

原 著

広島湾海域における麻痺性貝毒原因プランクトン *Alexandrium catenella*の毒組成

高田久美代, 山田 圭一, 小川 博美

Paralytic Shellfish Toxin Composition of *Alexandrium catenella* in Hiroshima Bay Area

KUMIYO TAKATA, KEIICHI YAMADA and HIROMI OGAWA

(Received Oct.30, 2000)

Paralytic Shellfish Toxin (PST) contents and compositions of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* isolated from the seawater in Kure Bay and Kaita Bay in 1999 were investigated by high performance liquid chromatography (HPLC).

The toxin profiles of two isolates from Kure Bay and Kaita Bay included C2 (44.2mol% and 46.8 mol%, respectively) and GTX4 (30.1mol% and 34.2mol%, respectively) as major components, and C1, GTX1, GTX2, GTX3 as minor components. The isolate from Kure Bay included neoSTX (10.2mol%), but that from Kaita Bay did not include it. The toxin contents of two isolates were 17.2fmol/cell and 6.80fmol/cell, respectively.

Clonal isolates of *A. catenella* from Kure Bay and Kaita Bay were also subjected to toxin analysis by HPLC. The toxin profile of these clonal isolates revealed a similar pattern in each area. The toxin contents of two clonal isolates ranged 7.74-15.0fmol/cell, 7.90-11.8fmol/cell, respectively.

These results suggest that *A. catenella* in Hiroshima Bay area should be carefully monitored to prevent a Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) incident.

Keywords: Paralytic shellfish toxin (PST), *Alexandrium catenella*, toxin composition, toxin content, HPLC

はじめに

麻痺性貝毒は*Alexandrium*属や*Gymnodinium catenatum*など数種の有毒渦鞭毛藻が産生する強力な神経毒であり, これを捕食した二枚貝に移行, 蓄積されるため, 水産業に大きな被害を及ぼすとともに, 食品衛生上大きな問題となっている。我が国では従来, 北海道や東北地方を中心に貝類の毒化が起こっていたが, 近年は, これまで発生していなかった西日本や九州地方において毒化がみられるようになり, 多発化, 広域化する傾向にある[1].

我が国における麻痺性貝毒による貝類の毒化の主な原因種は*Alexandrium tamarense*, *A. catenella*, *G. catenatum*の3種である。一般的には, 北日本海域では*A. tamarense*, 西日本海域では*A. catenella*が主として貝類を毒化させているが, 両者の分布が重複している海域もある[2]. また, 1996年以降は, 九州地方で*G. catenatum*による二枚貝の毒化が相次いでいる[3, 4].

広島湾及びその周辺海域では, 1992年以降毎年*A.*

*tamarense*が高密度に出現し, カキ, アサリなど二枚貝の毒化が続いてきた[5, 6]. ところが, 1999年は*A. tamarense*の出現数が少なく, カキ, アサリ等の二枚貝の毒力は規制値(4MU/g)を超えなかったが, 5月下旬からは呉湾, 海田湾などの広島湾海域で例年より高密度の*A. catenella*の出現が確認された。*A. catenella*は仙崎湾, 徳山湾(山口県)など他県の海域では麻痺性貝毒を産生することが報告されている[7-9]が, 本県の海域においては麻痺性貝毒の産生能も毒組成も確認されていない。

そこで, 本研究では呉湾と海田湾の*A. catenella*の麻痺性貝毒量と毒成分を分析し, 両海域に出現した*A. catenella*が麻痺性貝毒を産生することを確認するとともに, その毒組成を明らかにしたので報告する。

材料と方法

1. *A. catenella*の分離と培養

1999年5月と6月に呉湾と海田湾の海水からそれぞれ分離され, 県水産試験場において培養された*A. catenella*

の培養株を用いた。それぞれの培養株をACKU, ACKAとした。採水地点をFig. 1に示した。また, *A. catenella*の栄養細胞を1細胞ずつ分離してACKUから3株, ACKAから4株のクローン株を得て, それぞれACKU1~3, ACKA1~4とした。これを20℃, 約100 μ Em²/s, 14h明期, 10h暗期の条件下で培養した。培地はProvasoliら[10]のES培地を使用した。

