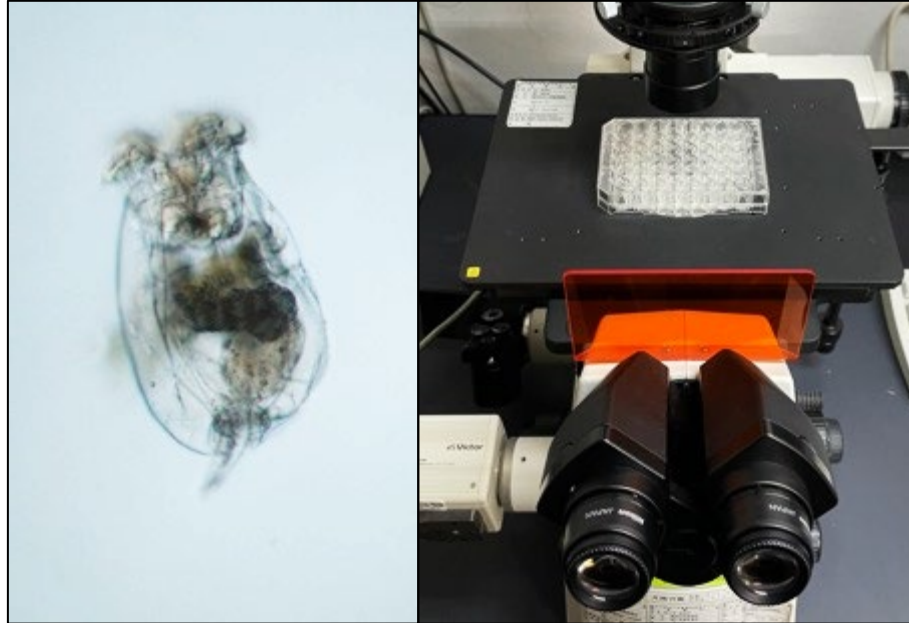


赤潮の毒性リスク評価のための ワムシ毒性試験マニュアル



令和6年1月

水産研究・教育機構 水産大学校
水産研究・教育機構 水産技術研究所

はじめに

- 赤潮の被害軽減対策の効果を最大限に発揮させるためには、漁業被害(水産有用種のへい死等)のリスクを事前に察知することが必要です
 - 現在のところ、赤潮による漁業被害のリスクは原因プランクトンの細胞密度を指標として推定されています
 - 原因プランクトンの種同定や計数には、熟練と時間を要します
 - 原因プランクトンの毒性は環境によって変化するため、細胞密度では正確に推定できない場合があります
 - 簡便かつ正確な赤潮の毒性推定手法が求められています
 - 原因プランクトンの初期発生段階で漁業被害のリスクを推定できれば、早期対策による被害の軽減が可能になります
- ➡ 本マニュアルでは、シオミズツボウムシ(以下、ウムシ)に対する毒性を指標とする赤潮原因プランクトンの毒性リスク評価手法について紹介します

目次

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
 - (1) 本法による毒性検出が可能な植物プランクトン
 - (2) 本法による毒性検出が不可能な植物プランクトン
 - (3) 必要な試薬, 実験器具および培養株
 - (4) 必要な機器
3. 試験方法
 - (1) ワムシおよび餌料プランクトンの培養
 - (2) ワムシ毒性試験の手順
 - (3) 毒性の判定基準
 - (4) 実験上の注意
4. 参考資料
5. 参考文献

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

赤潮の毒性は有害藻類ブルーム(HAB)種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ます。このため、赤潮による漁業被害の軽減を図るためには、低密度の段階から迅速かつ容易にHAB種の毒性を評価する必要があります。これまでに、*Brachionus plicatilis* Müller(シオミズツボワムシ: 以下, ワムシ)を用いたHAB種(主に*Heterocapsa circularisquama*や*Karenia mikimotoi*)の毒性評価が行われてきました(2~3頁の表を参照)。特に、*H. circularisquama*や*K. mikimotoi*のワムシに対する毒性は、貝類に対する毒性と共通することが示唆されており(Cho et al. 2017), 少なくとも**本法はHAB種の貝類に対する毒性リスクの評価に有効※**であると考えられます。また、本法はごく低密度の段階から迅速かつ少量の試料でHAB種の毒性を推定できるため、地方自治体などが現場で適用可能な毒性判定手法として有用であると考えられます。しかし、ワムシは株や培養条件の違いによって増殖生理が異なるため、HAB種に対する感受性も異なると考えられます。したがって、本マニュアルでは、過去の試験データや海域間等での毒性比較を可能にするために、ワムシの供試株、培養条件および毒性試験条件などを定めています。

※「ワムシに毒性を示す植物プランクトンが貝類に対してのみ毒性を発現する(魚類等の水産生物に影響しない)」という意味ではありませんので、ご注意ください。

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

(1) 本法による毒性検出が**可能**な植物プランクトン

分類群・種名	文献
渦鞭毛藻類	
<i>Alexandrium leei</i>	Shikata et al. 2020
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	Kim et al. 2000, Oda et al. 2001, Nishiguchi et al. 2016 Cho et al. 2017, 山崎ほか 2023
<i>Karenia mikimotoi</i>	安部・平山 1979, Zou et al. 2010, Cho et al. 2017 Kim et al. 2019, 山崎ほか 2023
<i>Karenia selliformis</i>	紫加田ほか 2023

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

(2) 本法による毒性検出が**不可能**な植物プランクトン

分類群・種名	文献
渦鞭毛藻類	
<i>Alexandrium tamiyavanichii</i>	Cho et al. 2017
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	Kim et al. 2000
<i>Heterocapsa triquetra</i>	Kim et al. 2000
<i>Prorocentrum minimum</i>	山崎ほか 2023
<i>Prorocentrum triestinum</i>	山崎ほか 2023
ラフィド藻類	
<i>Chattonella marina</i>	Kim et al. 2000, Cho et al. 2017, Kim et al. 2019 山崎ほか 2023
<i>Chattonella antiqua</i>	Cho et al. 2017, 山崎ほか 2023
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Kim et al. 2000
珪藻類	
<i>Skeletonema marinoi-dohmii complex</i>	山崎ほか 2023
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	山崎ほか 2023

