

有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* の細胞密度及び 形態の違いがブリ *Seriola quinqueradiata* に与える影響

折田和三・西 広海・田原義雄¹

¹ 始良・伊佐地域振興局林務水産課

養殖したブリ *Seriola quinqueradiata* 1年魚を培養した異なる細胞密度の *Chattonella antiqua* に曝露したところ, 細胞密度 1,366 cells/mL 及び 2,900 cells/mL でブリが 70 ~ 104 分後にへい死した。遊泳停止又は球形化した *C. antiqua* でも細胞密度 2,100 cells/mL でブリが 79 ~ 82 分後にへい死した。このことから, 物理的・化学的的刺激により細胞形態が遊泳停止又は球形化しても遊泳細胞と同等の魚毒性が維持されている可能性が高いと推測された。へい死したブリの鰓の小出鰓動脈側は, いずれも粘液由来と思われる付着物に覆われ, 海水交換が妨げられた結果, 窒息したと考えられた。

八代海で発生する *Chattonella antiqua* 赤潮は甚大な漁業被害を及ぼすことで知られている¹⁾が, そのへい死メカニズムや毒成分は明らかにされていない。筆者らは2012年1月にブリ *Seriola quinqueradiata* 当歳魚を細胞密度 2,200 cells/mL の培養した *C. antiqua* に曝露したところ, 約30分後にへい死し, その鰓の二次鰓弁の上皮細胞が剥離し, 二次鰓弁の隙間を閉塞する等の症状を示すことを報告した。²⁾

今般, このような鰓の病理学的変化が *Chattonella* 赤潮に対する通常の反応なのか, 曝露された細胞密度によって変化部位や程度に違いがあるのか, さらに球形化した細胞も魚毒性を持つのかを確認し, へい死機構の解明と被害防止技術開発への一助とした。

なお, 本研究の一部は水産庁委託事業(漁場環境

・生物多様性保全総合対策事業のうち赤潮・貧酸素水塊漁業被害防止対策事業「シャトネラ属有害プランクトンの漁業被害防止・軽減技術に関する研究」)で実施した。

材料及び方法

試験には2009年8月4日に八代海南部で採集した *C. antiqua* を当所で分離培養したクローン株を用いた。培養には, 栄養強化海水培地である f/2 培地³⁾ から Cu と Si を除き, Se と Tris を添加した改変 f/2 培地(表1, 坂本未発表)を用い, 試験実施7日前に5L容フラスコ14本に培養株を接種し, 温度23℃, 光強度約 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 14時間明10時間暗の明暗周期, 通気下で培養を行った。

表1 改変f/2培地組成

成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
NaNO ₃	1mL	75g/1000mL	8.83 × 10 ⁻⁴ M
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1mL	5g/1000mL	3.63 × 10 ⁻⁵ M
H ₂ SeO ₃	1mL	下記参照	
Trace metals-1溶液	1mL	下記参照	
Trace metals-2溶液	1mL	下記参照	
Vitamin mix	0.5mL	下記参照	
Tris	0.5g		
Seawater	1000mL		
pH 7.4			
H ₂ SeO ₃			
成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
H ₂ SeO ₃	1mL	0.129mg/100mL	1 × 10 ⁻¹⁰ M

Trace metals-1溶液

成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1mL	0.63g/100mL	3 × 10 ⁻⁸ M
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1mL	2.2g/100mL	8 × 10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1mL	1.0g/100mL	5 × 10 ⁻⁸ M
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1mL	18.0g/100mL	9 × 10 ⁻⁹ M

蒸留水で1000mLに定容

Trace metals-2溶液

成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3.15g	-	1 × 10 ⁻⁵ M
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	4.36g	-	1 × 10 ⁻⁵ M

蒸留水で1000mLに定容

Vitamin mix

成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
Vitamin B ₁₂	1mL	0.1g/100mL	1 × 10 ⁻¹⁰ M
Biotin	10mL	0.01g/100mL	2 × 10 ⁻⁹ M
Thiamine · HCl	200mg	-	3 × 10 ⁻⁷ M

蒸留水で1000mLに定容

表2 各試験区の *Chattonella antiqua* 細胞密度及び調整方法

試験区	細胞密度 (cells/mL)	調整方法	備考
1	2,000	培養株を飼育海水で希釈	へい死密度確認
2	1,000	培養株を飼育海水で希釈	へい死密度確認
3	500	培養株を飼育海水で希釈	へい死密度確認
4	0	飼育海水のみ	試験区1~3の対照区
5	球形化2,000	培養株を防除剤で遊泳停止又は球形化させた後、上澄みを飼育海水で希釈	遊泳停止, 球形化細胞毒性確認
6	0	試験区5と同様の方法で処理後、上澄みを飼育海水で希釈	試験区5の対照区

