

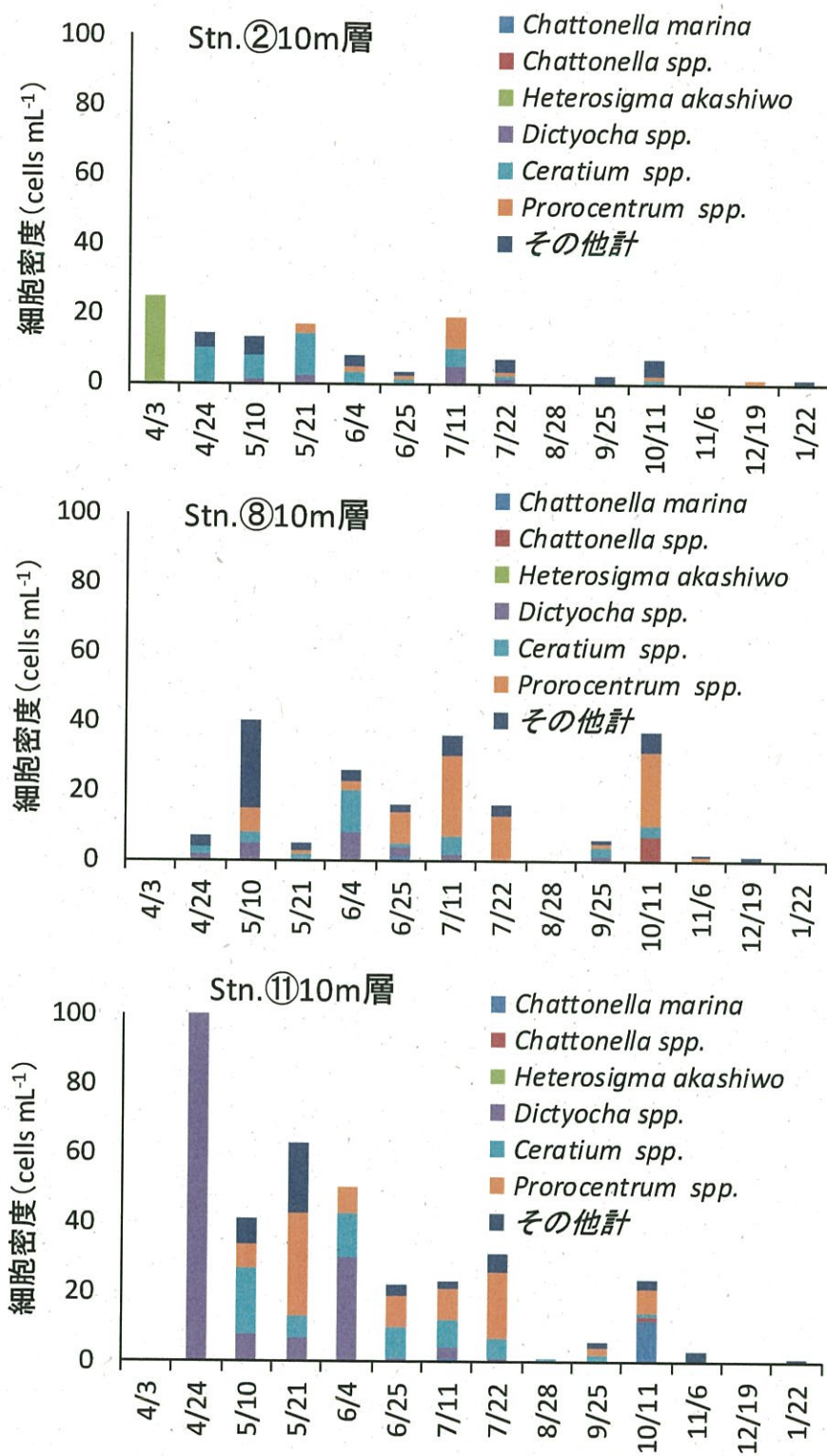


図 53. 鹿児島湾における植物プランクトン（鞭毛藻類）の組成変化（Stn. ②, ⑧, ⑪ 10m 層）.

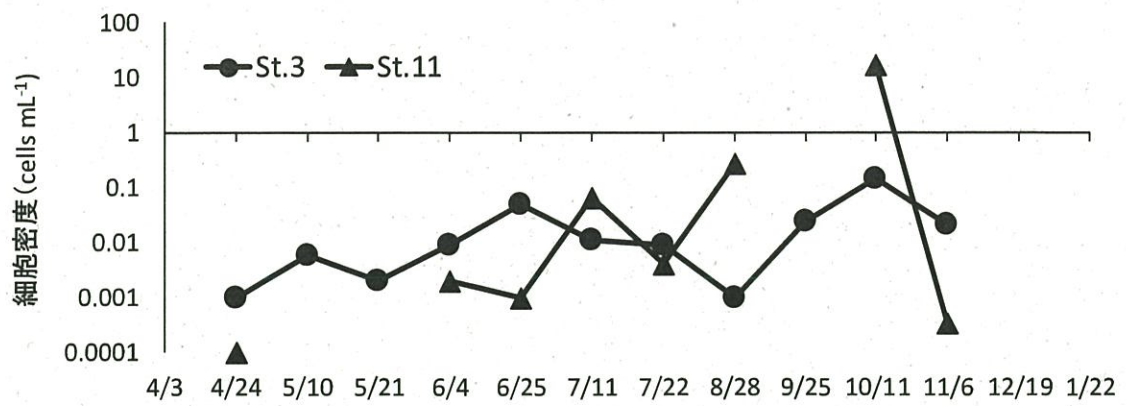


図 54. 鹿児島湾における *Chattonella* spp.細胞密度の推移 (Stn.③, ⑪表層).

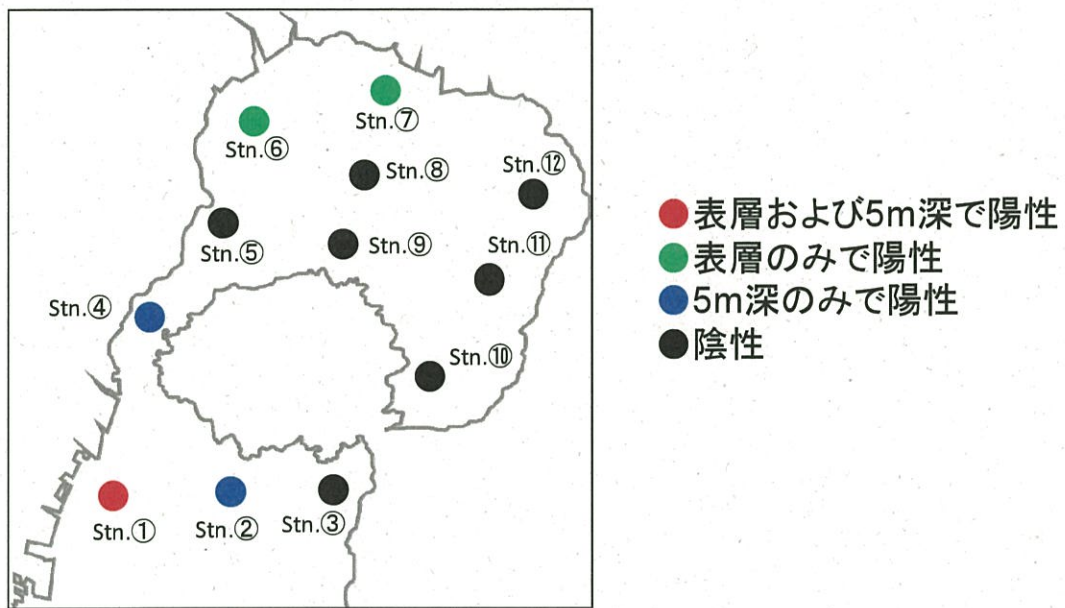


図 55. *Chattonella* spp.LAMP 法結果.

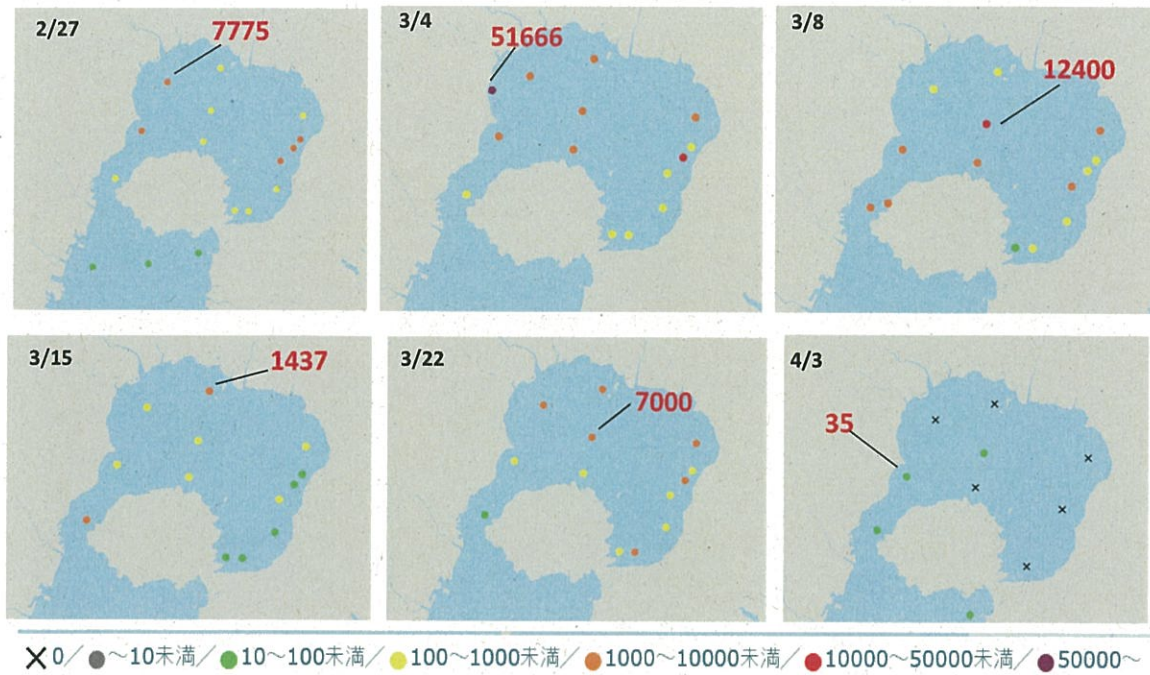


図 56. *Heterosigma akashiwo* 赤潮の水平分布の推移.