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) 必要な試薬, 実験器具および培養株

<試薬, 器具類>

- 培地用試薬類
- ピペットマン, チップ
- スライドガラス
- 数取器(カウンター)
- フラスコ, フラスコの栓
- シャーレ
- 平底48穴プレート
- プレートシール

<培養株>

- シオミズツボワムシ(L型, 奄美株)
- *Nannochloropsis oculata*
(真正眼点藻, ワムシの餌として使用する)

両株は当機構のジーンバンクで入手可能

国立研究開発法人水産研究・教育機構ジーンバンク事業
(<http://nria.fra.affrc.go.jp/bank/index.html>)

(4) 必要な機器

- インキュベーター
- 倒立顕微鏡
- 実体顕微鏡

3. 試験方法

(1) ワムシおよび餌料プランクトンの培養

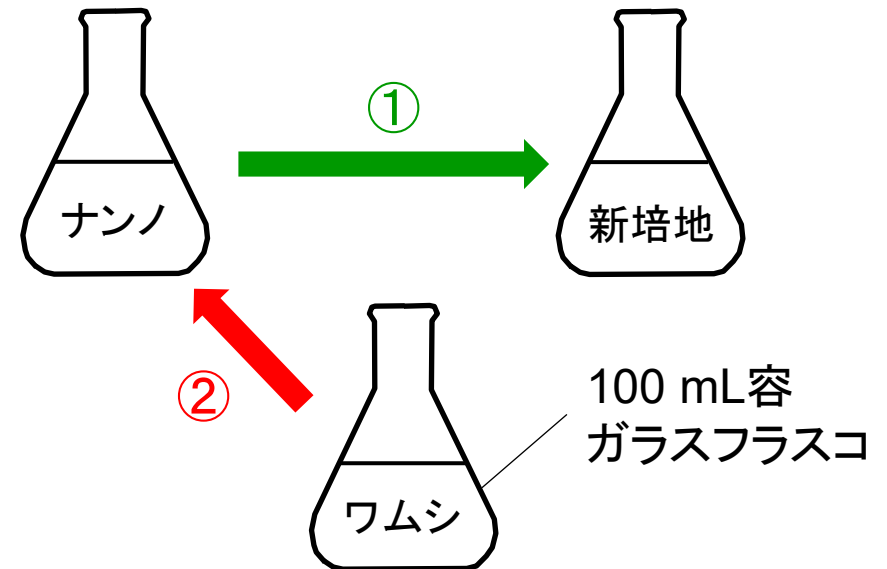
本毒性試験に用いるワムシの奄美株 (*Brachinus plicatilis sensu stricto*, L型ワムシ) およびワムシの餌料となる真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* (Droop) D.J.Hibberd は、国立研究開発法人水産研究・教育機構のジーンバンク事業(4頁参照)を通じて入手可能です。

ワムシの継代培養は週に1回とし、ワムシの餌料である *N. oculata* を培地等(例: 改変 SWM-3 培地; 紫加田ほか 2011) で十分に (3×10^6 cells mL⁻¹ 程度) 増殖させた培養液 40 mL にワムシを含む培養液 3~5 mL 程度を添加することにより、培養を維持します。一般的に、海産仔稚魚の初期餌料としてワムシを培養する際には、暗条件もしくは弱光下で行われることがほとんどです(論文でも光条件が記載されない場合が多い)。

注1) 培養が不安定になる傾向にあるため、強光下でのワムシ培養には注意が必要です(未発表)。

注2) *N. oculata* は弱光下では十分に増殖しませんので、150~200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度での培養が必要です。