曝露試験は、山川町漁協管内の養殖業者からブリ1年魚（平均体重 1,440 g）を 2013 年 1 月 16 日に購入し、供試魚に用いた。試験実施 1 週間前の 1 月 17 日から濾過温海水を注水して毎日約 1 ずつ水温を昇温させ、最終的に飼育水の水温を *C. antiqua* 培養温度と同じ 23 にした後、1 月 24 日の曝露試験実施までの間、給餌は行わなかった。試験実施前日に 180 L 容角形水槽に 1 試験区当たり供試魚 2 尾を入れ、1 日間濾過温海水流水で安静させた。曝露試験中は、濾過温海水の注水を停止し、1 kW ヒーターで加温し水温を 23 に維持した。また、通気及び酸素分散により酸素を供給した。

試験区は表 2 の 1 ~ 4 の 3 試験区及び対照区を細胞密度影響試験、5 ~ 6 の 1 試験区及び対照区を細胞形態影響試験とした。細胞密度影響試験は、細胞密度 5,700 ~ 11,000 cells/mL（平均細胞密度 8,900 cells/mL）となった *C. antiqua* を設定細胞密度になるように濾過温海水で希釈して用いた。細胞形態影響試験は、培養海水に赤潮防除剤（入来モンモリ 300 ppm）及び焼ミョウバン 75 ppm）を添加し、5 分間攪拌して細胞を遊泳停止又は球形化させた。曝露の際は粘土粒子による影響を避けるため、処理海水を静置・沈殿させた後、上澄み液を分取して細胞密度が 2,000 cells/mL になるように濾過温海水で希釈して用いた。また、赤潮防除剤のブリへの影響を確認するため、飼育海水に試験区 5 と同様の粘土処理を施し、静置・沈殿させた後、上澄み液を分取したものを対照区とした。それぞれの試験区にブリを 24 時間曝露し、その間の供試魚の行動を観察した。なお、試験開始直後及び 2 時間後まで適宜、水温、塩

分、溶存酸素濃度（DO）を多項目水質計（YSI 社製 Model 85）で測定し、pH は測定時刻に採水したサンプルを pH メーター（セントラル科学社製 UC-23）で測定した。

曝露試験でへい死したブリは、へい死確認後直ちに切りあげ、尾叉長及び体重を計測した。さらに、鰓を切り取り、第 1 鰓弓から第 1 及び第 2 鰓弁を数枚切り出して、光学顕微鏡（以下 LM という）で観察した。また、隣接する部位から鰓弁を含む鰓弓を 1 cm ほど切り出し 0.1 %リン酸バッファ 2 %グルタールアルデヒド固定液に浸漬した。固定された鰓弓からさらに鰓弁を切り出し、定法⁴⁾によりアルコール系列脱水、t-ブチルアルコール凍結乾燥、イオンスパッタ金属蒸着を経て、走査型電子顕微鏡（以下 SEM という）（日立製 S-3000N）で観察した。

また、0.1 %リン酸バッファ 2 %グルタールアルデヒドで固定された鰓を pH 2.5 アルシアンブルー染色（http://www.sigma-aldrich.co.jp/Technical_Support/pdf/Stain_Alcanblue.pdf, 2014 年 3 月 31 日）し、LM で観察した。

結果

曝露直後及び 1 時間後の *C. antiqua* 細胞密度を図 1 に示す。曝露直後の細胞密度は設定した細胞密度より 5 ~ 45 % 高く、試験区 1 は 2,900 cells/mL、試験区 2 は 1,366 cells/mL、試験区 3 は 570 cells/mL、試験区 5 は 2,100 cells/mL だった。曝露 1 時間後の細胞密度は、試験区 1 は 2,275 cells/mL、試験区 2 は 1,500 cells/mL、試験区 3 は 600 cells/mL、試験区 5

