

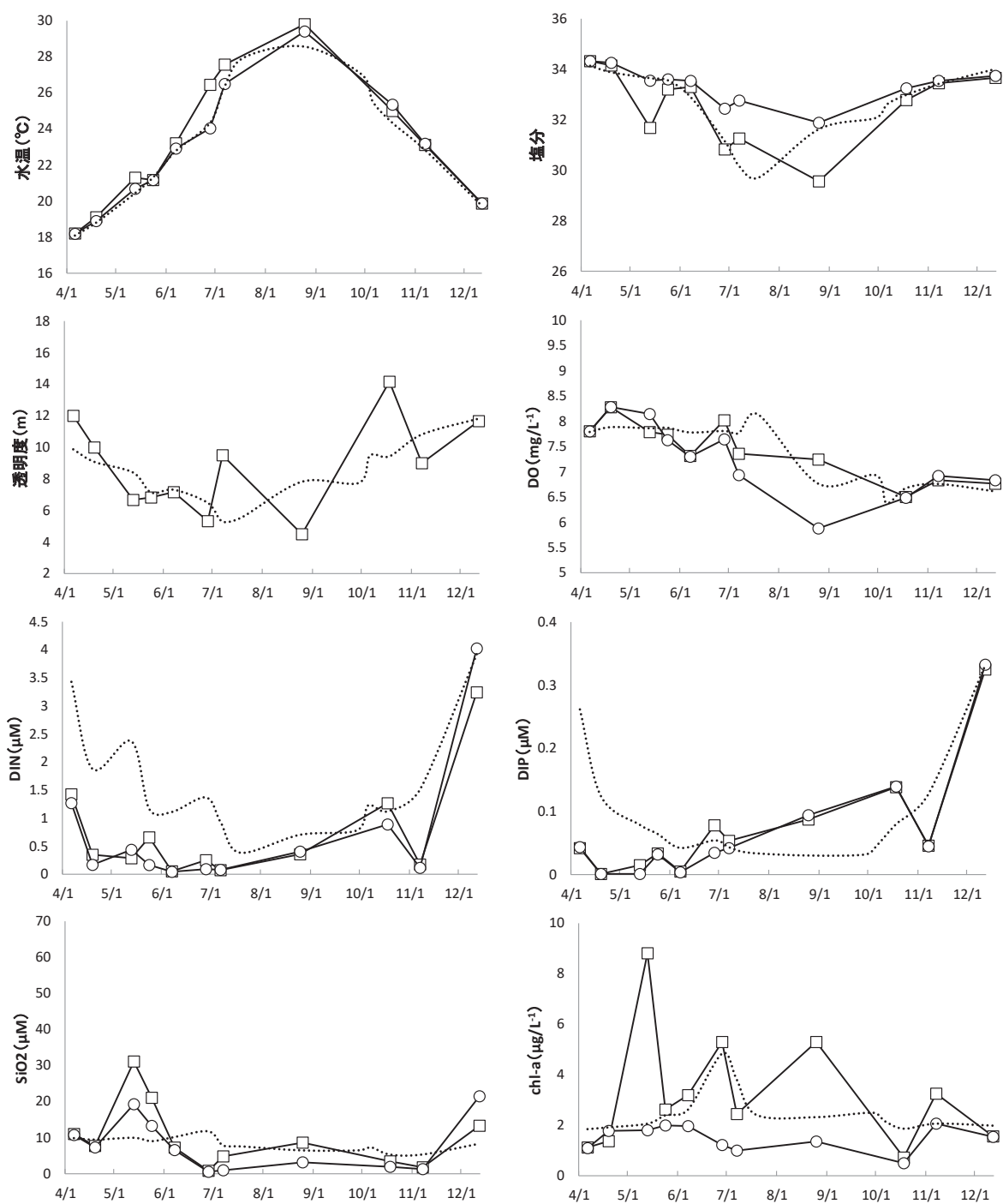


図 35. 鹿児島湾央における環境条件の推移. □ : 表層, ○ : 10 m 層, 点線 : 表層平年値.

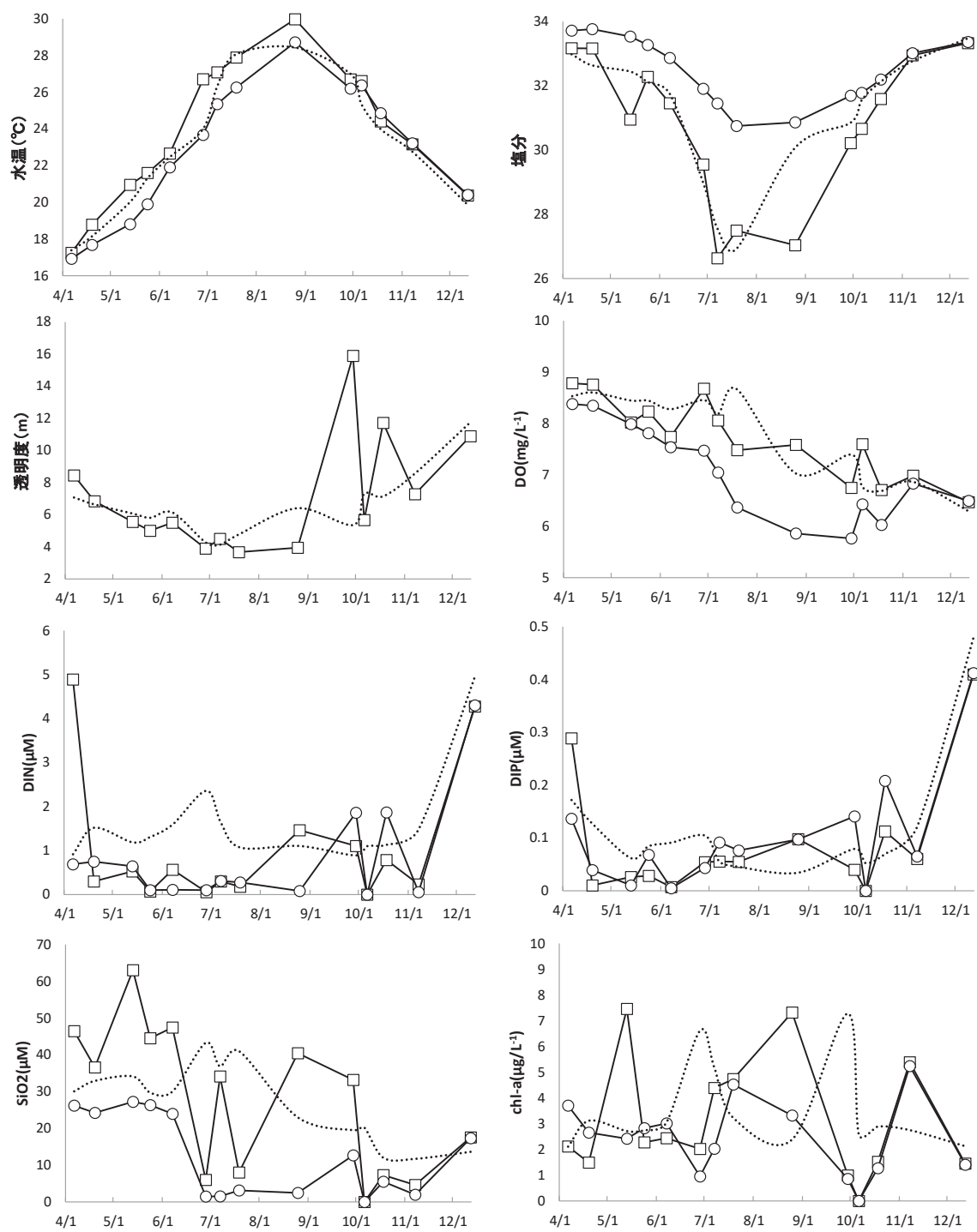


図 36. 鹿児島湾奥における環境条件の推移. □ : 表層, ○ : 10 m 層, 点線 : 表層平年値.

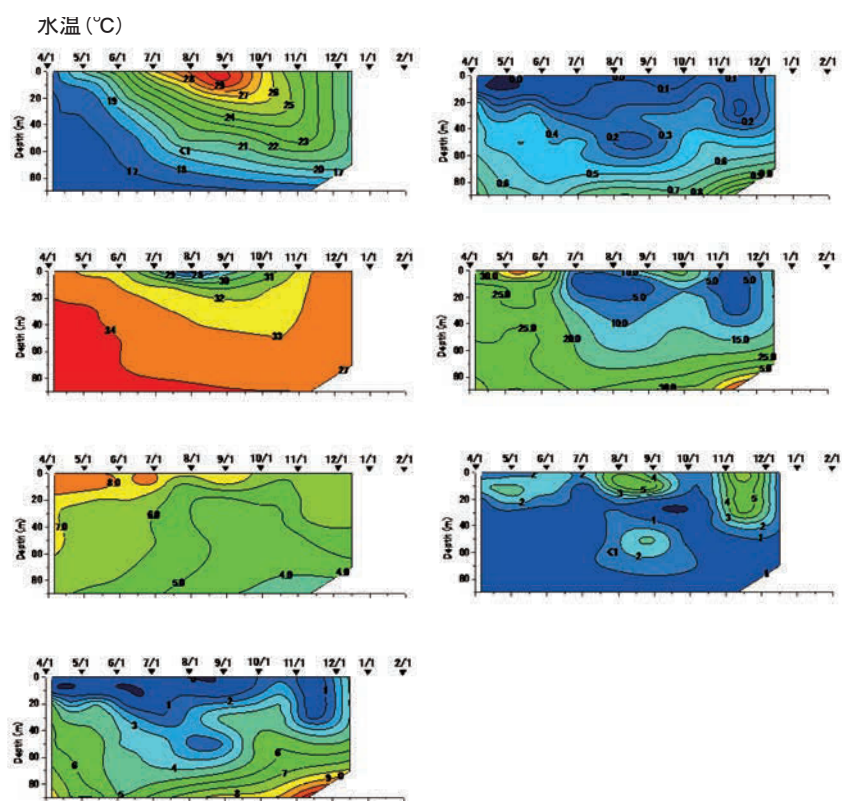


図 37. Stn.⑪における環境条件のイソプレット.

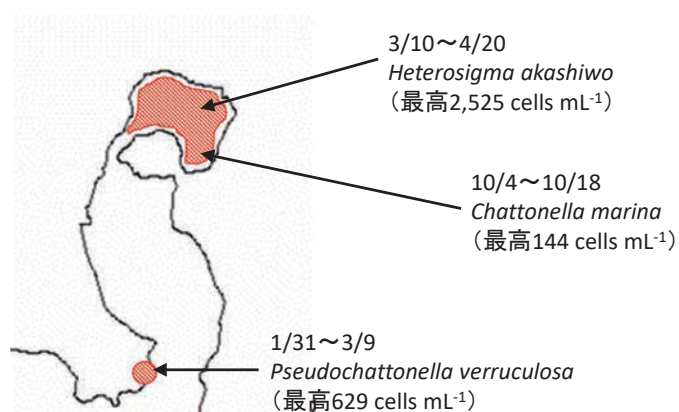


図 38. 2022 年に鹿児島湾で発生した赤潮.