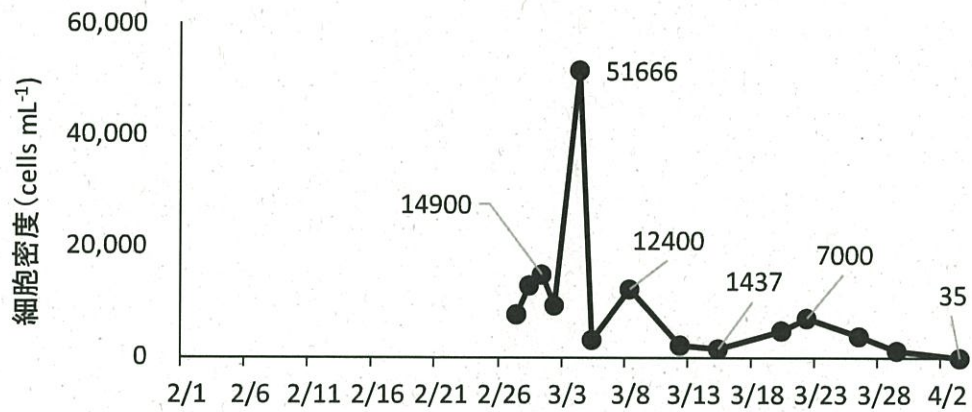


図 57. *Heterosigma akashiwo* の最高細胞密度の推移 (全調査点).

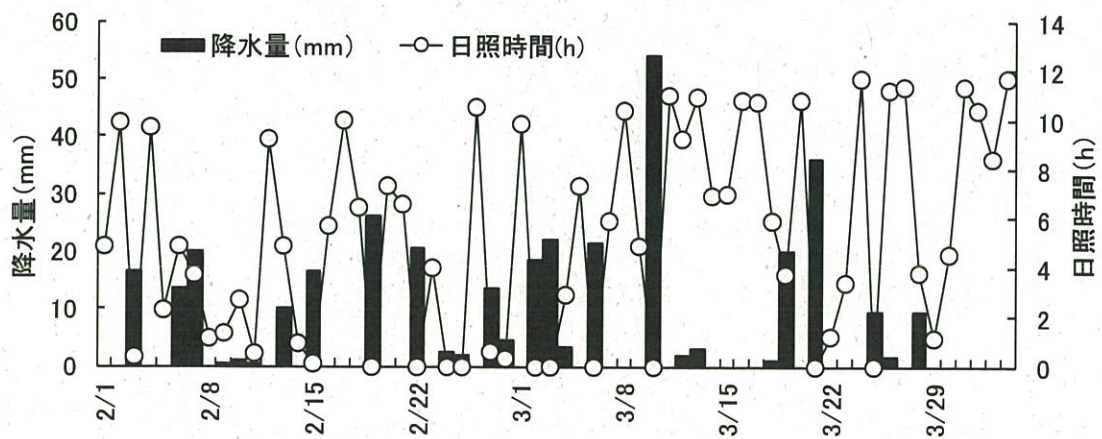


図 58. 降水量及び日照時間の推移(降水量：溝辺アメダス、日照時間：牧ノ原アメダス).

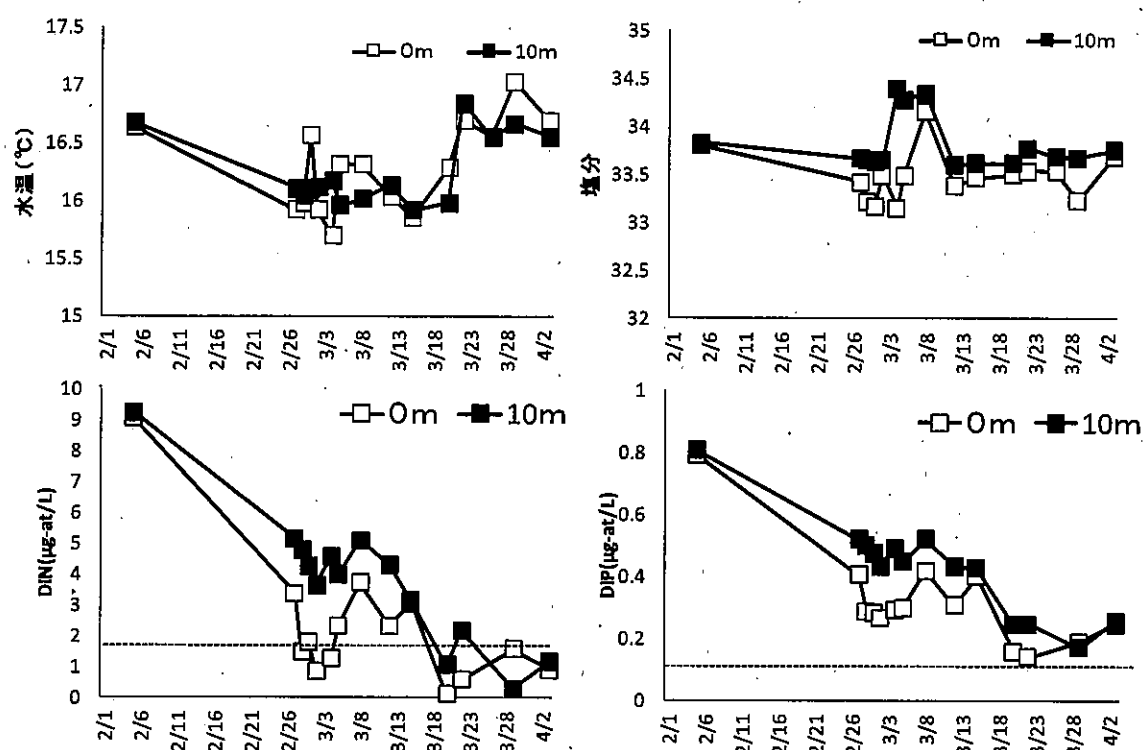


図 59. 水温，塩分，DIN，DIP の推移（湾奥部 9 定点平均）。横線は *Heterosigma akashiwo* が生残するために最低限必要な濃度。

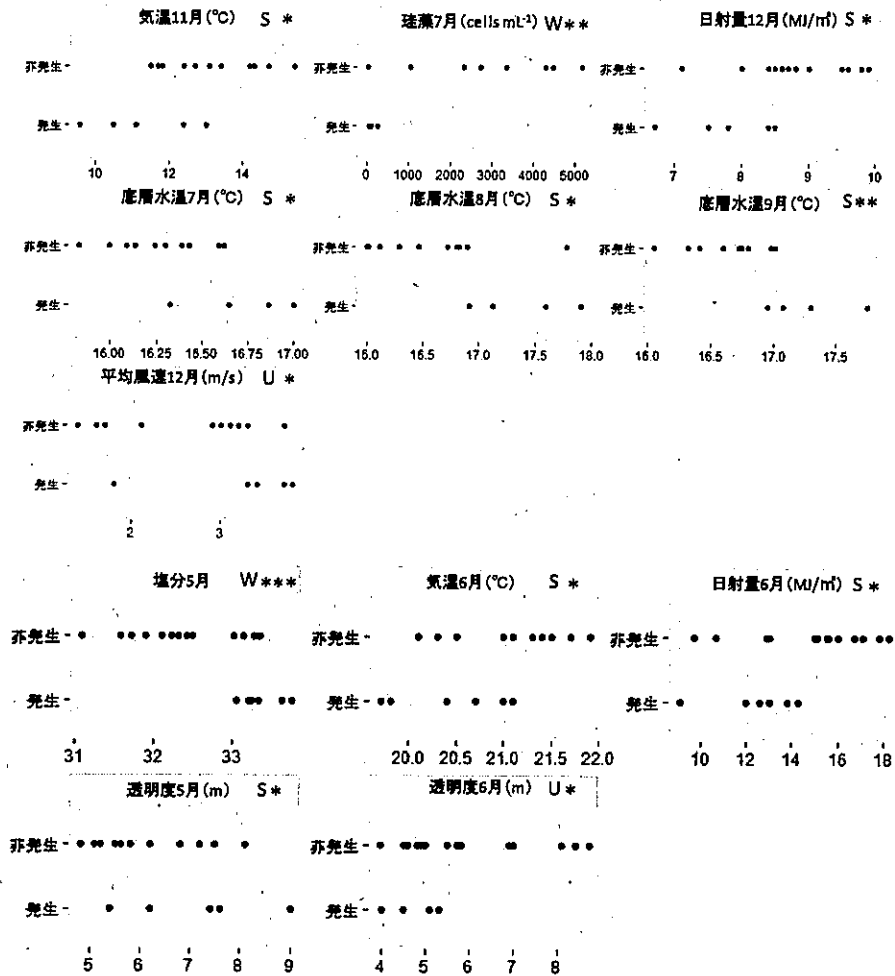


図 60. 鹿児島湾における *C. marina* 赤潮発生年の特徴解析例。S は Student の t 検定, W は Welch の t 検定, U は Mann-Whitney の U 検定を表す。*は $P<0.05$, **は $P<0.01$, ***は $P<0.005$ 。

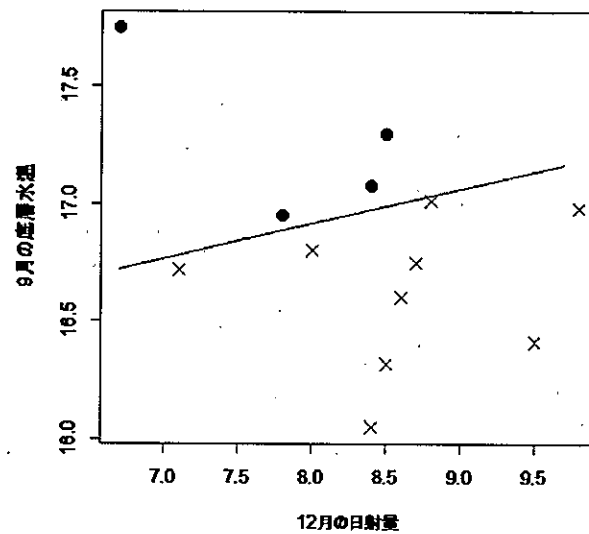


図 61. 鹿児島湾における *C. marina* 赤潮の線形判別分析結果例。●発生年, ×非発生年。

表 1. 2019 年九州南部地域における気温、日照時間及び降水量の旬別階級区分.