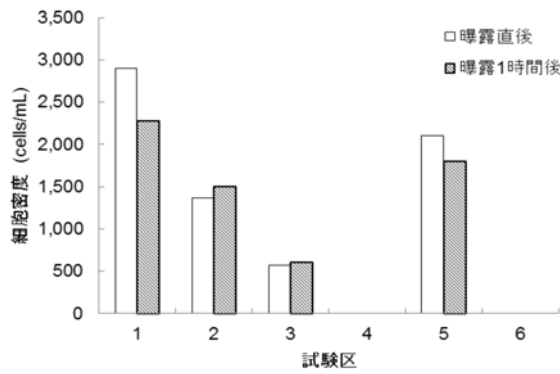


図1 *Chattonella antiqua* 細胞密度の推移

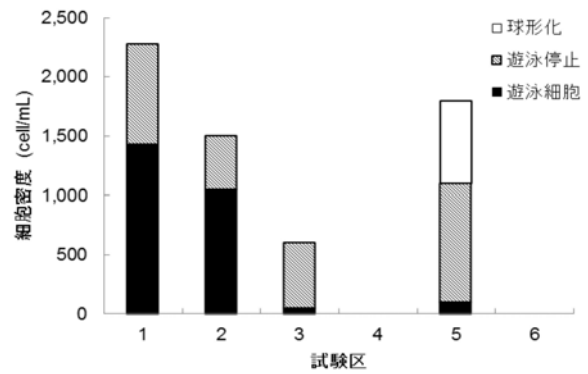


図2 曝露1時間後の *Chattonella antiqua* 細胞形態別細胞密度

は 1,800 cells/mL であり, 曝露直後の細胞密度の 78 ~ 110 % だった。

曝露 1 時間後の *C. antiqua* の形態別細胞密度を図 2 に示す。試験区 1 は遊泳細胞が 1,425 cells/mL (63 %), 試験区 2 は 1,050 cells/mL (70 %), 試験区 3 は 50 cells/mL (8 %) で, それぞれ残りは遊泳停止で球形化細胞は確認されなかった。試験区 5 は遊泳細胞が 100 cells/mL (6 %), 遊泳停止が 1,000 cell/mL (56 %), 球形化細胞が 700 cells/mL (39 %) だった。

C. antiqua に曝露したプリの生残状況を図 3 に示す。細胞密度影響試験では, 試験区 1 は曝露 70 分及び 73 分後に 2 尾ともへい死した。試験区 2 は 90

分及び 104 分後に 2 尾ともへい死した。試験区 3 及び試験区 4 は 24 時間後まで行動に異常は認められなかった。細胞形態影響試験では, 試験区 5 は 79 分及び 82 分後に 2 尾ともへい死した。試験区 6 は 24 時間後まで行動に異常は認められなかった。

曝露試験中の水質の変動状況を表 3 に示す。DO は, 試験開始時に酸素通気を行ったが, 著しく数値が高くなったため, 30 分後には全ての試験区で空気通気に切り替えたことから, 数値変動は大きくなった。へい死した試験区 1, 2, 5 の DO は, 24 時間後まで生残した他の試験区と比べても酸欠になるほど低い状態にはなかった。また, 試験区 5 及び 6

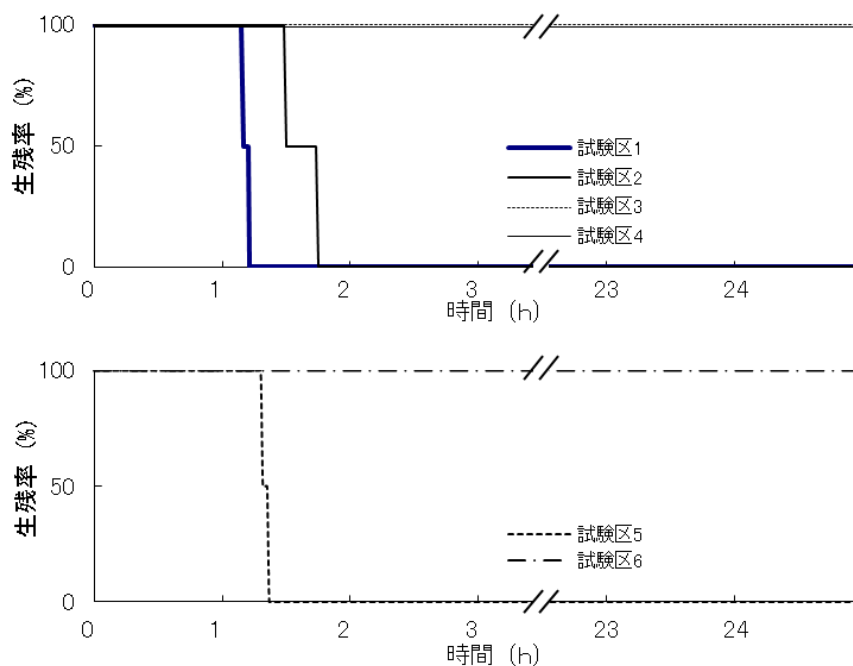


図3 *Chattonella antiqua* 曝露によるプリの生残状況
 (上段: 細胞密度影響試験 下段: 細胞形態影響試験)