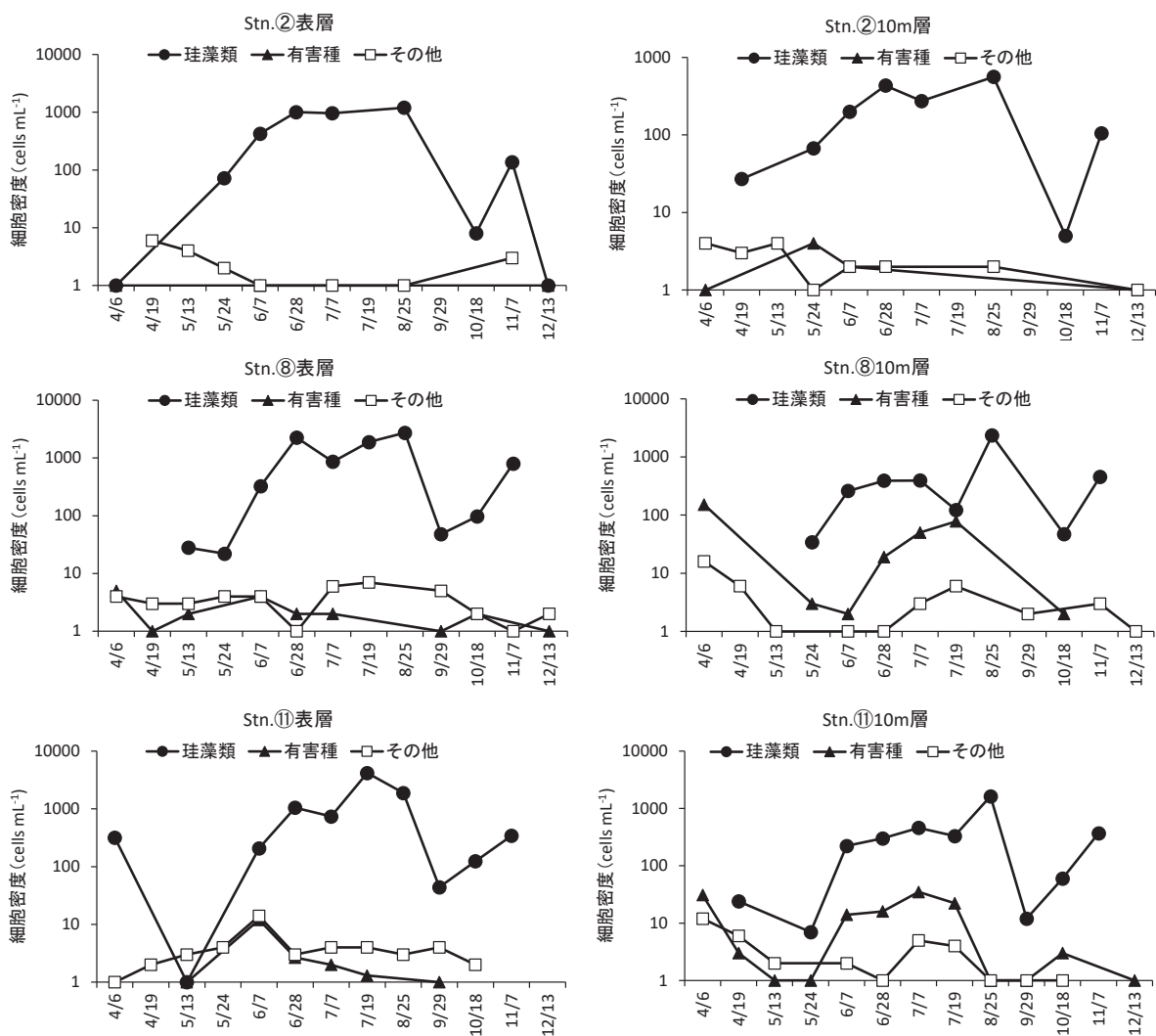


図 39. 鹿児島湾における植物プランクトンの組成変化 (Stn. ②, ⑧, ⑪).

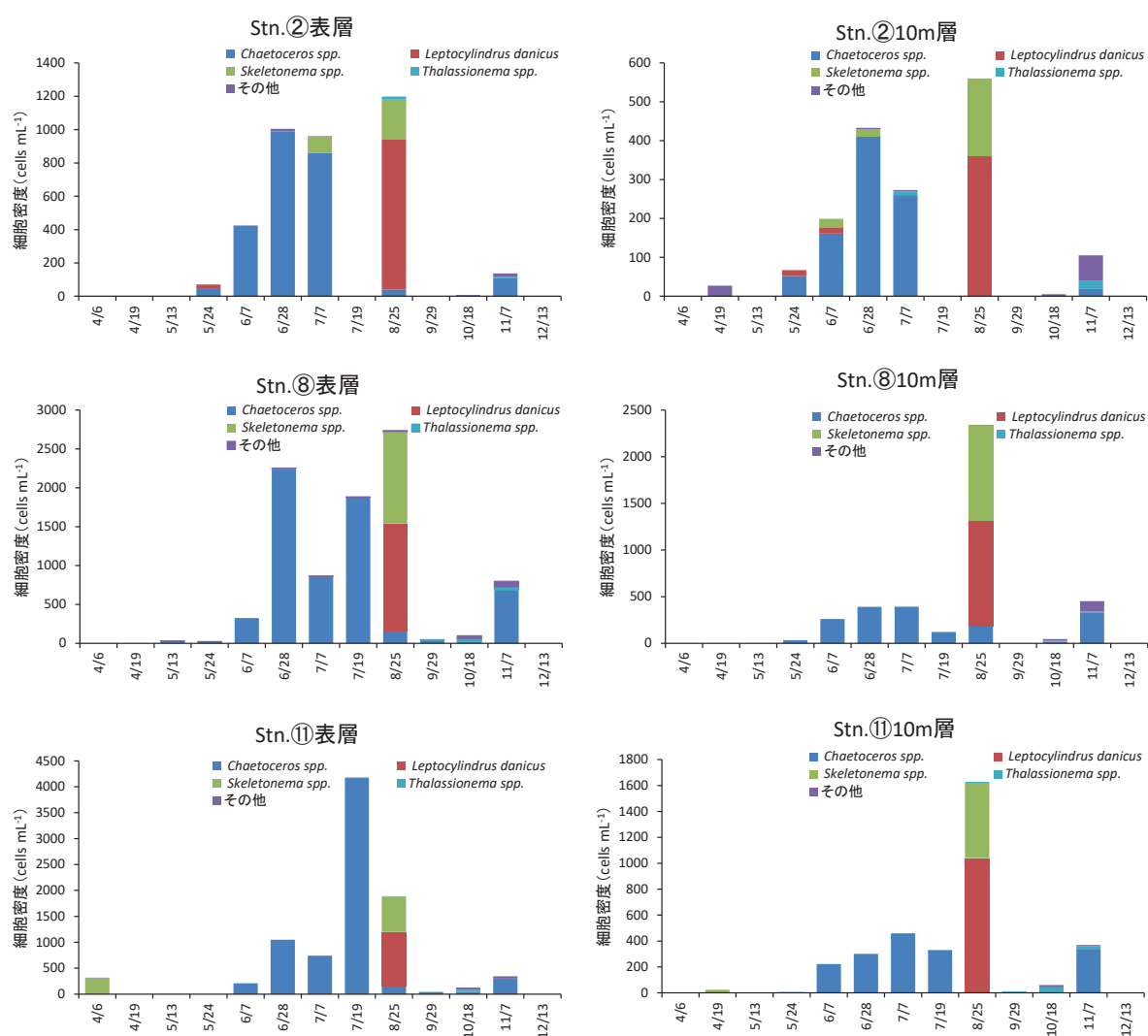


図 40. 鹿児島湾における珪藻類の種組成変化 (Stn. ②, ⑧, ⑪).

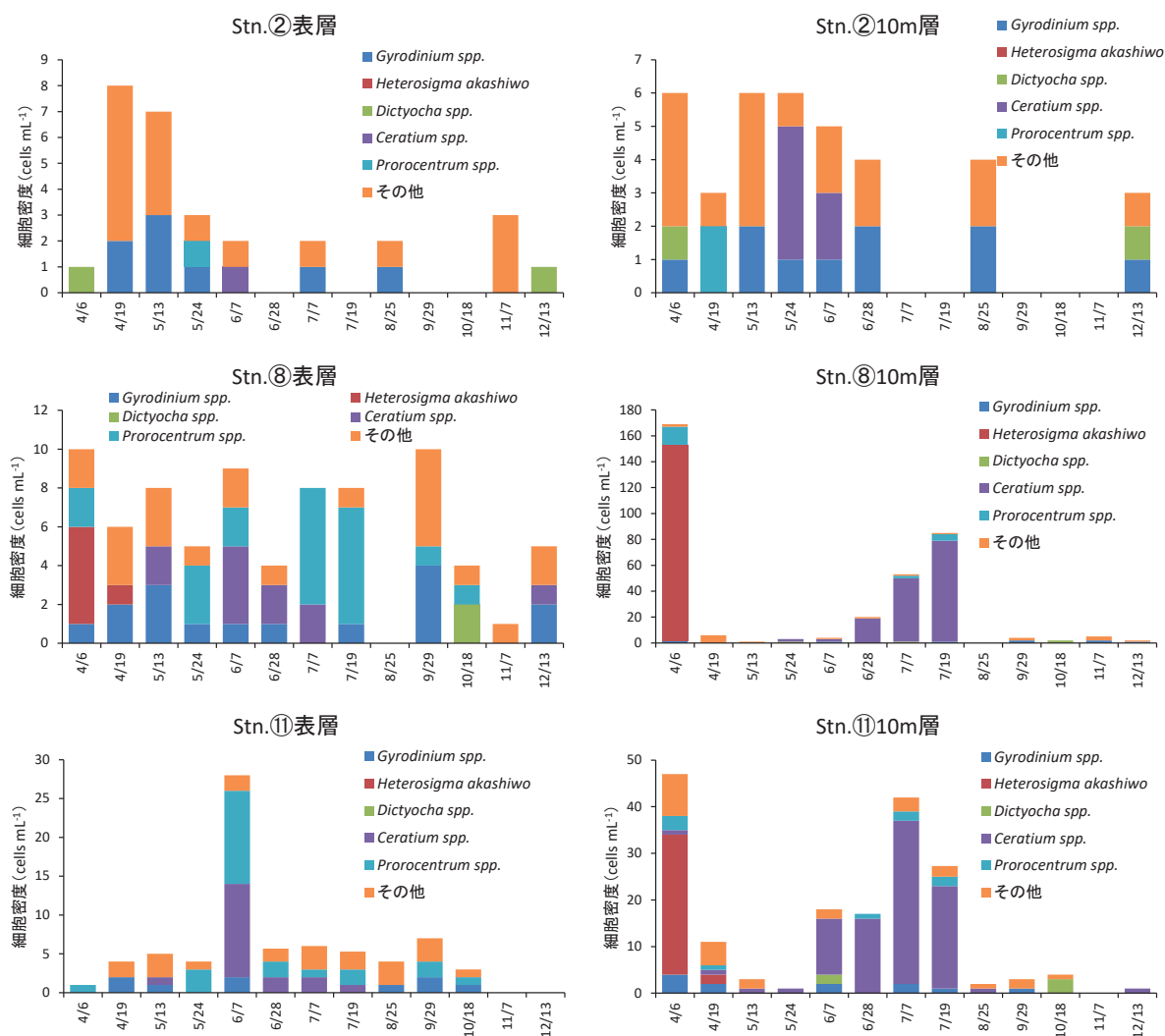


図 41. 鹿児島湾における鞭毛藻類の種組成変化 (Stn. ②, ⑧, ⑪ 表層).