2. *A. catenella*の毒量, 毒成分の分析

ACKUとACKAについて, 細胞の対数増殖期に培養液を分取し, *A. catenella*細胞を顕微鏡下で計測して細胞密度を求めた。次に, 培養液40mLを遠心分離(3,000rpm, 10min, 20℃)し, 沈査に0.05M酢酸2mLを加えて, 氷冷下超音波で細胞を破碎した。顕微鏡下で細胞の破碎を確認した後, 再び遠心分離(3,000rpm, 10min, 20℃)して上清を分取した。得られた上清を限外ろ過膜(UltrafreeC3CC, Millipore)でろ過した後, HPLC蛍光分析法[11]で毒量と毒成分を分析した。なお, カラムはInertsil ODS2 (4.6mm id \times 150mm; GL Science Inc.)を用いた。毒成分としてゴニオトキシン(GTX)1, GTX2, GTX3, GTX4, epiGTX8(C1), GTX8(C2), ネオサキソトキシン(neoSTX), サキソトキシン(STX)の8成分の分析を行った。クローン株ACKU1~3, ACKA1~4については, 細胞の対数増殖期にあたる16日目に培養液を分取し, 以下, ACKU, ACKAと同様の操作を行った。

HPLC分析の麻痺性貝毒標準品GTX1~4, C1, C2, neoSTXは(社)日本水産資源保護協会から配布されたものを, STXはCarbiochem社の製品を用いた。

結果及び考察

1. 培養株の毒量

呉湾と海田湾の海水から分離培養した*A. catenella*の培養株ACKU, ACKAの1細胞当たりの毒量は, それぞれ

17.2fmol/cell (1.87 \times 10⁻⁵MU/cell), 6.80fmol/cell (6.55 \times 10⁻⁶MU/cell)であった。

*Alexandrium*属の産生する麻痺性貝毒の量は培養条件, 増殖段階, 発生海域などによって異なることが報告されている[8, 12, 13, 14]。Kimら[8]は大船渡湾(岩手県), 田辺湾(和歌山県)で採取した*A. catenella*のシストから発芽させた培養細胞と, 瀬戸内海の海水から分離した培養細胞についてそれぞれ毒量を分析し, 大船渡湾の分離培養株は20.7~58.5fmol/cell, 田辺湾, 瀬戸内海の分離培養株は12.6~37.8fmol/cellであり, 大船渡湾の*A. catenella*の毒量が田辺湾や瀬戸内海のよりも, 約2倍高いと報告している。また, 坂本ら[9]は徳山湾(山口県)で採取した海水から分離した*A. catenella*の培養株の毒量は2.85fmol/cell(1.80 \times 10⁻⁶MU/cell), 天然細胞のそれは31.1fmol/cell(1.66 \times 10⁻⁵MU/cell)と報告している。本研究の結果を, これらの報告と比較すると, 1細胞当たりの毒量は徳山湾よりわずかに高かったが, その他の海域の結果より低い値であった。

また, *A. catenella*の1細胞当たりの毒量は*A. tamarense*に比較して少ないと言われている[15]。水田ら[16]は, 1993, 1994年の呉湾の*A. tamarense*の培養株の1細胞当たりの毒量をそれぞれ49.2, 62.1fmol/cell, 坂本ら[17]は, 1996年の呉湾の*A. tamarense*の培養株の毒量を24.1~106fmol/cellと報告している。本研究の*A. catenella*の毒量は, これらと比較すると約1/2~1/8であり, *A. catenella*の毒量は*A. tamarense*のそれよりも少ないことが確認された。

2. 培養株の毒組成

呉湾と海田湾の*A. catenella*の分離培養株の毒組成の結果をFig. 2に示した。この時の細胞密度はそれぞれ5,300cells/ml, 5,800cells/mlであった。呉湾の培養株は弱毒成分であるN-sulfocarbamoyl toxin C2と強毒成分の carbamate toxin GTX4がそれぞれ44.2, 30.1mol%を占め

