

一つは組織の固定法である。従来から魚介類の組織解析に用いられている Davidson 液などの固定液では、形態を留めた状態で *Chattonella* などの赤潮プランクトンを固定することが難しい。本研究では、赤潮プランクトン用の固定液や無固定による赤潮による養殖魚病変の解析法について検討した。

(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

18S rRNA の分子系統樹において、本研究で取得した *Chattonella*8 株は全て *Chattonella marina complex* のグループに属した (図 1)。この結果から、18S rDNA の配列で毒性を判定するのは困難であると考えられた。

これまでに取得した RNA-seq データから株ごとの NOX 遺伝子の変異パターンを抽出したところ、強毒 2 株と弱毒 2 株を明確に分ける変異として 3 つの塩基置換が同定されたが、うち 2 つは同義置換、1 つは 3'UTR に存在しており、いずれもアミノ酸変異を生じないものであった (表 1)。したがって、NOX 遺伝子を標的に毒性を判断するのは困難であると考えられた。しかしながら、このほかに個々の株のみに存在する変異が多数見つかっており、今後はそれらの変異が毒性へ影響する可能性を評価するとともに、本手法をトランスクリプトーム全体に拡張するよう、手法の改良を含めて検討する必要がある。

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

①異なる光および栄養塩条件下におけるワムシへの毒性、溶血活性、貝類への毒性診断法の検証 (水技研 [廿日市] , 北里大)

K. mikimotoi のワムシに対する毒性と溶血活性の同時計測試験において、ワムシに対する毒性は 100 および 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で他の光条件下と比べて低かったのに対し、溶血活性は暗所で高く、強光でわずかに高かった (図 2)。また、完全培地と比較して N および P 無添加培地でワムシに対する毒性が高かったのに対し、溶血活性は N 無添加培地のみで高かった (図 3)。以上の結果から、異なる光および栄養塩の条件下においてワムシに対する毒性と溶血活性は完全に一致しないことが判明した。ワムシに対する毒性は *K. mikimotoi* の細胞密度が 100 cells mL^{-1} 以下で検出可能であるが、溶血活性は 80,000 cells mL^{-1} 以上を要し、非常に検出感度が低い。従って、溶血アッセイは正確に *K. mikimotoi* の毒性を検出できていない可能性があり、そのことが今回の不一致の一因かもしれない。一方で、ワムシアッセイの結果から、*K. mikimotoi* の毒性が強光や暗所、栄養無添加といったストレス条件下で上昇することが新たに見出された。

K. mikimotoi のメガイアワビとワムシに対する毒性への同時暴露試験において、異なる光条件および栄養条件で培養した本種をメガイアワビへ暴露した結果を図 4 に示す。100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と比較すると、暗所および 1,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ においてへい死数がやや上昇する傾向が認

められたが、有意な差は認められなかった。本試験に使用した IMR04 株は強光および弱光下で培養が安定しなかったことが要因の一つと考えられた（図 5）。一方で、N および P 無添加条件におけるメガイアワビのへい死率はそれぞれ 93% および 100% であった。完全培地におけるへい死数と比較すると、P 無添加では有意にへい死率が高かった ($p < 0.05$, t-test)。栄養条件別試験は、光条件別試験 (25°C) とは異なる水温 (20°C) で実施したが、予備試験で N および P 無添加条件の培養株を暴露されたメガイアワビ稚貝は 25°C でも全滅することが確認されたため、水温の影響は小さいと考えられた。

次に、メガイアワビに暴露した *K. mikimotoi* 培養液を用いたワムシアッセイの結果を図 6 に示す。メガイアワビと同様に、異なる光強度間でへい死率に明確な差は認められなかった。また、N および P 無添加条件でもへい死率に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$, t-test)。上述したように、今回の試験において強光および弱光下で *K. mikimotoi* の培養が不安定であった。そのことが、本種の遊泳速度やワムシとの接触頻度に影響したことが一因かもしれない。また、今回は強毒株を使用したため毒性の変化が小さく、試験結果に反映されなかった可能性も考えられる。今後、他株を用いた再試験など今回の結果に関する検証が必要である。

②溶血活性計測およびワムシアッセイによる貝類に対する *K. mikimotoi* 毒因子の物性解明(水大校)

これまでに、*K. mikimotoi* は動物赤血球に対する強い溶血活性を有していることが報告されてきた (Arzul et al. 1994; Zou et al. 2010; Kim et al. 2020)。先行研究と同様に、*K. mikimotoi* 培養液は、光の有無に関係なく細胞密度依存的な極めて強い溶血活性を示した (図 7)。また、*K. mikimotoi* の細胞破碎液の溶血活性は培養液と比較して低く、明条件 (図 7a) における溶血活性の方が暗条件 (図 7b) より高い傾向にあった。よって、*K. mikimotoi* の細胞内には、数種の鞭毛藻類から見出された光依存型溶血活性物質 (Miyazaki et al. 2005; Kuroda et al. 2005) に類似する物質がわずかに存在している可能性がある。一方、*K. mikimotoi* の培養上清にはほとんど溶血活性が認められなかった (図 7)。これらの結果は、本種の細胞表面に局在する溶血活性物質が強い溶血を引き起こすという仮説 (Zou et al. 2010; Cho et al. 2017) を支持する。

次に、異なる細胞密度の *K. mikimotoi* をワムシに暴露し、半数致死濃度を指標とした毒性評価を試みた。その結果、*K. mikimotoi* の細胞密度に依存したワムシ致死率が得られ、2 時間半数致死濃度は $390 \text{ cells mL}^{-1}$ であった (図 8)。他方、令和 3 年度に、*K. mikimotoi* 暴露開始 24 時間後におけるクロアワビ稚貝およびメガイアワビ稚貝のへい死率がそれぞれ 50% および 55% であったことを報告した (紫加田ら 2021)。つまり、ワムシアッセイの結果から算出される 2 時間半数致死濃度が $400 \text{ cells mL}^{-1}$ 程度の場合、貝類のへい死リスクは 50% 程度であると推定される。今後、現場と室内の両面から更なる検討を行い、ワムシアッセイの半数致死濃度を指標とした貝類のへい死リスク評価手法の有効性を検証する必要がある。