月	旬	平均気温(平年差 °C)	降水量(平年比 %)	日照時間(平年比 %)
1	上旬	平年並 (0.5)	かなり少ない (11)	平年並 (100)
	中旬	高い (1.7)	平年並 (63)	平年並 (90)
	下旬	高い (1.4)	かなり少ない (34)	かなり多い (160)
2	上旬	かなり高い (2.9)	多い (163)	少ない (78)
	中旬	平年並 (0.4)	多い (149)	少ない (79)
	下旬	平年並 (1.8)	多い (164)	少ない (68)
3	上旬	高い (1.9)	かなり多い (259)	少ない (77)
	中旬	平年並 (0.3)	かなり少ない (34)	かなり多い (173)
	下旬	高い (0.8)	少ない (62)	平年並 (115)
4	上旬	低い (-0.4)	平年並 (80)	かなり多い (154)
	中旬	平年並 (0.0)	かなり少ない (23)	多い (125)
	下旬	かなり高い (1.4)	多い (128)	少ない (68)
5	上旬	低い (-0.8)	かなり少ない (35)	多い (121)
	中旬	かなり高い (1.4)	かなり多い (312)	少ない (71)
	下旬	高い (0.8)	かなり少ない (15)	かなり多い (143)
6	上旬	高い (0.6)	平年並 (70)	少ない (78)
	中旬	低い (-0.8)	少ない (59)	多い (147)
	下旬	平年並 (-0.1)	平年並 (94)	平年並 (82)
7	上旬	低い (-1.6)	かなり多い (372)	少ない (56)
	中旬	低い (-1.0)	多い (233)	かなり少ない (44)
	下旬	平年並 (0.3)	平年並 (83)	平年並 (103)
8	上旬	高い (0.9)	平年並 (54)	平年並 (109)
	中旬	平年並 (0.2)	かなり多い (200)	かなり少ない (64)
	下旬	低い (-0.5)	多い (144)	かなり少ない (53)
9	上旬	かなり高い (1.1)	平年並 (76)	平年並 (107)
	中旬	かなり高い (1.5)	少ない (32)	多い (123)
	下旬	高い (1.7)	平年並 (103)	平年並 (88)
10	上旬	かなり高い (2.1)	平年並 (83)	多い (124)
	中旬	かなり高い (2.0)	平年並 (64)	少ない (92)
	下旬	高い (1.4)	多い (166)	少ない (80)
11	上旬	平年並 (0.0)	かなり少ない (1)	かなり多い (151)
	中旬	平年並 (0.3)	少ない (32)	かなり多い (148)
	下旬	かなり高い (2.3)	多い (191)	少ない (75)
12	上旬	低い (-0.8)	平年並 (83)	少ない (88)
	中旬	かなり高い (3.1)	平年並 (60)	平年並 (103)

2) 有害赤潮の防除および漁業被害軽減のための技術開発

ア. 魚毒性診断技術の開発

水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所

紫加田知幸, 北辻さほ, 坂本節子

水産研究・教育機構 中央水産研究所

内田 肇, 及川 寛, 鈴木敏之

水産研究・教育機構 水産大学校

山崎康裕

自然科学研究機構 基礎生物学研究所

内山郁夫, 西出浩世

大分県農林水産研究指導センター水産研究部

井口大輝, 中里礼大, 内海訓弘

埼玉大学大学院 理工学研究科

西山佳孝

北里大学 医学部

西横俊之

1 全体計画

(1) 目的

近年, 西日本において *Karenia mikimotoi* 等赤潮による甚大な被害が頻発している。有害赤潮は長期化することも多く, 魚介類のへい死という直接的な被害だけでなく, 餌止めなどの対策を講じることによって生じる「間接的な損失」も大きい。一方で, 赤潮の魚毒性は赤潮原因プランクトンの生理状態等によって大きく変動することが知られている。そのため, 魚毒性が高い時に餌止め等の苦肉の策を限定すれば被害軽減につながるはずである。しかしながら, 赤潮による魚類のへい死機構は未だ詳細不明であり, 現場適用可能な魚毒性定量技術は開発されていない。本課題では, 各種簡易バイオアッセイ系や分子生物学的・分析化学的手法(活性酸素マーカー, 遺伝子発現, 毒分析など)を用いた魚毒性診断技術を開発し, 最終的にマニュアル作りを行う。

2 平成 31 年度計画及び結果

(1) 目的

全体計画と同じ

(2) 方法

1) 分子生物学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発(水産機構・瀬水研, 基生研)

有害赤潮プランクトンを対象に、既存の RNA-seq データから魚毒性の指標となり得る遺伝子を見出すことを目的とした。*Chattonella antiqua* および *C. marina* の強毒株および弱毒株の比較トランスクリプトームデータを解析した。RNA-seq データは以下の手順で取得された。マダイ稚魚を用いて毒性評価された *C. antiqua* 2 株 (NIES-1 株：強毒, C4 株：弱毒) および *C. marina* 2 株 (Ago03 株：強毒, Ago04 株：弱毒) が RNA-seq 解析に供された。対数増殖期 ($\sim 10,000$ cells mL⁻¹) にある培養株 50 mL を孔径 3 μ m のヌクレポアフィルターで濃縮後、等量のフェノール+エタノール溶液 (Shikata et al. 2019) を添加して冷凍保存した。解凍後、遠心して得られた沈殿について、キアゲン製の RNeasy Plant Mini Kit を用いて total RNA の抽出および精製を行った。Total RNA 試料から cDNA ライブラリーを作成後、次世代シーケンサー-Illumina high-seq 2500 による RNA-seq を行った。得られたデータについて、*de novo* アセンブルや各種アノテーション等を行った後、株間で発現に差のある遺伝子の抽出を行った。

2) 簡易アッセイ系を用いた魚毒性診断技術の確立と現場適用

これまでにシオミズツボワムシ (*Branchionus plicatilis*, 以下ワムシと略記する) のへい死率や溶血活性が *Karenia mikimotoi* や *Heterocapsa circularisquama* 等一部の有害赤潮プランクトンの魚介類に対する毒性と相関があると考えられている (Oda et al. 2001, Cho et al. 2017, Kim et al. 2019)。本課題では、動物プランクトンや動物赤血球等を用いた簡易バイオアッセイ系を現場適用するために、条件検討や手法確立を行い、現場計測時の結果の補正方法や適用可能条件を明らかにすることを目的とした。また、*K. mikimotoi* 等赤潮中のワムシへの毒性 (致死率) が魚類および貝類に対する毒性と相関があるかを明らかにするために、ワムシへの毒性の高いあるいは低い培養株を魚類および貝類に曝露して検証した。なお、一部の採水試料を用いた試験を除き、すべての試験は 3 反復で実施した。

ア. ワムシへの毒性を指標とする魚毒性診断法の確立

本課題では、現場計測時の結果の補正方法や適用可能条件を明らかにすることを目的として、様々な種類の植物プランクトン (現場で採集された試料を含む) をワムシに曝露し、植物プランクトン種別に毒性の程度と検出限界となる曝露密度を検討した。

A) 14 株の植物プランクトンがワムシの生残に及ぼす影響

試験に用いたワムシ (L 型ワムシ, 奄美株) およびワムシの餌料となる真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* は、国立研究開発法人水産研究・教育機構のジーンバンク事業を通じて恵与された。ワムシの継代培養は週に 1 回とし、ワムシの餌料と *N. oculata* が十分に増殖 (4×10^6 cells mL⁻¹ 以上) した培養液 40 mL にワムシを含む培養液 3 mL 程度を添加することにより、培養を維持した。なお、ワムシの培養は 25°C, 12hL:12hD, 70 μ mol m⁻² s⁻¹ にて行った。ただし、*N. oculata* は低照度で増殖が著しく低下するため、ワムシの餌料となる *N. oculata* および 14 株の植物プランクトン (*K. mikimotoi* [3 株], *H. circularisquama* [3 株], *Chattonella antiqua* [2 株], *C. marina* [2 株], *Prorocentrum minimum* [1 株], *P. triestinum* [1 株], *Thalassiosira*

pseudonana [1 株, CCMP1335] および *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex [1 株, NIES-324]) の培養は 25°C, 12hL:12hD, 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ にて行った。なお, *T. pseudonana* および *S. marinoi-dohrnii* complex は, それぞれ米国の National Center for Marine Algae and Microbiota および日本の国立環境研究所より購入した。

