

有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* のバッチ培養法による 増殖速度の簡易測定と海域での適用

畑 直垂・藤原正嗣・増田 健・辻 将治・中西麻希・西村昭史

Simplified in-vitro Batch Culture Method for Measuring Growth Rate of the Noxious
Dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and the Application in Coastal Waters

Naotsugu HATA, Masatsugu FUJIWARA, Takeshi MASUDA, Masaharu TSUJI,
Maki NAKANISHI and Akifumi NISHIMURA

キーワード：*Heterocapsa circularisquama*, 赤潮, 増殖速度, バッチ培養

For the purpose of establishing a convenient method for a short term prediction of occurrence and disappearance of the noxious dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* red tide, growth rates, measured from changes in the cell densities of the phytoplankton collected from a field site in Ago Bay and cultured under the simulated conditions with the natural environments using a simplified in vitro batch culture method, were compared with those of the natural population measured in situ. To begin with the study, we investigated adequate measurement conditions, with respect to the number of times to count the cell number per culture bottle and the minimum cell number and bottle number required for a measurement, to obtain accurate growth rate. The cell counting was done with the direct microscope technique. From the investigations, it was determined that it was necessary for accurate measurement with coefficient of variation less than 30% to count the cell number three times per culture bottle, and cell number in each measurement should be over 70. Moreover, over 1 or 2 bottles were necessary to detect a difference of 0.2 divisions/day based on the standard deviations of growth rates measured with 5 culture bottles. Growth rates measured by the simplified in vitro batch culture method were similar with those measured by the field culture method, in which culture bottles were suspended from a raft in Ago Bay, indicating the batch culture method can be used to estimate an actual growth rate of the natural population in the sea. Growth rates of *H. circularisquama* and *Karenia mikimotoi* were monitored during the blooming seasons of *H. circularisquama* in 2004, 2005 and 2008 and *K. mikimotoi* in 2006 for reference, respectively, in Ago Bay, using the in vitro batch culture method. The growth rate increased during the increasing phase of cell density of the planktons and decreased during the decreasing phase, suggesting that the monitoring of growth rate measured with the simplified in vitro batch culture can be a useful tool for the short term prediction of red tides of *H. circularisquama* and other planktons.

貝類を特異的にへい死させる渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* は、西日本各地の沿岸海域で赤潮を形成し、貝類養殖産業に甚大な被害を与えている（山本・田中 1990, 吉田・宮本 1995, 松山ほか 1997, 江藤ほか 1998, 尊田・木村 2001）。三重県の英虞湾では1992年に本種による赤潮が初めて発生し、養殖アコヤガイの大量へい死を招いたことから（松山ほか 1995）、当海域の真珠養殖業は約30億円に及ぶ甚大な経済的損失

を被った（本城 1998）。以来、英虞湾では本種による赤潮が毎年のように発生し（中西ほか 1999）、アコヤガイのへい死を引き起こしている（玉井 1999）。このため、英虞湾では本種の発生状況の調査が精力的に実施され、初期出現域が把握されるとともに（中西ほか 1999）、モニタリング体制が整備されたことによって（中西 2002）、近年は本種の出現を早期に捉えることが可能になった。これらの知見やモニタリング活動に加えて、個体群の発

達・衰退の動向、すなわち短期的な赤潮の消長を予測できれば、漁業被害のさらなる軽減に繋がることが期待できる。

これまでに英虞湾では、*H. circularisquama*による赤潮の消長の予測を目的として、本種の出現状況と海洋環境のモニタリングが長年に渡って実施され、当海域における本種赤潮の発生機構に関する多くの知見が蓄積された(三重県水産技術センター 1995 - 1999, 中西ほか 1999, 三重県ほか 2000 - 2001, 三重県ほか 2002 - 2004, 松山 2003, 三重県科学技術振興センター水産研究部 2005 - 2008)。また、物理・化学的な環境データを基にしたモデル計算(三重県ほか 2004)やニューラルネットワーク(Nagamori *et al.* 2001, 三重県ほか 2004)による赤潮予察技術の開発が行われた。しかし、多くの環境要因が関与する赤潮の発生機構は複雑であり、不確定な変動要因も多いため、物理・化学的要素に基づいた赤潮予察技術の実用化は困難な状況にある。

赤潮予察技術については、物理・化学的要素のほか、生物学的要素に基づいた手法についても研究が進められている。現場海域におけるプランクトン個体群(以下、現場個体群)の増殖速度は、種々の環境要因の影響を総合的に反映した結果であり、その個体群の潜在的な増殖能力を示すと考えられる。飯塚(1997)は、大村湾の*Gymnodinium mikimotoi*個体群の増殖速度を透析膜(セルロースチューブ)垂下による半開放流動系で測定し、赤潮発生の11日前から高い増殖速度が測定されたことを報告している。また、Honjo(1987)は、五ヶ所湾の*Chattonella marina*個体群の増殖速度を、定期的に単離した細胞を個別チャンバー内で培養する手法で測定し、赤潮ピークの6日前には高い増殖速度が測定されたのに対し、ピーク後には低い増殖速度が継続したことを報告している。これらの報告は、現場個体群の増殖速度が赤潮発生の予知指標となり得る可能性を示唆するものである。