① *N. oculata* を新しい培地に植え継ぐ

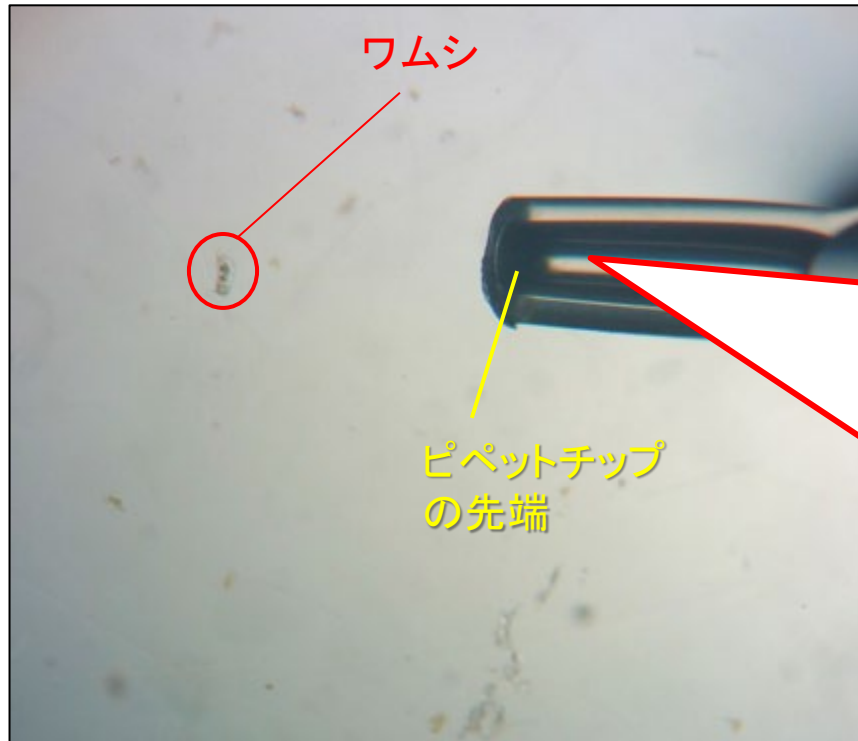


② ワムシ培養液 (3~5 mL) を *N. oculata* が増殖した培養液に植え継ぐ

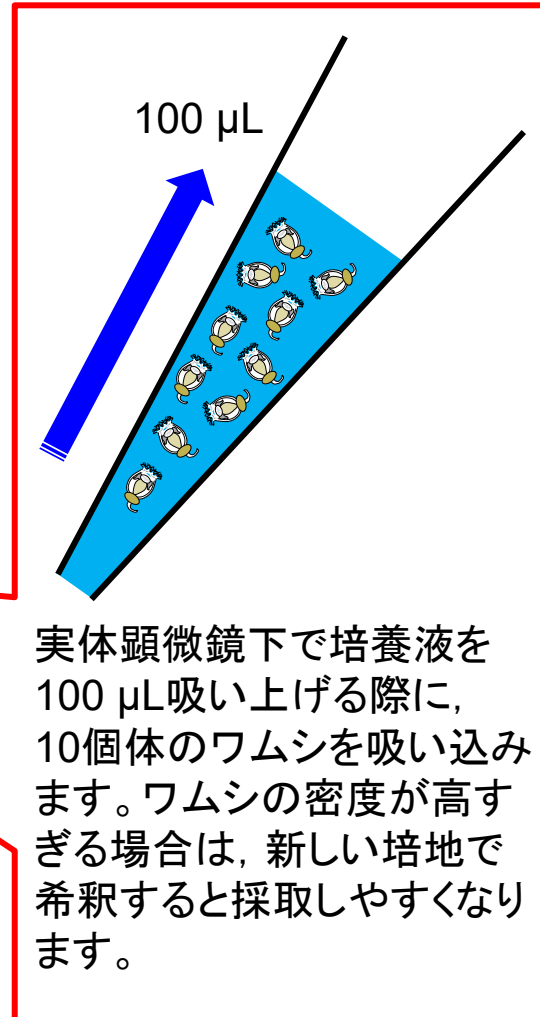
3. 試験方法

(2) ワムシ毒性試験の手順

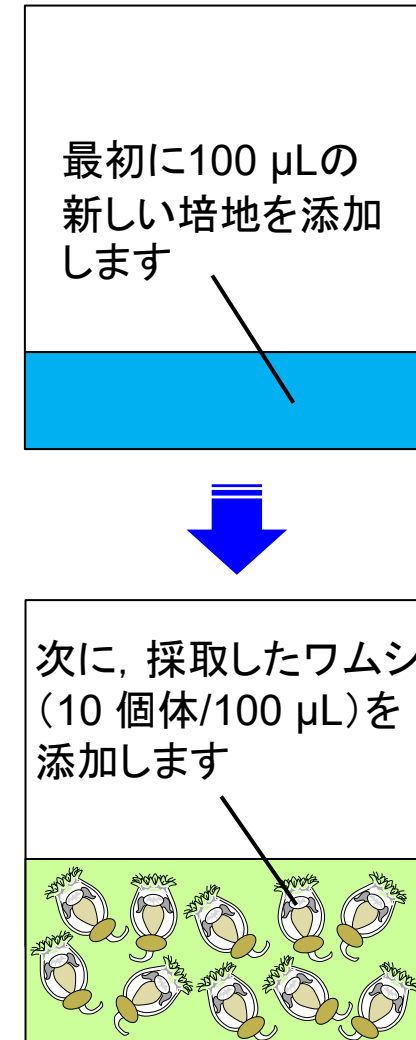
①ワムシ毒性試験は、48ウェルプレートを用いて1試験区につき3ウェルで実施します。各ウェルに培地(例:改変SWM-3; 紫加田ほか 2011) 100 μ Lを添加した後、25°C, 塩分30にて培養(培養7~10日目)したワムシを100 μ Lあたり10 個体になるようピペットで採取して添加します。



試験には200~300 μ m
のワムシを使用します
(9頁参照)



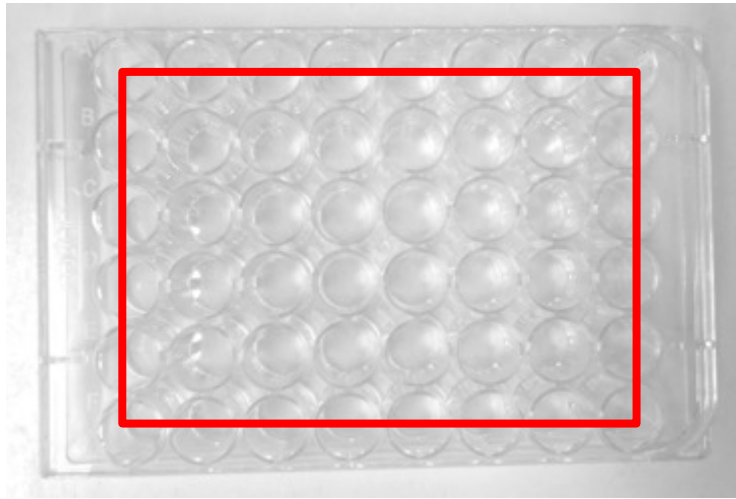
48 ウェルプレート



3. 試験方法

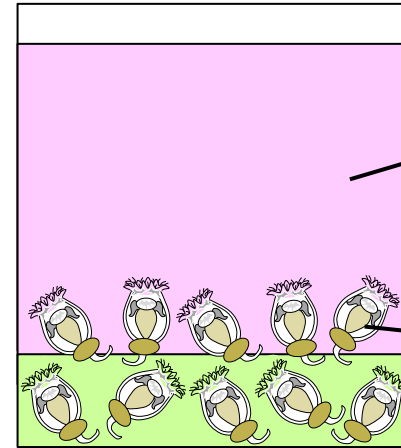
(2) ワムシ毒性試験の手順

②海水試料を 0.8 mL ずつ添加し、最終液量を1 mLとします。また、対照区として培地（例：改変 SWM-3培地；紫加田ほか 2011）のみにワムシを収容する試験区を設けます。48ウェルプレートには試験溶液の蒸発を防ぐためにプレートシールを貼付し、20～25℃、照明付きインキュベーターにて静置します。



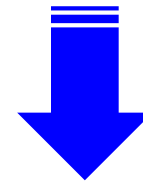
生残率が低下しやすい傾向にあるため（水分の蒸発が一因？）、一番外側のウェルは使用しません。

48 ウェルプレート



サンプル (800 μ L)

ワムシ
(10 個体/100 μ L
+ 培地 100 μ L)



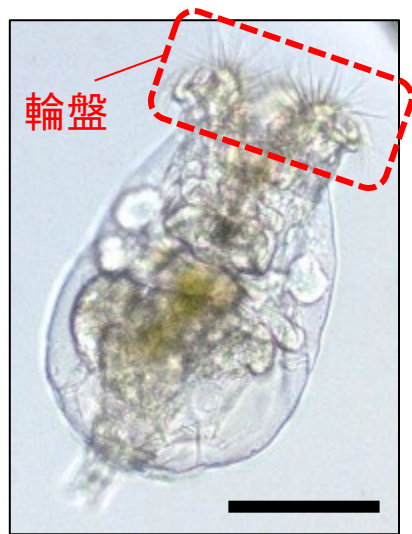
20～25℃、明条件で曝露

1時間毎にワムシ斃死個体数を計数します。
2時間ワムシのへい死をモニタリングし、
ワムシがへい死しない場合は6時間後まで
ワムシのへい死をモニタリングを継続します。