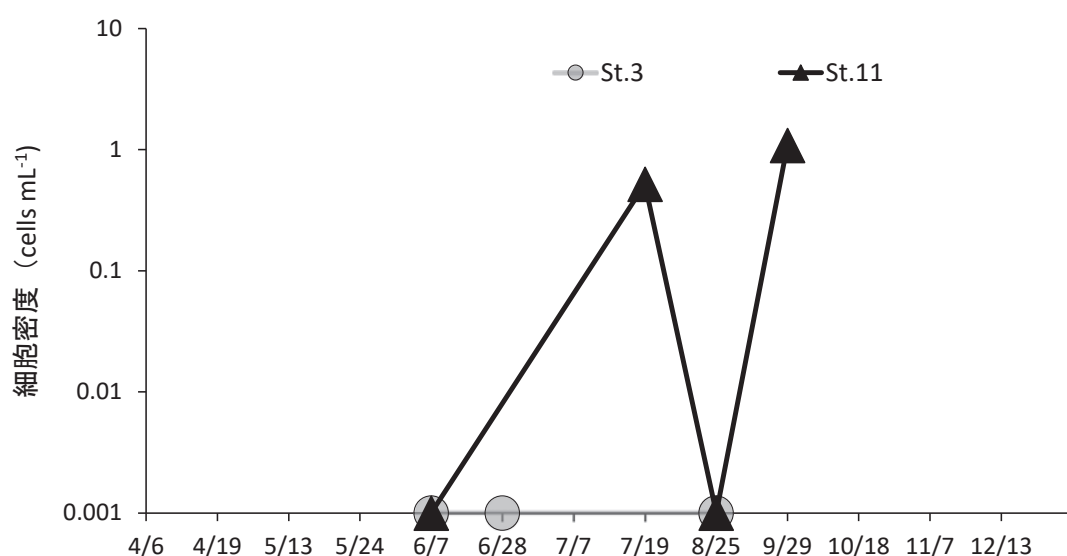


図 42. 鹿児島湾における *Chattonella* spp. の細胞密度の推移 (Stn. ③, ⑪ 表層).

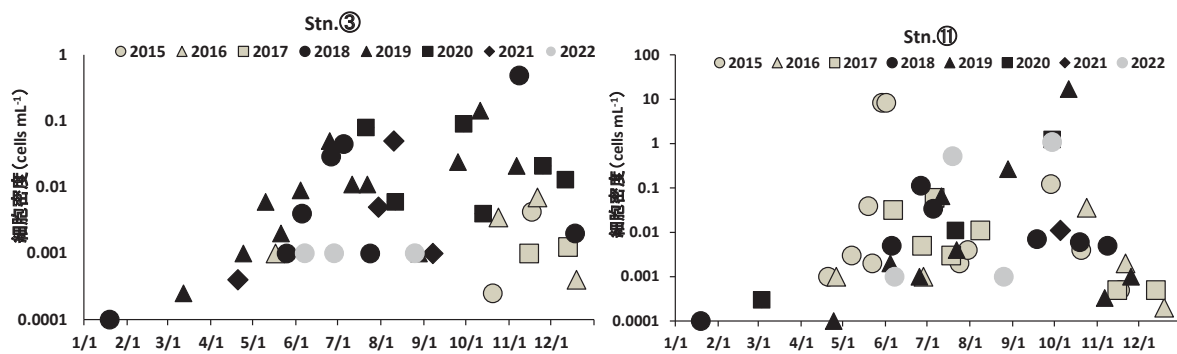


図 43. 2015 年以降の鹿児島湾における *Chattonella* spp.細胞密度の推移 (Stn.③, ⑪表層).

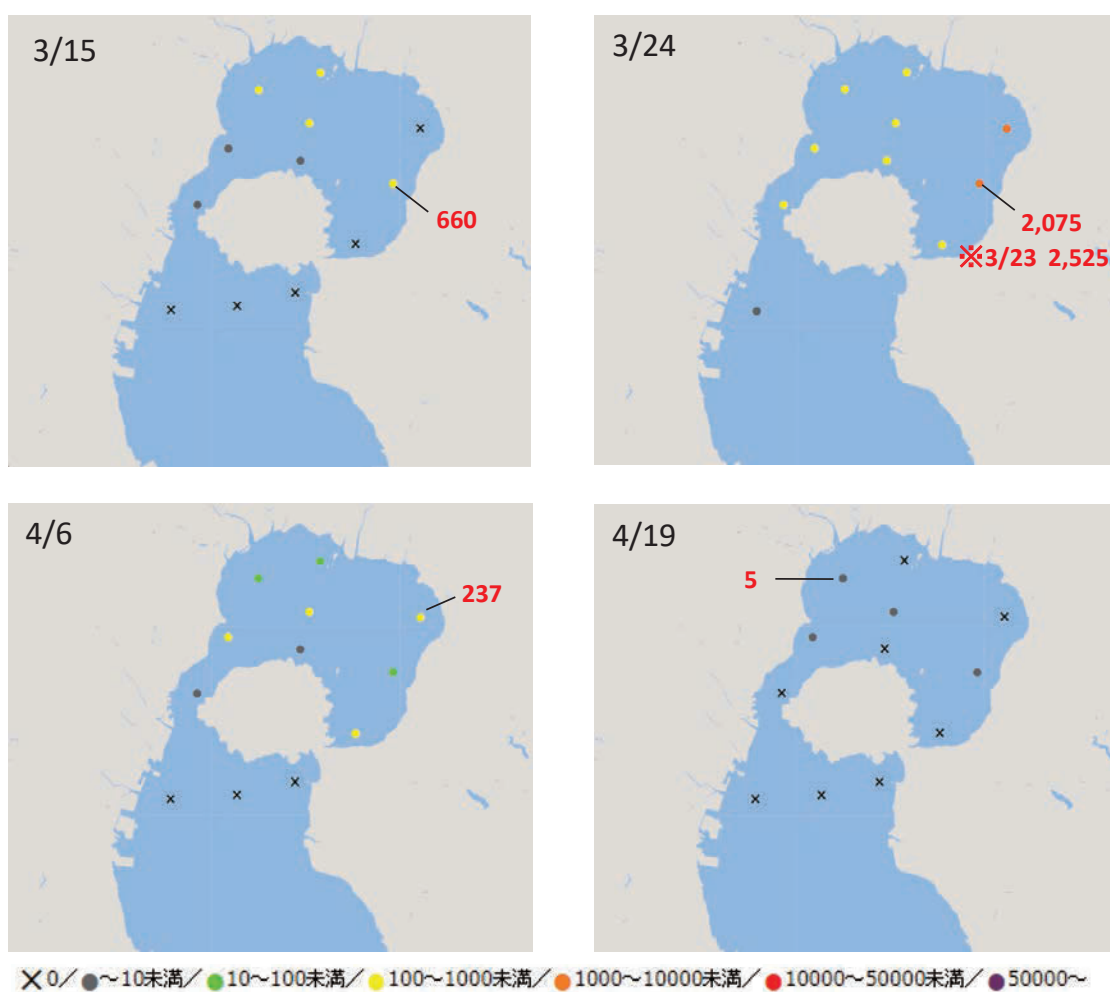


図 44. *Heterosigma akashiwo* 赤潮の水平分布の推移. 数値は細胞密度 (cells mL⁻¹).

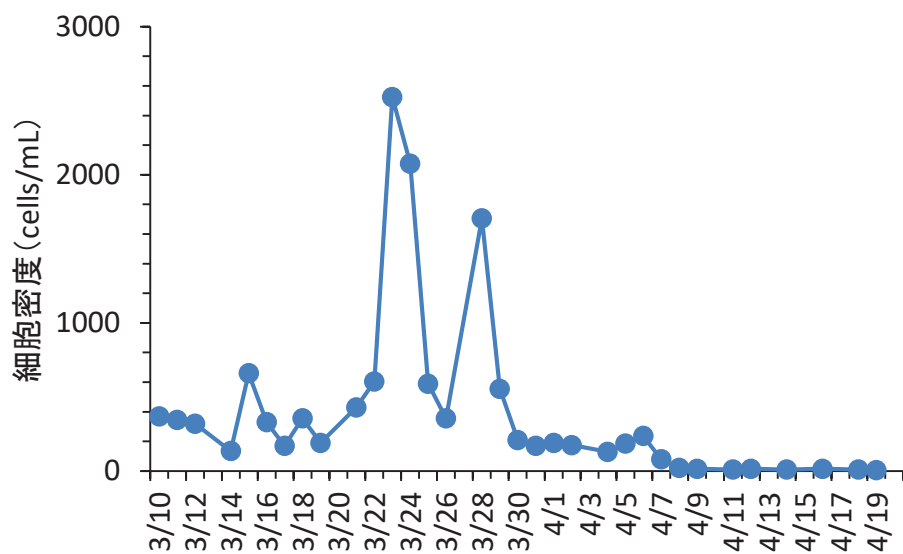


図 45. *Heterosigma akashiwo* の最高細胞密度の推移（全調査点）.