海域における個体群の増殖速度は短期間で変動する可能性がある。そのため、短期的な赤潮消長予測に利用するための増殖速度の測定法は、高頻度の測定に適用可能な簡便な手法で、かつ測定に要する期間が短いことが望ましい。このことを考慮すると、飯塚の方法はセルロースチューブの垂下および回収の労力が、Honjoの方法は細胞を単離する労力や増殖速度の測定に3日間を要することなどが、高頻度の測定を実施する場合に障害となる可能性がある。これらの方法以外にも*H. circularisquama*個体群の増殖速度を測定する手法として、分裂指数(個体群中に占める分裂中の細胞の割合)を指標とした手法が検討されたが(山口 1998)、本手法では*H. circularisquama*

の細胞分裂が起こる時間帯である暗期の終了時(午前5時頃)にサンプリンを行わなければならないことが障害となり、海域への適用には至っていない。

本研究では、海域における*H. circularisquama*個体群の増殖速度を簡便に測定する手法として、*H. circularisquama*を含む現場海水を自然環境に近い条件下でバッチ培養し、培養期間中の細胞密度の変化量から増殖速度を算定する手法について検討した。本手法では、試水中の細胞数を直接計数することによって細胞密度を算定する(直接計数法)際の測定値のばらつき、バッチ培養における培養条件および培養瓶毎の増殖速度の測定値のばらつき、などが増殖速度の測定精度に影響を与える主な要因と考えられる。そこで、まず、直接計数法における細胞密度の測定条件、すなわち1試料あたりの測定回数と、測定1回あたりの細胞カウント数について検討を行った。培養条件としては、海域の筏から培養瓶を海中に垂下する現場培養法と、より簡便な方法である人工気象器内で培養する室内培養法の2つの方法を検討した。また、培養瓶毎の増殖速度のばらつき度合いを調査し、その結果に基づいて、正確な増殖速度を算定するために必要な培養瓶の本数を統計的に見積もった。上記の条件について検討したうえで、本手法を海域における*H. circularisquama*個体群の増殖速度のモニタリングに適用し、短期的な赤潮消長予測への利用の可能性について検討した。

方 法

1. バッチ培養による増殖速度測定法の検討

1) 細胞密度の測定回数と細胞カウント数の検討

Fig. 1に示す英虞湾内の立神定点において、2004～2006年に*H. circularisquama*を含む海水試料(107試料)を採取した。各試料中の細胞密度の測定は、光学顕微鏡観察による直接計数法で行った。すなわち、Sedgewick Rafter カウンティングチャンバーに試水1mlを入れ、*H. circularisquama*の細胞密度に応じて0.1～1ml分を検鏡して細胞数をカウントし、細胞密度(cells/ml)を求めた。それぞれの試料での細胞密度の測定回数は3回、5回および10回の3条件を設定し、それぞれの回数での測定による細胞密度の変動係数(coefficient of variation; CV)(%)の差違を調査した。また、細胞カウント数の大小とCV(%)との関係についても調査した。

2) 培養方法の検討

試水を現場海域の筏から海中に垂下する現場培養法と、人工気象器(日本医化機械製作所, TG 100 AD)内で培養する室内培養法の2つの手法について検討した。2005

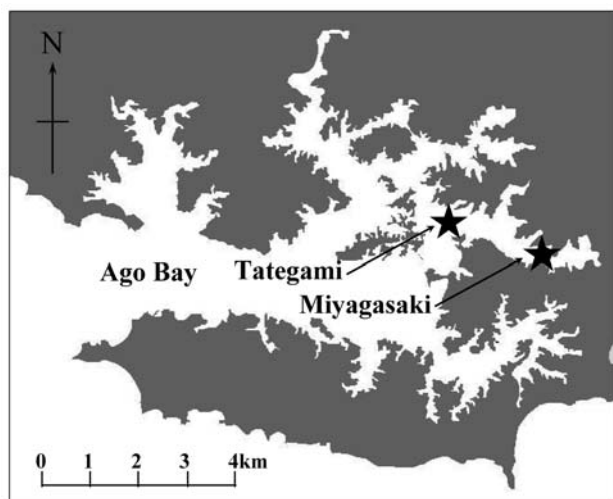


Fig. 1 Location of sampling stations for monitoring growth rate and cell density of *Heterocapsa circularisquama* in Ago Bay.

年の *H. circularisquama* の発生期間中であった7月4日～8月8日に週1回の頻度で、立神定点において午前10時頃に水深0.5m, 2m, 5mおよび底上1mの各層から採水した後、研究室に持ち帰って各層の試料の細胞密度を測定した。すべての調査日において細胞密度が最も高く、現場個体群の分布中心と考えられた5m層の海水を実験に供した。試水は、大型の動物プランクトンを除くため、目合い200 μ mのプランクトンネットで緩やかに逆濾過した。逆濾過した試水の一部は、現場培養法用として250ml容のポリカーボネイト製瓶1本に充填した後、瓶を定点の筏から5m層に垂下し、1日間培養した。残りの試水から、室内培養法用として250mlを三角フラスコ1本に入れ、温度をその日の5m層の現場水温、光強度を165 μ mol/m²/sec、1日の明暗周期を明期12時間、暗期12時間に設定した人工気象器内で1日間培養した。なお、光強度は予備調査より、立神定点における5m層付近の晴れた日の昼間の光強度を想定して設定した。現場培養法による試水と室内培養法による試水の培養前と培養後の細胞密度をそれぞれ直接計数法で測定し、次式によって増殖速度 μ （分裂回数/日；divisions/day）を算出した（飯塚 1997）。

$$\mu = k / \log 2$$

$$k = (\log N_t - \log N_0) / t$$

ここで、

μ : 増殖速度 (divisions/day)

