

増殖速度は、対数増殖期での計数値について、次の(1)式に最小二乗法 を適用し算出した。

$$\mu_1 = 1 / \Delta t \cdot \ln (B_t / B_0) \tag{1}$$

ここで、 μ_1 は比増殖速度(day⁻¹)、 Δt は対数増殖の期間(day)、 B_0 は対数増 殖初期の細胞数(cells)、 B_t は対数増殖終期の細胞数(cells)をそれぞれ示す。 また、得られた比増殖速度を次の(2)式を用いて、1日当たりの分裂回数に 換算した。

$$\mu_2 = \mu_1 \cdot (ln2)^{-1} \tag{2}$$

ここで μ₂は1日の分裂回数 (divisions day⁻¹) である。この分裂回数を以後、 増殖速度 (divisions day⁻¹) として扱う。増殖実験はすでに述べてきたように1 株に対してマルチウェルプレートの3穴で行い、その平均値を株に対する増 殖速度とし、最終的に実験に用いた株 (水温実験:4株、塩分・光強度実験: 2株)間の平均値を求めて、その条件における"増殖速度"とした。

3-2-5. 低水温における生残実験

低水温における生残を調べるための実験は、3-1.「序論」でも述べた英 虞湾の冬季の水温に近い10 ℃において行うこととした。普通、生残実験は1 細胞ずつ単離し、目的の環境下において細胞ごとの生死を追うものである。 しかし、本研究では10 ℃という低温下にて実験を行うため、細胞の観察時に おける顕微鏡の光や外気温により水温の上昇といった影響を受ける可能性が ある。そこで、本研究では以下のような方法をとることにより、この影響を 可能な限り排除した。

生残実験には維持培養していた 3 株(株①、②、⑤)を使用した。それぞ れの株を 40 mL 容の試験管内に収容し、まずは 25 ℃で増殖させた後、1 日 1 ℃ずつ温度を下降させることにより、目的の温度である 10 ℃への温度順化 を行った。培養条件は水温 10 ℃、塩分 30、光強度 150 µmol m⁻²s⁻¹で設定し、 f/2 培地を用いた。10 ℃に置いた試験管から 5 日毎に 1 mL を分取し、スライ ドグラス上に広げ落射蛍光倒立型顕微鏡(Nikon Eclipse TE300)を用いて全細 胞数とその中に含まれる生細胞数を計数した。なお、25 ℃から 10 ℃まで水 温を下げていく過程で、既に死亡する細胞があったため、実験開始時(0 日目) においても全細胞中には死細胞が存在した。すなわち、0 日目の生残率はこの 時点で 100 %とはならない。従って、0 日目の全細胞数に対する生細胞数の割 合を便宜的に 100 %とし、この割合を用いて、t 日目の生残率を次式で求めた。

t日目の生残率(%) =t日目の生細胞の割合 /0日目の生細胞の割合×100 実験は3回繰り返し(1 mLを3回分取)、得られた値の平均値をそれぞれの株のt日目の生残率とし、最終的に株間の平均生残率を求めた。ただし、 ピペットにより1mLずつ分注して計数するため、サンプリング時にはピペッ ティングにより確率上、生細胞の割合が多くなる場合や逆に少なくなる場合がある。このようなサンプリング誤差により、生残率は必ずしも継時的に低下していかない場合が生じることもある。

なお、実験中の細胞の生死については、次のように判定した(Fig.8参照): 細胞質が詰まっており、動作が確認できたものは"生細胞"と、殻のみとなっ ているものは"死細胞"とした。ただし、細胞質が詰まっているが動作が確 認できないもの、あるいは細胞質が縮んでいるものに関しては、別途培養実 験を行って、その生死を確かめた。すなわち、それらの細胞を f/2 培地を入れ

た 96 穴マルチウェルプレート (Becton Dickinson) に 1 細胞ずつ移して、25 ℃ で培養をし、最大 14 日間その後の様子を観察した。その結果、細胞質が詰まっ ているものは、全てで動作、あるいは増殖が確認されたため、そのような細 胞は"生細胞"と判定した。一方、細胞質が縮んだものについては、全てで 動作、あるいは増殖が確認できなかったため、そのような細胞は"死細胞" と判定した。

3-3. 結果

3-3-1. 増殖速度に及ぼす温度の影響

Gambierdiscus sp.の各水温における増殖速度を Fig. 9 に示す。英虞湾の株は 10、15、35 ℃では増殖が確認できず、20-32 ℃の間で増殖が確認された。増 殖に好適な水温は 20-30 ℃であった。最も高い増殖速度は 30 ℃で得られ、 その時の値は 0.2 divisions day⁻¹であった。35 ℃では、全ての細胞は死滅した が、10、15 ℃においては増殖しなかったものの、実験期間中、ほとんどの細 胞は生存していた。

3-3-2. 増殖速度に及ぼす塩分の影響

Gambierdiscus sp.の各塩分における増殖速度を Fig. 10 に示す。英虞湾の株は 塩分 25-40 の間で増殖した。塩分 20 では増殖はしなかったが、生存は確認さ れた。最も高い増殖が得られたのは塩分 30 の時であり、分裂速度は 0.29 divisions day⁻¹であった。

3-3-3. 増殖速度に及ぼす光の影響

Gambierdiscus sp.の各光強度における増殖速度を Fig. 11 に示す。英虞湾の株 は 50 µmol m⁻²s⁻¹ 以上では増殖速度が大きく変わらなかった(ほぼ 0.2-0.3 divisions day⁻¹)。細かくみると、150 µmol m⁻²s⁻¹ で最も高い増殖速度(0.29 divisions day⁻¹)を示し、それより強い光では徐々に増殖速度が低下する傾向 がみられたが、強光阻害が起こる光強度は確認できなかった。

3-3-4. 低水温における生残実験

10 ℃における英虞湾産 Gambierdiscus sp.の生残率を Fig. 12 に示す。10 ℃ という低水温において、英虞湾産 Gambierdiscus sp.の生残率は継時的に低下し たが、その低下の度合いは小さく 30 日目でも 70 %の生残率を示した。その 後、40 日目以降でも生残率は 40-50 %であった。なお、40 日目にかけて生残 率が一旦低下し、その後 50 日目にかけてわずかに増加した場合があったが、 これは本章 3 - 2 - 5.「低水温における生残実験」でも述べたように、ピペッ ティングにより分注した際に発生するサンプリング誤差に起因したためであ ると考えられる。さらに、各株の生残率を見ると(データは示してないが)、 株①と株⑤は 55 日目にかけて直線的に低下したのに対し、株②では 50 日目 以降ほとんど低下しなかった。このように、株間で生残率の低下に差異が見 られたため、それに伴う標準誤差が 71-111 %と大きくなった(Fig. 12)。

ところで、本実験は55日目までしか行うことができなかった。そこで、英 虞湾の Gambierdiscus sp.が何日目まで生残可能か、ここで得られた0-55日目 の生残率の値を外挿することで便宜的に見積もった。その結果、次式が得ら れた。

y = -1.14x + 101.28

ここで、yは生残率(%)、xは日数(day)を示す。この式を用い、生残率が 0%となる日数を求めたところ、88.8日(約90日)となった。

3-4. 考察

一般に温帯域に生息する渦鞭毛藻では、その適温は 15-25 ℃程度である。 例えば、温帯性であると言われている Alexandrium tamarense では最も好適な 増殖が見られた水温は 15 ℃であった(山本ら 1995、山本・樽谷 1997)。ま た、*Chattonella verruculosa と Heterocapsa triquetra* では好適な増殖は 15 ℃で 得られたことが報告されている(Yamaguchi et al. 1997)。さらに、*Karenia mikimotoi*(以前の *Gymnodinium nagasakiense*)や *G catenatum* では増殖好適水 温は 25 ℃であった(山口・本城 1989、Yamamoto et al. 2002)。*Cochlodinium polykrikoides* でも同様に好適な増殖は 25 ℃で得られた(Kim et al. 2004)。し かし、英虞湾から得られた *Gambierdiscus* sp.は、温帯域に生息していながらそ の増殖好適水温は 30 ℃であり(Fig. 9)、他の温帯性種に比べてかなり高温側 にシフトしていることは興味深い。

Bomber et al. (1988a) は、熱帯のフロリダ産 Gambierdiscus toxicus を用いて 実験を行ったところ、28 ℃で最大増殖速度が得られたことを報告している。 また、Morton et al. (1992) によると、同じくフロリダ産 G. toxicus では、その 最大増殖速度は 29 ℃であったという。さらに、Parsons et al. (2010) は、ハ ワイ産 G. caribaeus を用いて実験を行ったところ、28.5 ℃で最大増殖速度が 得られたことを示した。本研究において、英虞湾の株では 15 ℃以下では Gambierdiscus sp.細胞の増殖は確認されなかったが、この傾向も Bomber et al. (1988a) や Morton et al. (1992)、Parsons et al. (2010) で報告されているフロ

リダやハワイの Gambierdiscus 属株での場合と同様である。なお、本研究にお

ける増殖速度に及ぼす水温の影響の実験で得られた最大増殖速度(0.3 divisions day⁻¹)は、上述した熱帯・亜熱帯の株を用いて得られた *G. toxicus*の 最大増殖速度[フロリダ:0.3 divisions day⁻¹ (Bomber et al. 1988a)、0.2 divisions day⁻¹ (Morton et al. 1992)]とほぼ同程度であった。以上のことから判断する と、英虞湾の *Gambierdiscus* sp.は温帯域に生息していながら、温度に対する増 殖の応答は熱帯・亜熱帯の本属のそれと極めて似ているものとされる。

本研究において Gambierdiscus sp.の好適な増殖が得られた塩分は、25-35 で あった (Fig. 10)。過去の報告によるとフロリダ産 G toxicus の株においては 塩分 30 で最も高い増殖速度が得られている (Bomber et al. 1988a)。また、 Morton et al. (1992) によるとやはりフロリダ産 G toxicus では塩分 32 で最も 高い増殖速度が得られたものの、全体としては 30-34 の間で大きな違いはな いとされている。さらに、Parsons et al. (2010) は、ハワイ産 G caribaeus を 用いて実験を行ったところ、塩分 30 で最大増殖速度が得られたことを示した。 つまり、英虞湾産の Gambierdiscus sp.の塩分に対する増殖の応答も熱帯・亜熱 帯域における Gambierdiscus 属のそれと同様の傾向であった。

英虞湾産 Gambierdiscus sp.は光強度が 50 μ mol m⁻²s⁻¹以上で好適な増殖を示 した (Fig. 11)。熱帯・亜熱帯産の株を用いて行った他の研究でも同程度の光 強度で最大の増殖がみられたことが報告されている。例えば、Bomber et al. (1988a) では、フロリダ産 G toxicus において 83 μ mol m⁻²s⁻¹から少なくとも 332 μ mol m⁻²s⁻¹まで好適な増殖が得られ、Morton et al. (1992) ではやはりフロ リダ産 G toxicus において 146-220 μ mol m⁻²s⁻¹ (原著では 3500-5300 μ W m⁻²s⁻¹ とされており、この値を光量子量に換算した) で好適な増殖であった。さら に、Parsons et al. (2010) は、ハワイ産 G caribaeus を用いて実験を行ったと ころ 80-150 μ mol m⁻²s⁻¹ で好適な増殖を得られたことを示した。なお、本研究 では、英虞湾産 Gambierdiscus sp.の増殖に対する強光阻害が起きる光強度は確 認できなかった。フロリダ産の株を用いた他の研究(Bomber et al. 1988a & Morton et al. 1992)でも強光阻害が起こる光強度まで明らかにされていないが、 ハワイ産 G caribaeus を用いた研究(Parsons et al. 2010)によると、200 µmol m⁻²s⁻¹で増殖速度は急激に減少していた。藻場のような浅いところにも生息し ているため、どの程度の光強度まで増殖できるかを確かめることは、この生 物の光環境への適応を解明するために必要であり、英虞湾産 Gambierdiscus sp. についても調べなければならない。この点については、今後の課題としたい。