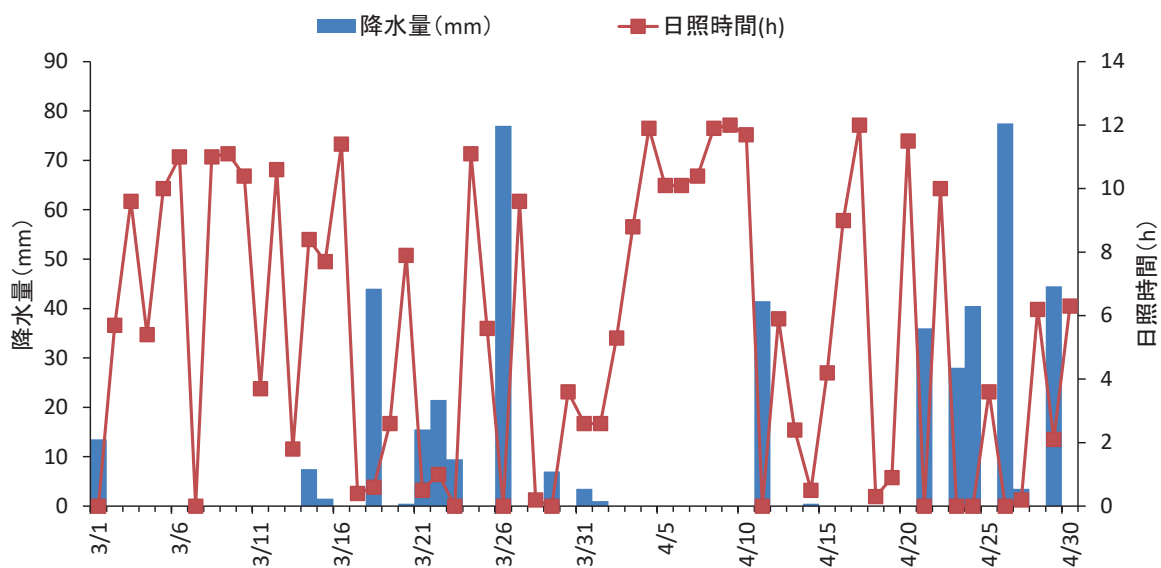


図 46. 降水量および日照時間の推移（降水量：溝辺アメダス，日照時間：牧ノ原アメダス）.

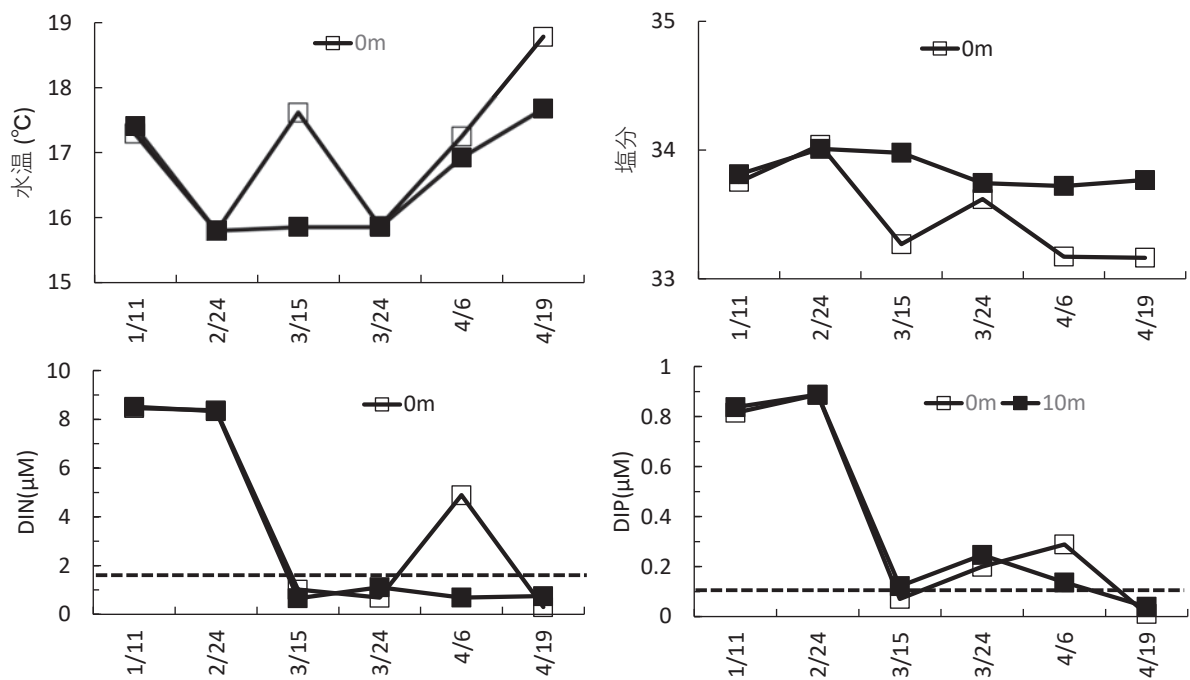


図 47. 水温, 塩分, DIN, DIP の推移 (湾奥部 9 定点平均). 横線 (...) は *Heterosigma akashiwo* が生残するために最低限必要な濃度.

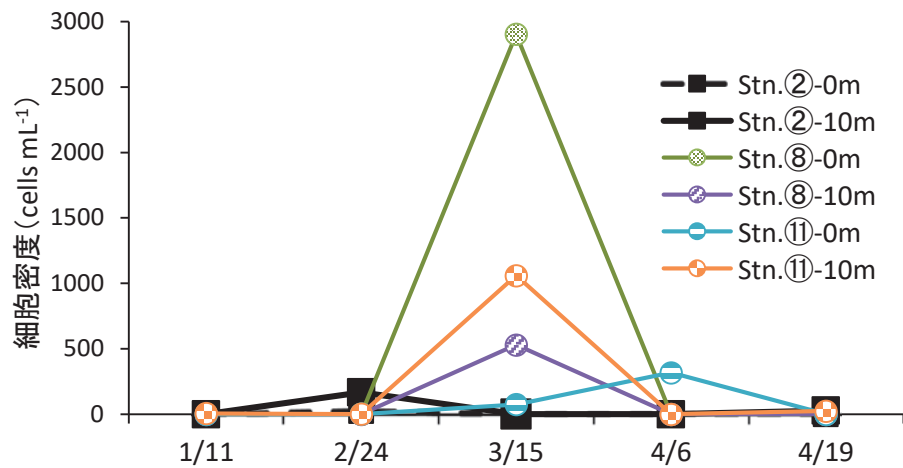


図 48. 珪藻類の細胞密度の推移(Stn. ②, ⑧, ⑪).

表 1. 異なる栄養条件で培養した *Chattonella* (4KGY 株) の 90%アセトン抽出液の 664/450 nm.

培養日数	完全培地	P無添加培地	N無添加培地
0	0.603	0.610	0.590
3	0.630	0.603	0.492
7	0.537	0.550	0.382

表 2. 2022 年九州南部地域における気温, 日照時間およ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 (-0.3)	平年並 (52)	多い (127)
	中旬	低い (-1.4)	少ない (23)	平年並 (99)
	下旬	高い (1.5)	平年並 (107)	少ない (71)
2	上旬	低い (-1.2)	平年並 (74)	かなり少ない (54)
	中旬	平年並 (-1.0)	平年並 (62)	少ない (76)
	下旬	低い (-2.9)	かなり少ない (2)	かなり多い (151)
3	上旬	平年並 (-0.5)	かなり少ない (20)	多い (141)
	中旬	かなり高い (3.7)	平年並 (101)	平年並 (108)
	下旬	高い (1.0)	かなり多い (202)	少ない (53)
4	上旬	平年並 (-0.4)	かなり少ない (3)	かなり多い (167)
	中旬	高い (1.7)	平年並 (94)	平年並 (94)
	下旬	かなり高い (1.7)	かなり多い (301)	かなり少ない (58)
5	上旬	平年並 (-0.4)	平年並 (68)	平年並 (88)
	中旬	かなり低い (-0.9)	多い (176)	かなり少ない (53)
	下旬	平年並 (0.2)	平年並 (84)	少ない (80)
6	上旬	平年並 (0.0)	平年並 (87)	多い (137)
	中旬	低い (-0.5)	多い (122)	かなり少ない (44)
	下旬	かなり高い (2.3)	少ない (41)	かなり多い (219)
7	上旬	高い (0.8)	多い (155)	平年並 (111)
	中旬	高い (0.6)	多い (174)	少ない (65)
	下旬	平年並 (0.2)	平年並 (105)	少ない (91)
8	上旬	かなり高い (1.1)	少ない (21)	多い (137)
	中旬	高い (1.3)	少ない (64)	平年並 (97)
	下旬	高い (0.9)	平年並 (71)	平年並 (110)
9	上旬	高い (0.8)	多い (126)	平年並 (96)
	中旬	かなり高い (1.6)	かなり多い (307)	少ない (71)
	下旬	高い (0.7)	少ない (19)	多い (130)
10	上旬	高い (0.7)	少ない (20)	平年並 (110)
	中旬	平年並 (-0.3)	平年並 (92)	平年並 (97)
	下旬	平年並 (0.3)	かなり少ない (2)	多い (133)
11	上旬	平年並 (0.4)	少ない (16)	多い (115)
	中旬	高い (1.9)	多い (185)	少ない (74)
	下旬	かなり高い (3.5)	かなり多い (263)	平年並 (96)
12	上旬	平年並 (-0.4)	平年並 (69)	平年並 (95)
	中旬	低い (-1.6)	平年並 (106)	平年並 (105)
	下旬	低い (-2.0)	平年並 (91)	平年並 (105)

表3 *Chattonella* 赤潮の発生に関する5年間の予察結果と実際の発生規模.

	2018 年	2019 年	2020 年	2021 年	2022 年
予察	高め	高め	中程度	中程度	高め
実際	大規模	大規模	非発生	大規模	小規模

表4 *Chattonella* 赤潮の5年間の推定および実際の発生時期.

	2018 年	2019 年	2020 年	2021 年	2022 年
推定	7月下旬～ 8月上旬	7月下旬～ 8月中旬	7月下旬～ 8月中旬	8月上旬～ 下旬	7月上旬～ 下旬
実際	7/31	8/19	9月上～ 中旬*	7/5	7/14

*2020 年は赤潮が発生しなかったため、最高細胞密度を示した時期を記載した。

表5 過去5年間の鹿児島湾における *Heterosigma akashiwo* の発生状況.

発生年	発生日	終息日	期間	発生海域	最高細胞密度 (cells/mL)	漁業被害 の有無
2018	5月9日	5月10日	2日間	垂水市牛根麓地先	20,600	なし
2019	2月27日	4月3日	36日間	鹿児島湾奥部	51,666	なし
2021	2月22日	3月26日	33日間	鹿児島湾奥部	48,000	なし
2022	3月10日	4月20日	42日間	鹿児島湾奥部	2,525	なし

表6 過去5年間の鹿児島湾における *Chattonella* 赤潮の発生状況.