最後に、様々な暴露条件下でワムシアッセイを実施し、本種が有する毒因子の化学的性状

および局在部位を推定した。図 9 に示すように、*K. mikimotoi* の凍結融解液は、プロテアーゼ阻害剤の有無に関係なくワムシに対して全く毒性を示さなかった。また、試料の冷凍保存や暴露試験にはガラス製の器具を使用しても毒性が検出されなかったことから、*K. mikimotoi* の毒因子はプラスチック吸着性を有するのではなく、低温でも活性を保持できない極めて化学的に不安定な物質であることが示唆された。一方、複数の暴露条件下でワムシアッセイを行った結果、培養液ではワムシに対する強い毒性が検出されたのに対し、培養上清、細胞破碎液、加熱処理した培養液および非接触条件ではワムシに対する毒性が全く検出されなかった（図 10）。これらの結果は先行研究（Zou et al. 2010）と完全に一致しており、*K. mikimotoi* の細胞表面に局在する溶血活性物質がワムシに対する致死効果に関与するという彼らの推察を強く支持する。また、加熱処理により毒性が失活したことから、本種の毒因子にはタンパク質の関与が示唆された。このことを受けて、遊泳を阻害しない濃度でトリプシン処理した *K. mikimotoi* 培養液をワムシに暴露した。暴露開始 1 時間後には、トリプシン処理区 ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ および $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) で有意なワムシに対する毒性の低下が認められたことから（図 11, $P < 0.05$ ）、タンパク質が *K. mikimotoi* の毒素本体もしくは毒性発現の過程で必要な化合物である可能性が示唆された。しかしながら、暴露開始 2 時間後以降は、トリプシン処理区における有意なワムシに対する毒性の低下は認められなかった。この結果は、試験開始時に試料が希釈されることによってトリプシンのタンパク質分解作用が持続せず、時間経過に伴い毒素が再び活性化（あるいは再生産）された可能性を示唆している。

3) 活性酸素レベルを指標にした魚毒性診断技術の確立と現場適用

①現場におけるスーパーオキシド (O_2^-) 計測法の確立と検証

令和 3 年 7 月 16 日、樋島東と大築島西の 2 地点で採取した赤潮海水および *Chattonella* をほとんど含まない薄井港のポンプアップ海水（対象区）にブリ 2 歳魚（餌止め 3 日目）を暴露した。樋島東で採取した赤潮海水は *Chattonella* を $492 \text{ cells mL}^{-1}$ の細胞密度で含んでおり、ブリは暴露開始 85 分、108 分後にへい死した（図 12）。大築島西で採取した赤潮海水は *Chattonella* を $6,800 \text{ cells mL}^{-1}$ の細胞密度で含んでおり、ブリは暴露 24 分、40 分後にへい死した。平成 29 年および令和元年に取得したデータも含めて、赤潮海水の魚毒性（1 尾目のへい死時間）と細胞密度、 O_2^- レベル間でスピアマンの順次相関係数を算出し、相関関係を調べた。なお、試験終了まで生残した個体のへい死時間は 360 分として計算した。その結果、細胞密度および O_2^- レベルいずれも魚毒性と有意な相関が認められた（図 13）。しかしながら、散布図より、細胞密度が $500 \text{ cells mL}^{-1}$ 未満の場合、細胞密度の値が近くても生残する場合とへい死する場合が両方存在することが確認された（図 12）。この点を踏まえると、細胞密度より O_2^- レベルの方が魚毒性の適確な指標となり得ると考えられた。

令和 3 年 7 月 19, 21, 22 日に各日 4 地点で採取した赤潮海水および *Chattonella* をほとんど含まない薄井港のポンプアップ海水（対象区）にブリ当歳魚（餌止め 1~2 日目）を暴露した。

暴露した海水中の *Chattonella* の細胞密度および O_2^- レベルはそれぞれ $0\sim 3,600\text{ cells mL}^{-1}$ および $0.03\sim 2.1\times 10^6\text{ Relative Luminescence Units (RLU)}$ の範囲にあった (図 14)。暴露 1 時間後のブリのへい死率は $0\sim 0.92$, 3 および 6 時間後のへい死率はともに $0\sim 1$ であった (図 15)。赤潮海水の魚毒性 (1, 3, 6 時間後のへい死率) と細胞密度, O_2^- レベル間で相関関係を調べた結果, いずれも有意な正の相関が認められた (図 16)。ただし, 魚毒性と 1 時間後のへい死率の相関係数は低めであった。

以上の結果より, O_2^- レベルは現場においても魚毒性の指標として十分活用可能と考えられた。細胞密度を算出するためには, 検鏡や種同定の技能が必要であるうえ, 現場で船上検鏡を行って即座に正確な値を出すためには極めて高度な技能と熟練, そして適性 (極めて船酔いしにくい体質など) が必要である。一方で, O_2^- 計測はルミノメーターさえあれば, 特別な技能や適性は必要なく, 1 海水試料あたり 5 分以内に結果を出すことができる。

② 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. 赤潮プランクトンの魚毒性に及ぼす Mn イオン濃度の影響

Mn 無添加培地で培養した NIES-1 株および Ago03 株の O_2^- レベルは, それぞれ完全培地のおよそ 7 分の 1 および 13 分の 1 であったが, ブリのへい死率に有意差は認められなかった (図 17)。Mn イオンは O_2^- の消去能を有するが, *Chattonella* の O_2^- 産生を阻害するわけではないと考えられている (Yamasaki et al. 2022)。すなわち, Mn イオンが海水中に高濃度に存在していても, *Chattonella* が鰓に付着あるいは接近する際に高濃度の O_2^- を放出し, 鰓に障害をもたらすことは可能である。本実験の結果はそのことを強く示唆するものである。しかしながら, 実際の現場 (九州沿岸域) には O_2^- レベルを下げるほどの濃度で Mn イオンは存在しておらず (Yamasaki et al. 2022), 現場における O_2^- レベルを指標とする魚毒性計測にそれほど影響はないと考えられる。

イ. NADPH オキシダーゼの定量法の確立

A. ペプチド抗体を用いた NOX の検出

NOX25216 に対するペプチド抗体を作製する際, エピトープとして NOX25216 の第 1 および第 2 膜貫通領域の間のループ部分にある Asp58-Thr75 配列を選択した (図 18)。得られたペプチド抗体を用いて *Chattonella* NIES-1 株の膜画分および可溶性画分をウエスタンブロッティング解析を実施したところ, 膜画分で 40 kDa 付近にバンドが検出された (図 19a)。しかし, このバンドは免疫前血清を用いても検出されたため, 非特異的なバンドだと考えられる。また, cDNA 配列に基づく NOX25216 の推定分子量 90 kDa とも大きく異なる。次に, 同じペプチド抗体を用いて Ago03 株の膜画分および可溶性画分をウエスタンブロッティング解析に供したところ, 膜画分で 80 kDa および 120 kDa 付近に明確なバンドが検出された (図 19b)。これらのバンドは免疫前血清を用いた場合には検出されなかった。しかし, その後同じウエス

タン分析を何度か試みたが、再現性は得られなかった。再現性が取れない理由として、*Chattonella* の NOX が細胞内プロテアーゼによって切断されやすいことが考えられる。今後、細胞から膜画分を単離する際に大量のプロテアーゼインヒビターを添加するなど、膜画分調製法を改良する必要がある。また、今回得られたペプチド抗体の特異性が低い可能性もあるので、別のエピトープを選択して新たにペプチド抗体を作製する必要もある。