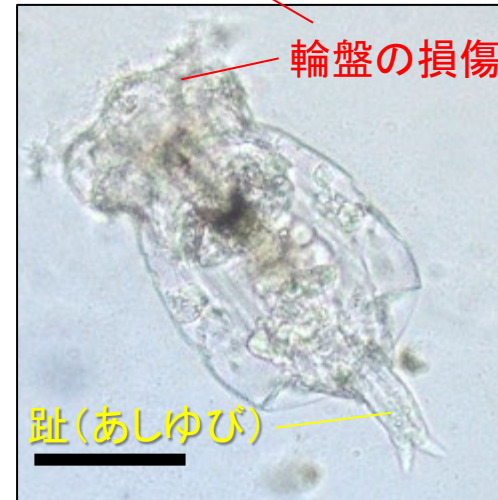
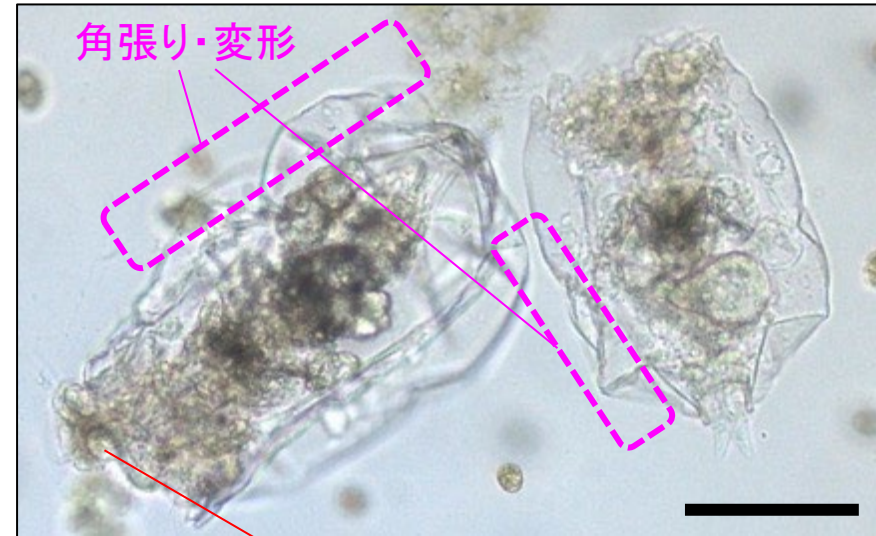
3. 試験方法

(3) 毒性の判定基準

ワムシの生残率は、曝露開始から1時間毎にワムシのへい死個体数を顕微鏡下で計数して算出します。右図に示すような外部形態の変形(角張り)が認められ、かつ、輪盤の繊毛や趾(あしゆび)の運動が5秒間以上停止した個体をへい死個体と判定します。なお、消化器官等の運動は判定基準に含みません。



ワムシ生存個体



スケールバー: 100 μ m

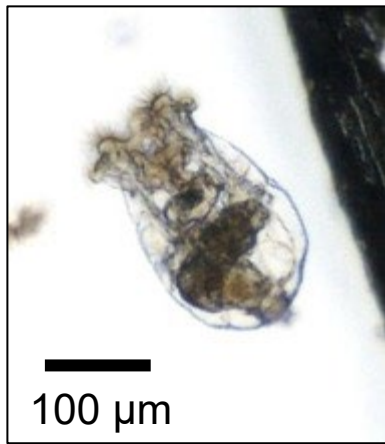
ワムシへい死個体

3. 試験方法

(4) 実験上の注意

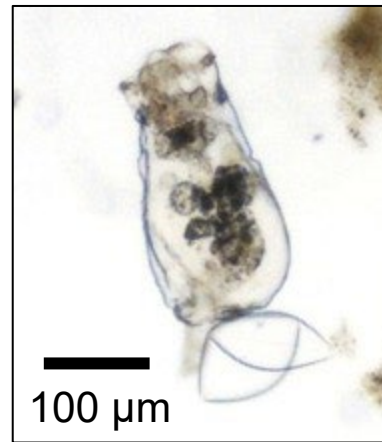
①使用するワムシの状態やサイズ

○利用可能



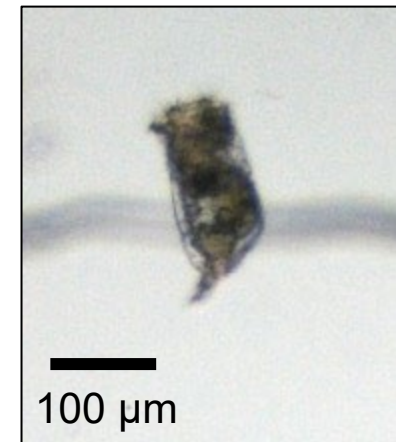
- ①サイズが200～300 μmである
(画像のワムシは 247 μm)
- ②洋ナシ型の形状である
- ③輪盤の繊毛が活発に動いており、遊泳している
- ④活発に摂餌し、消化器官等が大きい(体内に隙間なく消化器官等が観察される)

× 利用不可能



サイズは基準内(画像のワムシは 294 μm)であり、形状も洋ナシ型である。しかし、輪盤の繊毛運動や遊泳力が大きく低下している。このような死滅期を迎えた個体は、消化器官等が委縮して見える(健康な個体と比べ、体内の隙間が広い)。

× 利用不可能



繊毛運動や遊泳力等が活発であっても、サイズが基準より小さく(画像のワムシは 177 μm)、形状が寸胴型の個体は利用不可能である。
※サイズを揃えて毒性試験を実施するために、個体数の多い200～300 μmのワムシを使用する。

3. 試験方法

(4) 実験上の注意

②使用するワムシの培養スケールについて

毒性試験には、ガラスフラスコ等の閉鎖系で培養したワムシを使用することが推奨されます。しかし、試験研究機関によっては魚類仔稚魚の初期餌料として大量培養されているワムシの利用を検討されるケースがあるかもしれません。