ところで、熱帯・亜熱帯から報告されている *G* toxicus は 16 ℃以下では増 殖が確認されていない (Bomber et al. 1988a、Morton et al. 1992)。本研究にお ける *Gambierdiscus* sp. も 15 ℃以下では増殖は確認されなかったが (Fig. 9)、 生残していることは確認された。英虞湾の夏季の水温は 30 ℃近くまで上昇す るが、冬季には 10 ℃近くまで低下し、しかもその 10 ℃近い期間は 3-4 ケ月 程度続く (服部 2005)。生残実験の結果から、10 ℃という低水温下において 少なくとも 55 日間生残が確認された (Fig. 12)。さらに、その結果から推算 すると、約 90 日生残可能であるとされた。このことは、英虞湾の *Gambierdiscus* sp.個体群中には冬季から春季にかけても生残している細胞が存在することを 示唆するものである。

第4章

英虞湾における Gambierdiscus sp.の出現動態

4-1. 序論

Gambierdiscus 属が一般に生息している熱帯・亜熱帯域においては水温等の 環境が一年を通してほとんど変化しない。それにも関わらず、Gambierdiscus 属の付着密度は周年一定ではなく、増加する時期や減少する時期があること も報告されている。例えば Bomber et al. (1988a) ではフロリダの G toxicus の 現存量は9月に最も多く、4月に低いと報告されている。また、Gillespie et al. (1985)も同様にオーストラリアのクイーンズランドにおける G toxicus の現 存量の最大ピークは9月にみられ、1月から5月の間では低いことを示してい る。このことを考えると、水温・塩分・光等の環境要因が季節的に大きく変 化する温帯域においては Gambierdiscus 属の付着密度は極めて大きく変動す るはずである。しかし、温帯域においては本属の季節消長を調べた研究は全 くなされていない。そこで、本研究では英虞湾を研究対象海域として Gambierdiscus sp.の季節消長を現場調査により詳細に調べ、本種のクローン株 を用いて明らかにした生理的特徴(第2章参照)をもとに、その出現機構を 明らかにすることを目的とした。

4-2. 材料及び方法

(i) 試料の採集

調査は三重県英虞湾湾口浜島町地先の岩礁帯(Figs.3&13)の水深約1-2mの場所において、2008年11月から2011年12月まで月1回(但し、2009年9月から11月、2010年2011年の9月から10月は複数回)の頻度で行った。調

査日時及び潮位、潮の干満を Table 3 にまとめた。この場には Fig. 14 に示す ように豊かな藻場が広がっていた。この調査点において、シュノーケリング により潜水し、複数種の大型海藻を素手で採集した(Fig. 15)。海藻の採集に 際しては藻体をできるだけ揺すらないように注意し、採集後は海藻を水面下 で速やかにチャック付きビニール袋に収容した。その後、陸上にて藻体をビ ニール袋に入った海水と共にプラスチック製の広口ポリ瓶(1Lと2L容量の ものを使用)に改めて収容し、実験室へ持ち帰った。

採集した海藻は、Table 4 に示す緑藻鋼(3 種)、褐藻綱(9 種)、紅藻綱(15 種)の 27 種であった。これらのうち、緑藻鋼ミル目のミル(Codium fragile)、 褐藻綱アミジグサ目のウミウチワ(Padina arborescens)、ヒバマタ目のウミト ラノオ(Sargassum thunbergii)、紅藻綱サンゴモ目のウスカワカニノテ (Amphiroa zonata)、テングサ目のマクサ(Gelidium elegans)の5 種(Fig. 16) については、調査地点における優占種であり、1 年を通してほぼ存在していた ので、調査対象基本海藻種として可能な限り採集した。また、Gambierdiscus sp. の藻場内におけるパッチ状分布を調査するために、同じ種類の海藻を互いに 数 m 離れた複数の異なる場所から採集した。複数採集した海藻を Table. 5 に まとめた。

これらの調査と同時に多項目水質計 (クオンタ, Hach-Hydrolab) を用いて、 現場における水温と塩分を測定した。 さらに、別の環境要因として、気象庁 のホームページ (http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php) より調査地 点に最も近い三重県南伊勢町 (英虞湾浜島より約 7.5 km 西) の日間平均風力 (m s⁻¹) のデータを集計した。

(ii) 海藻の処理

海藻試料の処理方法を Fig. 17 に示す。実験室にて、現場で海藻を収容した ポリ瓶に海水の量に対して終濃度が1% (v/v)になるように中性ホルマリン を加えた。その後、ポリ瓶を 250 回激しく振盪して、藻体表面についている 付着物を剥離させた。この作業を終えてから、ポリ瓶の中身を全て野菜の水 切り用回転式ザル容器(市販品)の上に流し出して、ザルを手動回転し、海 藻に付いた余分な海水を遠心によって振り落した。ザルとその上の海藻をさ らにホルマリン入り濾過海水で丁寧に洗い、手動回転して海水を振り落した。 濾過海水で洗う作業をその後 2 回繰り返した後、藻体の湿重量を測定した。 ザルを通り抜けた全ての海水を、目合い 200 µm および 20 µm のナイロンメッ シュの篩を用いて分画し、20-200 µm の粒子画分を得た。この画分の粒子を最 終的にホルマリン濃度 1% (v/v)海水で 3-50 mL に定容して検鏡に供した。

(iii) Gambierdiscus sp.の観察と計数

海藻を処理して得られた検鏡用サンプルからの Gambierdiscus sp.の探索に は、すでに2-2-1.「英虞湾の Gambierdiscus 属細胞の形態観察」で述べ た通り、有殻渦鞭毛藻の鎧板の観察に利用されている Calcofluor White M2R (Siguma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)を使った蛍光染色法 (Fritz & Triemer 1985)を応用した。この手法を用いると、細胞の殻が UV 励起光下で青白い 蛍光を発するため、多量の粒子(プランクトンだけでなく有機・無機態の全 粒子)が混在するサンプル中でも Gambierdiscus sp.の探索が容易かつ確実にな る。サンプルの処理・観察手順は次の通りである。検鏡用に作成した 3-50 mL のサンプルに、1 mg mL⁻¹に調整した Calcofluor White M2R 溶液を終濃度が 10 µg mL⁻¹になるように加えた(例:10 mL のサンプルに 100 µL の Calcofluor White M2R 溶液を添加)。このサンプルから1 mL あるいは 0.5 mL を分取し、 罫線入りスライドグラス上に載せ、落射型蛍光顕微鏡(Nikon Eclips TE300) によりUV励起光下(EX365-10励起フィルター、DM400ダイクロイックミラー、 BA400 吸収フィルター)で *Gambierdiscus* sp.細胞の探索をした。探索には通 常光を使用せず UV 励起光のみを用いて行った。検鏡中、*Prorocentrum lima* や *Ostreopsis* sp.など様々な底生性渦鞭毛藻が青白い蛍光を発して検出された が、*Gambierdiscus* sp.と思われる細胞が出現したときにはその都度鎧板を観察 して同定した。この操作を、藻体の湿重量にして 3 g 以上観察するまで繰り返 した(湿重量が 10 g である藻体に対して 10 mL の検鏡用サンプルを作成した 場合、検鏡用サンプルの濃度は 1 g 藻体湿重量 mL⁻¹なので 3 mL 以上を観察す ることとなる)。それぞれの海藻に対して得られた計数値を最終的に藻体 1 g 湿重量当たりの付着密度(cells g⁻¹ macroalga wet weight;以下 cells g⁻¹と表記 する)に換算した。

4-3. 結果

4-3-1. 英虞湾における水温・塩分の季節変化

調査地点における水温と塩分の季節変化をFig. 18 とFig. 19にそれぞれ示す。 水温は、調査を開始した 2008 年 11 月には、18.1 ℃であったが、その後低 下し始め、2009 年 2 月にはこの年の最低水温となる 12.8 ℃まで低下した。そ の後、徐々に上昇し始め、2009 年 8 月にはこの年の最高水温となる 27.6 ℃を 示し、その後は冬季に向けて低下した。このような季節変化は 2010 年以降も 同様であった。なお、2010 年の最低水温は 2 月の 11.3 ℃であり、最高水温は 8 月の 21.5 ℃であった。さらに、2011 年の最低水温は 1 月の 11.4 ℃であり、 最高水温は 8 月の 30.4 ℃であった。 塩分は、2011 年 6 月には 28.0、9 月には 27.0 というように、時折低い値を 示したが、全体の傾向としては大きく変化せず、観測期間を通して 30-35 の 間で上下した。

気象庁より得た南伊勢町における日間平均風力の季節変化を Fig. 20 に示す。 本研究の観測期間全体を通してみると、どの年においても 11 月から 4 月の間 は相対的に風の強い日が多かった。一方、7 月から 9 月においては、年によっ て強風が多く記録される場合とそうでない場合があった。すなわち、2009 年 は日間平均風力が 2 m s⁻¹を超えるような日が多く、2011 年も同様の傾向で あった。しかし、2010 年においてはこの時期全体的に風力は弱く、ほぼすべ ての日で日間平均風力は 1 m s⁻¹程度かあるいはそれ以下であった。なお、い ずれの年も強風が記録された原因として、三重県地方に接近した台風による 影響が挙げられる(Fig. 20 中の赤い矢印参照)。

4-3-2. 英虞湾における Gambierdiscus sp.の海藻各種への付着

本調査で検出された Gambierdiscus sp.のすべての細胞は第2章「英虞湾にお ける Gambierdiscus 属の種同定」で述べた特徴を持つことから、Gambierdiscus sp.であった。Gambierdiscus sp.の細胞が検出された海藻は全27種のうち、緑 藻綱ミル目のミル、褐藻綱アミジグサ目のヘラヤハズ、ウミウチワ、サガラ メ、イシゲ、ジョロモク、ヤツマタモク、ウミトラノオ、紅藻綱ウミゾウメ ン目のガラガラ、サンゴモ目のウスカワカニノテ、ピリヒバ、テングサ目の マクサ、オバクサ、スギノリ目のユカリの計14種であった。各調査における それぞれの海藻に対する付着密度を Fig. 21 に示した。全調査において、 Gambierdiscus sp.はある特定の海藻のみに多く付着していたわけではなかっ た。例えば、2008年11月にはウミウチワに4.66 cells g⁻¹と多くの細胞が付着 していたが、2008 年 12 月には逆に 0.32 cells g⁻¹ と低く、この月にはウミトラ ノオに最も多く付着(2.46 cells g⁻¹)していた。一方、2009 年 1 月にはウミウ チワとウミトラノオからは検出限界以下であったが、ウスカワカニノテから 細胞がわずかに検出(0.39 cells g⁻¹)された。このようなケースは他の時期や 他の藻類でも認められた。なお、調査期間中における海藻類各種に対する最 高付着密度は 2009 年 10 月 1 日の褐藻綱ヒバマタ目のウミトラノオ (Fig. 16C) における 31.94 cells g⁻¹であった(Fig. 21)。

Gambierdiscus sp.のパッチ状分布を調べた結果を Table 5 にまとめた。 *Gambierdiscus* sp.は 2008 年 12 月に採集されたウミトラノオの藻体①、②から 多く検出され、その密度はそれぞれ 2.15 cells g⁻¹ と 2.46 cells g⁻¹であった。た だし、藻体③からは全く検出されなかった。この時、4 カ所から採取したウス カワカニノテにおいても、付着した藻体(①、②、④) と付着していない藻 体(③) が見られた。付着した藻体の密度はそれぞれ 0.92 cells g⁻¹、0.24 cells g⁻¹、 0.21 cells g⁻¹であった。また、2009 年 9 月 1 日に採取したミルにおける付着密 度は藻体①で 4.26 cells g⁻¹であったのに対し、藻体②では 1.59 cells g⁻¹であっ た。さらに、9 月 10 日のマクサにおける付着密度は藻体①は 0.56 cells g⁻¹、藻 体②は 0.26 cells g⁻¹であったのに対し、藻体③では 4.21 cells g⁻¹であった。