B. アクリルアミドゲル中における *Chattonella* 膜画分の O₂⁻産生活性の検出

強毒株、弱毒株ともに NADPH 存在下で 480-720 kDa の位置に明確な NBT 染色バンドが検出されたが、DPI 存在下ではバンドが明確に薄くなった (図 20)。このことから、*Chattonella* の培養液中で検出される O₂⁻は NOX に由来する可能性が示唆された。また、NOX の推定分子量が 60-90 kDa であるため、*Chattonella* の NOX は高分子複合体を形成していることが考えられる。さらに、*in vivo* では O₂⁻産生レベルが極めて低い弱毒株において、*in vitro* で強毒株と遜色ない O₂⁻産生が検出されたことは、機序は不明だが細胞内で NOX 活性あるいはその他の O₂⁻産生プロセスに対する抑制作用が働いていることを示唆している。

4) 分析化学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

①LC/MS/MS による魚毒成分探索

Chattonella の強毒株と弱毒株の過酸化脂質について LC/MS 分析により分析した。Bligh and Dyer 法で抽出した *Chattonella* の脂質を 10%のアセトンを含むイソプロパノールに溶解し、遊離脂肪酸およびステロール脂質を中心に過酸化脂質を解析した結果、強毒・弱毒株間に不飽和脂肪酸と過酸化物の比率に差は見られなかった (図 21)。

Chattonella および *K. mikimotoi* の強毒株の暴露によって横臥したブリの鰓から脂質を抽出し、LC/MS 分析に供した結果、*K. mikimotoi* を暴露した鰓の脂質と対照区間でトータルイオンクロマトグラムに明確な差は見られなかった。一方で、*Chattonella* を暴露した鰓の脂質は対照区と比較してトータルイオンクロマトグラムが大きく変化していた (図 22a)。そこで、薄層クロマトグラフィーで脂質クラスを解析すると、*Chattonella* 暴露区と対照区間に脂質組成パターンに明確な差が確認され (図 22b)、バンドの濃さから *Chattonella* 暴露区で遊離脂肪酸の量が多いことが推察された。

毒性の異なる *K. mikimotoi* 2 株の脂質抽出液について、ノンターゲット分析を行い、魚介類の毒性と相関する化合物群を検索した結果、脂溶性化合物に毒性と相関を示す化合物は検出されなかった。

②魚毒性と糖含有量の関係把握

毒性の異なる *Chattonella* 培養株の単糖組成を解析した結果、NIES-1 株、4KGY 株は Ago03 株、Ago04 株と比較してガラクトースのモル濃度比が高く、グルコースのモル濃度比が低かった (図 23)。しかしながら、これらの違いは強毒株と弱毒株を区別するものではなかった。

毒性の異なる株間で魚毒性と細胞当たりの糖含有量に相関がないことは分かっているが（紫加田ら 2020）、今回、強毒株および弱毒株のグリコカリックス画分の糖濃度を定量した。その結果、強毒株の方が弱毒株より細胞当たりの糖含有量が有意に高いことが明らかとなった（図 24a）。また、グリコカリックス画分の細胞当たりの糖含有量は完全培地よりも魚毒性を高める N 無添加および P 無添加培地で有意に高いことが明らかとなった（図 24b）。以上の結果より、グリコカリックスの糖含有量は魚毒性に影響する可能性が示唆された。

5) 赤潮に暴露された魚介類の組織学的解析の手法検討

本研究では、魚介類用の固定液を使わずに赤潮プランクトンの暴露による鰓の変化を観察する方法を検討した。まず、化学固定を行わずに採取した鰓をそのまま青色光（BV）励起で赤潮プランクトンの自家蛍光を観察する方法を試した。ブリ稚魚（体長：3～6 cm、体重：7～8 g）に有害赤潮プランクトン *K. mikimotoi* (IMR04 株；23,250 cells mL⁻¹)、*Chattonella* (Ago03 株；7,300 cells mL⁻¹)、*Alexandrium leei* (6,200 cells mL⁻¹) を暴露した。横臥後すぐに取り上げて鰓を採取し、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、赤潮プランクトンは赤色、鰓は青色（Control [非暴露] 参照）の蛍光を発し、明確に区別できた（図 25）。*K. mikimotoi* は形態を留めたまま鰓に付着するが、他種に比べて付着量は少ないこと、*Chattonella* は細胞が破裂した状態で大量に鰓に粘着すること、*A. leei* は形態を留めたまま密集した状態で鰓に付着することが明らかとなった。この手法は、各種有害赤潮プランクトンが鰓にどのように付着するかを可視化できる画期的な手法と考えられる。

次に、固定液を用いずに瞬間凍結する方法を試した。手順は以下の通りである。

1. ビーカーに 2-メチルブタンを入れ、細かく砕いたドライアイスを入れて冷やし、アルミホイルのフタを被覆。
2. 包埋皿に O.C.T Compound（サクラファインテック）を適量添加。
3. ピンセットで鰓組織を 2. に入れ、O.C.T Compound を上から追加。
4. スパチュラ等で組織が平らになるように調整。
5. 包埋皿ごと i) に入れ、2 分間浸漬。
6. 包埋皿ごと取り出し、アルミホイルで包んで -80°C で保管。

後日、クリオスタット（LEICA CM1850）による凍結切片を作製した。蛍光顕微鏡下（青色光励起）で鰓組織を観察したところ、上述した鰓採取直後と同様に、赤潮プランクトンの付着を観察することができた（図 26）。しかし、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行って光学顕微鏡下で観察したところ、鰓組織は概ね崩壊していた。本手法では、赤潮プランクトンの付着状況を後日確認するための保存方法としては有効だが、付着以外の変化を観察するには作製後の処理および染色前の固定が重要であると考えられた。

さらに、*Chattonella* の形態を維持できる数少ない固定液として知られる片野液（Katano et al. 2009）を用いた組織解析法について検討した。まず、片野液で *Chattonella* (Ago03 株)、*K.*

mikimotoi, *A. leei* を固定し、形態変化などを調べた。固定液は Katano et al. (2009) で示された濃度で調整した液とろ過海水で 2 倍希釈した液を用いた。固定後は冷蔵保存 (4°C) した。*Chattonella* については、固定後すぐに細胞外の粘液 (グリコカリックス) が剥がれ、細胞同士が付着して細胞塊が形成された (図 27)。細胞塊の形成は 2 倍希釈区で比較的少なかった。ただし、片野液中で細胞の形態は概ね保持され、自家蛍光も少なくとも 2 か月間は維持された。*K. mikimotoi* については、細胞塊の形成もなく、形態も保持されたが、自家蛍光は赤色から青色へと変化していき、2 か月後には完全に青色となった (図 28)。*A. leei* については、*Chattonella* ほどではないが、固定直後に細胞塊が生じた (図 29)。また、固定直後に細胞塊中の細胞数を含めても細胞密度が低下したので、細胞の破裂などが起こった可能性が高い。しかしその後、細胞密度は維持され、自家蛍光の強度は若干低下したが、少なくとも 2 か月後までは十分に検出できた。