発生年	発生日	終息日	期間	発生海域	最高細胞密度 (cells/mL)	漁業被害 の有無
令和元年	10月11日	10月21日	11日間	鹿児島湾奥部東部	22	なし
令和4年	10月4日	10月18日	15日間	鹿児島湾奥部	144	なし

2) 有害赤潮の防除及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 水産技術研究所（廿日市）
湯浅光貴，北辻さほ，坂本節子
水産研究・教育機構 水産技術研究所（五島）
紫加田知幸，秋田一樹
水産研究・教育機構 水産技術研究所（横浜）
内田肇
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
斎藤義昭，野田誠，宮村和良
鹿児島県水産技術開発センター
今吉雄二，赤塚麻美，吉満 敏
埼玉大学大学院 理工学研究科
西山佳孝，小竹敬久
北里大学 医学部
西槇俊之，勝村啓史，小川元之

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・分析化学的指標（活性酸素マーカー，遺伝子発現，生物毒など）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 令和4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

これまでに，*Chattonella* 属について魚毒性やスーパーオキシド (O_2^-) レベルが株間で大きく異なることが分かっている。その原因を追究することで新たな魚毒性診断手法を見出す可能性がある。本課題では，魚毒性の異なる複数のシャットネラ培養株を用いて，分

子生物学的手法による魚毒性診断技術の開発を試みた。

① 魚毒性を判別する遺伝子変異の特定

Chattonella marina var. *marina* (*C. marina*) Ago03 株 (強毒), Ago04 株 (弱毒) 及び *Chattonella marina* var. *antiqua* (*C. antiqua*) NIES-1 株 (強毒), 4KGY 株 (弱毒) の RNA-seq データ (計 12 サンプル) を用いて、株毎の変異箇所を同定した。昨年度 7 種類の NOX 遺伝子のみを対象として行った解析を、全遺伝子に拡張して行った。作成手順は昨年度とほぼ同様だが、はじめに遺伝子ごとにユニークな配列を一本につなげた SuperTranscript を作成する過程で、Trinity 付属プログラム (アセンブル結果をそのまま用いる) では同一配列由来の異なるアリルが正しくアラインされないケースが多く見られたため、今回はマルチプルアライメントプログラム map でアイソフォーム間のアライメントを作成し、それを用いて SuperTranscript を作成した。その後 STAR を用いて各リードを SuperTranscript にマップし、GATK の HaplotypeCaller で 1 塩基変異 (SNV) を同定した。さらに同定された SNV は、R の VariantAnnotation パッケージを用いて注釈づけした。

② NADPH オキシダーゼの定量法の確立

Chattonella の mRNA-seq 解析から 7 つの NADPH オキシダーゼ (NOX) 候補遺伝子が推定されている。昨年度、転写産物量の多い NOX25216 遺伝子に着目して、NOX25216 の第 1 及び第 2 膜貫通領域の間のループ部分にある Asp58-Thr75 配列をエピトープとしたペプチド抗体をコスモバイオ社に外注した。得られた抗体を用いて *Chattonella* の NOX タンパク質の検出を試みたが、膜画分に 80 kDa 及び 120 kDa 付近に明確なバンドが検出されたものの、他にも多数のバンドが検出されたため、NOX25216 (推定分子量 92 kDa) を特異的に検出することはできなかった (紫加田ら 2022)。そこで本年度は、NOX の活性部位近傍の Glu555-Phe571 配列をエピトープとしたペプチド抗体の作製をコスモバイオ社に依頼した。得られたペプチド抗体を用いて、O₂⁻産生が高い強毒株 (Ago03, NIES-1), 及び O₂⁻産生が低い弱毒株 (Ago04, 4KGY) (Shikata et al. 2021) における NOX 発現量を解析した。細胞を改変 SWM-3 培地で 25°C, 白色光 (12hL:12hD, 明期 6:00~18:00, 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で培養した。両株を初期細胞密度 2,000 cells mL⁻¹ で植え継ぎ、2 日間培養した後、遠心分離 (3,000 rpm, 4°C, 5 min) で集藻した。細胞懸濁液に各種プロテアーゼインヒビター (プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク株式会社・一般用), 4.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM アミノカプロン酸) を添加したのち、超音波処理 (出力 10 W, 2 秒×10 回) によって細胞を破砕した。細胞抽出液を遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 5 min) した後、膜画分と可溶性画分を得た。双方の画分を SDS の添加と加熱 (90°C, 90 sec) で可溶化し、SDS-PAGE (320 V, 20 mA, 130 min) でタンパク質を分離した。NOX25216 に特異的なペプチド抗体を用いてウェスタン法で NOX タンパク質を検出した。なお、実験はそれぞれ 3 回以上行った。

2) 分析化学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

魚毒性の異なる有害赤潮プランクトン培養株や天然赤潮海水を対象に、LC/MS/MS や HPLC 等を用いて魚毒成分等を分析し、魚毒性の指標となり得る成分の特定を試みた。

① LC/MS/MS による魚毒成分探索

これまでに、*Chattonella* の暴露によって魚類の鰓の脂質組成が大きく変化することが明らかとなった。赤潮プランクトンに対する鰓の分子レベルでの変化を明らかにすることで、赤潮プランクトンの魚毒成分を絞り込めると考え、魚毒性の異なる *Chattonella* 培養株 (強毒株: Ago03, 弱毒株: Ago04) を暴露したブリの鰓から抽出した脂肪酸について LC/MS 分析を行い、脂肪酸組成を比較した。*Chattonella* の培養株を、22.5°C, 12 hL:12 hD, 明期 6:00~18:00, 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定したインキュベーター内で静置培養した。ブリは 22°C で飼育され、半日餌止めした個体を用いた。30 cm 水槽に培養液または改変 SWM-3 培地 (対

象区)を5 Lを入れ、ブリ(平均体長 90.1 mm, 平均体重 7.3 g)を5尾ずつ収容して通気した。*Chattonella*の細胞密度は培養原液を濾過海水で希釈して $1,000\sim 1,500\text{ cells mL}^{-1}$ に調整した。希釈後の培養液については、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)を用いた化学発光法により O_2^- レベルを計測した。暴露試験は最長 8 時間行い、ブリの生死及び溶存酸素濃度 6 mg L^{-1} 以上を維持した。試験後の魚体から鰓を摘出し、Bligh and Dyer 法で総脂質を抽出後、LC/MS 分析に供することで脂肪酸組成を比較した。また、*Chattonella*の培養液(Ago03, Ago04 株)及び 0.05 U mL^{-1} のキサンチンオキシダーゼ(Sigma-Aldrich)と $5\text{ }\mu\text{M}$ のヒポキサンチン(ナカライテスク株式会社)により活性酸素を発生させた改変 SWM-3 培地及び無添加の改変 SWM-3 培地中に、非暴露のブリの鰓から Bligh and Dyer 法で抽出した総脂質を添加し、LC/MS/MS 分析を行った。総脂質の添加直前に O_2^- レベルの計測を行った。

さらに、魚介類の毒性と関連する化合物群について、毒性の異なる株間比較を行うため、複数の *K. mikimotoi* の培養液(強毒株:IMR04 株, 弱毒株:Km69-9ax, Km13TG, KmImari, KmSasebo 株)から ODS 固相抽出カラムで濃縮したメタノール抽出液を作製し、LC/MS 分析に供した。

② 魚毒性と糖含有量の関係把握

有害赤潮プランクトンが有する細胞外多糖(グリコカリックス)は粘性の原因となり、魚毒性と関与すると考えられている。これまでに、魚毒性が高まる培養条件で細胞外多糖が増加することを明らかにしたが(紫加田ら 2022)、魚毒性に関与する細胞外多糖の分子構造は不明である。そこで、魚毒性の異なる *Chattonella* 培養株や魚毒性に影響する栄養条件で培養した *Chattonella* からグリコカリックスを単離し、HPLC に供することでグリコカリックスの糖鎖結合を分析した。

強毒株(Ago03), 弱毒株(Ago04, 4KGY)を 25°C , 白色光(12hL:12hD, 明期 6:00~18:00, $300\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)で培養した。N 欠乏条件での解析には、改変 SWM-3 培地(完全培地)で培養した 4KGY 株を N 無添加培地で 4 日間培養した。グリコカリックスの単離及び糖サンプルの作製は Kim et al. (2000a) と Shikata et al. (2021) の手法に従って、以下の通りに行った。

1. 200 mL の培養液を 50 mL 容 TPX チューブ 4 本に分注し、超音波破碎機(UR-20P, 株式会社トミー精工)の最小出力(Power control : 0)で撹拌した。
2. 3,000 rpm 4°C で 5 分間遠心分離した。
3. 上清(グリコカリックス画分)を限外濾過フィルター(Biomax 300 kDa PBMK07610; Merck Millipore)をセットしたアミコン濃縮機(UFSC40001, Merck Millipore)に入れ、液量が 1 mL 以下になるまで濃縮した。
4. グリコカリックス画分に 9 倍量の 100%エタノールを添加し、 4°C で 2 時間以上静置した後、 $18,000\times g$, 4°C で 5 分間遠心分離を行い、上清を除去した。
5. 各画分をそれぞれ 500 μL のメタノール:クロロホルム=3:2, 100%エタノール, 80%エタノール, 60%エタノール, 100%エタノールで 2 回ずつ洗浄した。
6. 遠心エバポレーター(株式会社トミー精工)を使用して 60°C で 1 時間乾燥後、500 μL の蒸留水に溶解した。

糖濃度の測定結果を踏まえて全糖濃度が 1 mg mL^{-1} となるように蒸留水に再懸濁した。懸濁液に等量の 2 N トリフルオロ酢酸(TFA)を加え、オートクレーブで 120°C , 60 分間

の加水分解処理を行い、遠心エバポレーターで TFA を除去した。得られた糖の加水分解産物を高速液体クロマトグラフィー（Dionex ICS-5000+: Thermo Fisher Scientific）に供して、単糖（フコース、ラムノース、アラビノース、ガラクトース、グルコース、マンノース、キシロース、ガラクトン酸、グルクロン酸）を検出し、各単糖のモル濃度比を算出した。

また、糖濃度解析の結果を踏まえて、0.2 mg の糖が採取できるよう、グリコカリックス画分をサンプリングした。これを 6 種類の分解酵素 (α -アミラーゼ, β -グルコシダーゼ, β -1,3-グルカナーゼ, セルラーゼ, β -マンナナーゼ, β -1,4-ガラクタナーゼ) とそれぞれ反応させ、4-aminobenzoic acid ethyl ester で標識したのち、高速液体クロマトグラフィーに供してグリコカリックスの構成単糖の結合様式を解析した。