N_0 : 培養開始時の細胞密度

N_t : t 日後の細胞密度

である。

なお、本手法で求められる増殖速度は、プランクトンの純増殖速度ではなく、200 μ m以下の微小動物プランクトン等による捕食圧を含んだ見かけの増殖速度である。

現場法と室内培養法の2つの手法で測定した増殖速度の統計的な差は、繰り返しのない二元配置分散分析 (Factor: 培養法と調査日) によって解析し、 $P < 0.05$ を有意差と判断した。

3) 培養瓶の必要本数の検討

2007年7月6日に立神定点の5m層から採水した。海水のプランクトン組成はTable 1のとおりであった。目合い200 μ mのプランクトンネットで逆濾過した海水に培養した *H. circularisquama* を接種し、高密度区として本種の細胞密度が779cells/ml、低密度区として56cells/mlの2つの試験区を設定した。各試験区の試水は500ml容のポリカーボネイト製瓶5本ずつに充填し、各瓶の *H. circularisquama* の細胞密度を測定するとともに、実験1. 2)の室内培養法と同じ条件に設定した人工気象器内にすべての瓶を静置し、1日間培養した。培養後においても、高密度区と低密度区のすべての瓶の細胞密度を測定した。なお、各瓶の細胞密度は3回ずつ測定した。低密度区の計数では1回の測定において試水1ml中の細胞数をすべてカウントしたが、高密度区の計数では1回の測定におけるカウント数が100cells以上となることを条件として細胞数をカウントする試水の量を調整して行った。

得られたデータを用いての必要な培養瓶の本数の見積もりは、高密度区と低密度区、それぞれ瓶5本における増殖速度の標準偏差 (SD) を求め、次式の両側 t 検定に

Table 1. Phytoplankton composition in sea water sample used for estimation of the number of culture bottle.

Species	Cell density (cells/ml)
Dinophyceae	
<i>Prorocentrum dentatum</i>	5
<i>Ceratium furca</i>	3
Dinophyceae (unknown)	8
Bacillariophyceae	
<i>Chaetoceros</i> spp.	1,888
<i>Skeletonema costatum</i>	25
<i>Nitzschia</i> spp.	70
Cryptophyceae	
Cryptonadales (unknown)	13
Chrysophyceae	
<i>Dictyocha fibula</i>	23

における検出力ベースの例数設計 (浜田 2006) によって行った。

$$N = 2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 SD^2 / \Delta^2 \quad (\text{デルタ})^2$$

ここで、

N : 必要な例数 (培養瓶の本数)

α : 検定の有意水準 (0.05)

β : 有意差を見逃す確立 (0.20)

$Z_{\alpha/2}$: 正規分布の上側 $\alpha/2$ %点

Z_{β} : 正規分布の上側 β %点

Δ (デルタ) : 予想される差 (増殖速度の差)

である。

なお、増殖速度の差 (Δ) は、0.05, 0.10, 0.20 および 0.50 の各値に設定し、それぞれの条件における必要な培養瓶の本数を見積もった。

2. 現場個体群の増殖速度モニタリング

H. circularisquama 赤潮が発生した 2004 年, 2005 年および 2008 年に立神定点において、本種の細胞密度および増殖速度をモニタリングし、両者の推移の対応を検討した。2006 年は *H. circularisquama* による赤潮が発生せず、*Karenia mikimotoi* が赤潮を形成したため、*K. mikimotoi* について同様のモニタリングを実施した。細胞密度の値は、水深 0.5m, 2m, 5m および底上 1m 層の試水の細胞密度から求めた水柱平均値を用いた。増殖速度の測定は、実験 1. 2) の室内培養法に準じて行い、培養本数は 2004 年と 2005 年は 1 本, 2006 年と 2008 年は 2 本とした。なお、*H. circularisquama* および *K. mikimotoi* の細胞密度が 100cells/ml 以上の場合を赤潮と仮定した。

結 果

1. バッチ培養による増殖速度測定法の検討

1) 細胞密度の測定回数と細胞カウント数の検討

測定回数 3 回, 5 回, 10 回における 1 試料あたりの細胞密度 (複数測定の平均値) と、細胞密度の測定での CV (%) との関係を図 2 に示した。CV 値は、試料の細胞密度が低い程、大きくなる傾向が認められ、この傾向は測定回数が 3 回, 5 回, 10 回の 3 条件とも同様であり、CV 値に対する測定回数の影響は認められなかった。

測定 1 回あたりの細胞カウント数 (3 回測定の平均値) と、細胞密度の測定での CV (%) との関係を図 3 に示した。CV 値は、細胞カウント数が少ない程、大きくなる傾向が認められ、カウント数が 70cells/ 回未満での CV 値は 0 ~ 100% (平均 41%) であったのに対し、カウント数が 70cells/ 回以上での CV 値は 20% 以内 (平均

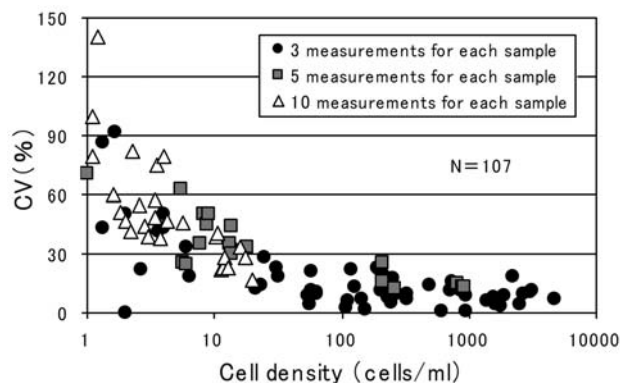


Fig. 2 Relationship between the number of measurement times and coefficient of variation (CV) of cell density.