この場合は、48ウェルプレートを用いたワムシの状態確認(山崎ほか 2023, 12頁)を実施し、大量培養しているワムシが毒性試験に供試可能であることをご確認ください。ワムシの状態が好ましくない場合は対照区(海水のみ)でもワムシの生残率が低下しますので、毒性判定ができません。また、開放系での大量培養では、繊毛虫(*Euplotes* sp., *Uronema* sp.), 太陽虫(*Oxnerella maritima*), ツリガネムシ(*Vorticella* sp.)等が混入して増殖している可能性がありますので、注意が必要です(赤潮プランクトン以外の生物がへい死要因となる可能性があるため)。

③実験者間でのへい死判定基準の統一について

異動等による担当者変更や複数の担当で実験を分担する場合は、ワムシのへい死判定基準(8頁)が実験者間で統一できていることを確実にしてください。初めて実験を行う場合はへい死判定に時間を要するかもしれません。しかし、判定に費やしている時間も赤潮プランクトンの曝露状態が継続しているため、時間をかけすぎるとは正確な毒性判定の妨げとなる可能性があります。10分以内に全ての試験区の毒性判定ができる程度の試験区の設定を心がけてください。なお、1つのプレートに収まらないような多検体の場合は1プレートずつセッティングを行い、時間差を設けて試験を進めてください。

3. 試験方法

(4) 実験上の注意

④使用するワムシの感受性チェックについて

生きている生物を毒性試験に用いる性質上、培養の状態等によって毒素に対するワムシの感受性が変化している可能性は否定できません。このため、定期的(半年～1年ごと)に毒性の感受性を確認しておくことが推奨されます。

感受性チェックの方法として、2通りの方法が挙げられます。

(a)すでに毒性が判明している*H. circularisquama*や*K. mikimotoi*等の培養株を用いる

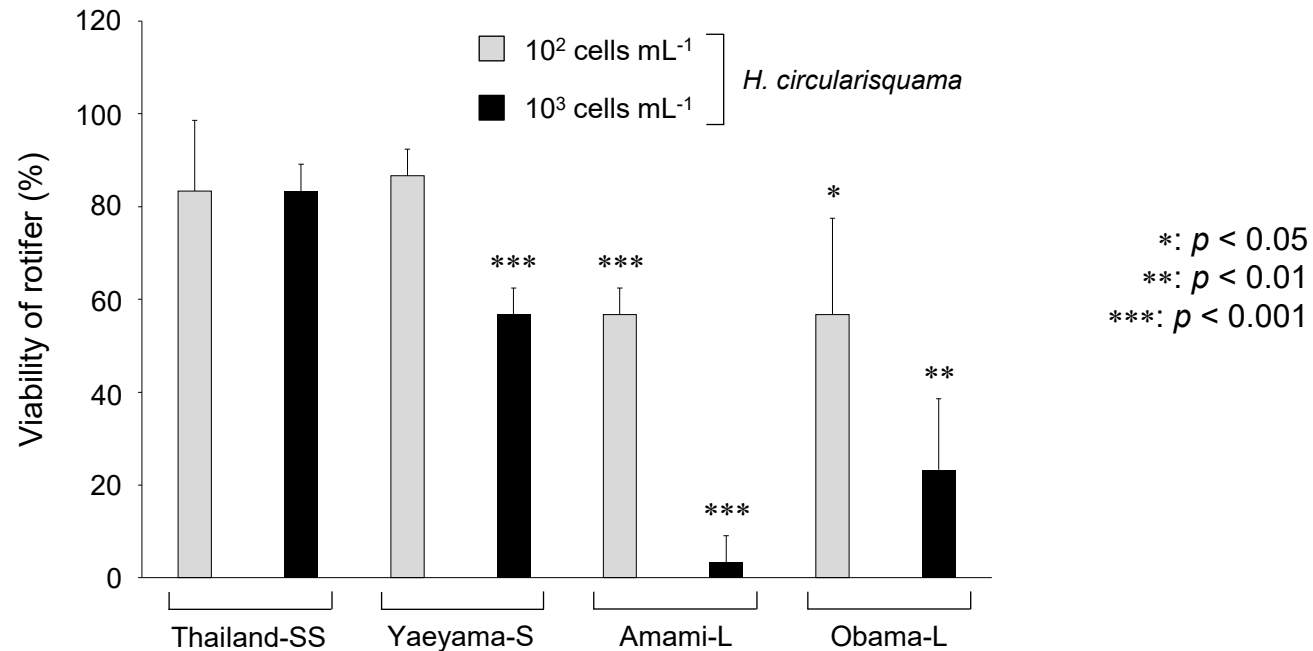
ワムシに対して強い毒性を示す*H. circularisquama*や*K. mikimotoi*等の培養株を保有されている場合は、現場試料の毒性試験時の陽性対照区としても利用可能です(15～16頁参照)。ただし、強毒のプランクトンであっても増殖段階等によって毒性が変化するケースもありますので、注意(常に同じ増殖段階で毒性試験を行うこと)が必要です。

(b)毒性が報告されている化学物質(Kashiwada et al. 1995)を用いる方法が挙げられます。

(a)の方法とは異なり、常に一定の毒力でワムシの感受性をチェックすることが可能です。よって、ワムシの感受性変化の有無を正確に捉えることが可能です。ただし、 LC_{50} が示されているのは有機リン系殺虫剤の成分であるため、取り扱いや試薬の管理・廃棄方法には注意が必要です。

