

氏 名	しら いし とも たか 白 石 智 孝
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1701 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	有害赤潮渦鞭毛藻 <i>Heterocapsa circularisquama</i> における高感度検出法 を用いた生態学的研究

論文調査委員 (主 査) 准教授 今 井 一 郎 教 授 左 子 芳 彦 教 授 藤 原 建 紀

論 文 内 容 の 要 旨

有害赤潮渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* は、魚類には全く影響を及ぼさず、カキ、アサリ、真珠貝等の有用二枚貝の大量斃死を引き起こすことで有名である。本種は西日本の沿岸域を中心に赤潮を形成し、二枚貝養殖業に甚大な被害を与えている。発生予察を通じた赤潮被害の軽減策の策定には、個体群動態の把握が不可欠である。しかし *H. circularisquama* に関しては、サイズが小さいことから光学顕微鏡観察において見落とされる傾向にあり、また同じ海域に形態的類似種が生息するために本種の識別が困難である。従って、低密度時からの個体群動態はこれまで不明であり、赤潮時またはその直前にしか本種の存在を確認できなかったのが現状である。本論文では、*H. circularisquama* の個体群動態の全貌を明らかにすることを目的として、本種を特異的かつ高感度に検出定量できるモニタリング方法を検討開発した。そして実際に現場海域において本種のモニタリングを実施し、高感度モニタリング法の実効性を示すとともに、本種の個体群動態及び越冬機構の解明を行った。その主な内容は次の通りである。

第1章では、*H. circularisquama* の生物学的特徴、赤潮発生に対する対策の状況、現行のモニタリング方法における問題点などを整理し、本種の個体群動態を解明することの意義について議論を加えた。そして本種を特異的に検出する定量法として、モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法及び real-time PCR 法に着目し、現場モニタリングへ適用するために克服しなければならない定量性の問題点を整理した。

第2章においては、間接蛍光抗体法を現場モニタリングに適用することを目的として、現場海水中の細胞を100%回収する濾過捕集法を組み合わせた間接蛍光抗体法を確立した。そして本法に用いたモノクローナル抗体の *H. circularisquama* への反応特異性を試験し、本法が現場モニタリングへ適用可能であることを示した。

第3章では、三重県英虞湾を対象海域として間接蛍光抗体法を用いた *H. circularisquama* のモニタリングを行い、本法が現場海域において *H. circularisquama* を低密度 (1 cell L^{-1}) から高感度に定量できるモニタリング方法であることを実証している。さらに、晩春から初冬にかけての発生から消滅に至る本種の個体群動態の詳細を初めて明らかにした。また現場の環境要因と本種細胞密度との関係を分析し、各環境要因が個体群動態に及ぼす影響について考察を加えた。次に、高知県浦ノ内湾においても同様のモニタリングを行い、浦ノ内湾における本種の個体群動態の全貌を解明した。特に冬から春にかけても継続的に本種の栄養細胞を検出し、海水から越冬遊泳細胞を分離培養して厳密な同定を行い、本種が栄養細胞の状態で水柱で越冬していることを発見した。

第4章では、これまで低密度時の微細藻類の定量性に問題のあった real-time PCR 法を現場モニタリングに適用するため、低密度でも試料中の細胞を完全に回収できる濾過捕集法と real-time PCR を組み合わせたモニタリング技法を検討開発した。さらに現場海域において本法を用いた本種のモニタリングを行い、間接蛍光抗体法による結果と比較してその定量結果の正当性を示した。そして本法が *H. circularisquama* に対して実際の現場モニタリングに適用可能であることを示した。

続く第5章では、*H. circularisquama* が周年生息することが確認された高知県浦ノ内湾において real-time PCR 法を用い

たモニタリングを行い、本法の現場モニタリングへの有用性を実証した。本法も現場海域における *H. circularisquama* の低密度時からのモニタリングに優れていることを示し、本種個体群動態の全貌を明らかにした。さらに他の海域でも real-time PCR法を用いたモニタリングを実施し、有用性の裏付けを行った。また、本藻の存在が未だ報告されていない黒潮流軸付近においてもこの方法でモニタリングを行い、本種個体群の内湾への移入経路の特定を試みた。

最後に第6章で本研究を総括し、間接蛍光抗体法とreal-time PCR法の現場モニタリングへの実用性を論じた。さらに今後の研究課題について述べ、日本沿岸域に生息する有害有毒赤潮種の新規個体群の移入経路に関する考察を加え、新たな仮説を提唱した。

論文審査の結果の要旨

我が国では、西日本の沿岸域を中心に有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* が赤潮を形成して養殖二枚貝の大量斃死を引き起こしてきた。赤潮による被害を軽減するためには、赤潮発生を予察するのが有効であり、そのためには本種の個体群動態を把握することが不可欠である。しかし、これまで *H. circularisquama* に関しては有効なモニタリング方法がなく、個体群動態の全容は不明であった。本研究においては本種を特異的かつ高感度に定量できるモニタリング方法を開発検討し、個体群動態および越冬機構の解明に成功している。評価される主な点は以下の通りである。

- 1) これまでの抗体を用いた微細藻類の検出法は、特異性と有効性は論じられてきたが定量性の問題から現場モニタリングには不適であった。本研究では現場試料中の細胞を完全に回収できる濾過捕集法と間接蛍光抗体法を組み合わせることにより、*H. circularisquama* の高感度モニタリング法の開発に成功している。そして実際に現場海域において本種のモニタリングを実施し、低密度から特異的かつ高感度に定量できることが示された。
- 2) 新たに開発検討された間接蛍光抗体法を用いて本種のモニタリングを行い、発生から消滅に至る本種の個体群動態が初めて明らかにされた。
- 3) 高知県浦ノ内湾において本種のモニタリングを間接蛍光抗体法によって実施し、本種の個体群動態の全貌を明らかにした。特に、冬季に栄養細胞が継続的に検出され、越冬遊泳細胞の同定に成功しており、本種は栄養細胞の状態越冬していることが初めて解明された。
- 4) Real-time PCR法は、理論的には特異性と感度の高い定量法であるが、細胞の完全な捕集法が確立されておらず、現場モニタリングへは用いられてこなかった。今回、濾過捕集法とreal-time PCRを組み合わせることにより、real-time PCR法を用いて *H. circularisquama* を低密度から高感度に定量可能であることが実証された。
- 5) Real-time PCR法を用いて微細藻類の現場モニタリングを継続的に実施した報告はなく、浦ノ内湾と英虞湾で実施された本論文が世界で初めての成果といえる。本法は簡易かつ高精度であり、現場海域における *H. circularisquama* の動態を実際に把握できることが示された。

以上のように本論文は、現場モニタリングに活用されてこなかった間接蛍光抗体法とreal-time PCR法を適用可能にし、*H. circularisquama* の個体群動態及び越冬機構を解明したものであり、今後の赤潮被害軽減に向けた発生予察に有効な知見を与えたと言える。また本論文で示したモニタリング法は直ちに実用可能であり、我が国の二枚貝養殖業の健全な発展へ大きく貢献するものと評価できる。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。