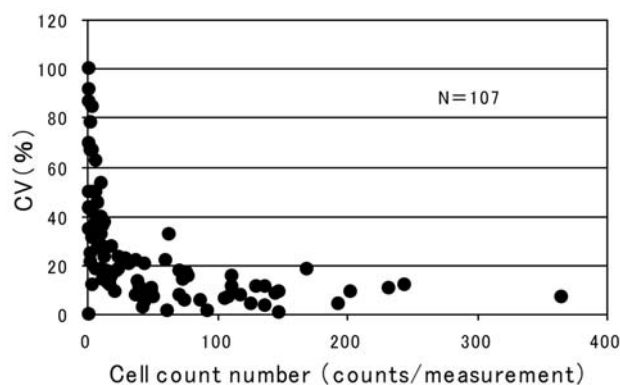


Fig. 3 Relationship between cell count numbers per measurement and coefficient of variation (CV) of cell density.

Cell count numbers and CV of cell density were calculated from 3 measurements for each sample.

9%) で安定していた。

2) 培養方法の検討

現場培養法および室内培養法で測定した *H. circularisquama* の増殖速度の推移を図 4 に示した。両手法で測定した増殖速度の推移は良く似た傾向を示し、7 月 4 日 ~ 8 月 1 日にかけては 0.0 divisions/day 前後の値で推移して大きな変化は認められなかったが、8 月 8 日には -1.0 divisions/day 以下にまで大きく低下した。

両手法による増殖速度の測定値には有意差は無かったが ($P > 0.05$), それぞれの調査日における増殖速度の測定値には有意差が認められた ($P < 0.01$)。

3) 培養瓶の必要本数の検討

高密度区および低密度区の細胞密度は、培養前から培養後にかけて共に増加し、増殖速度はそれぞれ 0.85 ± 0.07

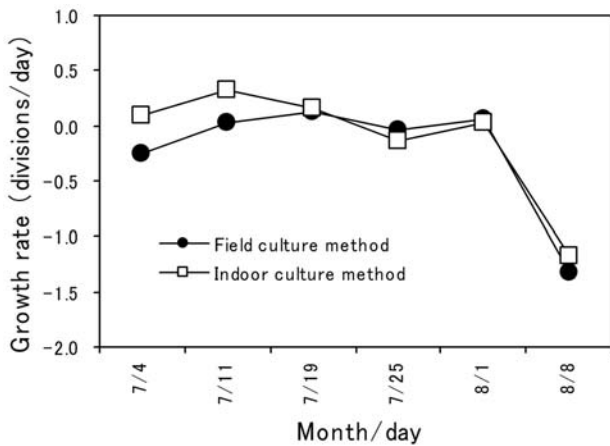


Fig. 4 Changes of growth rate of *Heterocapsa circularisquama* measured with the field culture method and the indoor culture method.

および 0.68 ± 0.05 divisions/day と算出された。両試験区で得られた増殖速度の標準偏差, $SD = 0.07$ および 0.05 を基にして, 統計的に培養瓶の必要本数を見積もって Table 2 に示した。見積もられた培養瓶の必要本数は, 検出可能な増殖速度の差を小さく設定するほど増加し, 0.50 divisions/day の差を検出するのに必要な瓶の本数はそれぞれ 0.2 本および 0.3 本以上, 0.20 divisions/day の差を検出するのに必要な瓶の本数はそれぞれ 1.0 本および 2.0 本以上と推定されたのに対し, 0.05 divisions/day の差ではそれぞれ 16.0 本および 31.4 本以上と, 0.20 divisions/day までの場合と比較して多くの本数が必要と見積もられた。

2. 現場個体群の増殖速度モニタリング

2004 年, 2005 年, 2008 年の *H. circularisquama* および 2006 年の *K. mikimotoi* の出現期間中に測定した細胞密度 (水柱平均値) と増殖速度の推移を Fig. 5 に示した。2004

年に測定した *H. circularisquama* の増殖速度は, 赤潮発生前の 8 月 2 日には -1.72 divisions/day で低い値を示していたが, 翌週 8 月 9 日の赤潮発生時には 0.20 divisions/day まで急激に増大した。その後の赤潮発生期間中も増殖速度は少しずつ増大し, 8 月 13 日の赤潮ピーク時には 0.47 divisions/day の最高値を示した。増殖速度は 8 月 16 日以降に低下傾向を示したのに対して, 細胞密度は 8 月 20 日以降にやや遅れて減少傾向を示し, 本種の発生は終息に向かった (Fig. 5A)。