Chattonella を暴露したマダイ及びブリの鰓を片野液で固定し、パラフィン切片を作製した。HE 染色して検鏡したところ、Davidson 液による固定試料でアーティファクトとして認められる上皮細胞の剥離はほとんど観察されなかった (図 30)。また、マダイでは *Chattonella* 細胞と考えられる像を検出したが (図 31)、ブリでは見つからなかった。ブリにおける未検出の理由として、上述のように、*Chattonella* 細胞は崩壊した状態で鰓に付着することが考えられる。

以上のことから、片野液による固定は *Chattonella* や *A. leei* ではグリコカリックスの剥離や細胞塊の形成といったアーティファクトが生じるので、赤潮プランクトンの鰓への付着状況の観察には不向きである。しかしながら、片野液は上皮剥離などのアーティファクトを生じずに鰓を固定する能力を有する。また、*K. mikimotoi* に暴露された鰓の解析には、*K. mikimotoi* 細胞の付着観察も含めて十分活用できる。ただし、時間が経つと *K. mikimotoi* の自家蛍光が鰓の蛍光と同じ青色に変化するので、長期間の保存は難しい。

引用文献

- Arzul G, Gentien P, Crassous M-P. A haemolytic test to assay toxins excreted by the marine dinoflagellate *Gyrodinium cf. aureolum*. *Water Res.* 1994; **28**: 961-965.
- Cho K, Kasaoka T, Ueno M, Basti L, Yamasaki Y, Kim D-K, Oda T. Haemolytic activity and reactive oxygen species production of four harmful algal bloom species. *Eur. J. Phycol.* 2017; **52**: 311-319.
- Katano T, Yoshida M, Lee J, Han MS, Hayami Y. Fixation of *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae) using Hepes-buffered paraformaldehyde and glutaraldehyde for flow cytometry and light microscopy. *Phycologia* 2009; **48**: 473-479.
- Kim D, Sato Y, Oda T, Muramatsu T, Matsuyama Y, Honjo T. Specific toxic effect of dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000a; **64**: 2719-2722.

- Kim D, Nakamura A, Okamoto T, Komatsu N, Oda T, Iida T, Ishimatsu A, Muramatsu T. Mechanism of superoxide anion generation in the toxic red tide phytoplankton *Chattonella marina*: possible involvement of NAD(P)H oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 2000b; **1524**: 220-227.
- Kim D, Li W, Matsuyama Y, Matsuo A, Yagi M, Cho K, Yamasaki Y, Takeshita S, Yamaguchi Y, Oda T. Strain-dependent lethal effects on abalone and haemolytic activities of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Aquaculture* 2020; **520**: 734953.
- Kuroda A, Nakashima T, Yamaguchi K, Oda T. Isolation and characterization of light-dependent hemolytic cytotoxin from harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Comp. Biochem. Physiol. Part-C: Toxicol. Pharmacol.* 2005; **141**: 297-305.
- 松山幸彦. 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* に関する生理生態学的研究－II *H. circularisquama* の毒性および貝類斃死機構の解明. 水研センター研報. 2003 ; **9** : 13-117.
- Miyazaki Y, Nakashima T, Iwashita T, Fujita T, Yamaguchi Y, Oda T. Purification and characterization of photosensitizing hemolytic toxin from harmful red tide phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat. Toxicol.* 2005; **73**: 382-393.
- Ritz C. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2010; **29**: 220-229.
- Sagi M, Fluhr R. Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of Activity by calcium and by Tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 2001; **126**: 1281-1290
- 紫加田知幸, 北辻さほ, 坂本節子, 内田肇, 及川寛, 鈴木敏之, 山崎康裕, 内山郁夫, 西出浩世, 井口大輝, 中里礼大, 内海訓弘, 西山佳孝, 西槇俊之. 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. 平成 31 年度漁場環境・改善推進事業のうち栄養塩, 赤潮・貧酸素水塊に対する被害軽減技術等の開発. (2) 赤潮被害防止対策技術の開発報告書, 赤潮共同研究機関, 広島. 2020 ; 253-288.
- 紫加田知幸, 北辻さほ, 坂本節子, 内田肇, 及川寛, 鈴木敏之, 山崎康裕, 内山郁夫, 西出浩世, 井口大輝, 中里礼大, 内海訓弘, 高杉朋孝, 東條智仁, 吉満敏, 西山佳孝, 湯浅光貴, 西槇俊之, 勝村啓史, 小川元之. 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. 平成 31 年度漁場環境・改善推進事業のうち栄養塩, 赤潮・貧酸素水塊に対する被害軽減技術等の開発. (2) 赤潮被害防止対策技術の開発報告書, 赤潮共同研究機関, 広島. 2021 ; 238-257.
- Shikata T, Yuasa K, Kitatsuji S, Sakamoto S, Akita K, Fujinami Y, Nishiyama Y, Kotake T, Tanaka R, Yamasaki Y. Superoxide production by the red tide-producing *Chattonella marina* complex (Raphidophyceae) correlates with toxicity to aquacultured fishes. *Antioxidants* 2021; **10**: 1635.
- Yamasaki Y, Hirayama R, Yamamoto A, Yuasa K, Shikata T. Effects of micronutrients on the detection of extracellular superoxide produced by the harmful raphidophyte *Chattonella antiqua* in culture. *J.*

Zou Y, Yamasaki Y, Matsuyama Y, Yamaguchi K, Honjo T, Oda T. Possible involvement of hemolytic activity in the contact-dependent lethal effects of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* on the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Harmful Algae* 2010; 9: 367-373.