ワムシを用いた簡易アッセイは, 48 ウェルプレート (Corning) を用いて実施した。まず, 各ウェルに改変 SWM-3 培地 0.1 mL を添加した後, 25°C, 塩分 30 にて培養 (培養 6~10 日目) したワムシを 0.1 mL あたり 10 個体になるようピペットで採取して添加した。その後, 希釈調製した *K. mikimotoi* (3 株, 曝露密度: $10^2 \text{ cells mL}^{-1}$), *H. circularisquama* (3 株, 曝露密度: $10^2 \text{ cells mL}^{-1}$), *C. antiqua* (2 株, 曝露密度: $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$), *C. marina* (2 株, 曝露密度: $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$), *P. minimum* (1 株, 曝露密度: $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$), *P. triestinum* (1 株, 曝露密度: $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$), *T. pseudonana* (1 株, 曝露密度: $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$), *S. marinoi-dohrnii* complex (1 株, 曝露密度: $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$) の細胞浮遊液を 0.8 mL ずつ添加し, 最終液量を 1 mL とした。また, 対照区として改変 SWM-3 培地のみワムシを収容する試験区を設けた。48 ウェルプレートは, 25°C, 12hL:12hD, 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のインキュベーターにて静置し, 曝露開始から 60 分間隔でワムシのへい死個体数を顕微鏡下で計数して生残率を算出した。なお, ワムシのへい死は, 繊毛や趾の運動が停止し, 外部形態が角張り変形した状態と定義した。

B) ワムシを用いた簡易アッセイによる現場で発生した *C. antiqua* の毒性評価

ワムシを用いた簡易バイオアッセイの現場適用に向けた条件検討のために, 現場で発生した *C. antiqua* 赤潮海水を対象に簡易バイオアッセイによる毒性評価を試みた。試料は, 2019 年 8 月 25 日に八代海楠浦湾の表層, 1.6 m および 20 m 層から採水後, 水産大学校へ送付した。到着後すぐに, ワムシを用いた簡易アッセイは, 48 ウェルプレート (Corning) を用いて上述と同様の方法で実施した。なお, 各採水層における *C. antiqua* の細胞密度は, それぞれ 324 cells mL^{-1} , 71 cells mL^{-1} および 2 cells mL^{-1} であった。

C) ワムシを用いた簡易アッセイによる現場で発生した *K. mikimotoi* の毒性評価

現場で発生した *K. mikimotoi* 赤潮の毒性を評価した。楠浦湾にて *K. mikimotoi* が高密度化した 2019 年 6 月 11 日および 17 日に, 表層の海水を約 25 L 採水し, 瀬戸内海区水産研究所に送付した。翌日に到着した海水を直ちに実験に供した。なお, 海水は熊本県水産研究センターにご提供頂いた。計数の結果, 6 月 11 日および 17 日の試料の *K. mikimotoi* の細胞密度は, それぞれ $8.8 \times 10^2 \text{ cells mL}^{-1}$ および $1.1 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ であった。ワムシを用いた簡易アッセイは, 48 ウェルプレート (IWAKI) を用いて上述と同様の方法で実施した。なお, 6 月 11 日および 17 日の試験プレートは, それぞれ 20°C および 22.5°C のインキュベーターにて静置した。

イ. 溶血活性を指標とする魚毒性診断法の確立

本課題では, 現場計測時の結果の補正方法や適用可能条件を明らかにすることを目的として, 14 株の植物プランクトンを用いて溶血活性試験を行い, 植物プランクトン種別に溶血活性の程度と検出限界となる細胞密度を計測した。これらにより, 現場計測時の結果の補正方

法や適用可能条件を検討にした。

ウサギの保存血（株式会社日本バイオテスト研究所）は、無菌的に 2 mL ずつ 15 mL 容チューブへ分注し、リン酸緩衝生理食塩水（以下、PBS と略記する）を 8 mL 添加した後、均一に懸濁するよう静かに攪拌した。その後、多目的冷却遠心機（CAX-371, 株式会社トミー精工）を用いて遠心分離し（ $420 \times g$, 10 分, 4°C ）、上清を取り除いた。また、上清が透き通るまで（最大 3 回）同様の洗浄を繰り返し、洗浄した赤血球は終濃度が 4 % になるように PBS に懸濁した。一方、*K. mikimotoi* (3 株), *H. circularisquama* (3 株), *C. antiqua* (2 株), *C. marina* (2 株), *P. minimum* (1 株), *P. triestinum* (1 株), *T. pseudonana* (1 株, CCMP1335) および *Skeletonema* sp. (1 株, NIES-324) の細胞浮遊液は、改変 SWM-3 培地を用いて希釈調整し、U 底 96 ウェルプレート（Dickinson and Company, Becton）の各ウェルへ 80 μL ずつ分注した。その後、4 % の赤血球懸濁液を 80 μL ずつ添加し、 25°C のインキュベーター内に静置した。5 時間の反応後、遠心分離（ $360 \times g$, 10 分, 4°C ）を行い、得られた各試料の上清 80 μL を測定用平底 96 ウェルプレート（Dickinson and Company, Becton）に気泡が入らない様に注意して回収した。最後に、得られた各試料の上清における 480 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー（Thermo Fisher SCIENTIFIC, MULTISKAN GO）によって測定した。なお、溶血活性の陽性反応区には、完全溶血を引き起こす Triton X-100（株式会社富士フイルム和光純薬, Polyoxyethylene(10)Octylpheny Ether）の 4 % 溶液（v/v）を用い、陰性対照区には改変 SWM-3 培地を用いた。また、試験区の溶血度は次式より算出した。

$$\text{溶血度 (\%)} = (\text{試料の溶血度} - \text{陰性対照区}) / (\text{陽性対照区} - \text{陰性対照区}) \times 100$$

ウ. 簡易アッセイ系で選抜された強毒株を用いた魚類および貝類への曝露試験（水大校，瀬水研）

A) 赤潮プランクトンの魚類に対する曝露試験

現場の赤潮海水をマダイ稚魚に曝露し、その毒性を検討した。八代海楠浦湾にて *K. mikimotoi* が高密度化した 2019 年 6 月 11 日および 17 日に、表層の海水を約 25 L 採水し、瀬戸内海区水産研究所に送付した。翌日に到着した赤潮海水を 10 L 容ガラスメジューム瓶に入れ、曝露試験まで 1 から 2 日間、インキュベーター内で $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14hL:10hD), 20°C (6 月 11 日) および 22.5°C (6 月 17 日) の条件で培養した。なお、赤潮海水は熊本県水産研究センター向井宏比古研究参事にご提供頂いた。水槽に赤潮海水またはろ過海水 6 L を入れ、マダイ稚魚（体長 $12.4 \pm 0.61 \text{ cm}$, 体重 $40.8 \pm 6.6 \text{ g}$ ）を 3 尾ずつ収容して通気した。6 月 11 日の赤潮海水区は 3 回、ろ過海水区は 1 回の反復で実施したが、6 月 17 日は赤潮海水区およびろ過海水区ともに 2 回の反復で実施した。試験は 6 時間行い、2 時間おきにマダイ稚魚の行動観察、水質計（WTW, Multi 3510 IDS）を用いた水質観測、化学発光試薬 L-012（富士フイル

ム和光純薬株式会社, 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido [3,4-d] pyridazine-1,4-(2H,3H) dione sodium salt) を用いたスーパーオキシドレベル (O_2^-) の測定および *K. mikimotoi* 細胞密度の計数を行った。なお, 6月11日および17日に採取した試料の曝露開始時における *K. mikimotoi* の細胞密度は, それぞれ $1,035 \text{ cells mL}^{-1}$ (6月11日), $7,115 \text{ cells mL}^{-1}$ (6月17日, 1日間培養) および $8,300 \text{ cells mL}^{-1}$ (6月17日, 2日間培養) であった。

B) 赤潮プランクトンの二枚貝に対する曝露試験

アサリに対する曝露試験は, 500 mL 容プラスチックビーカーを用いて実施した。まず, 殻長 $8.78 \pm 0.30 \text{ mm}$ のアサリを各ビーカーに5個体ずつ収容し, 25°C に設定した低温恒温器 (LTI-1200E, 東京理化工機株式会社) 内で, 止水, 連続暗期および微通気条件で12時間以上馴致した。その後, 曝露密度が $1.5 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ となるよう *K. mikimotoi* (19IMR4 株および ax69-9 株) 培養液を濾過滅菌海水で希釈調整し, 最終液量を 500 mL とした。また, 対照区として濾過滅菌海水のみにアサリを収容する試験区を設けた。各ビーカーは上述の条件にて静置し, アサリの生残は曝露開始から 3, 6, 12, 24, 48 および 72 時間後に確認した。一方, *K. mikimotoi* 細胞の懸濁状況を推定するために, 各試験区における *in vivo* クロロフィル蛍光値は蛍光光度計 (Trilogy, Turner Designs Instrument) を用いて測定した。なお, 殻が開いて動かず, かつ, 殻を柄付き針で刺激しても閉殻しない個体をへい死個体とした。

C) 赤潮プランクトンの巻貝に対する曝露試験

クロアワビに対する曝露試験は, 楠浦湾の赤潮海水および培養株を用いて実施した。到着した楠浦湾の赤潮海水を, ポリエチレン製 1 L 容角ボトルで1日間 (6月11日) および2日間 (6月17日), 前述の条件で培養した。山口県栽培漁業公社の津田徹班長にご提供頂いたクロアワビ稚貝 (殻長 $4.15 \pm 6.00 \text{ cm}$) を3個体ずつネットに入れ, 赤潮海水またはろ過海水 1 L を入れた 2~3 L 容の手つきポリメチルペンテン製ビーカーに収容した。その後, 通気条件にて *K. mikimotoi* の 24 時間曝露試験を開始した。なお, 6月11日および17日に採取した試料の曝露開始時における *K. mikimotoi* の細胞密度は, それぞれ $1.1 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ および $1.1 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ であった。曝露試験を開始して6時間目までは2時間おきに, その後は24時間目にクロアワビ稚貝の生死判定, 水質計 (Multi 3510 IDS, WTW) を用いた水質測定および *K. mikimotoi* 細胞密度の計数を行った。クロアワビ稚貝の生死は, ピンセットによる触診に対する反応の有無により判断した。