表3 各試験区の水質の変動(曝露直後～2時間後まで)

試験区	水温(°C)	塩分	pH	DO(mg/L)
1	23.2～23.5	33.5～33.7	7.8～7.9	6.3～15.3
2	22.8～23.8	33.4	7.8～7.9	5.6～10.8
3	23.6～24.1	33.4～33.5	7.8～7.9	5.4～測定上限値
4	25.6～26.9	33.1～33.5	7.8～7.9	3.6～5.4
5	24.6～26.0	33.5～33.7	7.5～7.6	5.6～15.4
6	23.4～24.1	33.4	7.3～7.5	5.1～12.1

の pH は試験区 1 ～ 4 に比べやや低く，試験区 5 は対照区である試験区 6 と比べて pH がわずかに高かった。

へい死したブリの鰓の LM 画像を図 4 に示す。二次鰓弁(図中矢尻)間又は二次鰓弁上には楕円から紡錘形をしたプランクトンの細胞が確認された。これらの細胞は *C. antiqua* の遊泳細胞の形を呈しておらず不明瞭ではあるが，細胞内組織である葉緑体顆粒が残存していた(図中矢印)。

供試したブリの鰓の SEM 画像を図 5 に示す。試験区 1 の一次鰓弁は，二次鰓弁列の小出鰓動脈側前面が付着物で覆われていた(図 5-1 矢印)。二次鰓弁の小出鰓動脈側前面は基部から頂点部までが付着物で塞がれているが，頂点部から小入鰓動脈方向には付着物は認められず，上皮細胞にも剥離は認められなかった(図 5-2)。一次鰓弁の小出鰓動脈側は，上皮細胞の剥離(図 5-3 矢尻)や粘液細胞の放出痕(図 5-4 矢尻)が多数認められた。

試験区 2 の一次鰓弁は，試験区 1 と同様，二次鰓

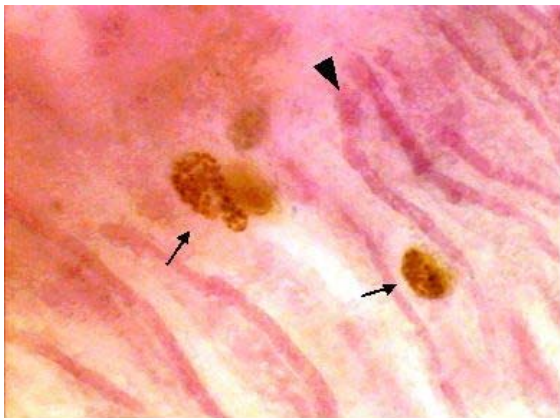


図 4 ブリの二次鰓弁上の *Chattonella antiqua* 細胞

弁列の小出鰓動脈側前面が付着物で覆われていた(図 5-5 矢印)。二次鰓弁の小出鰓動脈側前面は一次鰓弁の上皮細胞が二次鰓弁前面まで伸長するところ(図 5-6 矢印)があり，頂点部から小入鰓動脈方向には付着物は認められず，上皮細胞にも剥離は認められなかったが，二次鰓弁の毛細血管が拡張していた(図 5-7 矢尻)。一次鰓弁の小出鰓動脈側は，試験区 1 のような上皮細胞の剥離は認められなかったが，皺が寄ったような変化が認められた(図 5-8 矢尻)。

試験区 3 の一次鰓弁には，付着物はなく病理学的変化は認められなかった(図 5-9 矢印)。また，二次鰓弁にも付着物や上皮細胞の変化は認められなかった(図 5-10 矢印)が，わずかに粘液細胞の放出痕があった(図 5-11 矢尻)。二次鰓弁の毛細血管の拡張は認められなかった(図 5-12 矢尻)。

試験区 5 の一次鰓弁には，部分的に二次鰓弁列の小出鰓動脈側前面が付着物で覆われていた(図 5-13 矢印)。二次鰓弁の小出鰓動脈側前面は基部から頂点部までが付着物で塞がれているが，頂点部から小入鰓動脈方向には付着物は認められず，上皮細胞にも剥離は認められなかった(図 5-14 矢印)。一次鰓弁の小出鰓動脈側は，試験区 1 のような上皮細胞の剥離は認められなかったが，弱く皺が寄ったような変化と粘液細胞の放出痕が認められた(図 5-14 矢尻)。