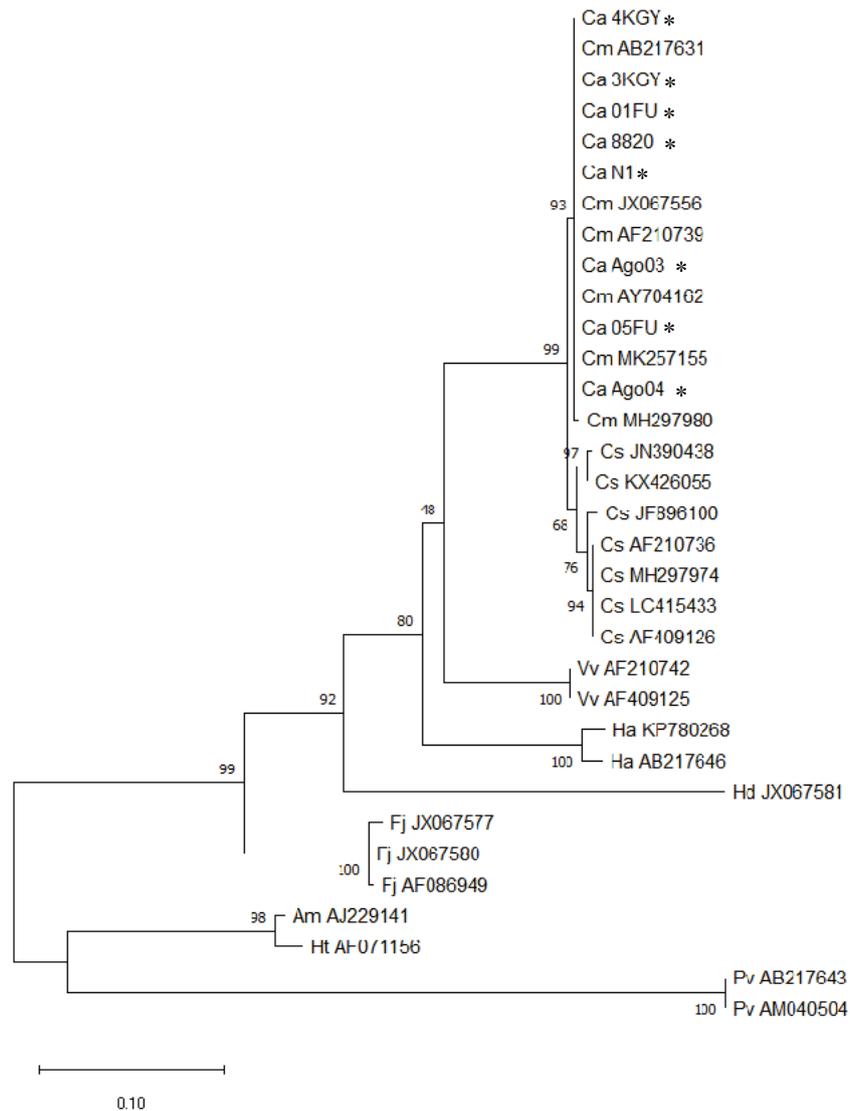


図 1. 18S rDNA の分子系統樹. 種名の後に記された番号は Accession ID, アスタリスクは本研究で使用した株. 以下, 種名の略記: Ca, *Chattonella antiqua*; Cm, *C. marina*; Cs, *C. subsalsa*; Vv, *Vacuolaria virescens*; Ha, *Heterosigma akashiwo*; Hd, *Haramonas dimorpha*; Fj, *Fibrocapsa japonica*; Am, *Abagrotis mirabilis*; Ht, *Halosiphon tomentosus*; Pv, *Pseudochattonella verruculosa*.

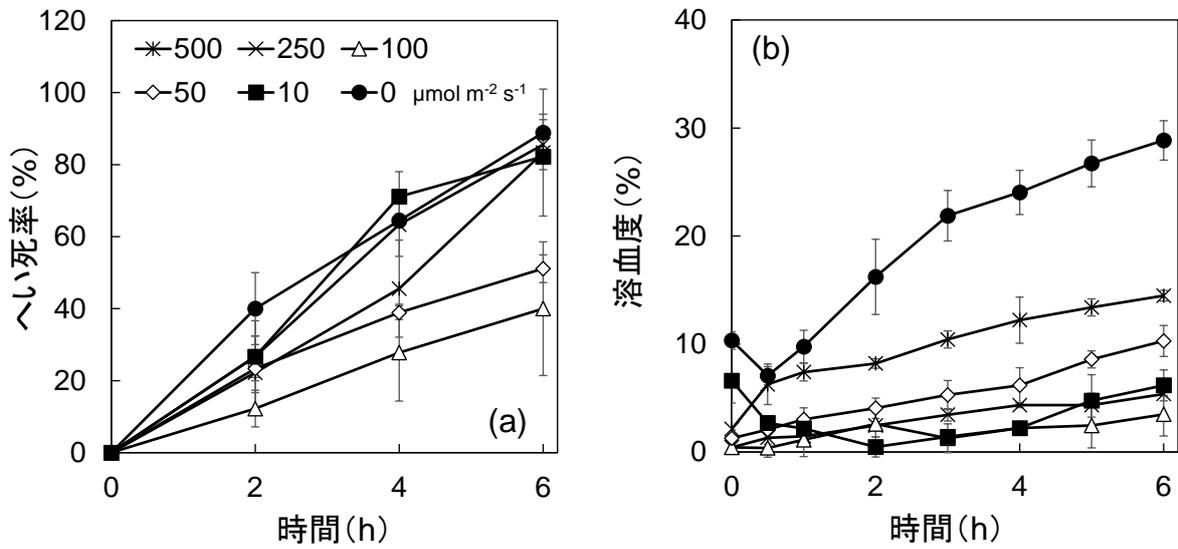


図 2. ワムシに対する毒性 (a) および溶血活性 (b) に及ぼす *Karenia mikimotoi* の培養条件 (光強度) の影響.

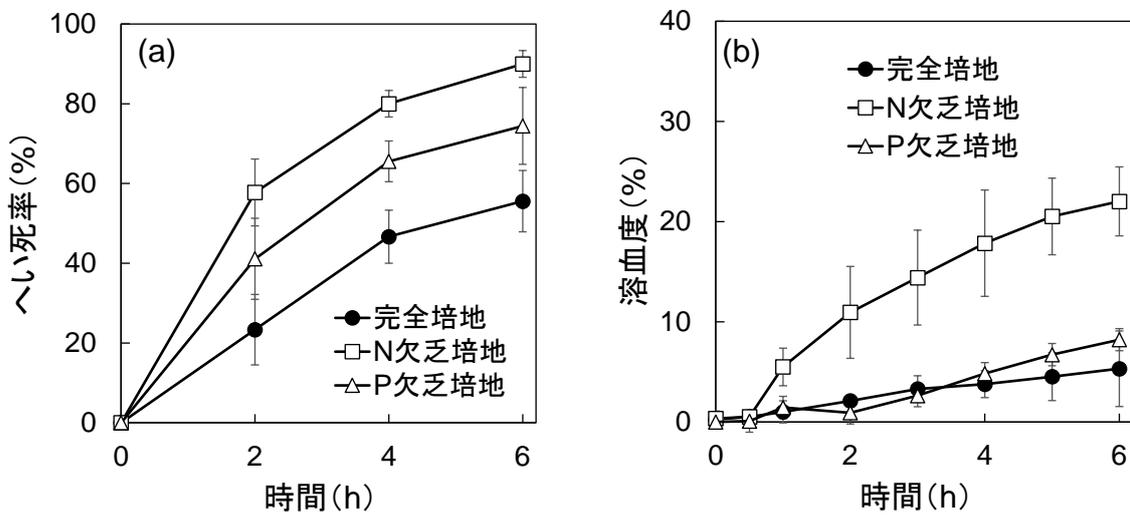


図 3. ワムシに対する毒性 (a) および溶血活性 (b) に及ぼす *Karenia mikimotoi* の培養条件 (光強度) の影響.