3) 魚毒性診断技術の現場検証

八代海において *K. mikimotoi* の赤潮発達の報告を受け、2022 年 8 月 4~17 日の期間、現場調査を行った。8 月 5~6 日は水産研究・教育機構所有の調査船「陽光丸」にて、8 月 9~17 は用船（東町漁協所有の「第十八鯨王丸」）にて、アワビ、ブリ、マサバ、マダイ、シマアジ及びシオミズツボワムシ(ワムシ)に対する現場赤潮海水の暴露試験を実施した。

8 月 5 の 12 時と 8 月 6 日の 9 時に八代海姫戸沖においてバケツで表層採水を行い、500 mL 容トルビーカーに 500 mL の赤潮海水を満たした。エアーのセット、種々の水質計測を行った後、長崎県栽培漁業センターからご提供頂いたアワビ（小サイズ：殻長 18 mm）を 6 個体ずつ投入し、6 時間おきに最長 24 時間、生死観察を行った。

2022 年 8 月 10~12 日に東町漁業協同組合の協力下で、アワビ及びブリを用いた現場赤潮海水の暴露試験を行った。2022 年 8 月 10~12 日の朝、薄井近辺の東町漁協管内で水揚げされたアワビ（中サイズ：殻長約 72 mm, 大サイズ：殻長 95 mm）及びブリ（尾叉長約 300 mm, 体重約 350 g）、マサバ（尾叉長約 350 mm, 体重約 440 g）、シマアジ（尾叉長約 410 mm, 体重約 1,060 g）、マダイ（小サイズ：尾叉長約 290 mm, 体重約 420 g, 大サイズ：尾叉長約 460 mm, 体重約 1,680 g）を購入し、調査船の活け間で赤潮発生海域まで輸送した。船上検鏡しながら、*K. mikimotoi* の細胞密度の異なる地点においてバケツで表層採水を行い、500 L 容のパンライト水槽に 8 割程度の赤潮海水を満たした。エアーのセット、各種の水質計測を行った後、アワビは 5 個体を収納したネットを 3 つ（合計 15 個体）ずつ、ブリは 20 尾ずつ、マサバは 10 尾ずつをそれぞれの水槽に、シマアジ 2 尾とマダイ小サイズ 3 尾、マダイ大サイズ 2 尾は同じ水槽に投入した。暴露開始 6~7 時間後まで、生死観察を行った。高気温による暴露海水の昇温を防ぐため、パンライト水槽の底に板氷と土嚢を敷き、その上にパンライト水槽を重ねたものを試験水槽とした。また、暴露試験中に水温を測定し、適宜氷嚢を暴露海水に浮かべた。

現場赤潮海水のワムシに対する毒性試験（ワムシ毒性試験）は、2022 年 8 月 4~17 日の移動日を除く全調査日に実施した。ワムシ毒性試験は、紫加田ら（2020）の手順に従い 3 回繰り返しの実施した。48 ウェルプレート（Corning）の各ウェルに改変 SWM-3 培地 0.1 mL を添加した後、25°C, 塩分 30 にて 7~10 日間培養したワムシを 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、*K. mikimotoi* の暴露密度が 100 cells mL⁻¹ となるよう調整した現場赤潮海水及び *K. mikimotoi* 培養液（IMR04 株）を 0.8 mL ずつ添加し、各ウェルの最終液量を 1 mL とした。また、改変 SWM-3 培地のみにはワムシを収容し、対象区とした。48 ウェルプレートは、25°C, 100 μ mol m⁻² s⁻¹ のインキュベーターにて静置し、暴露開始から 2 時間後に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。

4) 魚毒性診断技術のマニュアル作成

O_2^- レベルを指標とした魚毒性診断技術のマニュアル作成にあたって、 O_2^- レベルの検出を行うルミノメーター（Atto, AB-2270 ルミネッセンサーOcta）の機体間誤差を調べた。異なる使用年数（1年, 2年, 5年）の3台のルミノメーターについて、L-012 及び O_2^- を人工的に生成するキサンチンオキシダーゼ（Sigma-Aldrich）酵素反応系を用いた O_2^- レベルの計測を行った。測定は、異なる濃度のキサンチンオキシダーゼ（0, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 U mL⁻¹）を 10 μ L, 5 mM のヒポキサンチン（ナカライテスク株式会社）を 10 μ L, 1 mM の L-012 を 10 μ L, Phosphate buffered saline もしくは 10,000 U mL⁻¹ の Superoxide dismutase (SOD; 富士フイルム和光純薬株式会社) 20 μ L 及び濾過海水 950 μ L を測定用チューブ（WATOSON, Φ 12×55 mm PS）内で混合し、直ちにルミノメーターで 30 秒間の発光量計測し、発光量の積算値を算出した。

また、 O_2^- レベルを指標とした魚毒性診断技術の普及を図るため、これまでの本課題における成果を受けて、 O_2^- レベルを指標とする赤潮の魚毒性推定マニュアル及び赤潮の毒性リスク評価のためのワムシ毒性試験マニュアルを作成した。さらに、2022 年 12 月 7 日に広島市 TKP ガーデンシティ広島にて「スーパーオキシド検出法の研修会」を開催した。有害プランクトンのモニタリングを行っている都道府県及び漁業組合の担当者 6 名が参加した。今年度作成したマニュアルの原案を使用した講義と化学発光法による *Chattonella* 培養株の O_2^- レベル計測の実技指導を行った。研修会終了後にマニュアルに関するアンケート調査を実施した。

(3) 結果および考察

1) 分子生物学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

① 魚毒性を判別する遺伝子変異の特定

抽出された SNV のうち、対象とする 12 サンプルすべてで遺伝子型が決まった部位だけを対象として解析した。全体で 170,841 個 (39.3%) の非同義置換, 264,127 個 (60.1%) の同義置換, 1,510 個 (0.3%) のナンセンス変異が同定された。同定された変異のうち 2 株ずつで共有される変異について見ると、それらの 90%は系統的な近さを反映して *C. antiqua* と *C. marina* の種内で共有される変異であったが、強毒株と弱毒株で共有される変異が 9,170 個 (5%) 存在し、そのうち 2,511 個 (27%) が非同義置換であった (表 1)。いくつかの遺伝子においては、そのような変異が集中して存在しているものもあった。これらの結果は、毒性に関わる遺伝子を探索する際の手掛かりとして、今後活用していく予定である。

② NADPH オキシダーゼの定量法の確立

NOX2521 の Glu555-Phe571 配列をエピトープとした新たなペプチド抗体を用いて、*Chattonella* の強毒株 (Ago03) から調製した膜画分及び可溶性画分をウエスタン解析した。その結果、粗抽出液及び膜画分には 95 kDa 付近に明確なバンドを検出した (図 1a)。NOX25216 の推定分子量 92 kDa と一致するため、NOX25216 タンパク質が膜画分に存在することが示唆された。可溶性画分にも 95 kDa 付近にバンドが検出されたが、細胞抽出液の分画に用いた遠心分離の遠心力 (15,000 rpm) が弱かったため、NOX の局在が示唆されている細胞膜が十分に沈降せず、一部が上清の可溶性画分に残ったこと原因だと考えられる。今後、超遠心を用いて細胞抽出液を分画する必要がある。なお、この 95 kDa 付近のバンドは、従来の細胞破碎法では新たなペプチド抗体を用いても確認することはできなかった。

昨年度まで細胞破碎は、超音波処理（出力 10 W，30 秒×2 回）とガラスビーズ破碎を組み合わせて実施していた。また、プロテアーゼインヒビターは、プロテアーゼ阻害剤カクテル（ナカライテスク製・一般用）のみを用いてきた。今年度の細胞破碎法の改良により NOX 検出が改善されたことから、従来の操作では、細胞破碎中に温度が上昇し、細胞抽出液に含まれるプロテアーゼが活性化して、NOX が分解していた可能性が考えられる。また、NOX はプロテアーゼに対する感受性が高いことも示唆される。

新たなペプチド抗体を用いて、*Chattonella* の強毒株（Ago03, NIES-1）と弱毒株（Ago04, 4KGY）から調製した膜画分で NOX25216 の検出を行った。その結果、Ago03 株と Ago04 株で、95 kDa 付近に明確なバンドが検出された（図 1b）。一方、NIES-1 株及び 4KGY 株では、膜画分にも可溶性画分にも NOX は検出できなかった（図 1b）。Ago03 株と Ago04 株ではほぼ同じ強度のバンドが検出されたため、NOX25216 は両方の株で NOX が同程度に発現していることが示唆された。令和 3 年度に実施した膜画分の Native-PAGE 及び in-gel 活性染色解析から、Ago03 株及び Ago04 株の双方の膜画分に NOX 活性が検出されることがわかっている（紫加田ら 2022）。したがって、O₂⁻ 産生レベルが極めて低い弱毒の Ago04 株（Shikata et al. 2021）でも NOX は発現しており、細胞内では NOX 活性が何らかの制御因子によって抑制されていることが示唆される。NIES-1 株及び 4KGY 株ではプロテアーゼ活性がより強いために 95 kDa の位置にバンドが検出されなかったことが考えられる。

2) 分析化学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

① LC/MS/MS による魚毒成分探索

Chattonella の強毒株（Ago03 株）と弱毒株（Ago04 株）を暴露したブリから鰓を摘出し、Bligh and Dyer 法で総脂質を抽出後、LC/MS 分析に供した。対照区と比較して、強毒株及び弱毒株を暴露した試験区で同様の脂質変化が認められた（図 2）。対照区と比較して *Chattonella* 暴露区で大幅に減少したブリの鰓の総脂質から遊離した脂肪酸は、ドコサヘキサエン酸（DHA）、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサペンタエン酸（DPA）などの高度不飽和脂肪酸であり（図 3）、そのピーク強度は約 80% 減少した。最も減少量の大きい DHA の過酸化物を LC/MS/MS で検索したが、DHA 過酸化物の明瞭なピークは検出されなかった（図 4）。次に、*Chattonella* の培養液及びキサンチンオキシダーゼにより O₂⁻ を発生させた培地中にブリの鰓から抽出した総脂質を添加した結果、DHA などの高度不飽和脂肪酸を含め、ブリの鰓の脂質に変化は認められなかった（図 5）。この時、各培地中の O₂⁻ レベル（Relative luminescence units; RLU）は強毒株及びキサンチンオキシダーゼ添加区が高く、弱毒株は強毒株の 1/100 程度、培地のみコントロール区ではほとんど検出されなかった（図 6）。このことから *Chattonella* はブリの鰓の脂質を直接変化させるのではなく、ブリの生体を介して脂質を変化させることが示唆された。