2005 年に測定した *H. circularisquama* の増殖速度は, 個体群の増殖期にあたる 7 月 4 日～7 月 19 日にかけては $0.10 \sim 0.32$ divisions/day の高い値を示した。その後, 細胞密度は 7 月 25 日～8 月 1 日にかけて一旦低下したが, この時期にも増殖速度は $-0.04 \sim 0.06$ divisions/day の比較的高い値を維持していた。そして, 8 月 8 日には, 細胞密度の増加が再び確認された。一方で, 8 月 8 日の増殖速度は -1.32 divisions/day と低い値を示し, 翌週の 8 月 15 日には本種の発生は終息した (Fig. 5B)。

2008 年は *H. circularisquama* が 6 月 30 日の時点で 109 cells/ml と高密度で出現していた。その後, 7 月 7 日～7 月 22 日にかけて, 細胞密度の増加は認められなかったが, この期間の増殖速度は $-2.38 \sim -0.19$ divisions/day で, 値は低いながらも徐々に増大していた。そして, 7 月 22 日～7 月 28 日にかけて, 細胞密度が急激に増加して赤潮の形成に至り, 7 月 28 日の増殖速度は 0.54 divisions/day の最高値を示した。その後の増殖速度は大きく変動し, 8 月 11 日にかけては一旦大きく低下したが, 翌週の 8 月 18 日には再び増大し, さらに翌週の 8 月 25 日には極端に低い値を示した。細胞密度も増殖速度と良く似た変動を示し, 8 月 25 日以降, 本種の発生は終息に向かった (Fig. 5C)。

2006 年に測定した *K. mikimotoi* の増殖速度は, 個体群の増殖期にあたる 8 月 7 日および赤潮ピーク時の 8 月 10

Table 2. Estimation of the number of culture bottle necessary for detecting each amount of change of growth rate based on standard deviation (SD) of growth rate. SD was estimated from 5 culture bottles.

Amount of change of growth rate (Δ)	Number of culture bottle (N) *	
	High-density sample (SD=0.07)	Low-density sample (SD=0.05)
0.05	31.4	16.0
0.10	7.8	4.0
0.20	2.0	1.0
0.50	0.3	0.2

$$* \alpha = 0.05, \beta = 0.20, N = 2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 SD^2 / \Delta^2$$

日には、それぞれ 0.32 および 0.28 divisions/day の高い値を示していたが、8月15日以降は低下傾向を示した。細胞密度も8月15日以降に減少傾向を示し、本種の発生は終息に向かった (Fig. 5D)。

以上のように、両種の現場個体群の増殖速度は、細胞密度の推移に概ね対応し、全体としては、個体群の増殖期から赤潮盛期にかけて高くなり、赤潮盛期から衰退期にかけて低くなる傾向が認められた。ただし、増殖速度と細胞密度の推移を日を追って詳しく比較すると、2004年8月2日～8月9日や2008年8月10日～8月17日の様に、細胞密度の増加あるいは減少と同時に増殖速度も増大あるいは低下する期間、2008年7月7日～7月28日や2004年8月16日～8月20日の様に、細胞密度の増加あるいは減少に先立って増殖速度が増大あるいは低下する期間、また、2005年7月25日～8月1日の様に、細胞密度が減少したにも関わらず増殖速度が低下しない期間が認められた。

考 察

現場の海中には *H. circularisquama* 以外の多種のプランクトンが含まれるため、増殖速度算定のための細胞密度の測定は、顕微鏡観察による直接計数法によるほか

方法は無い。直接計数法は作業労力を要するため、多くの試料について計数を行うことは困難であり、測定精度と作業労力を考慮して、効率的に細胞密度の測定を行うための条件を明らかにすることが求められていた。当研究において、細胞密度の大小と測定回数が、測定された細胞密度の値の変動に及ぼす影響を調査したところ、細胞密度の CV 値は、試料の細胞密度が低い程、大きくなる傾向が認められ、この傾向は測定回数が3回、5回、10回の3条件とも同様であり、CV 値に対する測定回数の影響は認められなかった (Fig. 2)。

測定1回あたりの細胞カウント数が、測定された細胞密度の値の変動に及ぼす影響を調査したところ、カウント数が70cells/回未満では細胞密度の CV 値は0～100% (平均41%) と大きい値を示したのに対し、70cells/回以上では CV 値は20%以内 (平均9%) で安定していた (Fig. 3)。Lund *et al.* (1958) は、植物プランクトンの細胞密度の測定において、相対誤差20%以内の測定値を得るためのカウント数として100cellsを推奨している。また、Frontier (1972) は、動物プランクトンの個体数の測定において、カウント数100individualsで相対誤差31%が得られたと報告している。これらの報告と、今回得られた結果を総合して考えると、細胞密度の測定条件