4-3-3. 英虞湾における Gambierdiscus sp.の季節消長

前項で示した各調査におけるそれぞれの海藻に対する付着密度の図(Fig. 21)では、全体的な季節変化の傾向を検討することは困難である。そこで、ここでは各月に採取された複数種の海藻における Gambierdiscus sp.の付着密度の平均(以下、月平均付着密度とする)で結果を示す(Fig. 22)。Gambierdiscus sp.の月平均付着密度は、調査を開始した 2008 年 11 月には 2.08 cells g⁻¹であっ

たが、その後低下し始め、2009 年 2 月から 6 月には 0.02 cells g⁻¹以下あるい は検出限界以下であった。その後、徐々に上昇し、10 月には全調査期間を通 して最高付着密度となる 11.34 cells g⁻¹を記録した。その後は冬季に向けて減 少した。このような季節変化は 2010 年以降も同様であった。なお、2010 年に は 4 月に検出限界以下であったが、その他の月には常に検出され、最高付着 密度は、8 月の 9.90 cells g⁻¹であった。2011 年は 4-6 月の間に検出限界以下で あり、最高付着密度は 10 月の 2.42 cells g⁻¹ であった。以上のように、 *Gambierdiscus* sp.は、夏季から秋季にかけて増加していき、その後、冬季に向 かい減少した。しかし、増加を開始する時期については年によって差があり、 2009 年では 8 月から、2010 年では 7 月から、2011 年では 9 月からであった。 また、2009 年と 2010 年は 10 cells g⁻¹程度まで増加したのに対し、2011 年は その増加量は 2-3 cells g⁻¹ と少なかった。なお、本研究によって冬季にも *Gambierdiscus* sp.の細胞は生息していることが判明した。

4-4. 考察

4-4-1. 英虞湾における Gambierdiscus sp.の海藻各種への付着

本研究により、英虞湾浜島の藻場における Gambierdiscus sp.の海藻類各種への付着密度が明らかとなった。Gambierdiscus sp.は調査期間中採集した海藻類 27種(緑藻綱:3種、褐藻綱:9種、紅藻綱:15種)中、ある一部の特定の 海藻のみならず14種(緑藻綱:1種、褐藻綱:7種、紅藻綱:6種)の海藻か ら細胞が検出された(Table 6)。また、付着基質としての海藻の表面が房状(ウ スカワカニノテ、ガラガラ、ウミトラノオ、ピリヒバ)か、平滑(ウミウチ ワ)かにかかわらず付着していた。さらに、調査ごとに最大付着密度が記録 された海藻の種類は異なっていた(Fig. 21)。石川・倉島(2010)も指摘して いるように、このことは、本海域において、Gambierdiscus sp.には海藻基質への付着特異性はないことを示している。なお、ここではデータとして示さないが、調査時、現場において布(テトロン 60%:綿 40%)を人工海藻として設置したところ(Fig. 23)、Gambierdiscus sp.の付着が確認されている。つまり、Gambierdiscus sp.はどのような基質にも付着する特性を持つと考えられる。換言すれば、Gambierdiscus sp.は、本研究で採集されなかった海藻類も含めて、この場の様々な基質(岩の表面やゴミなど)に広く分布していた可能性がある。

ところで、Table 5 で示したように、同一調査時に同一の場所から複数藻体 採集した海藻種において、同一種でも藻体ごとに付着密度には大きな差が見 られた。このことは、本研究で調査した狭い範囲の藻場内で Gambierdiscus sp. は、他の海域での場合と同様に(例えば Yasumoto et al. 1980)、パッチ状分布 をしていることを表しているものと考えられる。つまり、英虞湾の藻場にお ける Gambierdiscus sp.の海藻への付着機構は、Gillespie et al. (1985) によって 他の海域においても指摘されているように、たまたまそこに海藻等の基質が あれば付着するというような日和見的な性格が強いものと理解される。また、 このことは同時に、Gambierdiscus sp.の付着密度調査を行う際、同一範囲から 複数の海藻を採集してパッチ状分布のバイアスを減少させる必要性があるこ とを示しているであろう。

4-4-2. 英虞湾における Gambierdiscus sp.の季節消長

本研究によって、温帯域である英虞湾における *Gambierdiscus* sp.の季節消長 (Fig. 22) が初めて明らかになった。その傾向は、水温の季節変化(Fig. 18) とよく対応しているものであった。すなわち、水温が 11.3-14.8 ℃と低い冬季 から早春季にかけて付着密度も低く、反対に、水温が21.4-31.5 ℃と高い夏季 から秋季には付着密度も高かった。こういった季節変化は、また第3章 「Gambierdiscus sp.の増殖に及ぼす物理的環境要因の影響」で明らかにした Gambierdiscus sp.の増殖に及ぼす水温の影響を調べた結果 (Fig. 9) からも説明 できる。すなわち、好適な増殖が得られた 20-30 ℃において、現場でも付着 密度が高く、増殖がみられなかった 15 ℃以下では現場においても増殖してい ないことが伺えた。このことは、現場の細胞の増殖は水温によって強く制御 されていることを示すものである。ただし、水温の変化と細胞の消長が年に よって必ずしも一致しないことも事実である。例えば、2009年では水温がす でに24 ℃以上となっている7月にも細胞は増殖しておらず、この年は9月か ら増加した。一方、2010年は水温の変化とほぼ対応して細胞も増加した。2011 年については興味深いことに細胞の増加が 9 月と遅れたばかりでなく、その 密度も前の 2 年に比べて極めて低かった。以上のことは水温以外の要因が、 現場における Gambierdiscus sp.の増加のタイミングとその量に影響を与えて いることを示すものである。調査期間中、塩分(Fig. 19)は特に変化しなかっ たので、これがその要因となっているとは考えられない。ところで、 Gambierdiscus sp.は海藻等の基質に付着して生息しているため、その基質から 剥がれれば当然検出される細胞数は少なくなるはずである。そう考えると藻 場の擾乱の大小によって細胞の付着密度も左右されるであろう。一般に、藻 場の擾乱は風に起因する波浪によって生じる。この観点から風力の季節変化 (Fig. 20) と細胞の季節消長(Fig. 22)を比べた結果、両者の間には一定の関 係が見られた。すなわち、水温が増殖の適温になり細胞が増加し始める時期

年には Gambierdiscus sp.は7月からすでに増加していた。一方、その時期風が

である 6-9 月の間、風力が比較的弱かった(台風の接近が少なかった)2010

強い日が多い傾向があった 2009 年には、細胞の増加は遅れた。特筆すべきは 2011 年で、この年はその時期風力が極めて強い日が多く、前述したように細 胞の増加は遅く(9月から)、その増加量も少なかった。これらのことを総合 的に考えると、次のように細胞の消長を説明することができるであろう。冬 季から春季にかけては水温が増殖には低いため、細胞はもともと増殖できな い。水温が増殖可能(15 ℃以上)となる6月頃より増殖を開始するが、この 時期に強風が吹くと、海藻からの剥離量が多くなり、見かけ上増殖していな いように見えるということである。つまり、海藻に対する付着密度は細胞の 増殖量と藻場の擾乱による剥離量との相対的な関係によって決まるものであ り、本研究の季節消長の結果はその関係を示しているものと考えられる。た だし、藻場における増殖の衰退の全体的な傾向はやはり水温によって制御さ れているのであり、このことは英虞湾だけでなく Gambierdiscus sp.が出現する 他の温帯域でも同様であるとされる。

この季節消長において特筆すべきは水温が 10 ℃近くになる冬季にもわず かながら Gambierdiscus sp.の細胞が検出されたことである。第3章 「Gambierdiscus sp.の増殖に及ぼす物理的環境要因の影響」の培養実験の結果 (Fig. 9) より、Gambierdiscus sp.は 10 ℃では増殖はできないが、生残可能で あった。しかも、10 ℃における生残実験の結果 (Fig. 12)、少なくとも55 日 は生残でき、推定では約 90 日間も生きながらえることが示唆された。このこ とは、Gambierdiscus sp.は英虞湾の冬季にも十分生残できることを示しており、 現場における冬季の生息確認と一致する。以上のように、季節的に水温変化 の激しい英虞湾における Gambierdiscus sp.の出現機構が明らかとなった。この ことは本研究における大きな成果としてあげられよう。 4-4-3. 英虞湾における Gambierdiscus sp.の付着密度

熱帯・亜熱帯海域においては G. toxicus (時には Gambierdiscus sp.あるいは Gambierdiscus spp.として)の海藻に対する付着密度が広く調査されており (Table 7)、例えば、ハワイでは 823 cells g^{-1} (Shimizu et al. 1982)、プエルト・ リコの東に位置する Virgin 諸島では 75.793 cells g⁻¹ (Carlson & Tindall 1985)、 オーストラリアのクイーンズランド・ブリスベーン沿岸では 2.180 cells g⁻¹ (Gillespie et al. 1985)、やはりオーストラリアのグレートバリアリーフに位 置する Heron 島では 250 cells g^{-1} (Heil et al. 1998)、フロリダでは 8,191 cells g^{-1} (Bomber et al. 1989)、インド洋南西に位置するマダガスカル島の東に浮かぶ Reunion 島では 455 cells g^{-1} (Turquet et al. 1998)、フランス領ポリネシアのタ ヒチ島では 10,880 cells g⁻¹ (Chinain et al. 1999)、アフリカ大陸とマダガスカル 島の間のモザンビーグ海峡にある Mayotte 等では 60.463 cells g⁻¹ (Turquet et al. 2001)、タンザニア沿岸に位置する Unguja 島では 880 cells g⁻¹ (Lugomela 2006) といった付着密度が報告されている。驚くべきはフランス領ポリネシア・ガ ンビエ諸島からの報告値で、海藻1gに 5.521,000 cells g⁻¹もの細胞が付着して いたという (Yasumoto et al. 1980)。本研究における最大付着密度である 31.9 cells g⁻¹(2009 年 10 月 1 日、ウミトラノオ)はこれら熱帯・亜熱帯域からの 報告値に比べるべくもなく著しく低いものである。

一方、Koike et al. (1991) は、沖縄の慶良間列島において G. toxicus の付着 密度調査を行った結果、同列島の阿嘉島から調査時の最大付着密度である 51 cells g⁻¹という値を報告している。これは本研究で得られた最大付着密度の 1.6 倍程度である。ちなみに、石川(未発表)は 2009 年 3 月 29 日に沖縄県名護 市の北西に位置する備瀬崎において本研究と同様の調査を実施した。その結 果、5 種類の海藻類(緑藻綱ミドリゲ目キツネノオ、褐藻綱ナガマツモ目オキ

ナワモズク、アミジグサ目ウミウチワ属の一種、紅藻綱サンゴモ目モサズキ 属の一種、ウミゾウメン目ナガガラガラ)に対する *Gambierdiscus* spp.の付着 密度は最大でも *Jania* sp. (モサズキ属の一種)の10.4 cells g⁻¹であり、他の海 藻では 0-1.0 cells g⁻¹であったことを明らかにした(平均 2.4 cells g⁻¹)。すなわ ち、31.9 cells g⁻¹という英虞湾における最大付着密度は、日本において古くか らシガテラが発生している沖縄地方(野口 2007)と大きくは違わないことを 示している。つまり、英虞湾においてもシガテラ発生の危険性があり、注意 が必要である。