4. 参考資料: ワムシ株による感受性の差異

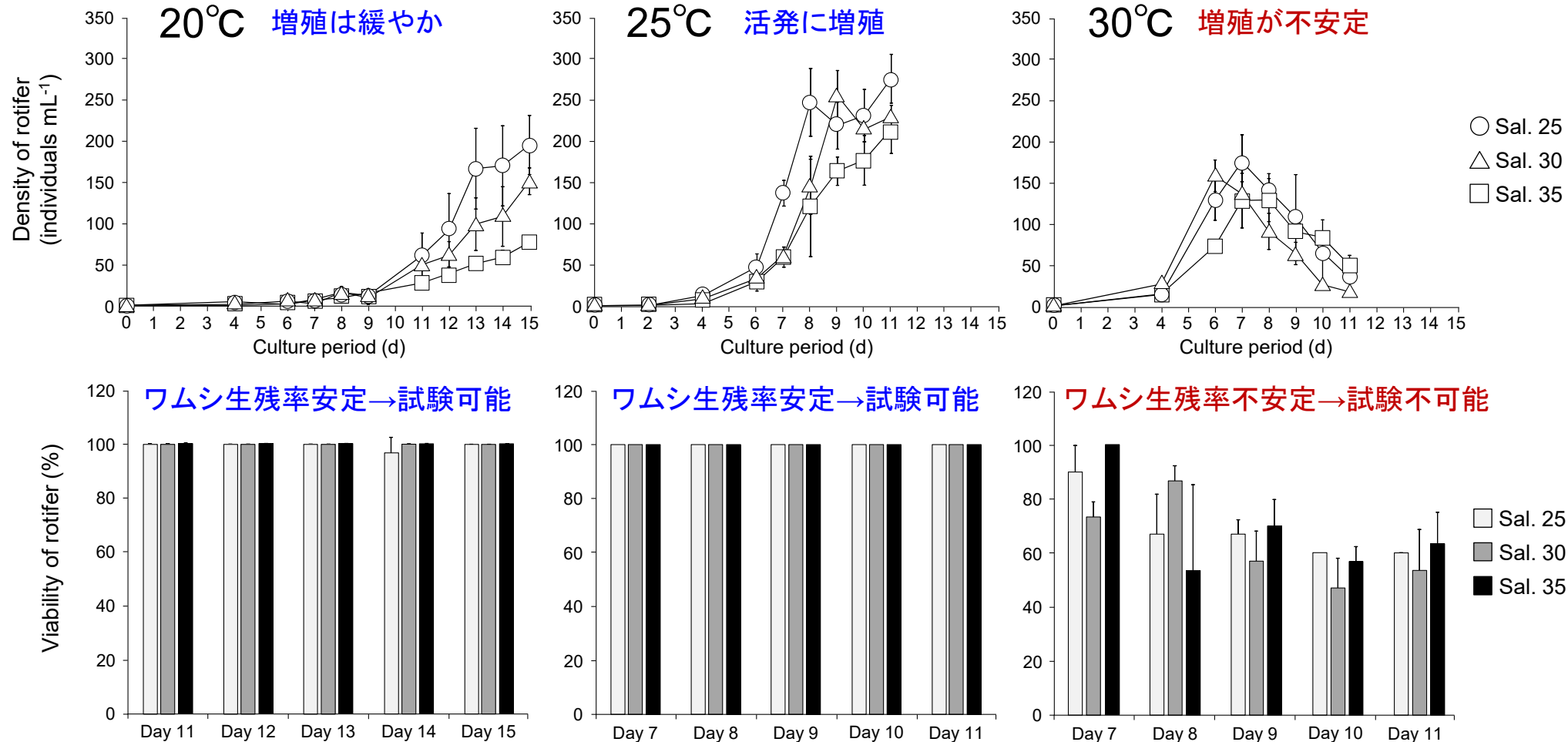
異なる4株のワムシにヘテロカプサを曝露して、株間の感受性を比較した



山崎ほか(2023)

4株のなかで最もヘテロカプサの毒性に対する感受性が高かったのは、奄美L型株でした。ヘテロカプサの毒性に対する感受性は、L型＞S型＞SS型の順に高い傾向にあります。

4. 参考資料: ワムシ毒性試験の実施条件

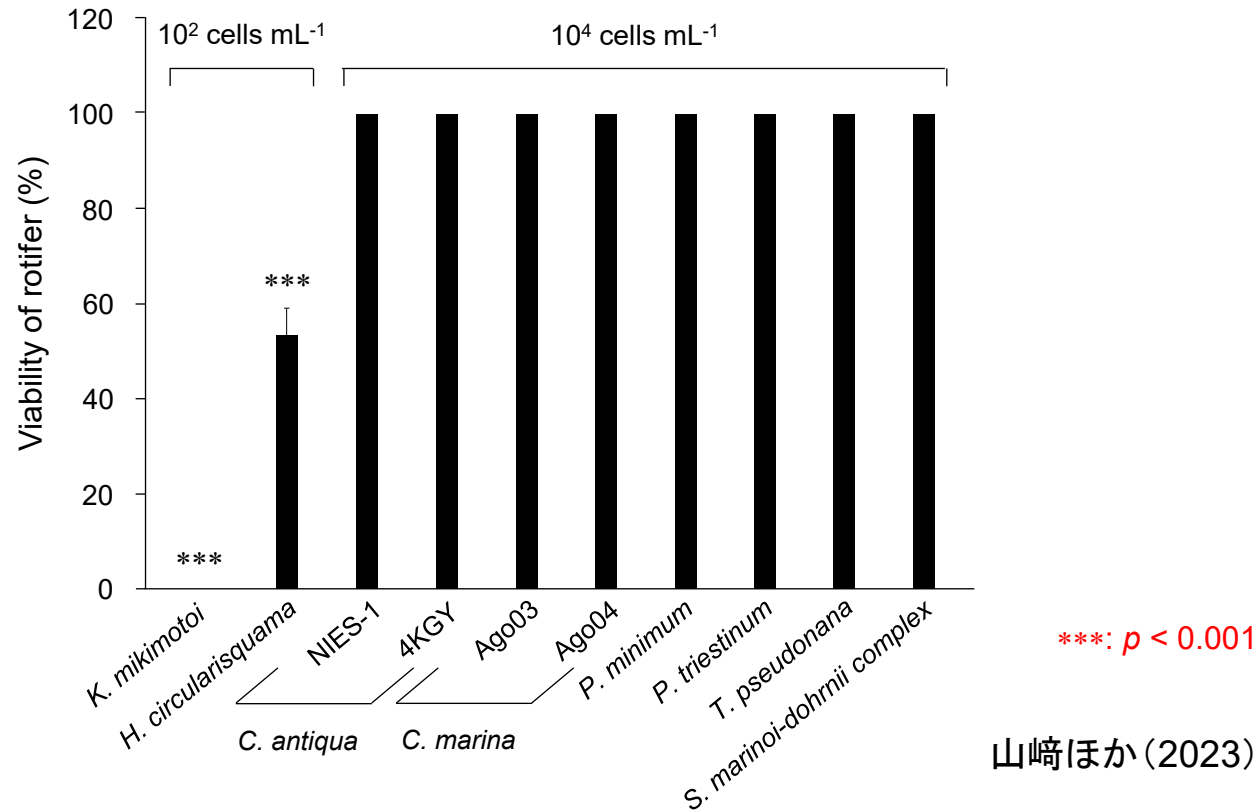


山崎ほか(2023)