毒性の異なる複数の *K. mikimotoi* の培養液のメタノール抽出液について LC/MS 分析した結果、いずれの培養株についてもブレバトキシン等の既知毒は検出されなかった。一方で、トータルイオンクロマトグラムの比較により強毒株の IMR04 株において弱毒株と比較して特徴的に増加する複数のピークが検出された（図 7）。

③ 魚毒性と糖含有量の関係把握

Chattonella 強毒・弱毒株のグリコカリックスの構成糖を分析した結果、主要な構成糖はガラクトースであり、次いでウロン酸（グルクロン酸，ガラクトン酸）及びグルコースが多いこと、強毒の Ago03 株は弱毒の Ago04 株と比較してすべての構成単糖の含有量が

高いことが明らかになった（図 8）。次に、これらの糖で構成される多糖類を同定するために、酵素を利用した特異的な酵素分解を行った。結合特異性の異なる 6 種類の酵素を *Chattonella* のグリコカリックス画分に作用させた結果、Ago03 株、Ago04 株ともにセルラーゼ（エンド- β -1,4-グルカナーゼ）により、分解物のオリゴ糖が遊離した（図 9）。一方、魚毒性が高まる N 欠乏条件で弱毒の 4KGY 株を培養すると、ガラクトース、マンノース、グルコースの含量が著しく上昇することが明らかになった（図 10）。さらに、酵素を利用した特異的な酵素分解実験の結果、セルラーゼ以外にもエンド- β -1,4-ガラクタナーゼにより、分解物のオリゴ糖が遊離した（図 11）。以上の結果から、グリコカリックスには、主鎖を β -1,4-グルカンとする多糖類が含まれていることが示唆された。また、シャットネラが栄養ストレスを受けると、側鎖のガラクトース残基か別のガラクトース含有多糖が増加することが推測される。

3) 魚毒性診断技術の現場検証

令和 4 年 8 月 5, 6 日に姫戸沖で採取した赤潮海水及び孔径 0.22 μm のヌクレポアフィルターで濾過した海水（対照区）をアワビ（小サイズ）に暴露した。8 月 5 日に採取した赤潮海水は 11,889 cells mL^{-1} の *K. mikimotoi* を含んでおり、アワビのへい死は暴露 10 時間後から生じ、暴露 24 時間後には 83%がへい死した（図 12a）。8 月 6 日に採取した赤潮海水は 9,378 cells mL^{-1} の *K. mikimotoi* を含んでおり、アワビのへい死は暴露 12 時間後から生じ、暴露 24 時間後には 94%がへい死した。令和 4 年 8 月 11 日に幣串前島沖で採取した赤潮海水及び市来崎で採取した *K. mikimotoi* をほとんど含まない海水（対照区）をアワビ（中、大サイズ）に暴露した。幣串前島沖で採取した赤潮海水は 21,800 cells mL^{-1} の *K. mikimotoi* を含んでおり、大サイズ及び中サイズのアワビはそれぞれ暴露開始後 1 時間、3 時間でへい死が生じ、暴露 7 時間後にはそれぞれ 87, 100%のアワビがへい死した（図 12b, c）。対照区においては、大サイズのアワビで一部へい死が生じたが、その他は全て生残した。以上の結果から、2022 年 8 月に八代海で発生した *K. mikimotoi* 赤潮がアワビに対する強い毒性を有していることを確認し、アワビのサイズが大きくなるほど、へい死が早く生じる可能性が示唆された。

令和 4 年 8 月 10, 12 日に 2~3 地点で採取した赤潮海水及びほとんど *K. mikimotoi* を含まない海水（対照区）をブリ、マサバ、シマアジ、マダイに暴露した。表 2 に暴露した赤潮海水の採水日、採水地点、*K. mikimotoi* 細胞密度、供試魚をまとめた。暴露試験の結果、ブリは、*K. mikimotoi* の細胞密度が 22,000 cells mL^{-1} の赤潮海水で 10 分以内に全て横臥したが、8,000 cells mL^{-1} の赤潮海水中では生残した（図 13a）。マサバは、*K. mikimotoi* の細胞密度が 11,066 cells mL^{-1} の赤潮海水で 1 時間以内に全てへい死したが、2,950 cells mL^{-1} の赤潮海水中では生残した（図 13b）。シマアジ及びマダイは、*K. mikimotoi* の細胞密度が 11,000 cells mL^{-1} の赤潮海水中で全て生残した（図 13c, d）。以上の結果から、魚種によって *K. mikimotoi* 赤潮に対する感受性が大きく異なり、ブリとマサバは感受性が高く、シマアジやマダイはへい死しにくいことが示唆された。

令和 4 年 8 月 5~6, 9~14, 16~17 日に各日 1~6 地点で採取した赤潮海水を *K. mikimotoi* 細胞密度が 100 cells mL^{-1} になるよう濾過海水で希釈し、ワムシに暴露した。赤潮の分布密度情報に基づいて、8 月 5~13 日を赤潮最盛期、8 月 14 日を赤潮衰退前、8 月 16~17 を赤潮衰退期と区別した時、ワムシへい死数は赤潮最盛期後半に低く、赤潮衰退前に高い傾向が確認された（図 14a）。また、採水時の *K. mikimotoi* の細胞密度とワムシへい死率についてスピアマンの順位相関係数を算出した結果、相関係数は 0.289 ($p=0.315$) が得られ、有

意な相関は認められなかった（図 14b）。一方で、赤潮全盛期を除いた相関解析を実施すると、相関係数 0.730 ($p < 0.05$) が得られ、有意な相関関係が認められた。以上の結果から、現場の *K. mikimotoi* 赤潮についてもワムシ暴露試験により毒性を検出できることが明らかとなった。また、ワムシ毒性は赤潮衰退前に高まり、衰退期については毒性が細胞密度に比例する可能性があるが、赤潮最盛期は採水地点の *K. mikimotoi* 細胞密度には依存せず、採水地点や採水日によって異なることが示唆された。

K. mikimotoi 赤潮に対する感受性は対象生物や個体サイズによって異なるため、ワムシ毒性試験によって毒性の強弱を判別するには、魚類もしくは貝類に対して異なる毒性を示す複数の赤潮海水においてワムシ毒性試験を実施するなど、さらなる検証が必要と考えられた。一方で、ワムシ毒性は *Chattonella* 属や *Prorocentrum* 属では検出されず、貝類をへい死させる *K. mikimotoi* や *Heterocapsa circularisquama* 等でのみ検出されることから（山崎ら 2023）、ワムシ毒性試験は現場赤潮海水の貝類等に対する毒性の有無を検出する手段として有用であると考えられた。

4) 魚毒性診断技術のマニュアル作成

O_2^- レベルを計測するルミノメーターの機体間誤差をキサンチンオキシダーゼ系と L-012 を用いた化学発光法で計測した結果、機体間で僅かな誤差が確認された。検出感度は、使用年数が 1 年の機体で最も高く、2 年の機体で最も低く、5 年の機体はその中間を示した（図 15）。したがって、機体間の検出感度差は経年劣化によるものではないと考えられた。また、本手法による検出感度の計測ではいずれも決定係数 $R^2 = 0.99$ 以上の検量線が得られており、機体間誤差は本手法にて補正可能であると考えられた。

O_2^- レベルを指標とした赤潮の魚毒性推定マニュアル（図 16）及び赤潮の毒性リスク評価のためのワムシ毒性試験マニュアルを作成した（図 17）。スーパーオキシドレベルを指標とした魚毒性診断技術マニュアルの構成は、1. 活性酸素レベルを指標とする赤潮の魚毒性推定の原理、2. 活性酸素レベルを指標とする赤潮の魚毒性推定方法、3. 測定方法、4. 参考資料、5. 参考文献とし、赤潮の毒性リスク評価のためのワムシ毒性試験マニュアルの構成は、1. ワムシに対する毒性を指標とする赤潮の毒性リスク評価の背景、2. ワムシに対する毒性を指標とする赤潮の毒性リスク評価方法、3. 試験方法、4. 参考資料、5. 参考文献とした。両マニュアルは後日、水産庁ホームページに掲載する予定である。

O_2^- レベルのマニュアルについては、原案を使用して研修会を開催した（図 18）。研修会後にマニュアルに関するアンケート調査を実施した結果、図 19 及び表 3 の集計結果が得られた。アンケート調査結果を受けて、マニュアル原案の修正を行った。

3 5 か年のまとめ

(1) 分子生物学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

魚毒因子候補として知られる O_2^- を産生する膜タンパク質である NOX の遺伝子を *C. antiqua*, *C. subsalsa*, *Heterosigma akashiwo*, *K. mikimotoi*, *H. circularisquama* の既存の RNA-seq データより検索した結果、各種で複数の NOX 遺伝子を同定した。さらに、魚毒性の異なる *Chattonella* 培養株を複数確立し、そのうち 4 株の RNA-seq 解析の結果から、強毒株では、光合成、NAD の生合成やエネルギー代謝、酸化還元反応、抗酸化機能に関連する遺伝子群が多く発現していることが明らかとなった。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り、魚毒性の指標となる可能性が考えられた。

NOX 遺伝子については, *Chattonella* の強毒・弱毒株間の変異解析を行い, 3 つの塩基置換を同定した。しかしながら, いずれもアミノ酸変異を生じない同義置換であったため, NOX 遺伝子の変異箇所を指標に毒性を判別することは困難であると判断した。そこで, 変異解析の手法をトランスクリプトーム全体に拡張して強毒株と弱毒株を比較した結果, 2,511 個の非同義置換を特定した。これらには魚毒性の指標として有用な遺伝子が含まれている可能性が考えられた。

Chattonella の NOX についてタンパク質の発現量が魚毒性の指標となりうるか, ウェスタンブロッティング法等を適用して検証した。6 つ存在する *Chattonella* の NOX 遺伝子のうち, タンパク質として発現する主要な NOX を特定するため, 複数の NOX に対するペプチド抗体を作成してウェスタン解析を実施した結果, NOX25216 のアミノ酸配列をエピトープとした抗体で推定分子量の位置にバンドが検出された。本タンパク質について, *Chattonella* の強毒株と弱毒株で発現量を比較したが, 発現量に違いは見られなかった。また, 両株における in-gel 活性染色解析から, 双方の株で NOX 活性が検出されることが判明した。したがって, O₂ 産生レベルが極めて低い弱毒株 (Shikata et al. 2021) でも NOX は発現しており, 細胞内では NOX 活性が何らかの制御因子によって抑制されていることが示唆された。