第5章

紀伊半島沿岸における Gambierdiscus 属の水平・鉛直分布

5-1. 序論

これまでも述べてきたように *Gambierdiscus* 属は本来、熱帯・亜熱帯性種と して知られている(例えば、Litaker et al. 2009)。3-3-1.「温度の増殖に 与える影響」で明らかにしたように英虞湾の *Gambierdiscus* sp.も、その増殖は 温帯域に生息する種としては一般的にあまりみられない 30 ℃という高温下 で活発であった。従って、日本でも水温の高い地域では *Gambierdiscus* sp.を含 む *Gambierdiscus* 属(本章においては以降、特別に種を明記する必要がない限 り *Gambierdiscus* 属として扱う)がより多く生息していると推測される。

紀伊半島においては潮岬沖に黒潮が接近して流れており、やや黒潮から離 れた英虞湾より、黒潮の影響を受ける潮岬周辺の方が、一年を通して水温が 高い傾向がある(大垣 2011)。そのため、紀伊半島においては潮岬周辺域で *Gambierdiscus* 属がより多く分布している可能性があるが、同半島海域におい ては *Gambierdiscus* 属の分布と現存量についての調査はこれまで行われてい ない。第1章で既に述べたように、紀伊半島の和歌山県側に位置するすさみ 町から 2008 年に釣獲したイシガキダイと三重県側の南伊勢町から 2009 年に 釣り上げた同魚を原因として実際にシガテラが発生していることを考えると、 *Gambierdiscus* 属が同半島沿岸でどの程度分布しているのかを明らかにするこ とは今後の被害を予測する上で早急な課題である。そこで、本研究では紀伊 半島沿岸において多くの調査点を設け *Gambierdiscus* 属の分布と現存量を調 べた。

なお、日本の沿岸では Gambierdiscus 属の鉛直的な分布については全く分
かっていないので、本研究では英虞湾湾口部に調査点を設け、Gambierdiscus sp. の鉛直分布についても調査した。

5-2. 材料及び方法

5-2-1. 紀伊半島沿岸における水平分布調査

紀伊半島沿岸の分布調査は2009年9月10日から14日に三重県から和歌山 県にかけての10点(浜島、五カ所湾、紀伊長島、尾鷲、熊野、新宮、潮岬、 すさみ、白浜、日の岬)で、2010年9月2日には三重県の3点(志摩、相差、 鳥羽)で行った(Fig. 24)。各調査点の位置について Table 8 にまとめた。4 -2.「英虞湾における Gambierdiscus sp.の出現動態」で述べた通りの方法で、 海藻を採集した。この調査で得た海藻は Table 9 で示す緑藻綱(2種)、褐藻綱

(11種)、紅藻綱(14種)の計27種であった。なお、得られた海藻は実験室に持ち帰る前に現場にて、海水の量に対して終濃度1%(v/v)になるように中性ホルマリンを加え、固定した。

調査では、同時に多項目水質計(クオンタ, Hach-Hydrolab)を用いて、現 場における水温と塩分を測定した。海藻試料の処理方法と Gambierdiscus 属の 計数方法も、4-2.「英虞湾における Gambierdiscus sp.の出現動態」に述べ た通りである。

5-2-2. 英虞湾湾口部における鉛直分布調査

英虞湾湾口部に調査地点を設け(Fig. 25)、2009 年 11 月 6 日に水深 0-2、5、 8-9、11-12 m の 4 つの水深において *Gambierdiscus* sp.の鉛直分布調査を行った。 海藻の採集は、スキューバーダイビングによる潜水によった(Fig. 26)。水中 で適宜生息している大型海藻を素手で採集し、その場で直ちに海藻をチャッ ク付きビニール袋に収め、その後陸上にて広口瓶に収容した。この調査で得た海藻は Table 10 で示す褐藻綱(2種)、紅藻綱(5種)の計7種であった。

また、4日後の2009年11月10日に、多項目水質計(クオンタ, Hach-Hydrolab) を用いて、この場における水温と塩分を測定した。海藻試料の処理方法と *Gambierdiscus* sp.の計数方法も、4-2.「英虞湾における *Gambierdiscus* sp. の出現動態」に述べた通りである。

5-3. 結果

5-3-1. 紀伊半島沿岸における水平分布

紀伊半島沿岸における 13 地点の試料を探索した結果、Gambierdiscus sp.と は異なる形態の種がみられた。すなわち、それらはすべて 1p プレートの形が Gambierdiscus sp.のそれより大きかった。したがって、紀伊半島沿岸には Gambierdiscus sp.以外の Gambierdiscus 属が生息していることが明らかとなっ た。ただし、データとしてはまとめてないが、それらの出現量は Gambierdiscus sp.と比べて少なく、全体の 2 割程度に過ぎなかった。このことから、紀伊半 島沿岸に分布する Gambierdiscus 属の主要構成種は Gambierdiscus sp.とされる。

紀伊半島沿岸における *Gambierdiscus* 属の各海藻における付着密度を Fig. 27 に示した。海藻に対する最高値は白浜のオバクサで最も高く、27.58 cells g⁻¹ であった。*Gambierdiscus* 属の各調査点における海藻類の平均値で見ると、白 浜が最も付着密度が高く 17.16 cells g⁻¹であり、続いてすさみの 5.39 cells g⁻¹、 日の岬の 3.75 cells g⁻¹であった (Fig. 28)。一方、その他の調査点では 0.00-2.28 cells g⁻¹であった。

水温は潮岬より以西の 4 カ所の調査点では 26.8-27.5 ℃と、すべての点で 26 ℃以上であった(Fig. 29)。潮岬より東側の地点ではそれよりも低く

24.6-25.4 ℃であった。2010 年に調査を行った志摩、相差、鳥羽では、水温は 23.3-23.7 ℃であった。塩分は全ての調査地点で 30.3 から 34.5 の間であった (Fig. 30)。

5-3-2. 英虞湾湾口部における鉛直分布

鉛直分布調査で採集した海藻は褐藻綱 2 種、紅藻綱 4 種の計 6 種 (Table 10) であり、このすべての種から *Gambierdiscus* sp.の細胞が検出された。各海藻に 対する *Gambierdiscus* sp.の付着密度を Fig. 31 に、水深ごとの平均付着密度を Fig. 32 に示す。最も高い *Gambierdiscus* sp.の付着密度が確認されたのは、水 深 8-9 m から採取したフタエオオギ (*Distromium decumbens*、付着密度: 4.72 cells g⁻¹) であった。一方、他の各海藻における付着密度は 0.00-3.45 cells g⁻¹ であった。水深ごとの平均付着密度を見ると、最も高いのは水深 5 m におけ る 2.45 cells g⁻¹で、最も高い付着密度が記録されたフタエオオギが採集された 水深 8-9 m の地点での平均値は水深 5 m のそれよりも低い 1.77 cells g⁻¹ という 値となった。これは、この水深で採集された他の海藻(カニノテ・ヘリトリ カニノテ)における付着密度が低かったためである。水深 0-2 m と 11-12 m で はそれよりも低い値で、それぞれ 0.70 cells g⁻¹ と 0.12 cells g⁻¹ であった。

表層から水深 11 m にかけての水温と塩分はほとんど変わらず、それぞれ 19.8-20.1 ℃と 33.9-34.2 の範囲であった(Figs. 33 & 34)。

5-4. 考察

5-4-1. 紀伊半島沿岸における水平分布

Gambierdiscus 属は紀伊半島沿岸に広く分布していることが、本研究により 初めて明らかとなった(Fig. 28)。ただし、その分布密度は調査点で異なり、 全体的にみると潮岬の西側で高く、東側で低かった。大垣(2011)によると 潮岬の西側では東側に比べて周年に渡り水温が高い。本調査時においても事 実、潮岬より西側の4カ所の点では26℃以上の水温が記録され、東側よりも 1 ℃ほど高かった。このことは、黒潮の影響を受けやすく、水温がより高い 紀伊半島の地域では Gambierdiscus 属の分布密度も高いであろうとした当初 の予測と合致するものである。ただし、周年最も水温が高いであろう潮岬で、 最高付着密度が記録されたわけではなく、むしろその密度は 0.38 cells g⁻¹と低 かった。4 - 4 - 1. 「Gambierdiscus sp.の海藻各種への付着」の調査でも明 らかにされたように、Gambierdiscus 属はパッチ状分布する傾向があるので、 その場における正確な分布密度を出すことは難しいが、今回の調査結果のみ から判断すると、白浜(17.16 cells g^{-1})と潮岬(0.38 cells g^{-1})ではあまりに もその差は大きい。前章でも考察したように、波による藻場の擾乱によって も付着密度は大きく変化する可能性があるため、水温だけの要因から分布を 解析することには無理があるかもしれない。いずれにしても、紀伊半島では 広く Gambierdiscus 属が分布しているため、将来にわたってシガテラも発生し やすいと考えられ、今後、海水の動きとも関連させて、同半島における Gambierdiscus 属の分布をさらに調べていく必要がある。

5-4-2. 英虞湾湾口部における鉛直分布

英虞湾湾口部での鉛直分布調査において、*Gambierdiscus* sp.は表層よりも 5-9 m にかけてその付着密度が高く、11-12 m にかけては急激に減少していた ことが明らかとなった(Fig. 32)。水温・塩分はこの場において鉛直的にほと んど変わらないので(Figs. 33 & 34)、これらの要因が、このような分布傾向 がもたらしているものではない。本研究では光環境を測定しなかったが、光 強度もこのような鉛直分布に影響を与えている可能性があるだろう。今後、 光環境と関連させて本種の分布を調査していく必要があるだろう。なお、 *Gambierdiscus* 属の鉛直的な分布を明らかにした研究は世界的にみても極めて まれであり、その意味で本研究の鉛直分布の結果は貴重な知見として位置づ けられよう。

第6章

総合考察

紀伊半島の南側には南方から来る黒潮が流れている。本来、熱帯・亜熱帯 性の Gambierdiscus 属は黒潮の分枝流に乗り、本研究の調査の場である英虞湾 に移入され、水温の高い夏季から秋季にかけて、増殖すると考えるのが普通 かもしれない。熱帯域では実際に流れ藻から G. toxicus の細胞が検出されてお り、本属はこれにより分布域を広げているとの推測もなされている (Bomber et al. 1988b)。しかし、英虞湾の Gambierdiscus sp.は同湾の冬季にも出現し、す なわち周年に渡り個体群を維持していた。つまり、英虞湾において本種は土 着しているということである。そのようなことを可能にさせるのは3-3-4.「低水温における生残実験」で明らかにしたような英虞湾産 Gambierdiscus sp.が、同湾の冬季の水温に近い 10 ℃という低水温においても約 90 日程度生 残できるという低水温への耐性によるものである。

本研究により、この Gambierdiscus sp.を主要構成種(全体の約80%以上が Gambierdiscus sp.)とする Gambierdiscus 属が紀伊半島に広く分布しているこ とが明らかとなった。また、英虞湾産 Gambierdiscus sp.はそのSSUの塩基配 列の解析により、Kuno et al. (2009)によって報告された Gambierdiscus sp. Type 2 と一致することが判明しており(2-3.「英虞湾における Gambierdiscus 属の種同定」参照)、この Gambierdiscus sp. Type 2 は Kuno et al. (2009)によ ると、四国の室戸岬や牟岐でも生息しているという。英虞湾以外の紀伊半島 沿岸でも四国の室戸岬や牟岐においても、冬季の水温は英虞湾と同程度かそ れよりも高いため[気象庁 日本近海 日別海面水温データ

(http://www.data.kishou.go.jp/db/kaikyo/daily/sst_jp.html)参照]、そのような場所ではやはり *Gambierdiscus* sp. Type 2 は、周年に渡って生息している可能性