ワムシの培養条件および毒性試験条件は、20°C～25°Cおよび塩分25～30です。
20°C培養では培養11日目から15日目、25°C培養では7日目から11日目のワムシを使用する必要があります。

4. 参考資料: 本試験で毒性検出可能な赤潮原因種と細胞密度

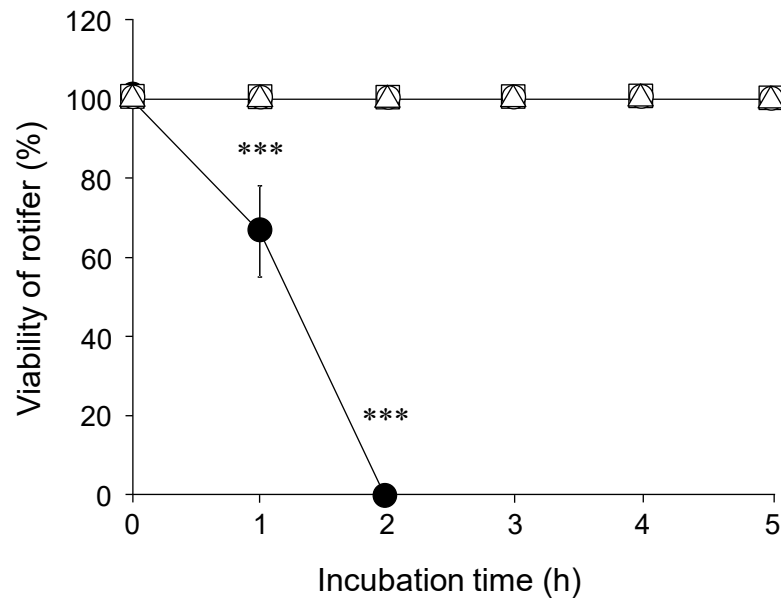
ワムシ(奄美株 L型)に様々な赤潮プランクトンを曝露して、毒性の有無を調べた



*H. circularisquama*や*K. mikimotoi*は、低密度でも本法による毒性リスク評価が可能です。少なくとも今回使用した*Chattonella*属等のラフィド藻、珪藻類3種および*Prorocentrum*属の培養株は、ワムシに対して毒性を示しませんでした。

4. 参考資料：現場採水試料を用いたワムシ毒性試験

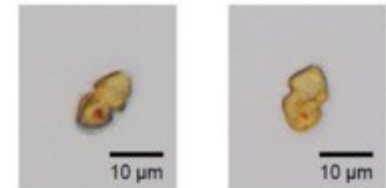
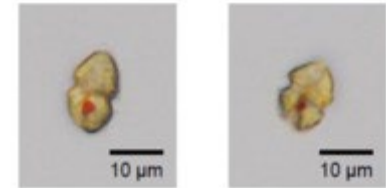
八代海宇城地先で採水した*Heterocapsa* sp.を含む海水および*H. circularisquama* 培養株(陽性対照区)をワムシ毒性試験に供した



両試料ともに
LAMP法陰性

- Control
- △ Uki-STN. A (2.4×10^4 cells mL^{-1})
- Uki-STN. B (5.0×10^4 cells mL^{-1})
- *H. circularisquama*
(10-8 strain: 12.3×10^4 cells mL^{-1})

***: $p < 0.001$



採水試料中の*Heterocapsa* sp.



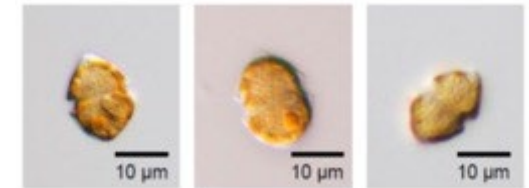
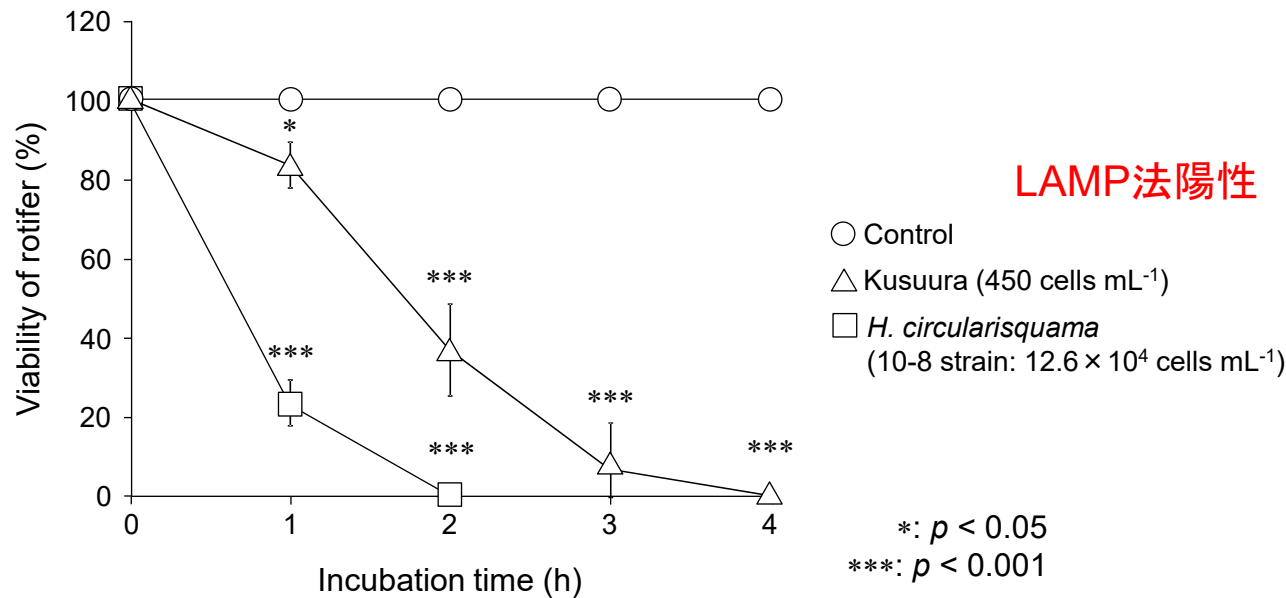
H. circularisquama

山崎ほか(2023)

現場で採集された*Heterocapsa* sp.を本法に供試した結果、ワムシのへい死は認められませんでした。後日、今回採集された細胞が*H. circularisquama*ではなかったことがLAMP法により示されました。種同定に時間を要する場合でも、毒性リスクの有無が評価可能です。

4. 参考資料：現場採水試料を用いたワムシ毒性試験

八代海楠浦湾で採水した*Heterocapsa* sp.を含む海水および*H. circularisquama*培養株（陽性対照区）をワムシ毒性試験に供した



採水試料中の*Heterocapsa* sp.