試験区 1 のアルシアンブルーで染色された鰓の LM 画像を図 6 に示す。一次鰓弁小入鰓動脈側及び二次鰓弁表皮細胞下に青色に染色された粒状の組織が観察された(図 6-1, 矢印)。さらに，二次鰓弁小出鰓動脈側の SEM 画像で確認された付着物は同様の青色に染色されていた(図 6-2, 矢尻)。

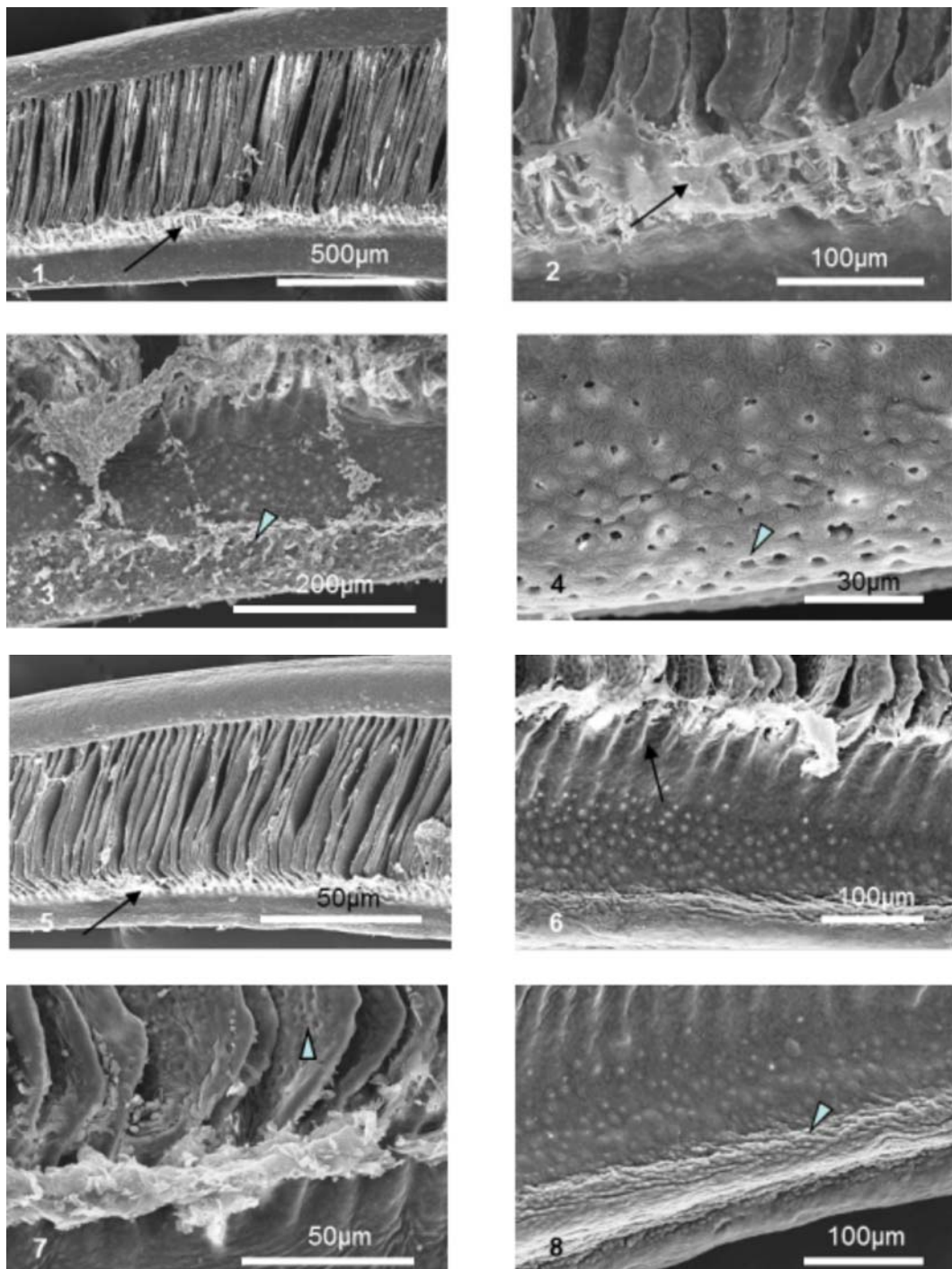


図5 供試したブリの鰓のSEM画像

(試験区1)

1 一次鰓弁 2 二次鰓弁 3 一次鰓弁の小出鰓動脈側 4 粘液細胞放出痕

(試験区2)