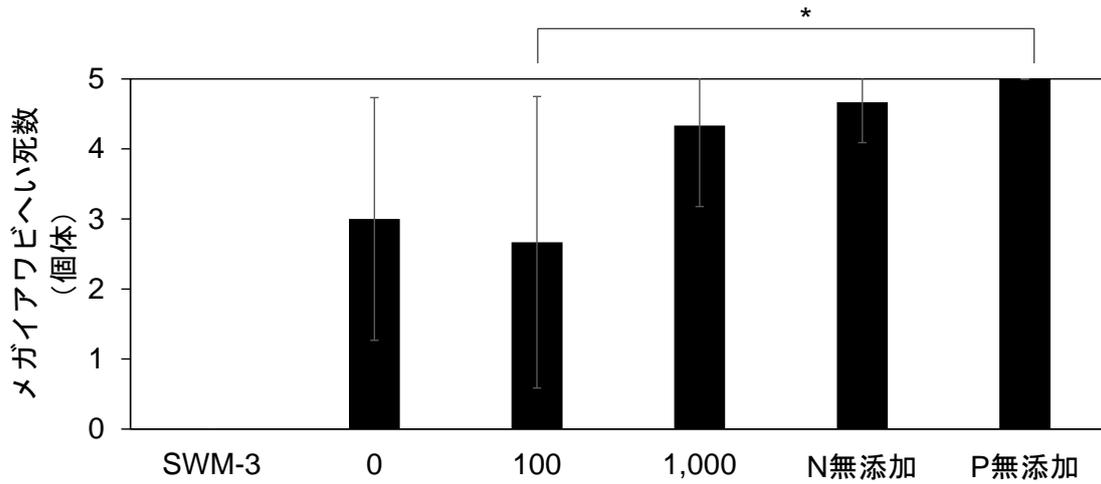


図4. メガイアワビのへい死に及ぼす *Karenia mikimotoi* の培養条件（光強度および栄養塩）の影響. アスタリスクは有意差が認められた区間 (* $p < 0.05$, Tukey HSD test)

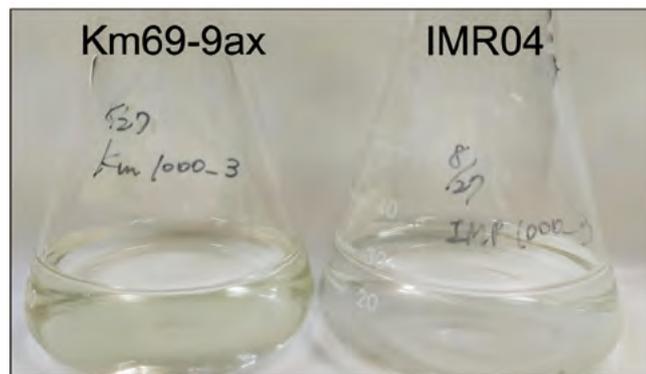


図5. 強光 ($1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で4日間培養した *Karenia mikimotoi*. Km69-6ax 株と比較して IMR04 株は強光下で高い細胞密度まで増殖しなかった.

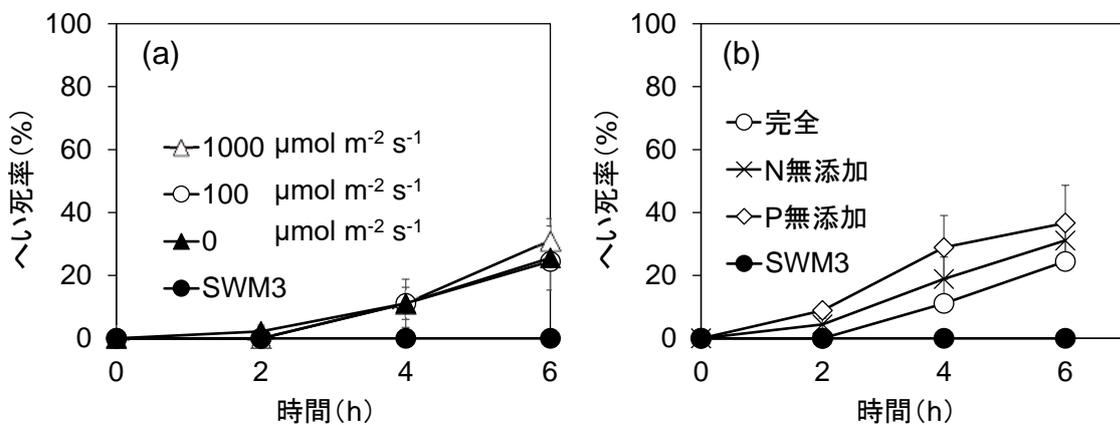


図6. ワムシのへい死率に及ぼす *Karenia mikimotoi* の培養条件 (a: 光強度, b: 栄養塩) の影響.

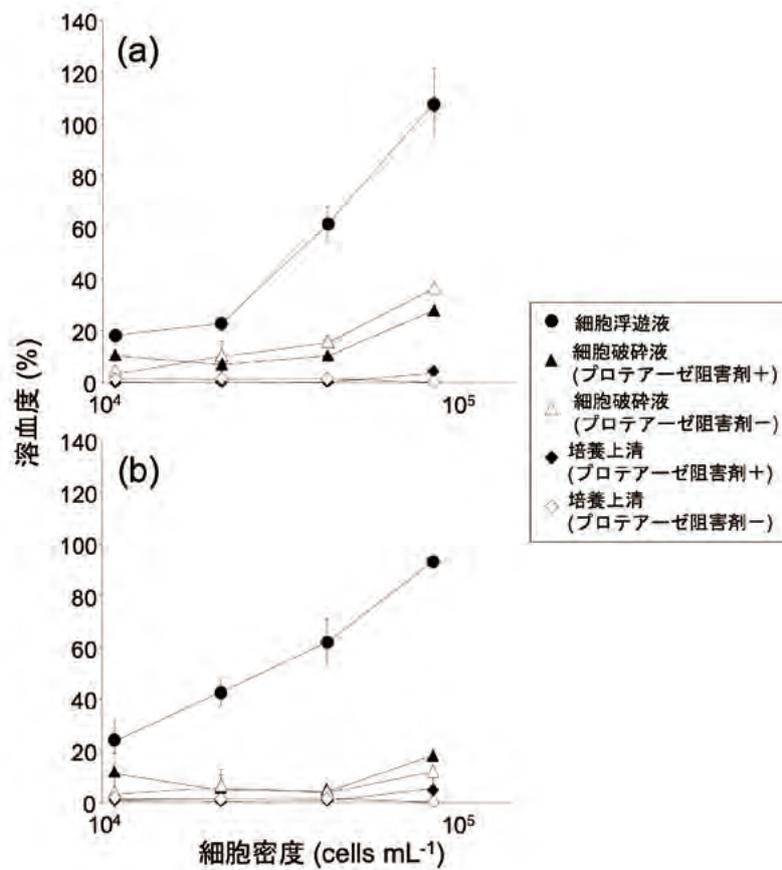


図 7. 明条件下 (a) および暗条件下 (b) における *Karenia mikimotoi* の培養液、細胞破碎液および培養上清の溶血活性.