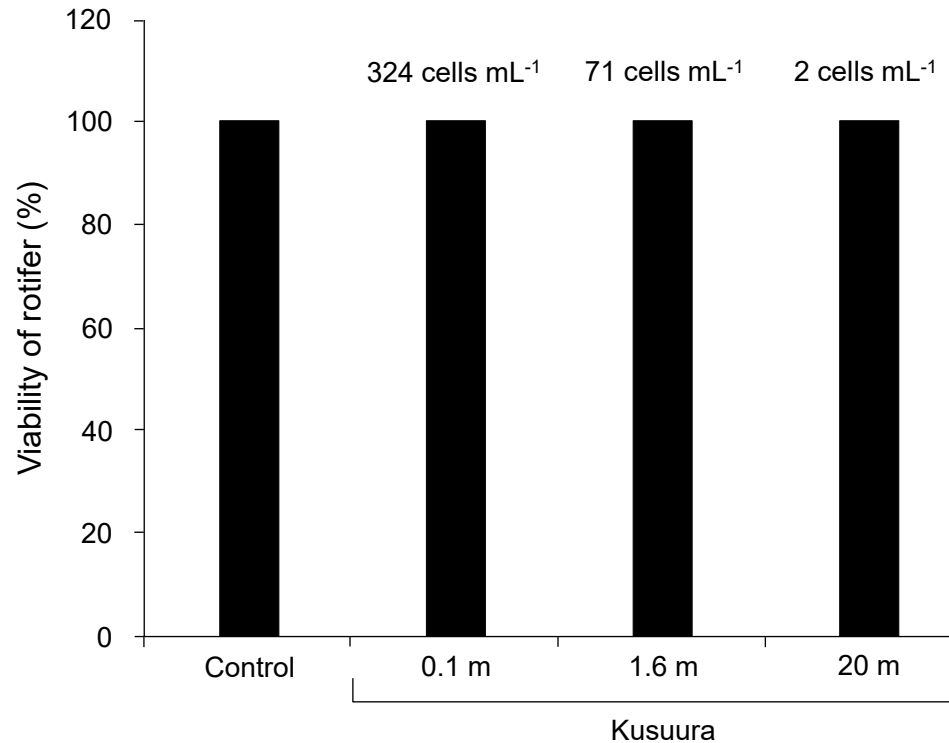
H. circularisquama

山崎ほか(2023)

現場で採集された*Heterocapsa* sp.を本法に供試した結果、曝露密度が低い状況でもワムシに対する毒性が検出されました。後日、今回採集された細胞は*H. circularisquama*であったことがLAMP法により示されました。種同定に時間を要する場合でも、毒性リスクの有無が評価可能です。

4. 参考資料：現場採水試料を用いたワムシ毒性試験

八代海楠浦湾で採水した*Chattonella antiqua*を含む海水をワムシ毒性試験に供した



山崎ほか(2023)

現場で採集された*Chattonella antiqua*を本法に供試した結果、室内実験の結果と同様にワムシに対する毒性は曝露密度に関わらず検出されませんでした。

5. 引用文献

安部哲文, 平山和次 (1979) *Gymnodinium* sp.のシオミズツボウムシ*Brachionus plicatilis*に対する致死作用. 長崎大学水産学部研究報告 46: 1–6.

Kashiwada S, Mochida K, Ozoe Y, Nakamura T (1995) Contribution of zooplankton to disappearance of organophosphorus insecticides in environment water. J. Pesticide Sci. 20: 503–512.

Kim D, Sato Y, Oda T, Muramatsu T, Matsuyama Y, Honjo T (2000) Specific toxic effect of dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on the rotifer *Brachionus plicatilis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 2719–2722.

Oda T, Sato Y, Kim D, Muramatsu T, Matsuyama Y, Honjo T (2001) Hemolytic activity of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its possible involvement in shellfish toxicity. J. Phycol. 37: 509–516.

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

Nishiguchi T, Cho K, Yasutomi M, Ueno M, Yamaguchi K, Basti L, Yamasaki Y, Takeshita S, Kim D, Oda T (2016) Intracellular haemolytic agents of *Heterocapsa circularisquama* exhibit toxic effects on *H. circularisquama* cells themselves and suppress both cell-mediated haemolytic activity and toxicity to rotifers (*Brachionus plicatilis*). Aquat. Toxicol. 179: 95–102.

Cho K, Kasaoka T, Ueno M, Basti L, Yamasaki Y, Kim D, Oda T (2017) Haemolytic activity and reactive oxygen species production of four harmful algal bloom species. Eur. J. Phycol. 52: 311–319.

Kim D, Li W, Matsuyama Y, Cho K, Yamasaki Y, Takeshita S, Yamaguchi K, Oda T (2019) Extremely high level of reactive oxygen species (ROS) production in a newly isolated strain of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. Eur. J. Phycol. 54: 632–640.

Shikata T, Taniguchi E, Sakamoto S, Kitatsuji S, Yamasaki Y, Yoshida M, Oikawa H (2020) Phylogeny, growth and toxicity of the noxious red-tide dinoflagellate *Alexandrium leei* in Japan. Reg. Stud. Mar. Sci. 36: 101265.

紫加田知幸, 湯浅光貴, 北辻さほ, 長谷川夏樹, 鶴沼辰哉, 山崎康裕, 西槇俊之 (2023) *Karenia selliformis*の毒性と鉛直移動特性. 水産海洋研究

紫加田知幸, 櫻田清成, 城本祐助, 小山長久, 生地暢, 吉田誠, 大和田紘一 (2011) 八代海におけるラフィド藻*Chattonella antiqua*の増殖および栄養塩との関係. 日本水産学会誌 77: 40-52.

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 (2023) 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 印刷中.