がある。さらに、対馬暖流の影響を受け、冬季にも水温が 13 ℃程度と比較的 高い若狭湾の新井崎や宮津において Gambierdiscus 属の出現が最近確認され (畑山ら 2010)、新井崎で採集された紅藻綱サンゴモ目ヘリトリカニノテに おいて 261.8 cells g⁻¹という極めて高い付着密度が報告された(畑山 私信)。 なお、この細胞はその後の分析により、遺伝的に G caribaeus に近縁であると 判明しており、英虞湾の Gambierdiscus sp. Type 2 (2-3.「英虞湾における Gambierdiscus 属の種同定」参照)と同種である(畑山 私信)。いずれにして も以上のことは、西日本一帯では Gambierdiscus 属はこれまで調査がなされた 範囲よりもさらに広範囲に分布しており、しかも周年に渡りその個体群を維 持している可能性があることを示唆するものである。

本研究では英虞湾の水深 1-2 m と浅い地点で季節消長調査を行った。 Gambierdiscus sp.の増殖の最適光量(3-3-3.「光の増殖に与える影響」 参照)が 50-350 µmol m⁻²s⁻¹程度であることを考えると、海表面に極めて近い 水深が 1-2 m の英虞湾浜島の岩礁帯では本種の増殖に対して強光阻害が起き ている可能性がある。したがって、本種の分布の最適水深は海表面よりも深 いところにあっても良いはずである。一回限りの調査では断言できないが、 そのような傾向は英虞湾での鉛直分布調査でも確かに示されたことは興味深 い(5-3-2.「英虞湾湾口部における鉛直分布」参照)。なお、英虞湾に おける Gambierdiscus sp.の消長は第一義的には水温に制御されるが、風などに よる海水の擾乱にも強く影響を受けることが本研究で示唆された(4-4-3.「英虞湾における Gambierdiscus sp.の季節消長」参照)。上述の推測の通り、 海表面ではなくある程度深いところに分布の中心があるとすれば、そこは海 水の擾乱も海表面と比べて小さくなるはずであり、そのような場所では Gambierdiscus sp. は海藻から剥離せず、極めて高い密度で分布している可能

性もある。本研究では、紀伊半島の水平分布調査においては、ほぼすべての 地点において Gambierdiscus 属がみられたが、どの地点でも水深 1-3m におけ る密度であり、上記の理由により、深い層にはさらに多くの細胞が生息して いる可能性もある。そのため、同半島における Gambierdiscus 属の詳細な分布 を明らかにするためには、より深い場所での調査が必要となってくるであろ う。

英虞湾の Gambierdiscus sp.は形態学的には G toxicus に酷似しているが、分子系統的には G caribaeus に近い種であった (2-3.「英虞湾における Gambierdiscus 属の種同定」参照)。既に述べたように Litaker et al. (2009) に よると、G caribaeus では毒産生能は報告されていなかったが、最近 Fraga et al.

(2010)によって本種も毒を持つことが示された。紀伊半島だけでなく Gambierdiscus sp. (Type 2)が分布しているところでは実際シガテラ被害が発 生しているのであるから、この種も当該中毒の原因となる毒素を保持してい る可能性が高い。いずれにしても今後 Gambierdiscus sp. (Type 2) についての 毒産生能について研究を進めていくことが重要である。

近年、地球の温暖化で水温の上昇が危惧されている。すでに 20 年前に伊豆 半島の下田で Gambierdiscus 属の出現が記録されているため (原・堀口 1982)、 その水温の上昇が近年の Gambierdiscus sp.の温帯域での分布をもたらしたも のではないと言える。ただし、今後さらに水温の上昇が続くと、温帯の Gambierdiscus 属の生息密度もより高くなり、さらにはその分布を北方へ広げ る可能性も考えられる。従って、温帯域におけるシガテラ発生のリスクは将 来より高くなると予想され、その意味でも当該海域における Gambierdiscus 属 の出現動向について継続的に監視していく必要がある。

本研究では英虞湾に生息する Gambierdiscus sp.の季節消長を詳細に明らか

にし、また生理的な特徴を解明することに成功した。さらに紀伊半島の沿岸 における水平分布や英虞湾湾口での鉛直分布がある程度判明した。以上の成 果は、温帯域における将来のシガテラ中毒発生の予知・予防に対して基礎的 知見として大きく資するものと期待されよう。 謝辞

本研究のテーマを与えてくださった三重大学大学院 生物資源学研究科 准 教授 石川 輝博士には、本研究を遂行過程及び、本論文の作成過程におい て、絶えず懇切丁寧なご指導・文献の貸与を賜りました。さらには、私的な 面にまでお心づかいいただきました。大変お世話になり、深く感謝いたしま す。三重大学大学院 生物資源学研究科 助教 田口 和典博士には、栄養塩の 分析をしていただいた他、本研究を遂行するにあたり、様々なご助言を賜り ました。ここに感謝の意を表します。また、本論文を御校閲していただき多 大なご協力を賜りました三重大学生物資源学部教授 前川 行幸博士に厚く お礼申し上げます。三重大学生物資源学部准教授 木村 妙子博士には本論文 を御校閲していただき、数々の助言と激励をいただきました。謹んで感謝い たします。

瀬戸内海区水産研究所赤潮環境部 赤潮生物研究室 山口 峰生博士なら びに同研究室 坂本 節子博士には、ご多忙の中、英虞湾産 Gambierdiscus 属 の遺伝子解析を快く引き受けてくださり、本論文作成の過程では多大なご協 力ならびにご助言を賜りました。ここに厚くお礼申し上げます。

三重大学大学院 医学研究科 電子顕微鏡室 技術専門員 小川 覚氏には、 電子顕微鏡の操作を丁寧にご教授いただいただけでなく、数回にわたる撮影 に際しても快くご協力いただきました。さらに、電子顕微鏡用試料処理の方 法を試行錯誤したときには、様々な貴重なご意見・ご協力をいただき、撮影 の成功へと導いていただきました。誠にありがとうございました。

三重大学大学院生物資源学研究科付属教育研究施設 紀伊・黒島生命地域 フィールドサイエンスセンター付属施設水産実験所助教授 木村 清志博士

には、温かいご助言をいただいた他、様々な便宜を図っていただきました。 ここに厚くお礼申し上げます。また、同水産実験所職員の小川 清宏氏には、 調査の際に船の操船をしていただいたなど、ご尽力いただきました。西岡 光 代氏および同水産実験所 学生諸子には、実験所での宿泊の際には、大変お世 話になり、またいつも温かい言葉をかけていただきました。心より感謝して おります。

英虞湾における Gambierdiscus sp.の調査の際には、長期間にわたる調査にも 関わらず快く許可をしていただいた三重県外湾漁業協同組合の皆様に深く感 謝いたします。また、紀伊半島水平分布調査の際に快諾していただいた、海 の博物館及び、鳥羽磯部漁業協同組合、三重外湾漁業協同組合志摩支所、同 組合くまの灘支所、海野漁業協同組合、尾鷲漁業協同組合、熊野漁業協同組 合、新宮漁業協同組合、和歌山東漁業協同組合、和歌山南漁業協同組合、紀 州日高漁業協同組合の皆様に、ここにお礼申し上げます。

京都大学大学院 農学研究科 応用生物科学専攻 海洋環境微生物研究室研 究員 石井 健一郎氏には、本研究を遂行する過程でいつもお心づかいをいた だき、また調査へもご協力をいただきました。深く感謝しております。北海 道大学大学院 水産科学研究科 海洋生物資源科学専攻 海洋生物学講座 浮遊 生物学研究室 博士課程1年 夏池 真史氏には紀伊半島沿岸水平分布調査の 際にご協力いただいただけでなく、本研究の遂行にあたり様々なご助言を賜 りました。ここに感謝の意を表します。京都大学大学院 農学研究科 応用生 物科学専攻 海洋環境微生物研究室 修士課程2年 畑山 裕城氏には、研究 対象種が同じであるため、数多くのご意見やご助言をいただきました。また、 紀伊半島沿岸水平分布調査の際にも、ご協力いただきました。厚くお礼申し 上げます。

最後に、三重大学 生物資源学部 生物海洋学研究室4年 浜野 五十二氏を はじめ生物海洋学研究室の学生諸子には調査に同行していただき、多大なご 協力いただいたほか、公私にわたりご助力をいただきました。心から感謝い たします。また、同研究室卒業生 井田 なつき氏、古田 光佑氏、木村 雄太 氏には、現場での調査において多大なるご協力をいただきました。ここに感 謝の意を表します。 参考文献

- Adachi, R. & Y. Fukuyo 1979. The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate Gambierdiscus toxicus gen. et sp. Nov. collected in a ciguatera-endemic area. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 45 : 67-71.
- Bomber, J. W., R. R. L. Guillard & W. G. Nelson 1988a. Roles of temperature, salinity, and light in seasonality, growth, and toxicity of ciguatera-causing *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo (Dinophyceae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 115 : 53-65.
- Bomber, J. W., S. L. Morton, J. A. Babinchak, D. R. Norris & J. G. Morton 1988b. Epiphytic dinoflagellates of drift algae-Another toxigenic community in the ciguatera food chain. *Bull. Mar. Sci.* 43 : 464-468.
- Bomber, J. W., M. G. Rubio & D. R. Norris 1989. Epiphytism of dinoflagellates associated with the disease ciguatera : substrate specificity and nutrition. *Phycologia*, 28 : 360-368.
- Carlson, R. D. & D. R. Tindall 1985. Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Island. In Toxic Dinoflagellates, eds. D. M. Anderson, A. W. White and D. G. Baden, Elsevier, New York : pp171-176.
- Chateau-Degat, M., M. Chinain, N. Cerf, S. Gingras, B. Hubert & E. Dewailly 2005. Seawater temperature, *Gambierdiscus* spp. variability and incidence of ciguatera poisoning in French Polynesia. *Harmful Algae*, 4 : 1053-1062.
- Chinain, M., M. Germain, X. Deparis, S. Pauillac & A. M. Legrand 1999. Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae), the causative agent of ciguatera in Tahiti, Frenchi Polynesia. *Mar. Biol.*, 135 : 259-267.

- Fleming, L., D. Baden, J. Bean, R. Weisman & D. Blythe 1998. Seafood toxin diseases : issues in epidemiology and community outreach. In Harmful Algae, eds. B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernandez & T. Wyatt, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, 245-248.
- Fraga, S., F. Rodriguez, A. Caillaud, J. Diogene, N. Raho & M. Zapata 2011. Gambierdiscus excentricus sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). Harmful Algae, 11: 10-22.
- Fritz, L. & R. E. Triemer 1985. A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. J. Phycol., 21 : 662-664.
- Gillespie, N. C., M. J. Holmes, J. B. Burke & J. Doley 1985. Distribution and periodicity of *Gambierdiscus toxicus* in Queensland, Australia. In Toxic Dinoflagellates, eds. D. M. Anderson, A. W. White, D. G. Baden, Elsevier, New York : pp183-188.
- Guillard, R. R. L. & J. H. Ryther 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana Hustedt and Detonnula confervacea (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8 : 229-239.
- 原慶明・堀口健 1982. 伊豆半島沿岸の海産微細藻類相. 国立科博専報, 15: 99-108.
- 畑山裕城・石川輝・夏池真史・武市有未・鰺坂哲朗・澤山茂樹・今井一郎 2011. 日本海若狭湾西部において見出された底生渦鞭毛藻 Gambierdiscus 属.日 本水産学会誌, 77: 685-687.