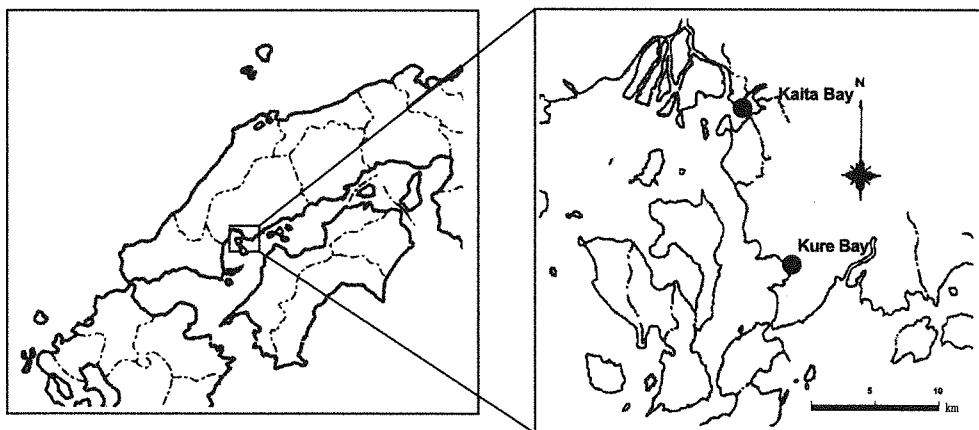


Fig.1. Map of the sampling stations

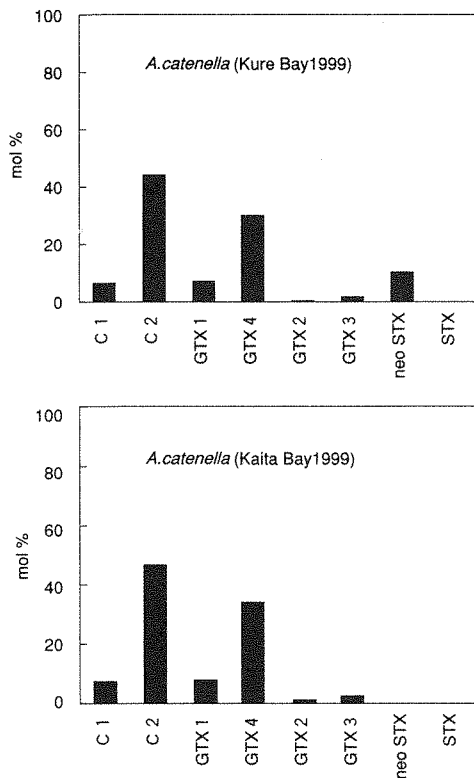


Fig.2. Relative abundance of each toxin (mol%) in *Alexandrium catenella* isolates from Kure Bay and Kaita Bay

て主要成分をなし、次いでneoSTXが10.2mol%であった。GTX1, GTX2, GTX3は0.3~7.2mol%, C1は6.4mol%で低成分をなしていた。海田湾の培養株も同じようにC2, GTX4がそれぞれ46.8, 34.2mol%を占めて主要成分を成し、GTX1, GTX2, GTX3は1.2~7.9mol%, C1は7.4mol%含まれていた。しかし、neoSTXは検出されなかった。また、いずれの培養株からもSTXは検出されなかった。

*Alexandrium*属の生産する麻痺性貝毒の毒組成は、一定の培養条件下では、同じ培養株において比較的安定であることが知られている[12, 13, 18]。また、同じ種であっても発生海域によって異なる場合のあることも報告されている[8, 19, 20, 21]。Kimら[8]は、田辺湾と瀬戸内海の*A. catenella*の培養株は弱毒成分N-sulfocarbamoyl toxins(C1, C2, C4, GTX5, GTX6)を79~95mol%含んで主要成分をなし、GTX1+GTX4を低成分として含むこと、それに対して大船渡湾の*A. catenella*の培養株は強毒成分carbamate toxinのneoSTXを主要成分として含み、GTX1, GTX4は含まないことを報告している。この違いは、大船渡湾は親潮に属し、田辺湾、瀬戸内海は黒潮に属していることと、藻類の毒組成が遺伝的に安定していることから、同じ種であってもそれぞれの海域によって、その海域固有の毒組成をもった固体群が作り出されることによるものであろうと推論している。また、