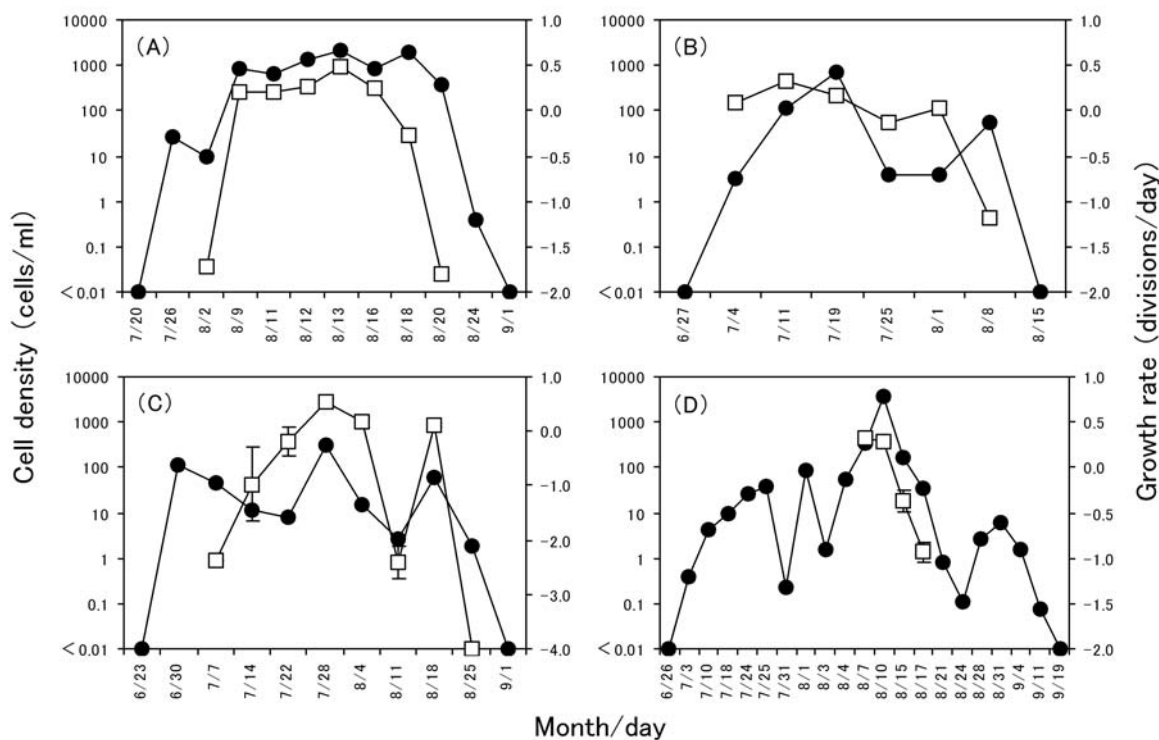


Fig. 5 Changes of cell density (●) and growth rate (□) of *Heterocapsa circularisquama* in 2004 (A), 2005 (B), 2008 (C) and *Karenia mikimotoi* in 2006 (D) in Ago Bay (marks : mean values, vertical bars : SE). Cell density refers to a mean value of measurements of 4 layers in water column.

Table 3. Adequate measurement conditions and coefficient of variation (CV) of cell density on each density level.

Cell density (cells/ml)	Measurement frequency (measurement/sample)	Cell count number (counts/measurement)	CV (%) (Mean±SD)	Number of data used for the estimate
1~4	3	all	49.7±28.4	29
5~9	3	all	40.6±22.2	9
10~19	3	all	30.4±11.8	14
20~49	3	all	19.1±5.7	6
50~99	3	all	11.1±5.3	6
100~999	3	100	9.0±4.9	10
1,000~9,999	3	100	8.4±4.4	11

は、測定値の変動幅の小ささと作業労力を考慮して、測定1回あたりの細胞カウント数は約100cellsを基本とし、測定回数は3回に設定するのが適当であろう。Table 3には、細胞密度レベル毎に設定した細胞密度の測定条件と当該条件における測定値のばらつき大きさ（予想される精度）を2004～2006年のデータから見積もって示した。この表を参考にして、精度管理を行いながら細胞密度の測定を行うことによって、一定レベルの測定精度を得ることが可能と考えられる。今後は、低密度試料における細胞密度の測定精度をより向上させるために、試料を濃縮して細胞数をカウントするなどの方法についても検討する必要がある。

現場培養法と室内培養法による *H. circularisquama* 個体群の増殖速度の推移を Fig. 4 に示した。現場培養法は、瓶の回収に労力は必要であるが、温度や光などの培養条件が自然環境に近いことが利点であり、真の増殖速度に近い値が得られ易いと考えられる。一方、室内培養法は、現場培養法と違って、船で現場海域に垂下した培養瓶を回収に行くための労力が省ける簡便性が利点であるが、本手法での培養条件、特に光条件では現場でのそれを忠実に再現しているとは言えず、現場培養法で得られる増殖速度と解離してしまう危惧があった。しかしながら、今回の研究では、両手法によって測定した増殖速度の推移はお互いに良く似た傾向を示し、有意差は認められなかった。この要因として、植物プランクトンの増殖速度が新しい環境に対応して変化するまでには時間的ラグがあると考えられており（飯塚 1997）、今回の室内培養法では培養期間を1日間と短期間に設定したことから、増殖速度に与える光環境の変化等の影響を最小限に抑えられた可能性がある。また、バッチ培養法では、培養期間が長くなるにつれて培養液中の栄養塩の減少や代謝産物

および老廃物の増加などが起こり、培養条件が変化することが問題点として指摘されているが（吉田 1987）、このことに関しても、培養期間を1日としたことから増殖速度の測定に大きな影響を及ぼさなかったと推察される。以上のことから、今回設定した室内培養法による増殖速度の測定条件（培養期間を1日間と短く設定）は、現場における *H. circularisquama* の増殖速度の測定には適当であったと思われる。