同様に, 室内培養した3株の *K. mikimotoi* (19IMR4, KU9, ax69-9) について, クロアワビ稚貝に対する毒性を判定した。試験に用いた *K. mikimotoi* (19IMR4, KU9, Km69-9ax) は, 20°C , 塩分 30 および $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (12hL:12hD) で培養した。対数増殖期の *K. mikimotoi* 培養液または改変 SWM-3 培地 (対照区) を前述した試験条件にてクロアワビ稚貝に曝露し

た。なお、*K. mikimotoi* の 19IMR4 株、KU9 株および ax69-9 株の曝露密度は、それぞれ 2.1×10^4 cells mL⁻¹、 2.4×10^4 cells mL⁻¹ および 2.9×10^4 cells mL⁻¹ であった。

3) 活性酸素計測法の開発、現場適用

化学発光試薬を用いた手法は感度が高く、赤潮プランクトンの O₂ を計測する上で適している。しかしながら、本手法の最大の弱点は一部の渦鞭毛藻のような発光生物が混入すると、正確な測定値を得ることが難しい点である。そこで、ルシフェラーゼ阻害剤の投与など、発光生物による発光をキャンセルする手法を検討する。また、吸光度や蛍光を指標にして O₂ を計測する手法について検討し、発光法と比較する。なお、反応液中に存在する蛍光試薬の疑反応によるバックグラウンド値が高かったことから、蛍光法による O₂ 計測手法については検討できなかった。

ア. O₂ 計測法の確立

A) 発光生物が化学発光法による O₂ 検出に与える影響

本課題では、現場で発生した渦鞭毛藻 *Noctiluca scintillans* の赤潮海水を用いて発光生物が化学発光法による O₂ 検出に与える影響について調べるとともに、ルシフェラーゼ阻害剤による発光生物由来の発光の低減が可能か検討した。また、発光生物 *N. scintillans* をふるいで除去することで *C. antiqua* の O₂ の測定が可能かどうかを検討した。

まず、*N. scintillans* の赤潮海水は、2019 年 4 月 9 日に室津湾の表層から採水後、直ちに水産大学校へ持ち帰った。試料中の *N. scintillans* の細胞密度は、704 cells mL⁻¹ であった。次に、*N. scintillans* の発光レベルは、ルミノメーター（アトー、AB-2270 ルミネッセンサー Octa）を用いて測定した。また、*N. scintillans* の発光が O₂ と無関係であることを確認するために、L-012 の存在下で発光測定を行った。測定は、10 μL の L-012（最終濃度：10 μM）、20 μL の PBS（もしくは PBS に溶解したスーパーオキシドジスムターゼ：SOD、富士フイルム和光純薬株式会社）および 970 μL の試料溶液を順次添加後、直ちにルミノメーターにて 30 秒間の発光パターンおよび発光レベルの積算値を測定した。なお、検出された化学発光レベルが O₂ 由来であるか判定するために、O₂ の特異的消去酵素である SOD を最終濃度が 200 units mL⁻¹ になるよう添加することにより、試料の発光レベルが大幅に減少するか否かを確認した。

B) 発光生物の影響低減手法の検討

今回は *N. scintillans*、*Alexandrium leei* および *Alexandrium tamarense* を発光生物、*C. antiqua* を O₂ 産生生物として実験対象にした。*N. scintillans* は 2019 年 3 月に広島湾で採集し、緑藻 *Dunaliella tertiolecta* (NIES-2258) を給餌しながら 25°C、塩分 30、100 μmol m⁻² s⁻¹ (12hL:12hD) で培養した。発光検出に与える *D. tertiolecta* の影響を排除するために、*N. scintillans* は実験前に新鮮な改変 SWM-3 培地に単離して 24 時間培養した。また、*C. antiqua* (NIES-1)、*A. leei* および *A. tamarense* の培養には、塩分 30 の改変 SWM-3 培地を用い、培養照度は 100 μmol m⁻² s⁻¹ (12hL:12hD) とした。*A. tamarense* 培養株（大阪湾より分離されたクローン株）は水産機

構・瀬戸内海区水産研究所 外丸主任研究員より分譲頂いた。また、*C. antiqua* (NIES-1), *A. leei* および *A. tamarense* の培養温度は、それぞれ 25°C, 20°C および 15°C とした。

i) ルシフェラーゼ阻害剤による発光抑制

市販されているルシフェラーゼ阻害剤で発光生物による発光を抑制できるかを検討した。*N. scintillans* (細胞密度 5 cells mL⁻¹), *A. leei* (細胞密度 24,400 cells mL⁻¹) および *A. tamarense* (細胞密度 22,000 cells mL⁻¹) の培養液をそれぞれ 1 mL ずつ採取し、ルミノメーターで発光レベルを測定した。その後、*N. scintillans*, *A. leei* および *A. tamarense* 培養液を 1 mL ずつ採取し、それぞれに、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したルシフェラーゼ阻害剤 (Sigma Aldrich, Luciferase Inhibitor I) を 1 µL ずつ、最終濃度 100 µmol L⁻¹ になるよう添加し、ルミノメーターで発光レベルを測定した。

ii) サイズ分画

発光生物である *N. scintillans* をふるいで除去することにより、*C. antiqua* が産生する O₂ のみを検出可能かについて検討した。適切なふるいの目合いを決定するために、5 cells mL⁻¹ の *N. scintillans* 培養液 50 mL を 100 µm および 150 µm のふるいでろ過し、ろ液を 10 mL 採取した。*N. scintillans* 培養液およびろ液を、ルミノメーターを用いた発光レベルの測定および光学顕微鏡下での *N. scintillans* 細胞の計測に供した。次に、5 cells mL⁻¹ の *N. scintillans* 培養液 50 mL と 20,000 cells mL⁻¹ の *C. antiqua* 培養液 50 mL を混合して 100 mL の混合培養液を作製し、目合い 100 µm のふるいでろ過した。混合培養液とろ液を 3 mL ずつ採取し、ルミノメーターを用いた発光レベルおよび L-012 による O₂ の測定を行い、*C. antiqua* および *N. scintillans* の細胞数を計測した。

イ. 吸光法による O₂ の検出法の検討

本課題では、還元系発色試薬である WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo phenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt, 同仁化学研究所) を用いた吸光法による O₂ の検出について検討を行った。本実験には、温度 25°C, 14hL:10hD, 明期 6:00~20:00, 200 µmol m⁻² s⁻¹, 白色光の光条件で培養した対数増殖期の *C. antiqua* (NIES-1 株:強毒) および *C. marina* (Ago03 株:強毒および Ago04 株:弱毒) を用いた。測定は、平底 96 ウェルプレート (Becton, Dickinson and Company) を用いて実施した。まず、194 µL の試料溶液、6 µL の PBS, もしくは PBS に溶解した SOD (200 units mL⁻¹) および超純水に溶解した 20 µL の WST-1 (最終濃度: 1.8 mM) を順次添加した。また、対照区として WST-1 溶液の代わりに 20 µL の超純水を添加した試験区を設けた。全ての試料を添加した平底 96 ウェルプレートは、温度 25°C, 200 µmol m⁻² s⁻¹, 白色光の光条件で 0.5 時間~2 時間静置した。一定時間の反応後、遠心分離 (510 × g, 10 分間, 4°C) を行い、得られた各試料の上清 80 µL を測定用平底 96 ウェルプレート (Becton, Dickinson and Company) に気泡が入らない様に注意して回収した。最後に、得られた各試料の上清における 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (MULTISKAN GO, Thermo Fisher SCIENTIFIC) によって測定した。なお、検出された各試験区の測定値から対照区の測

定値を差し引いた値を O_2 による発色レベルとし、この発色が O_2 由来であるか判定するために、SOD（終濃度：200 units mL^{-1} ）を添加して試料の発色レベルが減少するか否かを確認した。なお、吸光法による測定結果と比較検証を行うために、前述した化学発光法による O_2 の測定も並行して実施した。

ウ．活性酸素産生に及ぼす有害赤潮プランクトンの生理状態の影響把握

本課題では、現場で使用する際の計測値補正法の確立やデータ解釈の明確化のために、赤潮プランクトンにおける O_2 産生に及ぼす環境条件や光合成の影響を解析した。

A) 強毒・弱毒株の光合成解析と光合成関連タンパク質の定量

2018 年度に、*Chattonella* 属の O_2 産生に光合成が関与していることを明らかにした（紫加田ら 2019）。そこで、2019 年度は *C. marina* の魚毒性と O_2 産生が高い株（Ago03 株；強毒株）と低い株（Ago04 株；弱毒株）について光合成をさらに詳しく解析した。*C. marina* は、温度 25°C、12hL:12hD（明期 6:00～18:00、300 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ 、白色光）の条件で 2 日間培養し、Net 光合成活性の測定を行った。Net 光合成活性は、10 mM $NaHCO_3$ 存在下で細胞懸濁液に様々な強度の光（100, 200, 400, 700, 1,000, 1,500, 2,000 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ）を 5 分間照射し、発生する酸素の濃度を酸素電極を用いて測定して求めた。

