

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580255

研究課題名(和文) マイクロバイオアッセイによる赤潮生物の毒性因子解析

研究課題名(英文) Microbioassay for the analysis of toxic factors produced by red tide phytoplankton

研究代表者

小田 達也 (ODA, Tatsuya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：60145307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：赤潮毒性研究には、これまで、魚や貝類など海洋生物を用いた方法が主流であった。本研究では、赤潮生物の毒性を解析するための、通常の実験室でも対応できる高感度でしかも簡便なマイクロバイオアッセイ法の確立とその有効性の検証を目的とした。その結果、調べた赤潮プランクトンの内、カレニア・ミキモトイが特に強い細胞毒性を発現する事がわかった。さらに、カレニア・ミキモトイの強毒株と弱毒株のアワビやクマエビに対する毒性と培養細胞を用いた毒性試験の結果は良く相関していた。以上の結果は、赤潮研究、特にその毒性機構解明にマイクロバイオアッセイ法は有効性を示すことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Harmful algal blooms (HABs) are one of serious environmental problems. To investigate the toxic mechanism of HABs species, direct exposure experiments against fish or shellfish have been conducted. However, such exposure experiments generally require special animal rearing facilities and mass-culture of phytoplankton. Usage of appropriate cultured cells as an alternative for whole living animals seems to be a promising strategy. We evaluated lactate dehydrogenase (LDH)-release assay as a simple estimation method for toxic potential of harmful algal species at cellular level. Live cell suspension of *Karenia mikimotoi* (strain SUO-1), which is highly toxic to rotifer and has potent hemolytic activity, induced the release of significant levels of LDH from all the cell lines tested in cell-density and time-dependent manners, whereas another strain of *K. mikimotoi* (strain FUK), which is less-toxic to rotifer and has low hemolytic activity, showed fairly low activities.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：プランクトン 赤潮 毒性

#### 1. 研究開始当初の背景

赤潮は発生海域の多様な生物を斃死させる事は古くから知られているが、その毒性機構の詳細は未だ不明である。赤潮の原因生物は微細植物プランクトンであるが、その種類は多様であるのに加え、それらの毒性機構も多種多様であり、その解明を困難にしている一因となっている。また、赤潮毒性研究には、これまで、魚や貝類など海洋生物を用いた方法が主流であった。しかしながら、これら海洋生物の飼育には特別な施設が必要であることや操作の煩雑さ、さらに再現性に乏しい等の問題が指摘されている。従って、赤潮原因生物の毒性を調べるより簡便な方法の開発が求められている。

#### 2. 研究の目的

本研究では、赤潮生物の毒性を解析するための、通常の実験室でも対応できる高感度でしかも簡便なマイクロバイオアッセイ法の確立とその有効性の検証を目的とした。

#### 3. 研究の方法

特に毒性が強い赤潮原因種であるシャットネラ、カレニア・ミキモトイ、ヘテロカプサ・サーキュラリスクアーマを対象としたマイクロバイオアッセイ法開発に取り組んだ。これまでに実施した種々の動物種の赤血球に対する溶血活性、ワムシやアルテミアなどの動物プランクトンに対する毒性、海洋細菌（ピブリオ属）に対する毒性試験に加え、特に動物培養細胞をターゲットとして赤潮プランクトンの直接暴露での毒性検定法開発に取り組んだ。

#### 4. 研究成果

ブリ鰓由来上皮細胞や Vero 細胞に加え、ニジマス鰓由来細胞も導入し、検討した。その結果、調べた赤潮プランクトンの内、カレニア・ミキモトイが特に強い細胞毒性を発現する事がわかった。カレニア・ミキモトイについては、これまでの研究で強毒株と弱毒株が得られており、今回用いた培養細胞に対する毒性も、株の相違を反映する結果が得られた。さらに、カレニア・ミキモトイの強毒株と弱毒株のアワビやクマエビに対する毒性と培養細胞を用いた毒性試験の結果は良く相関していた。以上の結果は、赤潮研究、特にその毒性機構解明にマイクロバイオアッセイ法は有効性を示すことがわかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

(1) Z. Jiang, M. Ueno, T. Nishiguchi, R. Abu, S. Isaka, T. Okimura, K. Yamaguchi, and T. Oda. Importance of sulfate groups for the macrophage-stimulating activities of ascophyllan isolated from the brown alga

*Ascophyllum nodosum*. Carbohydrate Research 380, 124-129 (2013). 査読有り

(2) R. Abu, Z. Jiang, M. Ueno, T. Okimura, K. Yamaguchi, and T. Oda. *In vitro* antioxidant activities of sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum*. International Journal of Biological Macromolecules, 59, 305-312 (2013). 査読有り

(3) Y. Zou, D. Kim, M. Yagi, Y. Yamasaki, J. Kurita, T. Iida, Y. Matsuyama, K. Yamaguchi, and T. Oda. Application of LDH-release assay to cellular-level evaluation of the toxic potential of harmful algal species. Biosci. Biotechnol. Biochem., 77 (2), 345-352 (2013). 査読有り

(4) Y. Wang, Z. Jiang, D. Kim, M. Ueno, T. Okimura, K. Yamaguchi, T. Oda. Stimulatory effect of the sulfated polysaccharide ascophyllan on the respiratory burst in RAW264.7 macrophages. International Journal of Biological Macromolecules, 52, 164-169(2013). 査読有り