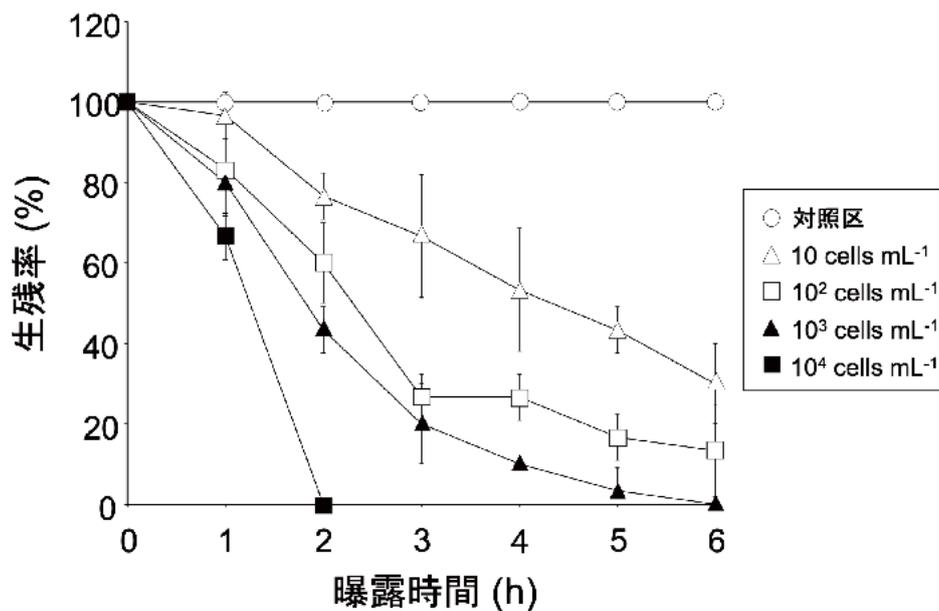


図 8. 細胞密度別の *Karenia mikimotoi* のワムシに対する毒性.

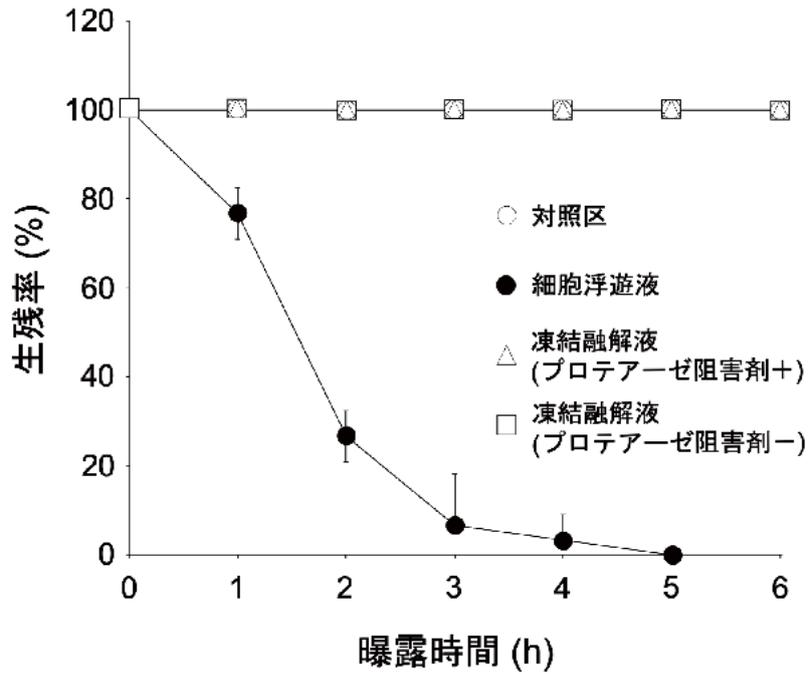


図 9. *Karenia mikimotoi* 培養液および凍結融解液のワムシに対する毒性.

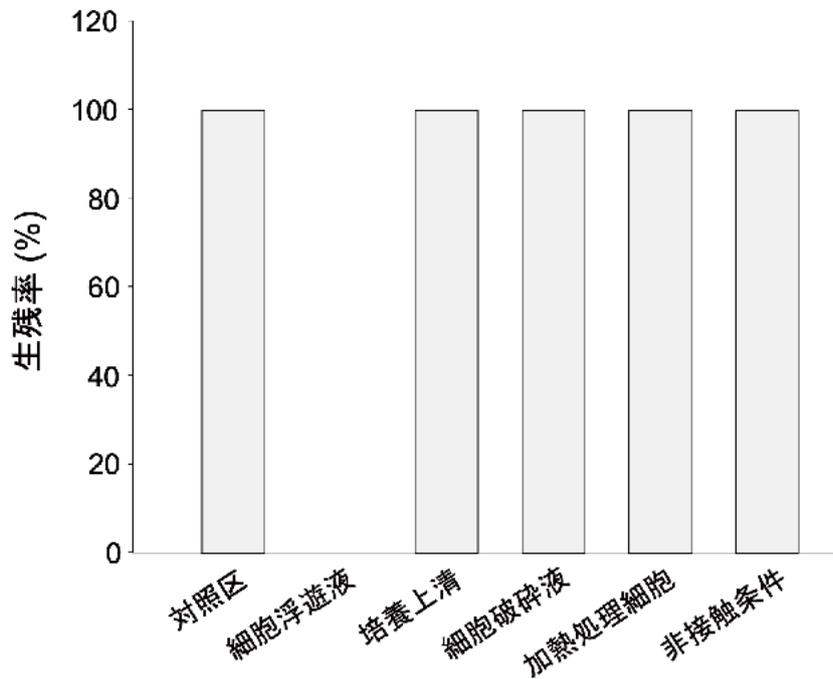


図 10. 各種処理を行った *Karenia mikimotoi* 培養液のワムシに対する毒性.

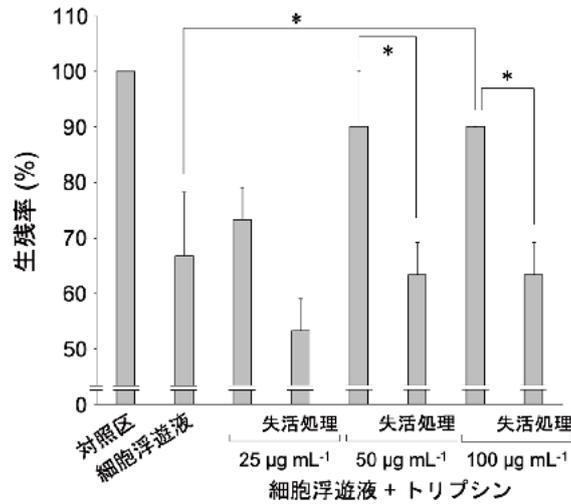


図 11. *Karenia mikimotoi* 培養液のワムシに対する毒性に及ぼすトリプシン処理の影響. アスタリスクは統計的に有意な差が認められた区間 (* $p < 0.05$, t-test) .

