

## Evaluation of Micro-bioassay for the Study on the Toxic Mechanism of Dinoflagellate *Karenia mikimotoi*

長崎大学大学院生産科学研究科  
鄒 亜男

渦鞭毛藻カレニア・ミキモトイ *Karenia mikimotoi* (以下カレニア) は、魚介類の大量斃死を引き起こすため、日本の赤潮重点監視対象種に指定されている。本種赤潮による漁業被害は、日本の他、世界各地で報告されており、魚類だけでなく、貝類にも強い毒性を示すことが報告されている。本種の魚類に対する毒性因子として、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS)、溶血毒素、高度不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) およびギムノシン (Gymnocin-A) 等が報告されてきたが、特定には至っておらず、明確な毒性機構は不明である。一方、赤潮生物の毒性機構解明には、毒性被害を受ける海洋生物等を用いたバイオアッセイ法がしばしば実施されているが、実験に用いる生物の培養維持には特別な施設が必要である他、それら生物を用いたバイオアッセイではしばしば再現性が乏しく、操作も煩雑であり、赤潮研究の推進を困難にしている一因となっている。また、赤潮生物に存在すると推定される毒性因子を解明するためには、赤潮生物から毒性因子を分離・精製することが一般的に考えられる方法であるが、従来の魚介類等を用いたアッセイ法においては、大量のサンプル調製が必要になり、実際に分離・精製過程で毒性因子を検出し、その分子レベルで実態解明を遂行していくことは極めて難しいと考えられる。

そこで本研究では一般的実験室内でも実施可能な簡便で再現性の良いバイオアッセイ法を開発し、その方法論の有用性について実証することを第一の目的とした。さらに、本方法により、カレニアの毒性発現機構の解明、特にその毒性因子を突き止めることを第二の目的とする。

これまでの研究成果に基づき、博多湾(FUK)と周防灘(SUO-1)から分離された2株のカレニアについて、動物プランクトンで広く種苗生産で稚魚の餌として用いられているワムシ(*Brachionus plicatilis*) を用いたバイオアッセイを実施した。その結果、本2種のワムシに対する毒性が株間で大きく異なることを見出した。SUO-1株はワムシに対して極めて強い致死作用を示したが、FUK株は比較的ワムシ毒性が弱い事がわかった。さらに、各種動物赤血球 (ウサギ、ウマ、ウシ、およびヒツジ) を用

いて溶血活性試験を実施した結果、ワムシに対する毒性が強い SUO-1 株はいずれの赤血球に対しても強い溶血活性を示したが、FUK 株は低活性であった。従って、カレニアのワムシ毒性には溶血性毒素が関与していると推定された。一方、カレニア細胞を遠心分離で除去した培養上清、或は超音波処理により破壊した細胞では、ワムシ毒性及び溶血活性ともに著しく低下した。これらの結果から、カレニアの毒性発現には生きた細胞が重要であることが強く示唆された。さらに種々の生化学的解析から、本カレニア株の溶血活性がイオンチャネル阻害を介するものではなく、非特異的な細胞膜破壊を引き起こす界面活性剂的溶血機構であると推測された。

次に、カレニアに存在する毒性因子に関して、より詳細に検討する事を目的として、アフリカミドリザルの腎臓由来株化細胞である Vero 細胞、ブリの鰭上皮由来 MJF 細胞及びニジマスの鰓由来 RTgill-W 1 細胞を用いたバイオアッセイについて検討した。特に、細胞内マーカー酵素である LDH (lactate dehydrogenase: 乳酸脱水素酵素) の細胞外への漏れを調べる事で、細胞のダメージの度合いを推定する方法を検討した。その結果、2 株のカレニアの動物細胞に対する毒性も株間で異なることがわかった。SUO-1 株は FUK 株に比べ、いずれの細胞に対しても著しく強い LDH 放出を誘導した。また、両株の細胞破壊液や培養上清は無活性であった。従って、カレニアの動物細胞に対する毒性発現には、生きた細胞の存在が重要であると推定された。さらにアワビ (*Haliotis cradherodii*) やエビ (*Penaeus semisulcatus*) についても暴露実験を実施した。その結果、アワビやエビに対しても SUO-1 株は FUK 株に比べより強い毒性を示した。さらに、LDH 放出法により 6 種の赤潮生物 (*Karenia mikimotoi*, *Heterocapsa circularisquama*, *Heterocapsa triquetra*, *Chattonella antiqua*, *Chaetoceros neogracile*, and *Nannochloropsis oculata*) の毒性を同様に調べた。無毒 3 種 (*H. triquetra*, *C. neogracile*, and *N. oculata*) はいずれの細胞に対しても、極めて低活性であったのに対して、有害種 3 種 (*K. mikimotoi*, *H. circularisquama*, and *C. antiqua*) は、標的細胞間で異なるものの、いずれも強く LDH 放出を誘導した。以上より、LDH 放出法は赤潮プランクトンの毒性の推定に有用であると考えられた。

以上の結果から、カレニアのワムシ毒性、溶血活性、および細胞毒性は互いによく相関することがわかった。生きたカレニア細胞は、細胞膜上に存在すると推定される溶血性毒性因子を介して、標的細胞膜に直接攻撃し、結果的に魚介類に対して致死作用を発現すると推定された。さらに、本研究で開発したマイクロバイオアッセイ法、特に LDH 放出法は短時間で結果が得られるメリットに加え、マイクロプレートでのスモールスケールでの実施が可能であるため、赤潮プランクトン毒性因子の詳細な解析が可能と考えられる。

