

原著論文

イメージサイトメトリーを用いた 有害赤潮原因渦鞭毛藻の死細胞検出技術の開発

外丸裕司^{*1}・木村 圭^{*2}・山口晴生^{*3}

Enumeration of cell mortality in the harmful bloom-forming dinoflagellates
Karenia mikimotoi and *Heterocapsa circularisquama* using image cytometry

Yuji TOMARU, Kei KIMURA and Haruo YAMAGUCHI

We developed a new protocol for detecting and enumerating viable and dead cells of the potentially harmful, bloom-forming dinoflagellates, *Karenia mikimotoi* and *Heterocapsa circularisquama*. The method employs image cytometry and SYTOX-green, which binds specifically to the nucleotides of dead cells and can be used to simultaneously count the number of viable and dead cells of these dinoflagellates. In this study, we evaluated increases in cell mortality due to salinity stress and virus infection in *K. mikimotoi* and *H. circularisquama*, respectively. In *K. mikimotoi*, a marked increase in cell death was observed when the salinity was decreased rapidly from 30 to <18. Similarly, viral inoculation appeared to increase the number of dead *H. circularisquama* cells in experimental cultures. It is considered that cell mortality in these algae may have been induced by changes in a variety of physical, chemical and biological factors. Further studies using this protocol would facilitate a deeper understanding of the processes affecting disintegration of harmful algal blooms.

キーワード：イメージサイトメトリー, SYTOX-Green, 死細胞, 赤潮

2015年9月10日受付 2015年12月18日受理

植物プランクトンの自然環境中における挙動を理解するため、これまでの研究の多くがその増殖という観点で進められてきた。その結果、赤潮原因種をはじめとする多くの植物プランクトンの増殖と物理・化学・生物学的諸要因との関係が明らかになってきた。一方、現場環境における植物プランクトンの挙動を把握するためには、その増殖とともに消失過程を詳細に理解する必要がある。この消失における代表的な例として動物プランクトンによる捕食があげられるが、実際には植物プランクトンの死滅には多くの要因が関与することが示唆されてい

る。例えば生物学的要因として、競合生物のアレロパシー様物質による死滅 (Yamasaki *et al.* 2007, Yamasaki *et al.* 2009), ウイルスによる感染死 (Nagasaki *et al.* 1999), 原生生物やカビの寄生による死滅 (Garces *et al.* 2013, 鏡味 2008), そして細菌による殺滅 (今井 2000) などが挙げられる。また、物理・化学的要因として、光不足や栄養塩の枯渇などのストレスも同様に、植物プランクトンの死に影響を与えることが知られている (Berges *et al.* 1998)。しかしながら、それらの死滅・殺滅因子が植物プランクトンの消失要因としてどの程度寄与しているか

*1 国立研究開発法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

〒739-0452 広島県廿日市市丸石2-17-5

National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Fisheries Research Agency,

2-17-5 Maruishi, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, JAPAN

tomaruy@affrc.go.jp

*2 佐賀大学低平地沿岸海域研究センター

*3 高知大学教育研究部自然科学系農学部門

は、定量的に検討されていない。

SYTOX-Green は核酸蛍光染色剤の一種であり、生きている細胞の膜は透過せず、生理活性を失った死細胞の膜のみを透過する性質を持つ。このことから現在、医学・生理学等、様々な研究分野で本染色剤を用いた死細胞の検出が行われている (Brussaard *et al.* 2001, Vardi *et al.* 2012)。本染色剤を用いた死細胞検出はフローサイトメトリー (FCM) や顕微鏡で行うことが可能である。しかしながら、このうち前者は高額な機械の導入が必要であり、なおかつ装置のオペレーティングが煩雑であることから、測定者に大きなコスト負担・労力を強いる。一方後者は、SYTOX-Green の蛍光検出が測定者の目視判断に依存するため、個人差が出やすく、定量結果の客観性が乏しいと指摘されている。

近年、画像解析に基づいた細胞解析技術 (イメージサイトメトリー, ICM) が発達している。本技術は顕微鏡観察による細胞の視覚化と蛍光情報の取得を同時に行うことが可能であり、FCM に対し比較的安価に導入できる機器である。操作においては FCM のようなトレーニングや顕微鏡観察のような技術の習得は必要とせず、また目視観察による人為的ミスを排除でき、定量結果に客観性をもたせることができる。

本研究では、本邦で発生する有害赤潮の中でも特に被害の大きい魚貝類致死原因渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi*, ならびに二枚貝類致死原因渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* の死細胞を SYTOX-Green 染色と ICM により検出・定量可能な手法の開発を目的とした。続いて至適化した検出条件を用い、急激な塩分変動ならびにウイルス感染によって引き起こされる *K. mikimotoi* ならびに *H. circularisquama* それぞれの死細胞発生を評価した。