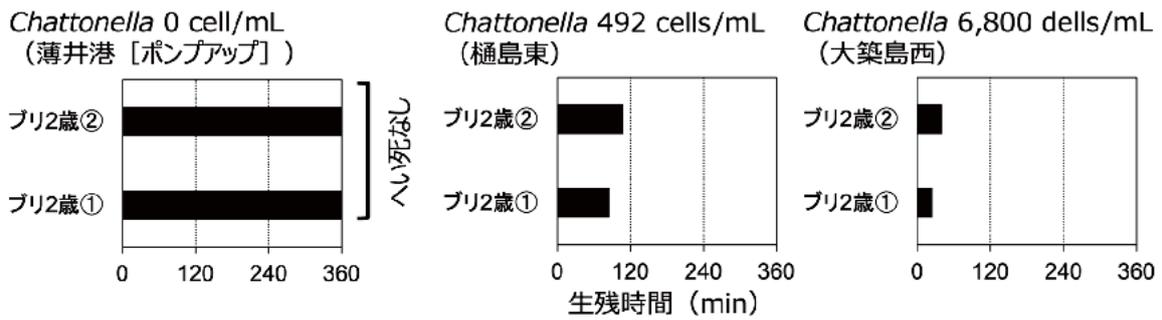


図 12. 八代海における 2 歳ブリへの赤潮海水暴露試験の結果.

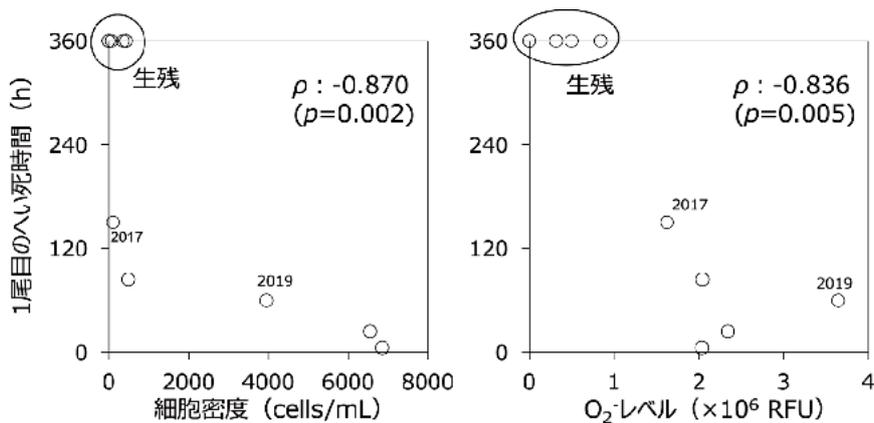


図 13. 2 歳ブリのへい死時間と細胞密度, O₂-レベルとの関係. 2017, 2019, 2021 年のデータをマージ. 2017 年, 2019 年のブリはそれぞれ指宿山川産, 東町漁協管内産で, 餌止め 3~5 日目で供試.

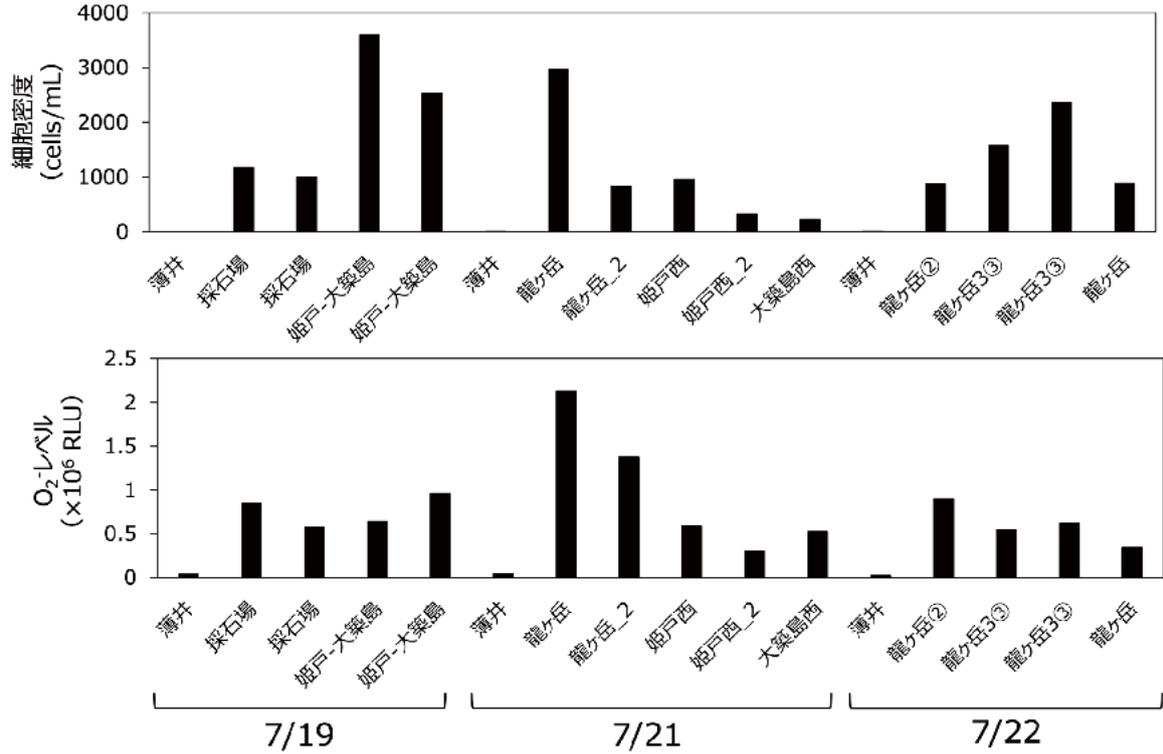


図 14. 当歳ブリの暴露試験時の細胞密度, O₂レベル.

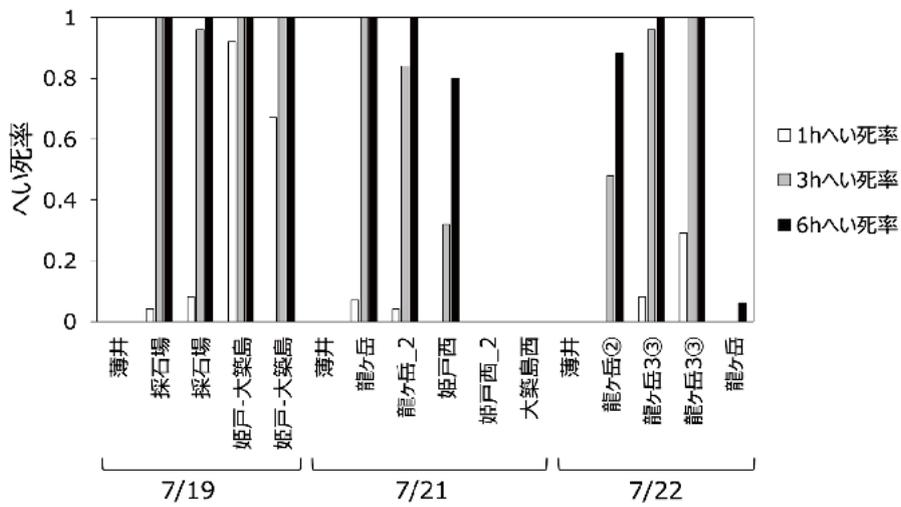


図 15. 当歳ブリのへい死率.