(2) 分析化学的手法を用いた魚毒性診断技術の開発

有害赤潮藻類における既知の毒性成分の有無を把握するため, *K. mikimotoi*, *H. circularisquama*, *C. ovata*, *C. marina*, *C. antiqua*, *Alexandrium leei* のメタノール抽出液について LC/MS/MS や LC/PDA 分析等を行い, 既知の毒性成分であるブレベトキシン, ギムノシン, アンフィジノール, パリトキシン, カーロトキシン, 溶血活性を示す光活性化ポルフィリン化合物を検索したが, いずれも検出されなかった。未知の魚毒成分を探索するため, 毒性の異なる複数の *Chattonella* 及び *K. mikimotoi* の培養株について脂肪酸や過酸化脂質の解析を行ったが, 毒性と相関を示す脂溶性化合物は検出されなかった。次に, 毒性の異なる複数の *K. mikimotoi* 培養株についてメタノール抽出液を調整し, LC/MS によるノンターゲット分析を行った結果, 毒性の高い株で特徴的に増加するピークを複数検出した。これらは *K. mikimotoi* の毒性の指標となる可能性が考えられた。

Chattonella の魚毒性に関与すると考えられるグリコカリックスについて, 強毒・弱毒株間で糖含有量や糖組成を比較した結果, 強毒株でグリコカリックスの糖含有量が多く, ガラクトースやウロン酸を主成分とすることが明らかとなった。また, マダイに対する *Chattonella* 培養株の暴露試験によって, 栄養塩が枯渇した細胞は魚毒性が著しく上昇することが明らかとなった。そこで, 異なる栄養条件で培養した *Chattonella* のグリコカリックスの糖含有量及び糖組成を解析した結果, グリコカリックスの糖組成に違いは見られないが, 糖含有量が N 及び P 欠乏条件で多かった。したがって, グリコカリックスの糖含有量は魚毒性の指標として有用であると考えられ, 今後, 魚毒性と関係する多糖成分の特定と簡易検出法の開発が期待される。

(3) 簡易アッセイ系を用いた魚毒性診断技術の開発

ワムシを用いた簡易アッセイによる 8 種 14 株の植物プランクトンの毒性評価を行った結果, *K. mikimotoi* 及び *H. circularisquama* は既往知見 (Kim et al. 2000b, Zou et al. 2010, Kim et al. 2019) と同様に低密度暴露 (100 cells mL⁻¹) でワムシに対して強い毒性を示した。一方, *C. antiqua*, *C. marina*, *P. minimum*, *P. triestinum*, *Thalassiosira pseudonana* 及び *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex の高密度 (10,000 cells mL⁻¹) 暴露区においては, ワムシのへい死が

認められなかった（山崎ら 2023）。これは現場赤潮海水を用いた試験においても同様の結果が得られており、*H. circularisquama* もしくは *K. mikimotoi* を最小で 100 cells mL⁻¹ 含有する赤潮海水をワムシに暴露するとへい死が生じたが、*Chattonella* を含む赤潮海水ではワムシは全て生残した。以上の結果から、本法は *Chattonella* 属のもつ魚毒性の評価には適さないが、*K. mikimotoi* や *H. circularisquama* の毒性評価に有効であると考えられた。*K. mikimotoi* 及び *H. circularisquama* は共通して貝類をへい死させる種であることから、毒性の異なる *K. mikimotoi* 培養株を用いてアワビに対する暴露試験とワムシ毒性試験を同時に実施した。その結果、各株のアワビとワムシに対する毒性の強弱が一致することを確認した。さらに、*K. mikimotoi* を異なる栄養条件で培養し、ワムシ毒性試験及びアワビ、マダイへの暴露試験にそれぞれ供した結果、N もしくは P 欠乏条件でワムシ及びアワビに対する毒性の上昇が認められた。しかしながら、マダイへの毒性は栄養条件間で違いが見られなかった。したがって、ワムシ毒性試験は魚類に対する毒性は反映しないが、貝類に対する毒性を高感度に検出できる手法と考えられた。

ワムシ毒性試験の検討と並行して、溶血活性を指標とする魚毒性診断技術の検討を行った。溶血活性はワムシに対する毒性と同様に、検討した有害プランクトン種のうち *K. mikimotoi* 及び *H. circularisquama* で検出され、両種においてアワビに対する毒性とも強弱が一致した。しかしながら、溶血活性の検出には数万 cells mL⁻¹ の対象プランクトン種を必要とすることから、低細胞密度の赤潮海水における毒性検出には不適であり、毒性診断技術として改善が必要であると考えられた。

（4）活性酸素計測系を用いた魚毒性診断技術の開発

魚毒性に関与すると考えられている *Chattonella* 等が細胞外へ産生する O₂⁻について、O₂⁻レベルを指標とする魚毒性診断技術を開発することを目的とした。O₂⁻を検出する手法として、L-012 を用いた化学発光法と WST-1 を用いた吸光度法を検討した。その結果、両手法において *Chattonella* 由来の O₂⁻を検出可能であったが、化学発光法では 1 測定 30 秒程度で O₂⁻レベルを高感度で計測できるのに対し、吸光度法は 2 時間程度の反応時間を要し、検出感度が低かった。しかしながら、化学発光法は海水中に *Noctiluca scintillans* 等の発光生物が存在する場合に、O₂⁻の検出が大きく妨げられることが問題であった。そこで、発光生物の影響を除外する手法を検討した結果、*N. scintillans* と *Chattonella* が混在した海水を目合い 100 µm のプランクトンネットで篩い分けることで、*Chattonella* の O₂⁻を正確に計測できることを明らかにした。次に、化学発光法による O₂⁻検出の検出に対する海水成分の影響を調べた結果、微量金属の Mn が海水中の O₂⁻を即座に消去することが明らかとなり、Mn が高濃度添加されている培地を使用した *Chattonella* 培養液では、現場赤潮海水と比較して検出される O₂⁻レベルが極めて低くなることを明らかにした（Yamasaki et al. 2022）。さらに、O₂⁻産生に対する環境条件及び生理変化の影響を解析した結果、*Chattonella* の O₂⁻産生は現場で赤潮を形成するような水温（22.5～25°C）、塩分（25～30）条件で高くなる傾向にあった（Yamasaki et al. 2022）。また、O₂⁻産生は光照射下で光合成が駆動することで促進し、明暗に応答して日変化することが明らかとなった（Yuasa et al. 2020a, Yuasa et al. 2020b）。一方で、栄養塩が枯渇した条件下では、光合成非依存的に O₂⁻産生が促進されることが明らかとなり（Yuasa et al. 2020b）、O₂⁻産生は複数の生理プロセスによって制御されることが示唆された。*Chattonella* の O₂⁻産生レベルと魚毒性の関係を明確にするため、現場及び室内で、*Chattonella* 細胞を含んだ異なる O₂⁻産生レベルの海水をブリやマダイに暴露し、O₂⁻レベルと魚類へい死率の相関関係を解析した。その結果、室内外の双方の試験で魚類へい死

率と O_2^- 産生レベルが有意な相関関係にあることが明らかとなった (Shikata et al. 2021, 湯浅 2022)。

以上により、化学発光法を適用した O_2^- レベルの計測による赤潮の魚毒性推定手法を確立し、その科学的根拠を提示することができた。

(5) 赤潮によりへい死した魚類の組織解析手法の開発

有害赤潮によってへい死した養殖魚に特異的な病変や、鰓へのプランクトン付着状況について、室内で各種有害赤潮プランクトンを暴露して瀕死状態となった魚体の組織解析を行い、解析手法の確立を目指した。使用する固定液を検討した結果、Davidson 液による固定試料では鰓上皮細胞の剥離がアーティファクトとして認められたが、片野液 (Katano et al. 2009) ではアーティファクトは認められなかった。一方で、片野液を使用して有害赤潮プランクトン種を固定した結果、*K. mikimotoi* では2ヶ月以上形態が保持されたが、*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たため、鰓へ付着した赤潮プランクトンの観察には不向きであった。そこで、固定液を使用せ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、凍結切片を作製して (Katsumura et al. 2022) 鰓組織を観察した結果、プランクトンは保持されたが、赤潮プランクトン非暴露区においても鰓組織が概ね崩壊していた。次に、各種有害赤潮プランクトンを暴露して横臥した個体をすぐに取り上げて鰓を採取し、蛍光顕微鏡下で観察した結果、赤潮プランクトンは赤色、鰓は青色の蛍光を発し、明確に区別できた。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。

(6) 魚毒性診断技術の現場普及

本課題にて開発した O_2^- レベルを指標とした魚毒性診断技術及びワムシ毒性試験による赤潮の毒性リスク評価手法について、マニュアルを作成した。また、 O_2^- レベルを指標とした魚毒性診断技術については、普及活動として、各県や漁協の赤潮モニタリング担当者を対象とした研修会を開催した。今後、赤潮のモニタリングにおける実用試験等を実施し、現場普及に努める必要がある。

引用文献

- 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.
- Katsumura T, Nishimaki T, Okita K, Ishii K, Takashi T, Yamatogi T, Ogawa M, Shikata T. A frozen-section procedure for detecting red-tide algae on the gills of aquaculture fish. *Cytologia* 2022; **87**: 67-68.
- Kim D, Li W, Matsuyama Y, Cho K, Yamasaki Y, Takeshita S, Yamaguchi K, Oda T. Extremely high level of reactive oxygen species (ROS) production in a newly isolated strain of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Eur. J. Phycol.* 2019; **54**: 632-640.
- 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* 2000a; **1524**: 220-227.
- 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.* 2000b; **64**: 2719-2722.

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) 有害赤潮の防除及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, 湯浅光貴, 北辻さほ, 坂本節子, 内田肇, 山崎康裕, 内山郁夫, 西出浩世, 野田誠, 宮村和良, 高杉朋孝, 東條智仁, 吉満敏, 西山佳孝, 小竹敬久, 西槇俊之, 勝村啓史, 小川元之. 2) 有害赤潮の防除及び漁業被害軽減のための技術開発. 令和 3 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. 2022 ; 235-264.

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. Plankton Res.* 2022; **44**: 36-47.

山崎康裕, 亀尾辰砂, 和田佳大, 北辻さほ, 湯浅光貴, 紫加田知幸. シオミズツボウムシに対する毒性を指標とした有害・有毒藻類の毒性リスク評価. 日本プランクトン学会報 2023 印刷中.

湯浅光貴. 有害赤潮プランクトンによるスーパーオキサイド産生と魚類へい死. 養殖ビジネス 2022 ; **754**: 47-51.

Yuasa K, Shikata T, Kitatsuji S, Yamasaki Y, Nishiyama Y. Extracellular secretion of superoxide is regulated by photosynthetic electron transport in the noxious red-tide-forming raphidophyte *Chattonella antiqua*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2020a; **205**: 111839

Yuasa K, Shikata T, Ichikawa T, Tamura Y, Nishiyama Y. Nutrient deficiency stimulates extracellular secretion of superoxide in the noxious red-tide-forming algae *Chattonella antiqua*. *Harmful algae* 2020b; **99**: 101938.

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.