5 一次鰓弁 6 一次鰓弁の上皮細胞 7 二次鰓弁及び毛細血管 8 一次鰓弁
の小出鰓動脈側

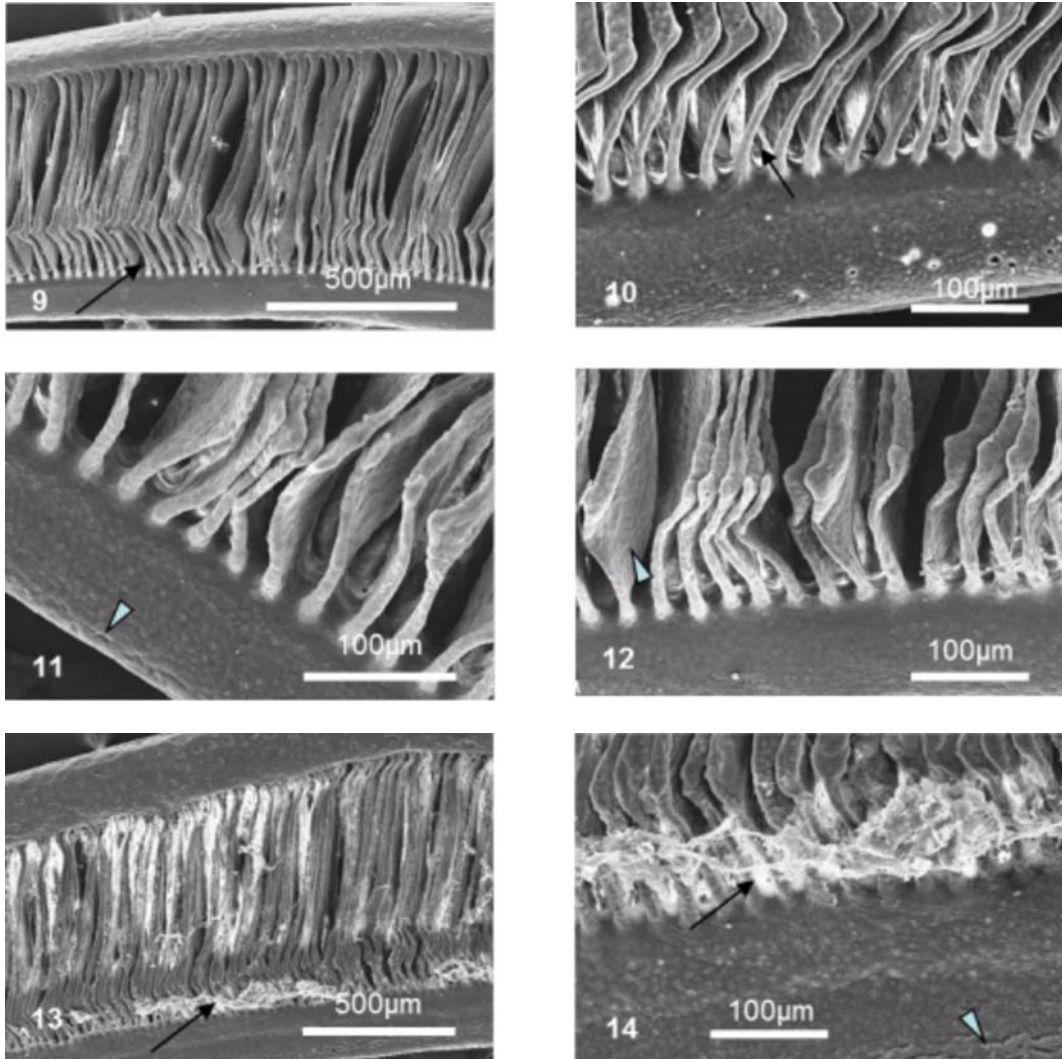


図5 供試したブリの鰓のSEM画像(続き)

(試験区3)

9 一次鰓弁 10 二次鰓弁 11 一次鰓弁の小出鰓動脈側 12 二次鰓弁の毛細血管

(試験区5)