- 服部真由子 2005. 英虞湾における有毒渦鞭毛藻 Alexandrium catenella の個体 群動態. 三重大学生物資源学部修士論文, 43pp.
- Heil, C.A., P. Bird & W. C. Dennison 1998. Macroalgal habitat preference of ciguatera dinoflagellates at Heron Island, a coral cay in the southeastern great barrier reef, Australia. In Harmful algae, eds. B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernandez & T. Wyatt, Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, 52-53.
- 石川輝・倉島彰 2010. 英虞湾における底生性有毒渦鞭毛藻 Gambierdiscus toxicus の出現. 水産海洋研究, 74:13-19.
- Kim, D., Y. Matsuyama, S. Nagasoe, M. Yamaguchi, Y. Yoon, Y. Oshima, N. Imada & T. Honjo 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). J. Plankton Res., 26 : 61-66.
- 気象庁 2008-2011. 気象庁ホームページ. 過去の気象データ検索 : http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php
- Koike, K. & T. Isimaru, M. Murano 1991. Distributions of Benthic Dinoflagellates in Akajima Island, Okinawa, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 : 2261-2264.
- Kuno, S., R. Kamikawa, S. Yoshimatsu, T. Sagara, S. Nishio & Y. Sako 2010. Genetic diversity of *Gambierdiscus* spp. (Gonyaulacales, Dinophyceae) in Japanese coastal areas. *Phycol. Res.*, 58 : 44-52.
- Lalli M. C. & T. R. Parsons 1993. Biological Oceanography An Introduction. Oxford. Pergamon. pp349.

- Litaker, R. W., M. W. Vandersea, M. A. Faust, S. R. Kibler, M. Chinain, M. J. Holmes, W. C. Holland & P. A. Tester 2009. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia*, 48 : 344-390.
- Litaker, R. W., M. W. Vandersea, M. A. Faust, S. R. Kibler, A. W. Nau, W. C. Holland, M. Chinain, M. J. Holmes & P. A. Tester 2010. Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus. Toxicon*, 56 : 711-730.
- Lugomela, C. 2006. Autecology of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo (Dinophyceae) in central coastal areas of Tanzania. *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.*, 5 : 213-221.
- 三重県 2008. イシガキダイのシガテラ毒が疑われる健康被害事例について.
 三 重 県 ホ ー ム ペ ー ジ H20.8.30 お 知 ら せ 情 報 : http://www.pref.mie.lg.jp/TOPICS/2008080485.htm
- Morton, S. L., D. R. Norris & J. W. Bomber 1992. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 157 : 79-90.
- 野口玉雄 2007. 水産振興 479. 水産食品の安心・安全について-魚介毒(マ リントキシン)による中毒予防など. 東京水産振興会, 東京, pp14-18.
- 大垣俊一 2011. 浅海生物相の長期変動 紀州田辺湾の自然史. 南紀沿岸生態 研究室, 144pp.
- Parsons, M. L. & L. B. Preskitt 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai'i. *Harmful Algae*, 6 : 658-669.

- Parsons, M. L., C. J. Settlemier & P. K. Bienfang 2010. A simple model capable of simulating the population dynamics of *Gambierdiscus*, the benthic dinoflagellate responsible for ciguatera fish poisoning. *Harmful Algae*, 10 : 71-80.
- 堺市衛生研究所 2009. シガテラ食中毒にご注意ください. 堺市衛生研究所 ホームページ. トピックス : http://www.city.sakai.lg.jp/city/info/ hoken/eiken/topics siga.html
- Shimizu, Y., H. Shimizu, P. J. Scheuer, Y. Hokama, M. Oyama & J. T. Miyahara 1982. Gambierdiscus toxicus, a Ciguatera-Causing Dinoflagellate from Hawaii. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 48 : 811-813.
- Turquet, J., J. P. Quod, A. Coute & M. A. Faust 1998. Assemblage of benthic dinoflagellates and monitoring of harmful species in Reunion Island, SW Indian Ocean, 1993-1996. In Harmful Algae, eds. B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernandez & T. Wyatt, Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, 44-47.
- Turquet, J., J.. P. Quod, L. Ten-Hage, Y. Dahalani & B. Wendling 2001. Example of *Gambierdiscus toxicus* flare-up following the 1998 coral bleaching event in Mayotte Island (Comoros, south-west Indian Ocean). In Harmful Algal Blooms 2000, eds. B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernandez & T. Wyatt, Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, 50-53.
- 山口峰生・本城凡夫 1989. 有害赤潮鞭毛藻 Gymnodinium nagasakiense の増殖 におよぼす水温、塩分および光強度の影響.日本水産学会誌,55: 2029-2036.

- Yamaguchi, M., S. Itakura, K. Nagasaki, Y. Matsuyama, T. Uchida & I. Imai 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.
- 山本民次・吉津祐子・樽谷賢治 1995. 三河湾産有毒渦鞭毛藻 Alexandrium tamarense の増殖に及ぼす水温、塩分及び光強度の影響. 藻類,43:91-98.
- 山本民治・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.
- Yamamoto, T., S. J. Oh & Y. Kataoka 2002. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.*, 68 : 356-363.
- Yasumoto, T., A. Inoue, T. Ochi, K. Fujimoto, Y. Oshima, Y. Fukuyo & R. Adachi 1980. Environmental Studies on a Toxic Dinoflagellate Responsible for Ciguatera. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46 : 1397-1404.
- 安元健・村田道雄 1991. さんご礁性魚類による食中毒シガテラの原因毒の解明. 科学と生物, 29:379-387.

安元健 1993. 海洋生物活性物質-マイトトキシンの構造決定. ファルマシア, 29:621-625.

図表

Table 1. 日本各地におけるシガテラ発生地点. 野口(2007)の表より引用.

中毒事例	発生	年月日	発生場所	原因魚
1	1949年	5月	東京都	 ドクカマス
2	1958年		沖縄県石垣島	イッテンフエダイ
3	1966年	7月	東京都	バラフエダイ
4	1.0	4月1日	沖縄県	ドクカマス
5		7月13日	東京都	バラフエダイ
6	1967年	1日15日	加杏川順	バラフエダイ
7	10074	2810	市古邦	バラフェダイ
, Q		58108	「「一本」である。	レラマサ
0	1060年		「未示 出手個	ビノマノ
10	1060年	4月11日	石丁示 古古	ハンハン
10	1909年	1月 2月20日	来乐和1月一日 	バラハク
10	1371-4	2月20日	一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一	バラバタ
12		12月17日	同和保	ハフハメ
13		12月18日	高加県	
14		12月19日	高加県	
10			高加県	
16		12月29日	尚知県	
17		12月30日	高知県	ハダ科魚類
18	1972年	1月1日	高知県	ハタ科魚類
19		1月2日	高知県	ハタ科魚類
20	22	8月24日	静岡県	カンパチ
21	1973年	2月26日	沖縄県	ドクウツボ
22	1974年	7月11日	宮崎県	バラフエダイ
23	1976年	6月25日	沖縄県	アカジン
24		10月24日	静岡県	カンパチ
25	1977年	9月21日	滋賀県	ドクカマス
26	1978年	9月16日	沖縄県	フタツボシドクギョ
27	1979年	9月25日	沖縄県	シガテラ毒魚
28	1981年	1月12日	沖縄県	ハタ科魚類
29	1982年	5月30日	沖縄県	ハタ科魚類
30		10月2日	鹿児島県	バラハタ
31	1983年	6月30日	鹿児島県	バラフエダイ
32		7月20日	沖縄県	バラハタ
33		12月26日	静岡県	ヒトミハタ
34	1984年	10月19日	沖縄県	イッテンフエダイ
35	1985年	5月13日	沖縄県	シガテラ毒魚
36		8月11日	沖縄県	バラフエダイ
37	1986年	11月23日	大分県	バラフエダイ
38	1987年	5月18日	沖縄県	バラフエダイ
39	1988年	3月23日	沖縄県	イシガキダイ
40		9月8日	沖縄県	アズキハタ
41	1989年	11月28日	沖縄県	ウツボ
42	1990年	5月27日	沖縄県	アカマダフハタ
43		7月20日	沖縄県	オオアオノメアラ
44		7月27日	沖縄県	アオジロバラハタ
45		8月12日	沖縄県	イッテンフエダイ
46		9月17日	沖縄県	アズキハタ
47	1992年	3月10日	沖縄県	イシガキダイ
48	(2)	8月9日	沖縄県	イッテンフエダイ
49		9月21日	沖縄県	バラフエダイ
50	1998年	4月1日	宮崎県	イシガキダイ
51	10072675577 - UK	7月28日	沖縄県	シイラ
52		8月3日	鹿児島県大島郡	イシガキダイ
53	1999年	11月	千葉県	イシガキダイ
54	····· 2001	6月	神奈川眞	バラハタ
55	2006年	6月	茨城県	バラフエダイ

計測部位	サイ	ズ幅	平均(µm)		
背腹長	47.5		100.0	77.1	
体幅	50.0		100.0	81.0	
体長	30.0	1 <u></u> 5	60.0	47.1	

Table 2. 英虞湾から検出されたGambierdiscus属の細胞サイズ.

観察した細胞:121細胞

	润本口味		調査時間中の 油 _			満潮				干潮				
		洞里口	<u>-</u>		潮位(cm)	/罕加	時刻	潮位(cm)	時刻	潮位(cm)	時刻	潮位(cm)	時刻	潮位(cm)
2008年	11月	20日	11:00 -	12:30	314-316	小潮	11.59	318	3(, 11))	222	5:11	200	18:54	256
	12月	15日	13:00 -	14:00	264-267	中潮	8:12	377	19:03	366	1.29	148	13:41	263
2009年	1月	22日	11:45 -	12:15	282-286	中潮	5.00	303	15:04	307	9.54	273	22:03	195
	2月	26日				大潮	7.01	351	18:48	357	0.38	173	12:52	199
	3月	17日	12:30 -	13:30	221-246	中潮	8:37	326	22:13	293	2:37	248	15:32	198
	4月	17日	11:30 -	12:30	270-285	小潮	8:59	303	9 <u>2</u> 0	<u>100</u>	4:00	275	16:53	218
	5月	16日	11:00 -	11.55	279-298	小潮	9:09	313	23:43	320	4.01	274	16:19	216
	6月	13日	9:35 -	11:30	286-334	中潮	8:23	343	21:52	348	2:54	276	15:10	215
	7月	10日	13:55 -	15:15	186-201	中潮	6:56	352	20:20	348	1:18	251	13:38	185
	8月	13日	13:30 -	14:00	295-302	小潮	10:17	341	21:47	360	3.58	240	15:35	284
	9月	1日	8:15 -	9:40	218-244	中潮	3:28	328	17:13	348	10:19	211	22:43	266
		10日	14:30 -	16:00	268-279	小潮	9:10	353	20:37	357	2:47	209	14:35	267
	10月	1日	8:50 -	10:20	222-230	中潮	4.03	339	16:45	359	10:11	219	22:33	238
		12日	9:35 -	11:20	273-312	小潮	13.34	328	5 <u>2</u> 3	<u>24</u>	5:49	222	19:30	298
		18日	11:20 -	14:00	233-247	大潮	5:48	385	17:25	382	11.44	230	-	120
	11月	6日	13:00 -	14:00	262-263	中潮	8:18	363	19:11	353	1.28	164	13:36	260
		23 🗄	12:50 -	14:45	271-295	小潮	10:10	329	21:08	311	2.54	205	15:37	269
	12月	18日	12:00 -	13:20	256-264	中潮	7:31	361	18:23	353	0:49	172	13:10	254

Table 3. 英虞湾におけるGambierdiscus sp.の季節消長調査日時及び潮の干満.

潮のデータは気象庁(http://www.jma.go.jp/jma/)より引用.

潮位は観測基準面よりの値である.

Table 3. つづき.