培養瓶5本における増殖速度の標準偏差（SD）から統計的に培養瓶の必要本数を見積もった結果、培養瓶16.0～31.4本以上を用いれば、0.05divisions/day程度増殖速度の変化を識別できる高い測定精度が得られると推定された（Table 2）。しかし、細胞密度の測定方法が作業労力を要する直接計数法であることを考慮すると、この様な多数の試料について計数を行うことは困難といえる。一方、0.20divisions/day程度増殖速度の変化については、培養瓶1.0～2.0本以上を用いた測定によって識別できる可能性が示唆された。培養瓶1～2本程度で測定が行えれば簡便であるが、0.20divisions/day程度増殖速度の変化を識別する測定精度で、赤潮の消長予測への利用が可能か否かが問題である。このことに関しては、今回の室内培養法で測定した *H. circularisquama* および *K. mikimotoi* の発生期間中の現場個体群の増殖速度が-4.0～0.54divisions/dayの広い変動幅で変化し、また、個体群の増殖期および衰退期には0.20divisions/dayを超える変動幅で増殖速度が短期間に変化した事例も観察されたことから（Fig. 5）、0.20divisions/day程度を識別する測定精度でも赤潮の消長予測に利用可能と推察された。

2004年、2005年および2008年の *H. circularisquama* 赤潮発生時および2006年の *K. mikimotoi* 赤潮発生時に測定した二種の現場個体群の増殖速度は、細胞密度の推移に

概ね対応し、全体としては個体群の増殖期から赤潮盛期にかけて高くなり、赤潮盛期から衰退期にかけて低くなる傾向が認められた (Fig. 5)。このことから、増殖速度をモニタリングすることによって、その時点が個体群の増殖期にあるのか、衰退期にあるのかを推測できる可能性がある。さらに増殖速度と細胞密度の変化を詳細に比較すると、2004年8月16日～8月18日の様に細胞密度の減少に先立って増殖速度が低下した期間や、2005年7月19日～8月1日の様に細胞密度が減少したにも関わらず増殖速度はほとんど低下しなかった期間、2008年7月7日～7月22日の様に細胞密度が増加していないにも関わらず、増殖速度が徐々に増大した期間が認められた。2004年は赤潮の終息を事前に把握した事例、2005年は細胞密度が再び増加する危険性を把握した事例、2008年は赤潮発生の危険性が徐々に高まっている状況を把握した事例と解釈できる。これらの結果は、室内培養法で測定した現場個体群の増殖速度が、短期的な赤潮消長予測の指標となり得る可能性を示唆するものである。増殖速度と細胞密度が同様に变化する期間も少なからず認められるため、増殖速度を先行指標とした予測には限界があるものの、細胞密度のモニタリングに加えて、現場個体群の増殖速度をモニタリングすることによって、赤潮消長過程を従来よりも的確に把握できるものと考えられた。

今回の調査において、2008年の *H. circularisquama* の増殖速度は、赤潮発生期間中の8月11日に細胞密度と共に極端に低下し、その後再び増加したことが観測されている。同一の赤潮の発生期間中に、増殖速度が一時的に低下したのは、今回測定した立神定点における8月11日の最高密度が12cells/ml と低かったのに対して、湾奥の宮ヶ崎 (Fig. 1) では848cells/ml の高い細胞密度が観測されたことから、*H. circularisquama* 個体群の分布中心域が湾奥に移動していたことが原因であったと推察された。実際に8月11日の宮ヶ崎の現場海水を用いて測定した *H. circularisquama* 個体群の増殖速度は -0.56divisions/day で、立神定点のように極端に低い値は示さなかった。このことから、調査定点が海域における個体群の分布中心域を極端に外れた場合には、個体群全体を代表する増殖速度が得られない可能性が考えられた。したがって、現場個体群の増殖速度をより正確に把握するためには、1定点における部分環境的な増殖速度ではなく、個体群の分布中心域を的確に把握しながら、水域内の個体群全体を代表する増殖速度を捉える努力も必要と考えられた。

今回の研究で明らかになった、これまでよりも効率的に増殖速度を算定するための手法は、簡便で、特別な機

器や技術を必要とせず、1日間という短期間で測定結果が得られるなどのメリットがある。また、汎用性が高いため、*H. circularisquama* 以外のプランクトンへの応用も期待される。今後、今回の手法で測定される増殖速度が、海域における個体群の増殖速度をどの程度正確に反映しているかについて、測定事例を増やすと共に、分裂頻度による増殖速度測定 (山口・本城 1990, 山口 1998) などの培養を必要としない手法と比較するなどして、さらに検証を進めていく必要がある。

要 約

短期的な赤潮の消長予測への利用を目的として、海域で採取した *Heterocapsa circularisquama* 含む海水試料をバッチ培養し、その間の細胞密度の変化量を用いて増殖速度を推定する手法を確立するため、細胞密度の測定精度、培養方法および培養瓶の必要本数について検討した。直接計数法による細胞密度の測定では、1試料あたりの測定回数を3回、測定1回あたりの細胞カウント数を70cells以上とした条件において、変動係数 (CV) が安定する傾向が認められた。培養瓶を現場海域の筏から垂下する現場培養法と人工気象器内で培養する室内培養法の2つの手法で測定した増殖速度は、いずれも良く似た傾向で推移し、簡便な室内培養法でも増殖速度の推移を把握可能と推察された。培養瓶5本における増殖速度の標準偏差 (SD) を基にして統計的に培養瓶の必要本数を見積もった結果、0.2 divisions/day 程度の増殖速度の変化を識別するために必要な培養瓶の本数は1～2本と考えられた。英虞湾において2004年、2005年および2008年の *H. circularisquama* 赤潮発生時および2006年の *Karenia mikimotoi* 赤潮発生時にモニタリングした現場個体群の増殖速度は、赤潮発達期には高く、終息期には低くなる傾向が認められた。このことから、新しく確立した簡便な手法を用いてモニタリングした現場個体群の増殖速度は、短期的な赤潮消長予測の指標として利用できる可能性が示唆された。