13 一次鰓弁 14 二次鰓弁

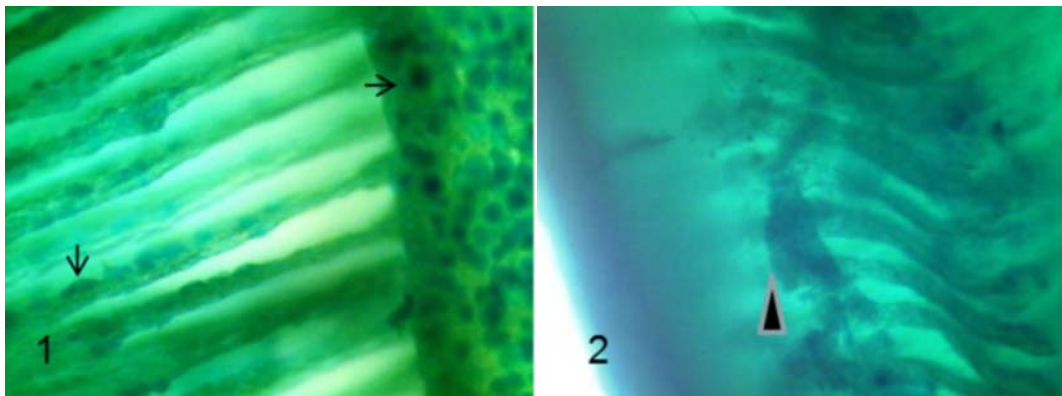


図6 へい死したブリの鰓のアルシアンブルー染色LM画像

考 察

細胞密度影響試験として、養殖したブリを異なる細胞密度の *C. antiqua* に曝露したところ、試験区 1 では 73 分以内、試験区 2 では 104 分以内に曝露したブリがへい死したが、試験区 3 では 24 時間後もへい死しなかった(図 3 上段)。曝露 1 時間後の細胞密度は曝露直後の 78 ~ 110 % だった(図 1)が、計数誤差が大きいと考えられ、大幅に細胞密度が低下した試験区はなく、曝露中はほぼ設定した細胞密度が維持されていたと思われる。曝露開始からへい死までの間の DO は酸欠を起こすような酸素濃度ではなかったことから、これらのへい死は飼育水の酸欠によるものでなく *C. antiqua* によるものと推測され、へい死に至る時間は試験区 1, 2 の順で細胞密度の高さに応じて短かった。松山ら⁵⁾ は、ブリ幼魚を供試魚とした曝露試験で、*C. antiqua* 細胞密度が高くなるに応じて 24 時間生存率が低下し、個体別の生存時間も短縮する傾向が明瞭であったとしている。今回の細胞密度影響試験は 3 試験区ではあったが細胞密度が高いほどへい死までの時間が短く、松山ら⁵⁾ と同様の傾向が見られ、約 500 ~ 1,300 cells/mL の間にへい死を引き起こす閾値があったと推測される。

細胞形態影響試験として、養殖したブリを赤潮防除剤で細胞形態を変化させた *C. antiqua* に曝露したところ、試験区 5 で 82 分以内に曝露したブリがへい死した(図 3 下段)。*C. antiqua* 細胞を添加せずに防除剤のみを添加した試験区 6 では pH が試験区 1 ~ 4 に比べやや低下し防除剤の影響と考えられるが、へい死は見られなかったことから、試験区 5 のへい死原因は粘土粒子及び粘土粒子を除去した後の防除剤添加によるものではなく、遊泳停止又は球形化した *C. antiqua* によるものと考えられる。*Chattonella* 細胞が外部刺激等により容易に形態を変える⁶⁾ ことはよく知られており、古賀⁷⁾ は水温 25℃、塩分 11.9 の培地で接種後 24 時間で約 90 % が球形化し、水温 25℃、塩分 17.8 の培地では接種 6 日後には全細胞が球形化したと報告している。また、本県が実施した粘土散布による赤潮緊急沈降試験の中で、*C. antiqua* や *C. marina* に由来モノリや活性粘土などを散布すると、その時の濃度が高くなるに応じて紡錘型をした遊泳細胞が遊泳停止、球形化細胞、細胞破壊へと変化する事⁸⁾ を報告している。試験区 5 の総細胞密度は、試験区 1 と 2 の間にある

が、細胞形態が異なる。すなわち、曝露 1 時間後の試験区 1 と 2 は遊泳と遊泳停止で球形化細胞は認められなかったが、試験区 5 はほとんど遊泳停止と球形化細胞だった。へい死に至るまでの時間は細胞密度影響試験も含めると試験区 1, 5, 2 の順で短かった。もし、球形化細胞が魚毒性を失い、遊泳と遊泳停止のみが魚毒性を持つのであれば、試験区 5 は試験区 2 よりも魚毒性を持つ細胞形態の細胞密度は低くなり、試験区 2 の方が試験区 5 よりもへい死に至る時間が短くなる可能性が高いと考えられるが、へい死に至るまでの時間とは一致しない。球形化細胞も魚毒性を持つと考えた場合、試験区 5 は試験区 2 よりも魚毒性を持つ細胞形態の細胞密度は高くなり、へい死に至るまでの時間と一致する。さらに、いったん球形化した細胞も時間経過とともに形態が遊泳停止、遊泳細胞へと回復する場合がある⁹⁾ ことから、細胞破壊以外は物理的・化学的刺激により細胞形態が変化しても魚毒性は失うことなく、遊泳細胞と同等の魚毒性が維持されている可能性が高いと推測される。