(5) D. Kim, S. Naruse, K. Kadomura, T. Nakashima, Z. Jiang, Y. Yamasaki, K. Yamaguchi, and T. Oda. Transitional reactive oxygen species (ROS) production in fertilized egg embryos of devil stinger (*Inimicus japonicus*), a marine fish species. Biosci. Biotechnol. Biochem., 76 (8), 1561-1564 (2012). 査読有り

(6) K. Nakano, D. Kim, Z. Jiang, M. Ueno, T. Okimura, K. Yamaguchi, and T. Oda. Immunostimulatory activities of the

sulfated polysaccharide ascophyllan from *Ascophyllum nodosum* in *in vivo* and *in vitro* systems. Biosci. Biotechnol. Biochem., 76 (8), 1573-1576 (2012). 査読有り

(7) Z. Jiang, Y. Hama, K. Yamaguchi, and T. Oda. Inhibitory effect of sulphated polysaccharide porphyran on nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. J. Biochem. 151(1):65-74 (2012). 査読有り

(8) M. Ueno, T. Hiroki, S. Takeshita, Z. Jiang, D. Kim, K. Yamaguchi, and T. Oda. Comparative study on antioxidative and macrophage-stimulating activities of polyguluronic acid (PG) and polymannuronic acid (PM) prepared from alginate: Carbohydrate Research. 352, 88-93 (2012), 査読有り

(9) Y. Yamasaki, T. Yokose, T. Nishikawa, D. Kim, Z. Jiang, K. Yamaguchi, T. Oda. Effects of alginate oligosaccharide mixtures on the growth and fatty acid composition of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 113, 112-116 (2012). 査読有り

(10) Z. Jiang, T. Okimura, K. Yamaguchi, and T. Oda. The potent activity of sulfated polysaccharide, ascophyllan, isolated from *Ascophyllum nodosum* to induce nitric oxide and cytokine production from mouse macrophage RAW264.7 cells: Comparison between ascophyllan and fucoidan. Nitric Oxide. 25, 407-415, (2011). 査読有り

(11) D. Kim, K.-S. Choi, H.-K. Hong, Z. Jiang, Y. Zou, K.-S. Choi, Y. Yamasaki, Y. Matsuyama, K. Yamaguchi, and T. Oda. Comparative study on the toxic effects of red tide flagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Chattonella marina* on the short-necked clam (*Ruditapes philippinarum*). Biosci. Biotechnol. Biochem., 75 (10), 2052-2055 (2011). 査読有り

(12) D. Kim, Y. Yamasaki, Z. Jiang, Y. Nakayama, T. Yamanishi, K. Yamaguchi, T. Oda. Comparative study on modeccin- and phytohemagglutinin (PHA)-induced secretion of cytokines and nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells. Acta Biochim. Biophys. Sin., 43, 52-60 (2011). 査読有り

(13) Y. Yamasaki, Y. Zou, J. Go, T. Shikata, Y. Matsuyama, K. Nagai, Y. Shimasaki, K. Yamaguchi, Y. Oshima, T. Oda, T. Honjo. Cell contact-dependent lethal effect of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on phytoplankton-phytoplankton interaction. Journal of Sea Research. 65, 76-83 (2011). 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

(1) Zedong Jiang, Takasi Okimura, Kenichi Yamaguchi, Tatsuya Oda. Macrophage-stimulating activity of sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from marine brown alga *Ascophyllum nodosum*. 10<sup>th</sup> Carbohydrate Bioengineering Meeting. Prague, Czech Republic (April 21-24, 2013).

(2) Yanan Zou, Daekyung Kim, Yasuhiro

Yamasaki, Kenichi Yamaguchi, Tatsuya Oda.  
Evaluation of LDH-release Assay for the  
Detection and Analysis of Cellular Level  
Toxic Potential of HAB species.15th  
International Conference on Harmful Algae  
(15<sup>th</sup> ICHA 2012 Korea). CECO, Gyeongnam,  
Korea (October 29 - November 2, 2012).

(3) Junya Tomita, Tomoki Nishiguchi,  
Motoaki Yagi, Daekyung Kim, and Tatsuya  
Oda: Evaluation of toxic potential of  
newly isolated *Chattonella antiqua*, by  
laboratory exposure experiments and  
micro-bioassay using cultured cells.  
PICES-2012. October12-21, 2012, Hiroshima,  
Japan.

(4) Daekyung Kim, Kil-Nam Kim, Seong Woon  
Roh, and Tatsuya Oda:Neuroprotective  
effects of the aqueous extracts from  
*Nannochloropsis oculata* evaluated by  
AAPH-induced oxidative damage of DNA in  
hippocampal neuronal cells. The 9th  
Asian-Pacific Marine Biotechnology  
Conference. July 13-16, 2012, Kochi,  
Japan.

(5) Daekyung Kim and Tatsuya Oda:  
Detection and characterization of  
bio-toxic factors produced by red tide  
phytoplankton *Heterocapsa  
circularisquama* by micro-plate bioassay.  
The 6th Asian Pacific Phycological Forum.  
October 9-14, 2011, Yeosu, Korea.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

6. 研究組織

(1)研究代表者

小田 達也 (ODA, Tatsuya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授  
研究者番号：60145307

(2)研究分担者

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・  
准教授

山口 健一 (YAMAGUCHI, Kenichi)

研究者番号：90363473