また、上記の条件で培養した細胞を遠心分離（3,000 rpm, 4°C, 5 分間）で集め、細胞をガラスビーズと超音波で破砕して粗抽出液を得た。粗抽出液に含まれるタンパク質をドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の存在下で加熱（80°C, 5 分間）して可溶化し、SDS-PAGE（320 V, 20 mA, 150 分間）で分離した。光合成関連タンパク質として、PSII の反応中心タンパク質 D1、集光アンテナタンパク質 fucoxanthin-chlorophyll-binding protein（FCP）、 CO_2 固定酵素 ribulose 1, 5-bisphosphate oxygenase/carboxylase（Rubisco）、カルビン回路の酵素 fructose 1, 6-bisphosphatase（FBPase）に着目して、それぞれのタンパク質に対する抗体を用いてウェスタン法でタンパク質を検出した。検出したバンドの強度を Image J（<http://rsbweb.nih.gov/ij/>）を用いて定量した。なお、実験は 3 回繰り返し行なった。

B) O_2 レベルに及ぼすカルビン回路阻害剤の影響

NADPH オキシダーゼ（NOX）は還元型ニコチンアミドジヌクレオチドリン酸（NADPH）を酸化して O_2 を産生するが、カルビン回路も NADPH を消費する。そこで、*C. marina* の O_2 レベルをカルビン回路の阻害剤であるグリコールアルデヒド（GA）の存在下で測定し、*Chattonella* における O_2 産生へのカルビン回路の関与を検証した。上述の明暗周期下で培養した強毒株および弱毒株に終濃度 3 mM の GA もしくは滅菌水を添加し、0, 30, 60, 120, 180 分間、300 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ の光を照射した後、 O_2 レベルを L-012 による発光を指標に、ルミカウンター（NU-2500、株式会社マイクロテック・ニチオン）で計測した。実験は 3 回繰り返し行なった。

C) O_2 レベルに及ぼす細胞内 NADPH および $NADP^+$ レベルの影響

NOX による O_2 産生は、NADPH の酸化と共役反応であるため、一般に O_2 産生レベルは細

胞内の NADPH および酸化型ニコチンアミドジヌクレオチドリン酸 (NADP⁺) レベルに影響されると考えられている (Hashida and Kawai 2019)。そこで、*Chattonella* における O₂ 産生への細胞内 NADPH および NADP⁺ レベルの関与を検証した。NADPH および NADP⁺ の定量はシアノバクテリアで確立されている酵素サイクリング法 (Ishikawa et al. 2019) を参考にした。まず、*C. marina* の強毒株 Ago03 および弱毒株 Ago04 を明暗周期下で 2 日間培養し、GA 存在下と非存在下で 1 時間培養した。細胞を遠心分離で集め、2 N HCl あるいは 2 N NaOH を添加して超音波破碎を行い、NADP⁺ あるいは NADPH の粗抽出液を作製した。粗抽出液を 95°C のヒートブロックで 1 分間熱処理した後、遠心分離で上清を回収して夾雑物を除去した。さらに、NaH₂PO₄ (pH5.6) あるいは 0.1 M HEPES-KOH (pH8.0) を添加して、NADP⁺ あるいは NADPH の抽出液を中和した。最後に、NADP⁺ あるいは NADPH 抽出液に反応液 (1.2 mM DCPIP, 20 mM 1-Methoxy-PMS, 10 mM Glucose 6-phosphate, 0.1 M HEPES-KOH [pH7.5]) と 215 U mL⁻¹ glucose 6-phosphate dehydrogenase (Sigma Aldrich; G6PDH) を添加して、ダブルビーム吸光度計 (PerkinElmer 社製, Lambda 25) で 595 nm の吸光度の時間変化を測定した。なお、実験は 3~4 回繰り返した。

D) NADPH オキシダーゼの定量と複合体解析

NOX の発現量と O₂ 産生レベルとの関係を調べた。まず、*C. marina* の強毒株 Ago03 および弱毒株 Ago04 から上述の方法でタンパク質を抽出し、SDS-PAGE を行った。*C. antiqua* の推定 NOX のアミノ酸配列 (Shikata et al. 2019) から作製したペプチド抗体 (ユーロフィンジェノミクス社へ発注) を用いて、ウエスタンブロッティング法で NOX の検出と定量を行った。

植物では NOX は活性化因子等と複合体を形成して、O₂ を産生することが知られている (Ma et al. 2018)。そこで、*C. marina* の NOX が複合体を形成しているかを検証した。強毒株 Ago03 および弱毒株 Ago04 から抽出したタンパク質を 2, 5, 8, 10 % の β -dodecyl maltoside で穏やかに可溶化し、Clear Native-PAGE (100V, 10 mM, 6 時間) でタンパク質を複合体の状態で分離した。NOX 抗体を用いて、ウエスタンブロッティング法で NOX の検出と定量を行った。

E) 魚毒性に及ぼす光合成阻害剤投与の影響

Chattonella の魚毒性に及ぼす光合成の影響を調べた。25°C; 14h:10hD (6:00~20:00 明, 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で *C. marina* 強毒株 Ago03 を培養し、6 L の培養液を準備した。*C. marina* 用培地 (改変 SWM-3 培地, 対照区), 培養液のみ, 終濃度 0.1 μM で光合成阻害剤 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) を添加して 1 日間培養した液を 30 cm 水槽に入れ、マダイ稚魚を 3 尾ずつ投入した。生死を最長 6 時間観察し、横臥したマダイはすぐに引き上げた。試験期間中、ヒーターおよびエアーを調節することで、水温を 25°C, 溶存酸素濃度を 5 mg L⁻¹ 以上の曝露条件を維持した。本実験は 2 回繰り返し、合計 6 匹中の生残率を算出した。

F) 現場における O₂ レベルを用いた魚毒性計測

現場において、発光法で計測した O₂ レベルと魚毒性との関係を鹿児島水産技術開発センタ

ーおよび東町漁業協同組合と共同で調べた。2019年9月3～4日、*C. antiqua* 赤潮の最盛期にあった八代海において、試験を実施した。試験魚は夜明け前に薄井で水揚げされた養殖ブリ(2.64～3.67 kg, 2年魚, 事前に4日間餌止め)を購入し、調査船(東町漁協鯨王丸)の生け簀で輸送した。船上検鏡しながら、*C. antiqua* 細胞密度の異なる4か所(薄井: 70 cells mL⁻¹, 湯ノ口: 320 cells mL⁻¹, 龍ヶ岳: 3,950 cells mL⁻¹, 御所浦南: 430 cells mL⁻¹)においてバケツで、1か所(龍ヶ岳南: 2,817 cells mL⁻¹)においてポンプで採水を行い、1トン容のパンライト水槽に8割程度の赤潮海水を満たした。L-012を用いたレベル計測、エアーのセット、種々の水質計測を行った後、ブリを2尾ずつ投入した。曝露開始8時間後まで、生死観察を行った。へい死したブリについては、鰓を採取してDavidson液で固定して持ち帰り、後日鰓組織を採取後、定法に従いパラフィン切片作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびPAS+アルシアンブルー染色を施して観察した。

4) 分析化学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

ア. LC/MS/MSによる魚毒成分探索

赤潮プランクトンを対象として、既知の毒性成分ギムノシン、アンフィジノール、パリトキシンおよびカーロトキシンについて、高速液体クロマトグラフィーハイブリット型質量分析装置(LC/QTOF)による分析を行った。ギムノシン以外の分析については、2018年度に*K. mikimotoi*, *Heterocapsa circularisquama*, *Chattonella ovata*, *C. marina*, *C. antiqua*, *A. leei*より採取したメタノール抽出液(紫加田ら 2019)を供した。ギムノシン分析用のサンプルは以下の手順で採取した。各プランクトンの培養液 50 mL を 3,000 rpm, 5 分間, 遠心分離器(BECKMAN COULTER, Allegra X-30R)にかけてペレットを作製した。ペレット試料に 5 mL の 100%アセトンを添加し、試料が熱くならないように注意しながら超音波破碎機(トミー精工, UR-20P)を用いてホモジナイズ後、さらに遠心分離(3,000 rpm, 5 分間)を行い、上澄みを褐色瓶に移して分析まで-20℃で保存した。

次に、2018年度にノンターゲット分析を行った結果、*H. circularisquama*の強毒株に特異的なMSスペクトルを見出した(紫加田ら 2019)。そこで、株数を増やして同様にLC/PDA/QTOF分析を行った。まず、*H. circularisquama* 11株を25℃, 14h:10hD(6:00～20:00明, 150 μmol m⁻² s⁻¹)の条件で培養した。より現場環境に近づけるために2018年度よりも弱い光で培養した。50 mLの培養液を3,000 rpm, 5分間, 遠心分離器にかけてペレットを作製した。ペレット試料に5 mLの100%メタノールを添加し、試料が熱くならないように注意しながら超音波破碎機を用いてホモジナイズ後、さらに遠心分離(3,000 rpm, 5分間)を行い、上澄みを褐色瓶に移して分析まで-20℃で保存した。さらに、*K. mikimotoi* 3株について*H. circularisquama*と同じ条件で培養して、上述の方法でアセトン抽出液を作製し、ノンターゲット分析を行った。

イ. 魚毒性と糖含有量の関係把握

*Chattonella*等の有害赤潮プランクトンの魚毒因子として、高い粘性を有する細胞外多糖が

想定されている (Jenkinson et al. 2007)。魚毒性の異なる赤潮プランクトン培養株についてフェノール硫酸法により細胞乾重量あたりの糖含有量を計測し、比較した。*C. antiqua* および *C. marina* の強毒株 6 株、弱毒株 5 株を試験に供した。各株を 25°C, 14h:10hD (6:00~20:00 明, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の条件で培養し、対数増殖期 (6,300~14,500 cells mL^{-1}) にある *Chattonella* の培養液 150 mL を遠心にかけてペレットを作製し、-20°C で冷凍保存した。乾燥試料に超純水添加し、超音波碎波機 (トミー精工, UR-21P) を用いてホモジナイズ後、遠心にかけて上清を回収して水溶性成分を得た。次に、水溶性成分に 100 % エタノールを添加して一晩 4°C で静置した後、遠心して上清除去、100 % エタノールを添加、超音波発生装置で不溶物を再懸濁させ、遠心にかけて上清除去を除去した。試料を風乾後、不溶物を超音波発生装置で懸濁させ、孔径 0.45 μm のシリンジフィルターで不溶物を除去した。得られた糖類の粗抽出液について、フェノール硫酸法による比色定量を行った。吸光度 (480 nm) はマイクロプレートリーダーによって測定した。なお、検量線作成のための全糖の標準品として、D (+)-Glucose を用いた。