へい死した試験区 1 及び 2 のブリの鰓には、一次鰓弁の小出鰓動脈側上皮細胞の粘液細胞放出痕が多数認められ(図 5)、大量の粘液が放出されていたと推測される。さらに、試験区 1 では当該箇所の上皮細胞が剥離し、試験区 2 では皺が生じるなどの病理学的変化が確認された。これは、大量の粘液細胞放出により通常上皮組織に埋没している粘液細胞の部位が空洞化し、このため上皮細胞が剥離したり、収縮による皺が生じたものと考えられる。二次鰓弁の小出鰓動脈側を覆うように附着していた物質は、アルシアンブルーに染色されていた(図 6)ことから糖を含有する物質であり、前述のように粘液細胞の放出が確認されていることから粘液由来のものと考えられる。試験区 3 でも粘液細胞放出痕がわずかに認められたが、二次鰓弁を覆っている状態は認められなかった。これらのことから、鰓からの大量の粘液放出により、粘液が二次鰓弁の小出鰓動脈側を覆い、海水交換が妨げられ窒息によりへい死したと考えられる。

2012 年 1 月に細胞密度 2,200 cells/mL で *C. antiqua* 培養株を用いたブリ曝露試験では、32 分後には試験区全ての供試魚(平均体重 800 g)がへい死し、へい死魚の鰓の二次鰓弁は小出鰓動脈側の上皮細胞が著しく剥離していた。²⁾ 今回の曝露試験よりも短時間でへい死し、その病理学的変化も激しい

ものであり、極めて重篤な状態であったと推測される。今回の試験では、そのような二次鰓弁上皮細胞の損傷は認められず、その部位が粘液由来と思われる付着物で覆われ、これがへい死の原因と考えられた。供試魚の大きさや試験環境などブリの *C. antiqua* に対する感受性の違いやプランクトン自体が持つ毒力の違いなどにより、へい死までに至る時間や病理学的変化に差が生じたと考えられ、今後も知見を集積する必要がある。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、改変 f/2 培地組成は独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区分水産研究所 坂本節子博士の方法を参考にさせていただいた。感謝申し上げます。

文 献

- 1) 西 広海, 田原義雄, 徳永成光, 久保 満, 中村章彦. 2009年及び2010年に八代海で発生した *Chattonella antiqua* 赤潮. 鹿水技セ研報 2012; 3: 37-44.
- 2) 折田和三, 西 広海, 田原義雄, 中村章彦. 赤潮総合対策調査事業- (赤潮被害防止緊急対策事業). 平成 23 年度鹿水技セ事報 2012; 110-123.
- 3) Guillard R R L and Ryther J H . Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 1962; 8: 229-239.
- 4) (社)日本電子顕微鏡学会関東支部. 走査型電子顕微鏡 共立出版, 東京. 2000.
- 5) 松山幸彦, 吉田 誠, 鈴木健吾, 栗原健夫, 橋本和正. シャトネラ属に対する甲殻類, 貝類及び小型魚類への影響試験. 平成 23 年度漁場環境・生物多様性保全総合対策委託事業 赤潮・貧酸素水塊漁業被害防止対策事業 シャトネラ属有害プランクトンの魚介類への影響, 毒性発現機構の解明に関する研究報告書. 水産庁. 2013; 3-16.
- 6) 高山晴義. 広島県沿岸に出現する赤潮生物 - *Chattonella antiqua* (HADA)Ono と *Chattonella marina* (Subrahmayan) Hara et Chihara. 広水試研報 1983; 13: 59-64.
- 7) 古賀文洋. *Chattonella antiqua* (Chloromonadophyceae)の形態及び増殖率への塩分の影響. 南西水研報 1984; 17: 197-205.
- 8) 昭和 55 年度赤潮対策技術開発試験報告書 2-(1)粘土散布による赤潮緊急沈降試験. 鹿児島県水産試験場, 1981.
- 9) 田原義雄, 折田和三, 西 広海, 小湊幸彦. 既存赤潮防除剤の効果的使用方法の検証及び赤潮防除剤の改良. 平成 24 年度漁場環境・生物多様性保全総合対策委託事業 赤潮・貧酸素水塊漁業被害防止対策事業 シャトネラ属有害プランクトンの漁業被害防止・軽減技術に関する研究報告書. 水産庁. 2014; 3-19.