			調査時間中の っぽん しょうしょう いっぽう しょうしょう しょうしょう いんしょう いっぽう しゅうしょう いっぽう しゅうしょう しゅうしょう いっぽう しゅうしょう ゆうしょう しゅうしょう ゆうしょう しゅうしょう しゅうしょう しゅうしょう しゅうしょう しゅうしょう しゅうしょう しゅうしょう しゅうしょう ゆうしょう ゆうしょう しゅうしょう しゅう しゅう しゅう しゅう しゅうしょう しゅう しゅう しゅう しゅうしょう しゅうしょう しゅう しゅう しゅう しゅう しゅう しゅう しゅう しゅう しゅう しゅ	54	満潮				干潮					
241	i	調宜日明	Ŧ		潮位(cm)	7年月		潮位(cm)	時刻	潮位(cm)	時刻	潮位(cm)	時刻	潮位(cm)
2010年	1月	15日	11:10 -	12:30	232-242	大潮	6:49	330	17:37	329	0:04	150	12:14	230
	2月	4日	13:00 -	14:15	209-239	中潮	9:11	340	21:47	308	2:56	191	15:23	193
	3月	16日	11:30 -	12:25	195-205	大潮	6:29	354	18:22	352	0:02	195	12:26	193
	4月	16日	11:20 -	12:50	166-187	中潮	6:27	350	19:32	360	0:34	217	12:53	166
	5月	15日	12:15 -	13:30	153-162	大潮	6:00	348	19:21	358	0:20	239	12:38	152
	6月	12日	11:30 -	13:00	166-182	大潮	4.55	357	18:34	372	11:45	165	<u>#</u>	<u>124</u>
	7月	24日	11:30 -	12:00	223-226	中潮	4:05	366	17:48	381	11:12	221	23:29	290
	8月	23日	11:00 -	12:00	191-192	大潮	4:46	346	17.58	354	11:26	189	23:42	240
	9月	6日	11:00 -	12:00	180-204	中潮	3.37	336	16.57	359	10:13	174	22:45	242
		20日	11:30 -	12:40	235-262	中潮	3:52	339	16.52	357	10:19	223	22:43	249
	10月	1日	11:15 -	11:50	318-320	小潮	11:48	320	22:10	319	4:29	223	16:58	294
		21日	11:00 -	12:10	240-251	大潮	4.58	357	16:50	366	10:47	239	23:08	209
	11月	18日	9:55 -	11:20	256-275	中潮	3:47	331	15.35	344	9:39	256	21:58	207
	12月	20日	10:20 -	11:10	259-263	大潮	5:46	351	16:45	352	11.05	259	23:31	162
2011年	1月	17日	10:30 -	11:40	260-265	大潮	4.57	317	15.51	322	10:18	259	22:36	159
	2月	18日	10:50 -	11:40	210-226	大潮	6:03	365	17.58	358	12:20	207	-	-
	3月	19日	10:40 -	11:50	186-204	大潮	5:43	357	17:52	370	11:43	185	-	22
	4月	18日	11:00 -	12:00	168-180	大潮	5:33	374	18:34	388	11:58	168	28	<u>22</u>
	5月	16日	11:00 -	12:00	162-174	大潮	4:17	344	17:42	357	10:57	162	23:17	234
	6月	17日	11:40 -	13:00	173-193	大潮	6.03	369	19:46	376	0:37	269	12:53	173
	7月	25日	11:00 -	12:00	289-304	長潮	14:14	320	<u>2</u>	22	7:18	246	18:52	299
	8月	10日	11:30 -	12:30	242-268	若潮	2:09	341	16:49	361	9:37	219	22:13	293
	9月	9日	11:00 -	12:20	217-250	中潮	3:37	338	16.56	355	10:12	212	22:41	253
		27日	11:00 -	12:00	213-217	大潮	5:32	402	17:45	405	11:40	212	23:57	206
	10月	12日	11:20 -	12:30	231-234	大潮	5.55	370	17:48	370	11:49	231	-	=
		26日	11:20 -	12:30	213-227	大潮	523	370	17:05	372	11:17	210	23:37	157
	11月	21日	11:30 -	12:30	235-308	若潮	2:15	312	14:16	328	8:00	225	20:59	197
	12月	14日	11:50 -	13:30	246-272	中潮	8:28	348	19:31	341	1:44	158	13:58	245

潮のデータは気象庁(http://www.jma.go.jp/jma/)より引用. 潮位は観測基準面よりの値である.

	E	科	海藻名(学名)
緑藻綱(Chlorophyceae)	ミル目(Codiales)	ミル科(Codiaceae)	ナガミル(<i>Codiaceae cylindricum</i>)
			ミル(<i>C. fragile</i>)
			クロミル (<i>C. divaricatum</i>)
褐藻綱(Phaeophyceae)	アミジグサ目(Dictyotales)	アミジグサ科(Dictyotaceae)	ヘラヤハズ (<i>Dictyopteris prolifera</i>)
			ウミウチワ(Padina arborescens)
	コンブ目(Laminariales)	チガイソ科(Alariaceae)	ワカメ(Undaria pinnatifida)
		コンブ科(Laminariaceae)	サガラメ(<i>Eisenia arborea</i>)
	イシゲ目(Ishigeales)	イシゲ科(Ishigeaceae)	イシゲ (Ishige okamurae)
	ヒバマタ目(Fucales)	ホンダワラ科(Sargassaceae)	ジョロモク(Myagropsis myagroides)
			ヒジキ (Sargassum fusiforme)
			ヤツマタモク(<i>S. patens</i>)
			ウミトラノオ(<i>S. thunbergi</i> i)
紅藻綱(Rhodophyceae)	ウミゾウメン目 (Nemaliales)	ガラガラ科(Galaxauraceae)	ガラガラ(<i>Tricleocarpa cylindrica</i>)
		コナハダ科(Liagoraceae)	ヨゴレコナハダ (<i>Liagora japonica</i>)
	サンゴモ目(Corallinales)	サンゴモ科(Corallinaceae)	カニノテ(Amphiroa anceps)
			ウスカワカニノテ(A. zonata)
			ピリヒバ(<i>Corallina pilulifera</i>)
			フサカニノテ (Marginisporum aberrans)
			ヘリトリカニノテ (<i>M. crassissimum</i>)
	テングサ目(Gelidiales)	テングサ科(Gelidiaceae)	マクサ (Gelidium elegans)
			オバクサ (<i>Pterocladiella tenuis</i>)
	スギノリ目 (Gigartinales)	ムカデノリ科(Halymeniaceae)	トサカマツ (<i>Prionitis crispata</i>)
		オキツノリ科(Phyllophoraceae)	オキツノリ(Ahnfeltiopsis flabelliformis)
		ユカリ科 (Plocamiaceae Kuetzing)	ュカリ(<i>Plocamium telfairiae</i>)
	オゴノリ目 (Gracilariales)	オゴノリ科(Gracilariaceae)	シラモ(Gracilaria bursa-pastoris)
	マサゴシバリ目(Rhodymeniales)	フシツナギ科(Lomentariaceae)	フシツナギ (<i>Lomentaria catenata</i>)
	イギス目(Ceramiales)	フジマツモ科(Rhodomelaceae)	クロソゾ (Laurencia intermedia)

Table 4. 英虞湾におけるGambierdiscus sp.の季節消長調査にて採集した海藻種.

採取日	海藻名	付着密度 (cells g ^{−1})
2008/12/15	ウミトラノオ① (<i>Sargassum thunbergi</i> i)	2.15
	ウミトラノオ② (<i>S. thunbergi</i> i)	2.46
	ウミトラノオ③(<i>S. thunbergiì</i>)	0.00
	ウスカワカニノテ①(<i>Amphiroa zonata</i>)	0.92
	ウスカワカニノテ② (<i>A. zonata</i>)	0.24
	ウスカワカニノテ③ (<i>A. zonata</i>)	0.00
	ウスカワカニノテ④ (<i>A. zonata</i>)	0.21
2009/1/22	ウミウチワ① (<i>Padina arborescens</i>)	0.00
	ウミウチワ② (<i>P. arborescens</i>)	0.00
	ウミトラノオ① (<i>Sargassum thunbergii</i>)	0.00
	ウミトラノオ② (<i>S. thunbergii</i>)	0.00
	ウスカワカニノテ①(<i>Amphiroa zonata</i>)	0.37
	ウスカワカニノテ② (A. zonata)	0.39
2009/2/26	ウミウチワ① (<i>Padina arborescens</i>)	0.00
	ウミウチワ② (<i>P. arborescens</i>)	0.00
	ウミトラノオ① (<i>Sargassum thunbergii</i>)	0.00
	ウミトラノオ② (<i>S. thunbergii</i>)	0.00
	ウスカワカニノテ① (<i>Amphiroa zonata</i>)	0.15
	ウスカワカニノテ②(A. zonata)	0.00
	ウスカワカニノテ③ (<i>A. zonata</i>)	0.00
2009/3/17	ウミトラノオ① (Sargassum thunbergii)	0.00
	ウミトラノオ② (<i>S. thunbergi</i> i)	0.00
2009/5/16	ウミトラノオ① (Sargassum thunbergii)	0.00
	ウミトラノオ② (<i>S. thunbergii</i>)	0.00
	ウミトラノオ (<i>S. thunbergii</i>)・クロソゾ(<i>Laurencia intermedia</i>)	0.00
	ウスカワカニノテ①(<i>Amphiroa zonata</i>)	0.00
	ウスカワカニノテ② (<i>A. zonata</i>)	0.00
2009/6/13	ウスカワカニノテ① (<i>Amphiroa zonata</i>)	0.00
	ウスカワカニノテ② (<i>A. zonata</i>)	0.00
2009/7/10	ミル① (Codiaceae fragile)	0.13
	ミル② (<i>C. fragile</i>)	0.00
	ウスカワカニノテ① (<i>Amphiroa zonata</i>)	0.18
	ウスカワカニノテ② (<i>A. zonata</i>)	0.22
	マクサ① (Gelidium elegans)	0.00
	マクサ② (G. elegans)	0.00
2009/8/13	マクサ① (Gelidium elegans)	0.14
	マクサ② (G. elegans)	0.23
2009/9/1	ミル① (Codiaceae fragile)	4.26
	ミル② (<i>C. fragile</i>)	1.59
2009/9/10	マクサ① (Gelidium elegans)	0.56
servedetse délation	マクサ②(G. elegans)	0.26
	マクサ③ (G. elegans)	4.21

Table 5. Gambierdiscus sp.のパッチ状分布調査.

Table 6.季節消長調査においてGambierdiscus sp.が検出された海藻種.

	海藻名(学名)	細胞検出の有無
緑藻綱	ナガミル (<i>Codiaceae cylindricum</i>)	_
	ミル (<i>Codiaceae fragile</i>)	0
	クロミル (Codiaceae divaricatum)	
褐藻綱	ヘラヤハズ (Dictyopteris prolifera)	0
	ウミウチワ (<i>Padina arborescens</i>)	0
	ワカメ (Undaria pinnatifida)	
	サガラメ(<i>Eisenia arborea</i>)	0
	イシゲ (Ishige okamurae)	0
	ジョロモク(Myagropsis myagroides)	0
	ヒジキ (Sargassum fusiforme)	—
	ヤツマタモク(Sargassum patens)	0
	ウミトラノオ (Sargassum thunbergii)	0
紅藻綱	ガラガラ (<i>Tricleocarpa cylindrica</i>)	0
	ヨゴレコナハダ (<i>Liagora japonica</i>)	
	カニノテ (Amphiroa anceps)	
	ウスカワカニノテ (Amphiroa zonata)	0
	ピリヒバ (Corallina pilulifera)	0
	フサカニノテ (Marginisporum aberrans)	100
	ヘリトリカニノテ (Marginisporum crassissimum)	
	マクサ (Gelidium elegans)	0
	オバクサ (Pterocladiella tenuis)	0
	トサカマツ(Prionitis crispata)	5
	オキツノリ(Ahnfeltiopsis flabelliformis)	-
	ユカリ (<i>Plocamium telfairiae</i>)	0
	シラモ (Gracilaria bursa-pastoris)	
	フシツナギ(Lomentaria catenata)	<u></u>
	クロソゾ (Laurencia intermedia)	-

O:細胞が検出された海藻.

-:細胞が検出されなかった海藻.