5) 養殖魚の赤潮によるへい死の確定診断技術の開発

赤潮が直接の原因で変調をきたしている、あるいはへい死した養殖魚に特異的な病変は整理されておらず、特定されていないのが現状である。そこで、室内で各種有害赤潮プランクトンを曝露して瀕死状態となった魚体について組織解析を行った。*C. marina* 強毒株 (Ago03), *A. leei*, *A. tamarensis* に曝露して瀕死状態 (横臥) となったマダイ稚魚を Davidson 液で全身固定した。後日鰓組織を採取後、定法に従いパラフィン切片作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは PAS+アルシアンブルー染色を行って光学顕微鏡下で観察した。

(3) 結果及び考察

1) 分子生物学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

Blast2GO の Fisher's Extract Test を行い、*C. antiqua* および *C. marina* の強毒株における遺伝子発現の特徴を調べた。図 1 の横軸は Gene Ontology (GO) term, 縦軸はその GO term にアサインされた遺伝子数 (G) とアサインされなかった遺伝子数 (H) の比 ($G/H \times 100$ [%]) である。GO とは、遺伝子の機能に関する概念を定型的に整理したものである。今回解析対象とした全データセット (強毒株および弱毒株両方を含む) と比べると、強毒株では、光合成 (photosynthesis, thylakoid, plastid), NAD の代謝や NAD を介した生化学反応 (NAD biosynthetic process, L-aspartate oxidase activity, glucose 1-dehydrogenase [NAD(P)] activity), 酸化還元反応 (Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process, oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors), 抗酸化反応 (glutathione gamma-glutamylcysteinyltransferase activity, cellular oxidant detoxification, phytochelatin biosynthetic process, ferroxidase activity, ferroxidase activity, antioxidant activity) に関連する遺伝子群の比が高かった。これは強毒株が弱毒株と比べて O_2

産生レベルが高いことと矛盾しない結果である。恐らく、強毒株は光合成電子伝達系で生み出される高い還元力を NOX を介して細胞外に逃がすとともに、抗酸化物質などで処理すると推察された。今回ピックアップされた遺伝子は *Chattonella* の魚毒因子を特定するための基礎情報となるだけでなく、魚毒性の指標にもなる可能性がある。

2) 簡易アッセイ系を用いた魚毒性診断技術の確立と現場適用

ア. ワムシへの毒性を指標とする魚毒性診断法の確立

A) 14 株の植物プランクトンがワムシの生残に及ぼす影響

ワムシを用いた簡易アッセイによる 14 株の植物プランクトンの毒性評価を行った結果、既往知見 (Zou et al. 2010, Kim et al. 2019) と同様、3 株の *K. mikimotoi* はワムシに対して極めて強い毒性を示した (図 2)。また、*H. circularisquama* は、既往知見で示されている *H. circularisquama* (Kim et al. 2000) と同様に強い毒性を示した強毒株 (Kamo ax04 株)、やや毒性の低い株 (ax10-8 株) およびほとんど毒性のない弱毒株 (ax9-9 株) に分類することができた (図 2)。一方、*C. antiqua*, *C. marina*, *P. minimum*, *P. triestinum*, *T. pseudonana* および *S. marinoi-dohrnii* complex の高密度 (10^4 cells mL⁻¹) 曝露区においては、ワムシのへい死が認められなかった (図 2)。特に、*Chattonella* 属 4 株については、魚類への毒性が強い株 (NIES-1 株および Ago03 株) と魚類への毒性が弱い株 (4KGY 株および Ago04 株) の間にワムシに対する毒性の差異がないことから、本法は *Chattonella* 属のもつ魚毒性の評価には適さないことが明確になった。

以上の結果より、細胞サイズや曝露密度が異なるため本研究の結果だけでは種間における毒性の強弱を議論することはできないが、ワムシを用いた簡易アッセイは、少なくとも *K. mikimotoi* や *H. circularisquama* における同種の株間における毒性評価には有効であると考えられる。また、*K. mikimotoi* や *H. circularisquama* は 100 cells mL⁻¹ という低密度でも強い毒性を検出できるため、ワムシを用いた簡易アッセイは、発生初期から *K. mikimotoi* や *H. circularisquama* の持つ毒性評価に活用できる可能性がある。今後、現場で出現した *K. mikimotoi* や *H. circularisquama* の毒性評価にワムシを用いた簡易アッセイを導入するためには、本法による毒性評価と魚介類に対する毒性との関連性について詳細な検討を行うとともに、半数致死濃度などの指標を用いて毒性検出の閾値となる有害種の細胞密度を明らかにする必要がある。

B) ワムシを用いた簡易アッセイによる現場で発生した *C. antiqua* の毒性評価

現場赤潮海水を用いてワムシを用いた簡易アッセイの有効性について検証するために、2019 年 8 月 25 日に楠浦湾の 0 m, 1.6 m および 20 m 層から採水した *C. antiqua* 細胞を含む試料をワムシに曝露した。図 3 に示すように、すべての試験区においてワムシのへい死は認められず、この結果は図 2 に示した室内実験結果と一致した。また、2018 年 8 月に楠浦湾で採水した *H. circularisquama* を含む (450 cells mL⁻¹) 試料をワムシに曝露した結果、曝露開始後

4 時間で全てのワムシがへい死した (紫加田ほか 2019)。

以上の結果より、ワムシを用いた簡易アッセイは、現場で発生する *H. circularisquama* の毒性評価に有効であると考えられる。今後、さらに現場の採水試料でワムシを用いた簡易アッセイの実証試験を繰り返し、毒性判定可能な種、毒性検出の閾値となる種別の細胞密度およびアッセイ系の汎用性向上に関する検討が必要である。

C) ワムシを用いた簡易アッセイによる現場で発生した *K. mikimotoi* の毒性評価

楠浦湾の赤潮海水をワムシに曝露した結果、6 月 11 日の海水は曝露開始から 8 時間後においても生残率が 86.7%だったのに対し、6 月 17 日の海水は曝露開始から 4 時間後に全滅した (図 4)。6 月 11 日および 17 日の試料における *K. mikimotoi* の細胞密度は、それぞれ 8.8×10^2 cells mL⁻¹ および 1.1×10^4 cells mL⁻¹ と極めてあったことから、両試料の細胞密度の差がワムシに対する毒性発現に影響した可能性がある。一方、*K. mikimotoi* の室内培養株は 100 cells mL⁻¹ でワムシに対して強い毒性を示すのに対し (図 2)、現場で発生した *K. mikimotoi* 細胞は 1.1×10^4 cells mL⁻¹ で毒性を示したことから、ワムシに対する毒性が低かった可能性がある。また、この結果は、*H. circularisquama* で確認された株間の毒性の差異であった可能性に加え、輸送等のストレスなどにより *K. mikimotoi* 細胞の活性が低下していた可能性も考えられる。

以上の結果より、ワムシを用いた簡易アッセイは、現場に出現した *K. mikimotoi* の持つ毒性を検出可能であるが、毒性の過小評価を避けるためには現地で簡易アッセイが実施できる体制を構築することが望ましいと考えられる。

イ. 溶血活性を指標とする魚毒性診断法の確立

溶血活性試験による 14 株の植物プランクトンの毒性評価を行った結果、*K. mikimotoi* (19IMR4 株) および *H. circularisquama* (Kamo ax04 株) の溶血活性は細胞密度依存的に上昇した (図 5)。また、*K. mikimotoi* (KU9 株, ax69-9 株) および *H. circularisquama* (ax10-8 株) について、活性は上記 2 株に比べて低いものの細胞密度依存的に上昇した (図 5)。一方、ワムシに対してほとんど毒性のない *H. circularisquama* (ax9-9 株) からは、溶血活性も検出されなかった (図 5)。同様に、ワムシに毒性のない *C. antiqua*, *C. marina*, *P. minimum*, *P. triestinum*, *T. pseudonana* および *S. marinoi-dohrnii* complex からは、溶血活性もほとんど検出されなかった (図 5)。特に、*Chattonella* 属 4 株については、魚類への毒性が強い株 (NIES-1 株および Ago03 株) と魚類への毒性が弱い株 (4KGY 株および Ago04 株) の間に溶血活性の差異がないことから、本法はワムシを用いた簡易アッセイと同様、*Chattonella* 属の魚毒性評価には適さないことが明確になった。また、ワムシを用いた簡易アッセイや溶血活性試験および既往知見 (Cho et al. 2017) より、*K. mikimotoi* や *H. circularisquama* の魚毒性発現機構は *Chattonella* 属と大きく異なることが示唆された。

以上の結果より、溶血活性試験の結果はワムシを用いた簡易アッセイの結果とよく一致しており、*K. mikimotoi* や *H. circularisquama* の毒性評価には有効であると考えられる。ただし、低密度では毒性を検出することが困難であるため、本法は培養株の毒性の経年変化を確認す