坂本ら[9]は徳山湾で採取した海水から分離した*A. catenella*の培養株はC2とGTX4をそれぞれ63.9mol%, 22.1mol%主要成分として含み、C1, C4, GTX1を低成分として3.2~6.0mol%含むことを報告している。

本研究に供した呉湾と海田湾の培養株は、いずれも強毒成分のneoSTXを主要成分とする大船渡湾の培養株とは異なり、弱毒成分のN-sulfocarbamoyl toxins(C群, GTX5, GTX6)を主要成分とする田辺湾、瀬戸内海の培養株に近い毒組成のパターンを示した。これは呉湾、海田湾において、黒潮型の毒組成をもつ個体群が作り出されていることを示している。また、呉湾、海田湾の培養株と徳山湾の培養株を比較すると、いずれの株もC2とGTX4を主要成分として含むよく似た毒組成を示している。このことは、地理的に田辺湾などよりもさらに近い、徳山湾の培養株とより類似した毒組成を持つ個体群が作り出されていることを示している。

また、呉湾の培養株ACKUはneoSTXを含んでいるが、海田湾の培養株ACKAはこれを含まない。呉湾と海田湾は地理的には約15kmしか離れていないが、それぞれの湾内で固有の固体群が形成された可能性があり、潮流の状況調査も含めて引き続き追跡調査を行う必要がある。

水田ら[16]は1993, 1994年の呉湾の*A. tamarense*の毒組成を明らかにしている。今回の呉湾の*A. catenella*の毒組成と比較すると、弱毒成分であるN-sulfocarbamoyl toxin C2を主要成分として、C1, GTX1, GTX2, GTX3を低成分として含むこと、またneoSTXを数mol%含む点では両種はよく似たパターンを示している。しかし、*A. tamarense*がC2を57.2~79.2mol%, GTX4を15.1~31.6mol%含むのに対して、*A. catenella*はそれぞれ44.2mol%, 30.1mol%含み、C2の組成は*A. tamarense*より約20%低く、GTX4の組成は約10%高い値であった。Kimら[8]は、大船渡湾の*A. tamarense*と*A. catenella*の毒組成が大きく異なることを報告している。本研究では、その差異は小さいものの、同じ海域でも種によってその毒組成が異なることが示された。

2. クローン培養株の毒量と毒組成

ACKU, ACKAそれぞれの培養株から1細胞ずつを分離して得たクローン培養株ACKU1~3とACKA1~4の毒量と毒組成の結果を、それぞれTable 1及びFig 3, 4に示した。この時の細胞密度はそれぞれ6,600~13,100cells/ml, 6,400~10,900cells/mlであった。

呉湾の培養細胞から得た3株は、C2が55.0~65.4mol%, GTX4は17.2~21.6mol%で主要成分をなしていた。低成分としてはC1, GTX1, GTX2, GTX3が0~9.0mol%, neoSTXが5.5~7.2mol%含まれていた。1細胞当たりの毒量は7.74~15.0fmol/cellで、平均値は12.4fmol/cellであった。

Table 1. Toxin contents (fmol/cell) of *Alexandrium catenella* clonal isolates from Kure Bay and Kaita Bay

Clonal culture	Kure Bay			Kaita Bay			
	ACKU1	ACKU2	ACKU3	ACKA1	ACKA2	ACKA3	ACKA4
Toxin content	7.74	14.6	15.0	11.8	7.90	8.40	10.4

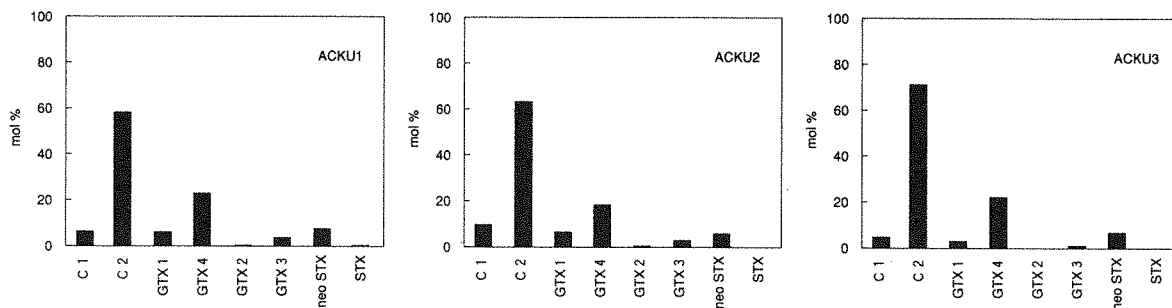


Fig.3. Relative abundance of each toxin (mol%) in clonal isolates of *Alexandrium catenella* from Kure Bay