文 献

- 江藤拓也・桑村勝士・佐藤博之 1998: 1997年秋季に豊前湾で発生した *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の発生状況と漁業被害の概要. 福岡水産海洋技術センター研報, 8, 91-96.
- Frontier, S. 1972: Calcul de l'erreur sur un comptage de zooplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 8(2), 121-123.
- 浜田知久馬 2006: "3 統計学的検定入門". 学会・論文発表のための統計学 統計パッケージを誤用しないた

- めに, 真興交易医書出版部, 東京, 67 91.
- Honjyo, T. 1987 : Growth potential of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) collected in Gokasho Bay, Central Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, 34 (2), 119 124.
- 本城凡夫・松山幸彦 1998 : 特集 貝類養殖業を脅かすヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ赤潮 発生状況と被害. 瀬戸内海, 1998, No.4, (社) 瀬戸内海環境保全協会, 兵庫, 27.
- 飯塚昭二 1997 : “4・1 群成長・生物間関係・行動生態”. 赤潮の科学 (第2版) (岡市友利編), 恒星社厚生閣, 東京, 115 147.
- Lund, J. W. G., Kipling, C. and E. D. LeCren : The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, 11 (2), 143 170.
- 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. 日水試, 61 (1), 35 41.
- 松山幸彦・木村 淳・藤井 斉・高山晴義・内田卓志 1997 : 1995年広島湾西部で発生した *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の発生状況と漁業被害の概要. 南西水研研報, 30, 189 207.
- 松山幸彦 2003 : 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* に関する生理生態学的研究 - I *H.circularisquam* 赤潮の発生および分布拡大機構に影響する環境要因等の解明. 水研センター研報, 7, 24 105.
- 三重県・水産庁養殖研究所・兵庫県・徳島県・香川県・広島県・山口県・福岡県・大分県・高知県・佐賀県・長崎県・国土環境株式会社 2000 - 2001 : ヘテロカプサ赤潮等発生予察技術開発試験. 平成 11 - 12 年度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 (水産庁委託).
- 三重県・(独) 水産総合研究センター養殖研究所・兵庫県・徳島県・香川県・広島県・山口県・福岡県・大分県・高知県・佐賀県・長崎県・国土環境株式会社 2002 - 2004 : ヘテロカプサ赤潮等発生予察技術開発試験. 平成 13 - 15 年度 赤潮・貝毒等被害防止対策事業報告書 ヘテロカプサ赤潮等緊急対策 (水産庁委託).
- 三重県科学技術振興センター水産研究部 2005 - 2008 : ヘテロカプサ赤潮の消長予測技術開発. 平成 16 - 19 年度 赤潮等被害防止対策事業報告書 (水産庁委託).
- 三重県水産技術センター 1995 - 1999 : 海域特性による赤潮被害防止技術開発試験. 平成 6 - 10 年度 赤潮対策技術開発試験報告 (水産庁委託).
- Nagamori, E., Honda, H., Hanai, T., Nakanishi, K., Hata, N., Masuda, T., and Kobayashi, T. 2001 : Prediction of occurrence of *Heterocapsa circularisquama* red tide by means of fuzzy neural network. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 34 (8), 998 1005.
- 中西克之・大中澄美子・小林智彦・増田 健 1999 : 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* をめぐる研究と問題点, 4) 英虞湾における *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の発生過程. 日本プランクトン学会報, 46 (2), 161 164.
- 中西克之 2002 : 英虞湾におけるヘテロカプサ赤潮監視体制の現状と課題. 養殖, 2002, 4, 緑書房, 東京, 61 64.
- 尊田佳子・木村仁美 2001 : 2000年三河湾における *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の発生状況. 愛知水試研報, 8, 1 6.
- 玉井恭一 1999 : 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* をめぐる研究と問題点, 1) *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の発生と被害状況. 日本プランクトン学会報, 46 (2), 153 154.
- 山口峰生・本城凡夫 1990 : 有害赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* (*Dinophyceae*) の同調的細胞分裂と分裂頻度による増殖速度の測定. 日本プランクトン学会報, 37 (1), 3 18.
- 山口峰生 1998 : 新型赤潮生物 *Heterocapsa circularisquama* の増殖特性と分裂指数による増殖速度の推定. 渦鞭毛藻・ラフィド藻等による新型赤潮の発生機構と出現予測技術の開発に関する研究 平成 9 年度研究報告書 (瀬戸内海区水産研究所), 7 12.
- 山本千裕・田中義興 1990 : 福岡湾で発生した 2 種類の有害赤潮プランクトンについて. 福岡水試研報, 16, 43 44.
- 吉田陽一 1987 : “自然水域における植物プランクトンの増殖率 測定法を中心として”. 微生物の生態 3 増殖をめぐって (日本微生物生態学会編), 学会出版センター, 東京, 41 55.
- 吉田雄一・宮本政秀 1995 : 1994年楠浦湾に発生した *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の消長と日周変化について. 熊本水産研究センター研報, 3, 31 35.