る手法、およびワムシを用いた簡易アッセイによる毒性評価を担保するダブルチェック手法として有効であると考えられる。

ウ. 簡易アッセイ系で選抜された強毒株を用いた魚類および貝類への曝露試験

A) 赤潮プランクトンの魚類に対する曝露試験

楠浦湾で採水された *K. mikimotoi* の赤潮海水をマダイ稚魚に曝露した結果、図 6 に示すように、6 月 11 日および 17 日の海水を曝露されたマダイ稚魚は全ての区で生残し、異常行動も認められなかった。また、 O_2 レベルは低く、曝露前後で変化しなかった (図 6)。なお、試験終了まで DO は 5.7 mg L^{-1} 以上を維持していたことから、曝露試験中に魚類が酸欠を起こすリスクもほとんど無かったと判断された。また、*K. mikimotoi* の細胞密度も試験終了まで維持されていた。一方、*K. mikimotoi* の赤潮海水を曝露されたワムシは、6 月 11 日の試料では生残したが、6 月 17 日の試料では 4 時間後に全滅しており (図 4)、マダイ稚魚への毒性と一致しなかった。しかし、ワムシに対する毒性と溶血活性の検出可能な細胞密度が大きく異なるように、*K. mikimotoi* の毒性に対する魚類の感受性も異なると考えられる。また、前述したように、現場の採水試料は輸送等のストレスにより *K. mikimotoi* 細胞の活性が低下していた可能性も考えられる。今後は、各試験における適切な細胞密度の検討や現地で試験を実施できる体制の構築が必要である。

B) 赤潮プランクトンの二枚貝に対する曝露試験

簡易アッセイ (ワムシの曝露試験および溶血活性試験) で検出された毒性と二枚貝に対する毒性との関連性について検証するために、アサリを用いた *K. mikimotoi* の曝露試験を実施した。曝露開始から 72 時間後においても、2 株の *K. mikimotoi* (ax69-9 株および 19IMR4 株) は、アサリに対する致死作用を示さなかった (図 7)。また、*K. mikimotoi* 細胞の懸濁状況を推定するために各試験区における *in vivo* クロロフィル蛍光値を測定した。この結果、2 株の *K. mikimotoi* 曝露区では経時的に *in vivo* クロロフィル蛍光値が減少しており、19IMR4 株曝露区において大幅な *in vivo* クロロフィル蛍光値の減少が認められた (図 7)。一方、本研究では、*H. circularisquama* の曝露時にアコヤガイで認められる継続的な閉殻現象 (Nagai et al. 2006) は観察されなかったが、アサリからの粘液分泌が *K. mikimotoi* 曝露区でのみ観察されたこと等から、試験水中の経時的な *in vivo* クロロフィル蛍光値の減少は、アサリの粘液に *K. mikimotoi* 細胞が吸着して沈殿したことに起因すると考えられる。以上のように、*K. mikimotoi* はアサリに対して何らかの影響を与えていることが示唆されたものの、簡易アッセイで検出された毒性との関連性を明確にすることができなかった。今後は、アサリに対する *K. mikimotoi* の曝露密度や増殖段階の検討、供試貝類の種や殻長の検討および毒性の強い新規培養株の樹立等を進める必要がある。

C) 赤潮プランクトンの巻貝に対する曝露試験

楠浦湾の *K. mikimotoi* 赤潮海水をクロアワビ稚貝に曝露した結果、6 月 11 日および 17 日の

海水を曝露されたクロアワビ稚貝にへい死個体は認められなかった（図 8）。また、触診に対する応答も良好で、行動不能などは生じていなかった。同様に、室内培養株 3 株の *K. mikimotoi*（19IMR4 株、KU9 株および ax69-9 株）を曝露されたクロアワビ稚貝にもへい死個体は認められなかった（図 9）。近年、Kim et al. (2020) は、3 株の *K. mikimotoi* をメガイアワビの稚貝（殻長 17.2 ± 1.3 mm）に曝露し、株によってメガイアワビの稚貝に対する毒性が大きく異なっており、メガイアワビに対して強い毒性を示した株は、 2.0×10^4 cells mL⁻¹ で 70% 程度の強い溶血活性を示すことを報告している。培養や試験条件が異なるため単純な比較はできないが、本研究で最も高い溶血活性を示した *K. mikimotoi*（19IMR4 株）の 2.0×10^4 cells mL⁻¹ における溶血活性は 40% 程度と推定されるため、本研究で使用した *K. mikimotoi* 株は Kim et al. (2020) の報告でメガイアワビの稚貝をへい死させた *K. mikimotoi* 株と比較して毒性は低かった可能性がある。また、供試生物の種や殻長（成長段階）が異なること等も、簡易アッセイで検出された毒性との関連性を明確にすることができなかった原因であると考えられる。

エ. 簡易アッセイ系による毒性評価に関する今後の課題

以上のように、ア. ～ウ. で示してきた簡易アッセイ系を用いた魚毒性診断手法と魚介類への毒性に関する検討の結果、ワムシや溶血活性による簡易アッセイは、*K. mikimotoi* や *H. circularisquama* の持つ潜在的な毒性を定量的に評価できる可能性がある。しかしながら、本年度の試験結果では簡易アッセイで検出された毒性と魚介類に対する毒性との関連性を明確にできなかったことから、今後は供試生物の種や増殖・成長段階、曝露密度および試料採集・運搬等を含む試験体制の構築を進める必要がある。

2) 活性酸素計測法の開発、現場適用

ア. O₂ 計測法の確立

A) 発光生物が化学発光法による O₂ 検出に与える影響

化学発光法による O₂ 検出に与える発光生物の影響を明らかにするために、現場で発生した *N. scintillans* の赤潮海水を用いて発光測定を行った。化学発光試薬を添加していない条件下において、*N. scintillans* の発光レベルは細胞密度依存的に上昇が検出した（図 9）。また、*N. scintillans* の発光レベルは、低密度（6.25 cells mL⁻¹）でも現場で測定される *Chattonella* の化学発光レベル（紫加田ほか 2019）と同等であることが明らかとなった（図 9）。さらに、この発光レベルは化学発光試薬や O₂ の特異的消去酵素の添加によってほとんど変動しないことから（図 9）、*N. scintillans* などの発光生物が試水に混在している場合は、化学発光法による O₂ の検出が極めて困難であると考えられた。

B) 発光生物からの影響低減手法の検討

A) の状況を踏まえて、発光生物由来の発光低減手法について検討を行った。図 10 に示すように、*N. scintillans*、*A. leei* および *A. tamarense* はいずれもルシフェラーゼ阻害剤添加の前後で発光レベルにほとんど差異が認められなかった。従って、今回用いたルシフェラーゼ阻

害剤の添加は、発光生物由来の発光低減手法として有効でないと判断された。

次に、試料からの発光生物の除去方法について検討を行った結果、*N. scintillans* を 150 μm のふるいによって除去した場合は、ろ液に $0.33 \pm 0.57 \text{ cells mL}^{-1}$ の *N. scintillans* 細胞が観察され、発光も検出された (図 11)。これに対し、100 μm のふるいを用いた場合は、ろ液に *N. scintillans* 細胞が観察されず、発光も検出されなかった (図 11)。従って、*N. scintillans* の除去には 100 μm のふるいが有用と考えられた。さらに、*N. scintillans* と *C. antiqua* の混合培養液を試料として 100 μm のふるいを用いた *N. scintillans* の除去効果について検討した結果、ろ過前に検出されていた *N. scintillans* 由来の発光がろ過処理により低減していることが化学発光レベルにより確認でき、ろ過処理した試料の $\text{O}_2^{\cdot -}$ レベルは *C. antiqua* のみをろ過した場合と同等であった (図 11)。

イ. 吸光度によるスーパーオキシドの検出法の検討

図 12 に示すように、*C. antiqua* の培養液に WST-1 を添加すると、経時的に吸光度が上昇した。ただし、30 秒程度で検出可能な化学発光法とは異なり、十分な吸光度の変化を検出するためには 2 時間程度の反応時間が必要であった。一方、吸光度 (WST-1) 法および化学発光法の両手法において、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ の特異的消去酵素の存在下で検出レベルが低下したことから (図 13)、両手法で検出される化学発光や吸光度の上昇は、*C. antiqua* および *C. marina* が産生する $\text{O}_2^{\cdot -}$ によるものと考えられた。

以上の結果より、吸光度 (WST-1) 法は化学発光法と比べて感度が低い、同様に $\text{O}_2^{\cdot -}$ の検出に有用である可能性が示唆された。今後、発光生物による影響や現場での測定を想定した測定条件等をはじめとして、今後さらに詳細な検討が必要である。

ウ. 活性酸素産生に及ぼす有害赤潮プランクトンの生理状態の影響把握

A) 強毒株および弱毒株の光合成解析と光合成関連タンパク質の定量

Net 光合成活性は、強毒株と比べて弱毒株において、 $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上の強光下で高いことが明らかとなった (図 14)。また、強毒株および弱毒株の光合成タンパク質の発現量を解析した結果、D1, FCP, FBPase の発現量は強毒株および弱毒株の間で同程度であったが、Rubisco の発現量は弱毒株の方が強毒株より約 4 倍高かった (図 15)。これらの結果から、弱毒株は強毒株よりカルビン回路の活性が高いことが示唆された。弱毒株の Net 光合成活性が高いことも Rubisco の高発現によることが考えられる。

B) $\text{O}_2^{\cdot -}$ レベルに及ぼすカルビン回路阻害剤の影響

3 mM GA 存在下で $\text{O}_2^{\cdot -}$ レベルを測定した結果、強毒株では添加後 30 分間で $\text{O}_2^{\cdot -}$ が著しく上昇し、その後 3 時間高いレベルを維持した (図 16)。一方で弱毒株では、GA 存在下でも極めて低いレベルであった。これらの結果から、強毒株ではカルビン回路が阻害されることによって、蓄積した NADPH が NOX の基質として使われ、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 産生が増大したことが示唆された。一方、弱毒株は何らかの理由で NOX 活性が低いために GA 存在下でも $\text{O}_2^{\cdot -}$ レベルがほとんど変化しなかったことが示唆された。