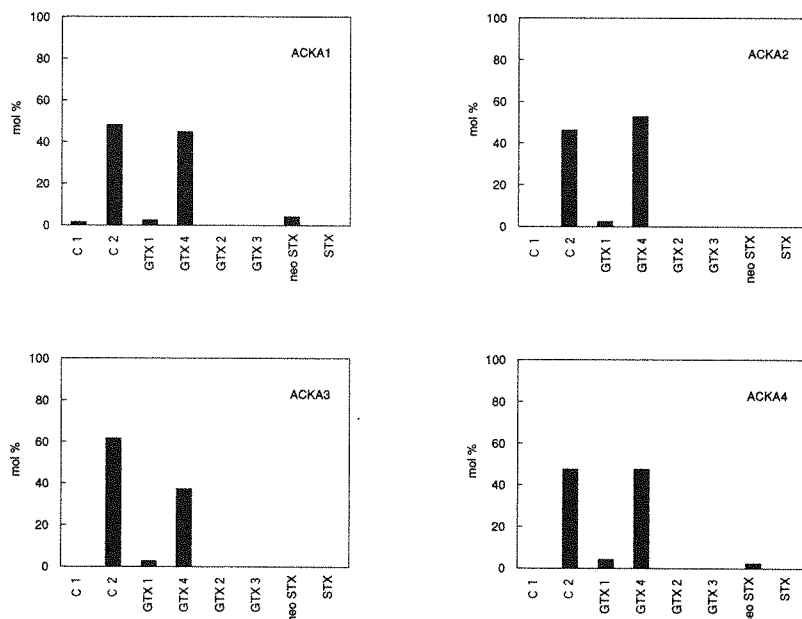


Fig.4. Relative abundance of each toxin (mol%) in clonal isolates of *Alexandrium catenella* from Kaita Bay

呉湾の3株は、もとの培養株の毒組成と比較して、C2の含有率が若干高く、GTX4とneoSTXの含有率がやや低かったが、いずれももとの培養株とよく似たパターンを示した。また、毒量はもとの培養株に比べてやや低い値を示した。

海田湾の4株では、C2が45.6~60.4mol%, GTX4は36.7~51.5mol%で主要成分をなしていた。低成分としてはC1, GTX1, GTX3を0~4.4mol%含んでいた。neoSTXはもとの培養株からは検出されなかったが、クローン株では2株にそれぞれ1.9, 3.9mol%と若干量含まれていた。1細胞あたりの毒量は7.90~11.8fmol/cellで、平均値は9.62fmol/cellであった。海田湾の4株では、もとの培養株と比較してGTX4の含有率が若干高く、C1,

GTX1の含有率がやや低いものの、もとの培養株とよく似たパターンを示した。また、毒量はもとの培養株に比べてやや高い値であった。

このように、両海域のクローン株の毒組成は総じてもとの培養株と似た毒組成のパターンを示し、相互の株間にも大きな変動はみられなかった。

渦鞭毛藻の*Alexandrium*属では、同じ海域で発生した同じ種でも、培養株によって産生する毒組成が異なる場合があり、同じ海域内に異なる毒組成をもつ固体群が混在する可能性が示唆されている[8, 16, 17]。水田ら[16]は1993年と1994年に呉湾で発生した*A.tamarense*が2つのタイプの毒組成のパターンを示したことを報告している。また、坂本ら[17]は1996年に同じ呉湾で分離した

A. tamarense の毒成分を比較し、クローン株の毒組成は多様であり、少なくとも2つ以上の異なる毒組成をもつ固体群が混在する可能性を示唆している。今回、水田[16]、坂本[17]らとは異なる結果が得られた理由としては、本研究の対象藻体が同じ*Alexandrium*属でも*A. catenella*で種が異なることなどが考えられる。