海域	最大付着密度(cells g ⁻¹)	参考文献
ハワイ	823	Shimizu et al. 1982
プエル・トリコ Virgin諸島	75,793	Carlson & Tindall 1985
オーストラリア Queensland	2,180	Gillespie et al. 1985
オーストラリア Heron島	250	Heil et al. 1998
フロリダ	8191	Bomber et al. 1989
インド洋 Reunion島	455	Turquet et al. 1998
フランス領ポリネシア タヒチ	10,880	Chinain et al. 1999
モザンビーク海峡 Mayotte島	60,463	Turquet et al. 2001
タンザニア Unguja島	880	Lugomela 2006
フランス領ポリネシア ガンビエ諸島	5,521,000	Yasumoto et al. 1980
沖縄 慶良間諸島	51	Koike et al. 1991
沖縄 名護市備瀬崎	10.4	石川私信
三重県 英虞湾 浜島	31.9	本研究

Table 7. 世界のGambierdiscus属の最大付着密度.

調査日時		調査	地点	緯度経度
2009年 9月 1	10日	三重県	浜島	34°17.26'N、136°45.57'E
1	11日		五力所湾	34°19.33'N、136°39.62'E
			紀伊長島	34°11.81' N、136°31.64' E
			尾鷲	34°07.35'N、136°16.95'E
			熊野	33° 53.96' N、136° 08.30' E
1	12日	和歌山県	新宮	33°41.12'N、135°59.32'E
			潮岬	33°26.46'N、135°45.96'E
			すさみ	33° 32.56' N、135° 29.41' E
1	13日		白浜	33° 37.53' N、135° 23.82' E
			日の岬	33° 53.37' N、135° 04.69' E
2010年 10月	2日	三重県	志摩	34°14.58'N、136°50.43'E
			相差	34°23.14'N、136°54.51'E
			鳥羽	34° 27.89' N、136° 54.04' E

Table 8. 紀伊半島沿岸におけるGambierdiscus属の水平分布調査地点.

糸岡	目	科	海藻名(学名)
- 緑藻綱(Chlorophyœae)	シオグサ目(Cladophorales)	シオグサ科(Cladophoraœae)	チャシオグサ (Cladophora wrightiana)
	ミル目(Codiales)	ミル科(Codiaceae)	ミル (Codiaceae fragile)
褐藻綱(Phaeophyceae)	アミジグサ目(Dictyotales)	アミジグサ科(Dictyotaceae)	ヘラヤハズ (<i>Dictyopteris prolifera</i>)
			シワヤハズ (D. undulata)
			ウミウチワ (<i>Padina arborescens</i>)
			フクリンアミジ (Ruglopteryx okamurae)
			シマオオギ (Zonaria diesinglana)
	コンブ目(Laminariales)	コンブ科(Laminariaceae)	サガラメ(<i>Eisenia arborea</i>)
	ヒバマタ目(Fucales)	ホンダワラ科(Sargassaceae)	ジョロモク(Myagropsis myagroides)
			インモク(Sargassum hemiphyllum)
			トゲモク(<i>S. micracanthum</i>)
			ヤツマタモク(<i>S. patens</i>)
			ウミトラノオ(S. thunbergil)
紅藻綱(Rhodophyceae)	サンゴモ目(Corallinales)	サンゴモ科(Corallinaœae)	カニノテ(Amphiroa anceps)
			ウスカワカニノテ (<i>A. zonata</i>)
			ピリヒバ(<i>Corallina pilulifera</i>)
			フサカニノテ (Marginisporum aberrans)
	テングサ 目(Gelidiales)	テングサ科(Gelidiaceae)	マクサ (Gelidium elegans)
			オバクサ (<i>Pterocladiella tenuis</i>)
	スギノリ目(Gigartinales)	ムカデノリ科(Halymeniaœae)	キントキ (Grateloupia angusta)
			マタボウ (<i>Polyopes polyideoides</i>)
			トサカマツ(<i>Prionitis crispata</i>)
		イバラノリ科(Hypneaceae)	イバラノリ(Hypnea asiatica)
		ツカサノリ科(Kallymeniaceae)	ホソバノトサカモドキ (<i>Callophyllis japonica</i>)
		オキツノリ科(Phyllophoraœae)	オキツノリ(<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>)
			ハリガネ (<i>A. paradoxa</i>)
	マサゴシバリ目 (Rhodymeniales)	ワツナギソウ科(Champiaceae)	ワッナギソウ (<i>Champia parvula</i>)

Table 9. Gambierdiscus属の紀伊半島水平分布調査において採集した海藻種.

新聞	目	科	海藻名(学名)
褐藻綱(Phaeophyceae)	アミジグサ目 (Dictyotales)	アミジグサ 科(Dictyotaceae)	フタエオオギ(Distromium decumbens)
			ウミウチワ(Padina arborescens)
紅藻綱(Rhodophyceae)	サンゴモ目(Corallinales)	サンゴモ科(Corallinaceae)	カニノテ (Amphiroa anastomosans)
			ウスカワカニノテ(A. zonata)
			ピリヒバ(Corallina pilulifera)
			ヘリトリカニノテ (Marginisporum crassissimum)
	テングサ目(Gelidiales)	テングサ科(Gelidiaceae)	マクサ (Gelidium elegans)

1	Table 10	公古公本	田本にセい	て「「生」た	~ 流 蕰 插
	lable TC	,如但刀叩	河且にのい	し休未し/	_/毋 沫 作生.



Fig. 1. 日本各地でのシガテラ発生地域[野口(2007)の表をまとめた]. 番号はTable 1 の中毒事例と対応.



Fig. 2-1. 紀伊半島沿岸(和歌山県すさみ町)において釣獲された魚 (イシガキダイ)を原因としてシガテラ発生を報告した新聞記事. (2008年4月12日 讀賣新聞)



Fig. 2-2. 紀伊半島沿岸(三重県南伊勢町)において釣獲された魚 (イシガキダイ)を原因としてシガテラ発生を報告した新聞記事. (2008年8月29日 中日新聞)



Fig. 3. 英虞湾湾口部におけるGambierdiscus sp.の調査採集地点.



Fig. 4-1. 三重県英虞湾湾口部浜島にて検出された Gambierdisus属細胞の光学顕微鏡写真(通常光下). A:細胞上面(上殻)、B:細胞腹面 (スケールバーは20 μm)





Fig. 4-2. 三重県英虞湾湾口部浜島にて検出された Gambierdisus属細胞の光学顕微鏡写真(UV励起光下). A:細胞上面(上殻)、B:細胞腹面 (スケールバーは20 μm)


Fig. 10. A dichotomous tree detailing the morphometrics (cell size, shape and plate structure) used to distinguish the various Gambierdiscus species.

Fig. 5. 形態学的特徴(細胞サイズ、形、鎧板の構造)に基づいた Gambierdiscus属の同定のための検索図(Litaker et al. 2009).





Fig. 7-1. rDNA SSUの配列をもとにしたGambierdiscus属の分子系統樹(NJ法).



Fig. 7-2. rDNA SSUの配列をもとにした Gambierdiscus 属の分子系統樹 (NJ法).

Fig. 7-1.におけるG. Ruetzleri、G. yasumotoiを除くGambierdiscus属についての拡大部分.

Type 1(□)とType 2(□)に関してはKuno et al. (2010)によって分けられたGambierdiscus sp.のゲノタイプ (genotype).



Fig. 8. 水温10℃下の生残実験における英虞湾産Gambierdiscus sp.細胞の生死判定手順. 細胞の外見から明らかな生死判定ができないものについては細胞を25℃に移して培養を行い、 その増殖あるいは動作の有無を確認した.



Fig. 9. 各水温における英虞湾産Gambierdiscus sp.の増殖速度. 縦棒は標準誤差を示す.



Fig. 10. 各塩分における英虞湾産Gambierdiscus sp.の増殖速度. 縦棒は標準誤差を示す.



Fig. 11. 各光強度における英虞湾産Gambierdiscus sp.の増殖速度. 縦棒は標準誤差を示す.



Fig. 12. 英虞湾産Gambierdiscus sp.の10℃における生残率の継時変化. 縦棒は標準誤差を示す.





Fig. 13. 英虞湾浜島における季節消長調査地点. A:陸側からの様子 B:海側からの様子



Fig. 14. 英虞湾の季節消長調査地点における藻場.



Fig. 15. 英虞湾における季節消長調査の海藻採集風景.





Fig. 16. 英虞湾におけるGambierdiscus sp.の季節消長調査において 採集した基本海藻の5種.

- A:緑藻鋼ミル目ミル(Codium fragile)
- B:褐藻綱アミジグサ目ウミウチワ(Padina arborescens)
- C:ヒバマタ目ウミトラノオ(Sargassum thunbergii)
- D: 紅藻綱サンゴモ目ウスカワカニノテ(Amphiroa zonata)
- E:テングサ目マクサ(Gelidium elegans)

マクサの写真は藻類学研究室ホームページ http://soruipc2.bio.mie-u.ac.jp/sourui_photo/rhodo/makusa.htmlより引用



Fig. 17. 英虞湾におけるGambierdiscus sp.の季節消長調査の海藻試料処理手順.









Fig. 21. 英虞湾におけるGambierdiscus sp.のそれぞれの海藻に対する 各月の付着密度.

〇の中の数字は同種の海藻種における藻体番号である. N.D.は検出限界以下を示す.



Fig. 21. つづき.



1: ナガミル	7:サガラメ	13:ガラガラ	19: ヘリトリカニノテ	25:シラモ
2:ミル	8:イシゲ	14:ヨゴレコナハダ	20:マクサ	26:フシツナギ
3: クロミル	9:ジョロモク	15 :カニノテ	21 :オバクサ	27: クロソゾ
4:ヘラヤハズ	10:ヒジキ	16:ウスカワカニノテ	22:トサカマツ	
5: ウミウチワ	11: ヤツマタモク	17:ピリヒバ	23:オキツノリ	
6: ワカメ	12:ウミトラノオ	18: フサカニノテ	24: ユカリ	

Fig. 21. つづき.

N.D.





Fig. 23. 英虞湾浜島において行った布を人工海藻にみたてた実験. 布素材:テトロン 60 %、綿 40 %.

A:人工海藻. B:海中における人工海藻実験の様子.



Fig. 24. 紀伊半島沿岸におけるGambierdiscus属の水平分布調査地点. 調査日: 2009年9月10-14日(調査地点1-10) 2010年9月2日(調査地点11-13)



Fig. 25. Gambierdiscus sp.の鉛直分布調査地点.



Fig. 26. Gambierdiscus sp.の鉛直分布調査の様子.



Fig. 27. 紀伊半島沿岸における各海藻に対するGambierdiscus属の 付着密度.

調査日:2009年9月10-14日(調査地点1-10)

2010年9月2日(調査地点11-13)

〇の中の数字は同種の海藻種における藻体番号である.

N.D.は検出限界以下を示す.



Fig. 28. 紀伊半島沿岸におけるGambierdiscus属の水平分布. 調査日:2009年9月10-14日(調査地点1-10) 2010年9月2日(調査地点11-13) N.D.は検出限界以下を示す. 縦棒は標準誤差を示す.



Fig. 29. 紀伊半島沿岸におけるGambierdiscus属の水平分布調査に おける水温.

調査日:2009年9月10-14日(調査地点1-10) 2010年9月2日(調査地点11-13)



Fig. 30. 紀伊半島沿岸におけるGambierdiscus属の水平分布調査に おける塩分.

調査日:2009年9月10-14日(調査地点1-10) 2010年9月2日(調査地点11-13)





平均付着密度(cells g-1)

Fig. 32. 鉛直分布調査における各水深の平均付着密度.

横棒は標準誤差を示す.



Fig. 33. 英虞湾湾口部の鉛直分布調査点における水温.



Fig. 34. 英虞湾湾口部の鉛直分布調査点における塩分.