おわりに

本県海域においては、これまで*A. catenella* の高密度の出現がなかったことから、毒量や毒組成についての知見もなく、麻痺性貝毒原因プランクトンとして注目されていなかったが、本研究において、1999年に広島湾海域に出現した*A. catenella*が毒産生能をもつことが確認され、毒組成も明らかとなった。しかし、培養細胞の毒量は天然細胞のそれに比べて低いことが報告されており[14, 22]、自然界における貝類毒化のメカニズムを明らかにするためにも、今後は、天然細胞の毒量と毒組成を把握する必要がある。

また、*A. catenella*はその適水温が16~22℃と*A. tamarense*の12~16℃に比較して高いことから、貝類の毒化期間が長期化する懸念があり、本県においては、従来の*A. tamarense*を中心とした監視体制を、*A. catenella*の発生も考慮したものに改める必要があると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な*A. catenella*を分与していただきました本県水産試験場高山晴義資源環境部長に深く感謝致します。

文 献

- [1] 宮澤啓輔(1994): 日水誌, 60, 683-684.
- [2] 福代康夫(1981): 赤潮研究会分類班資料No. 3, 水産庁研究部漁場保全課, 72.
- [3] Takatani, T., Morita, T., Anami, A., Akaeda, H., Kamiyo, Y., Tsutsumi, K., and Noguchi, T. (1998): J. Food Hyg. Soc. Japan, 39, 275-280.
- [4] Akaeda, H., Takatani, T., Anami, A., and Noguchi, T. (1998): J. Food Hyg. Soc. Japan, 39, 272-274.
- [5] 水田満里, 高田久美代, 門田達尚, 海佐裕幸(1993): 広島県保健環境センター研究報告, 1, 37-41.
- [6] Asakawa, M., Miyazawa, K., and Noguchi, T. (1993): J. Food Hyg. Soc. Japan, 34, 50-54.
- [7] Onoue, Y., Noguchi, T., Maruyama, J., Ueda, Y., Hashimoto, K., and Ikeda, T. (1981): Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 47, 1347-1350.
- [8] Kim, C.-H., Sako, Y., and Ishida, Y. (1993): Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 641-646.
- [9] 坂本節子, 長崎慶三, 松山幸彦, 小谷祐一(1999): 瀬戸水研報, 1, 55-61.
- [10] 岩崎英雄, 西澤一俊, 千原光雄編(1979): 藻類研究法, 283-285, 東京, 共立出版.
- [11] Oshima, Y. (1995): JAOAC International, 78, 528-532.
- [12] Boyer, G.L., Sullivan, J.J., Harrison, P.J., and Taylor, F. J. R. (1987): Mar. Biol., 96, 123-128.
- [13] Ogata, T., Ishimaru, T., and Kodama, M. (1987): Mar. Biol., 95, 217-220.
- [14] Oshima, Y., Bolch, C.J., and Hallegraeff, G.M. (1992): Toxicon, 30, 1539-1544.
- [15] 佐子芳彦, 金昌勲, 石田祐三郎(1992): 生物と化学, 30, 726-734.
- [16] 水田満里, 山田圭一(1995): 広島県保健環境センター研究報告, 3, 37-41.
- [17] 坂本節子, 小谷祐一(1998): 南西水研報, 31, 45-52.
- [18] Kim, C.-H., Sako, Y., and Ishida, Y. (1993): Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 633-639.
- [19] Anderson, D.J., Kulis, D.M., Doucette, G.J., Gallagher, J.C., and Balech, E. (1994): Mar. Biol., 120, 467-478.
- [20] Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirotsu, M., and Yasumoto, T. (1990): Toxic Marine phytoplankton, Elsevier, Amsterdam, 391-396.
- [21] Cembella, A.D., Sullivan, J.J., Boyer, G.L., Taylor, F.J.R., and Anderson, R.J. (1987): Biochem. Syst. Ecol., 15, 171-186.
- [22] Kodama, M., Fukuyo, Y., Ogata, T., Igarashi, T., Kamiyama, H., and Matsuura, F. (1982): Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 48, 567-571.