材料と方法

実験供試株 培養液には、SWM-3 改変海水培地 (Chen *et al.* 1969) に 2nM の Na_2SeO_3 を添加した培地を用いた (Imai *et al.* 1996)。実験は全て水温 20°C, 光強度 140 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (12h : 12h 明暗周期) の下で実施した。*K. mikimotoi* Km6Y 無菌株および *H. circularisquama* HU9433 有菌株、いずれも分離クローン株を用いた。バクテリアの存在有無は、SYBR-Gold (最終濃度：市販品に対し 1/10⁴ 濃度) で染色した培地中の懸濁物を 0.2 μm ヌクレポアフィルター (ワットマン) 上に捕集し、蛍光顕微鏡 (励起光：470 ~ 490nm ; 蛍光：510 ~ 550nm; ダイクロイックミラー：505nm ; BX50; オリンパス) で観察することで判定した (Kimura and Tomaru 2014)。その結果、*K. mikimotoi* 株培地中にはバクテリアの存在は確認されなかった。一方、*H. circularisquama* 株の培地中にはバクテリアの存在が確認された。また、*H. circularisquama* 株に特異的に感染するウイルス HcDNAV01 株 (Tarutani *et al.* 2001) は、以下

のように調製した。対数増殖期にある *H. circularisquama* に予備培養していた HcDNAV01 株培養液を接種して 72 時間培養し、ウイルス感染によって *H. circularisquama* を溶藻させた。培養終了後、遠心処理 (2,000rpm, 10 分間, 4°C) を行った *H. circularisquama* 溶藻液の上清を採取し、さらに 0.8 μm ヌクレポアフィルターで濾過した濾液をウイルス懸濁液として用いた。

イメージサイトメトリー (ICM) 実験には Tali® イメージサイトメーター (ライフテクノロジーズ) を用いた。測定するサンプル 25 μL を Tali 測定専用スライド (Tali® Cellular Analysis Slide, ライフテクノロジーズ) に流し込みし、細胞の数と大きさ、緑色蛍光ならびにクロロフィル自家蛍光 (赤色蛍光) 強度を測定した。解析イメージを図 1 に示す。測定条件として本機の標準セットアップを用いた。励起に係る緑色ならびに赤色チャンネル用光源 (LED) の波長は、それぞれ 458 \pm 20nm ならびに 530 \pm 20nm であり、フィルターはそれぞれ 466/40 EX, 495 LP Di, 525/50 EM ならびに 543/22 EX, 580 LP Di, 585 LP EM である。スライドのスキャニングには 4 倍対物レンズ、ならびに 1.3 メガピクセルのカメラを用いた。スキャニングで得られた細胞数、細胞の大きさ、各細胞の緑色ならびに赤色蛍光強度は、本機の標準ソフトウェアで解析した。生細胞と死細胞の判定は ICM で得られる情報の内、細胞サイズ、赤色蛍光強度ならびに緑色蛍光強度によって判別した。すなわち、*K. mikimotoi* の場合、細胞サイズが 16 ~ 36 μm かつ赤色蛍光強度が 1500 以上の細胞を生細胞とし、さらに赤色蛍光強度の有無にかかわらず細胞サイズが規定値以内で緑色蛍光強度が 1500 以上ある細胞を死細胞とした。同様に *H. circularisquama* の場合は、細胞の生死に関わるパラメーターとして、細胞サイズ、赤色蛍光強度ならびに緑色蛍光強度を、それぞれ 10 ~ 30 μm , 1500 以上ならびに 1500 以上とした。いずれの場合も、ICM によってスキャンされた粒子が細胞サイズの範囲内であっても、緑色蛍光強度ならびに赤色蛍光強度が 1500 未満の場合は細胞残渣または細胞以外の粒子として扱い、データから除外した。また上記において、死細胞を規定する緑色蛍光強度は、予備実験の結果、SYTOX-Green 染色を施した生細胞の緑色蛍光強度を明らかに超える値とした。赤色蛍光強度については、残渣状の細胞が持つ赤色蛍光強度よりも、高い値とした。

死細胞の SYTOX-Green 染色性 対数増殖後期にある細胞の培養液にパラホルムアルデヒド/グルタルアルデヒド混合溶液 (Kimura *et al.* 2012) を等量添加し、4°C で一晚固定し、細胞タンパク質を変性させた。常温下で 3 分間、3,000rpm (\times 700g) の条件で遠心後、上清を取り除いた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH = 7.4) 5 mL を添加して細胞ペレットを再懸濁した後、5 分間常温で振盪 (40rpm) することで PBS 洗浄を行った。同様の PBS 洗浄を 2 回繰り返した後、Triton-X を 1% 含む

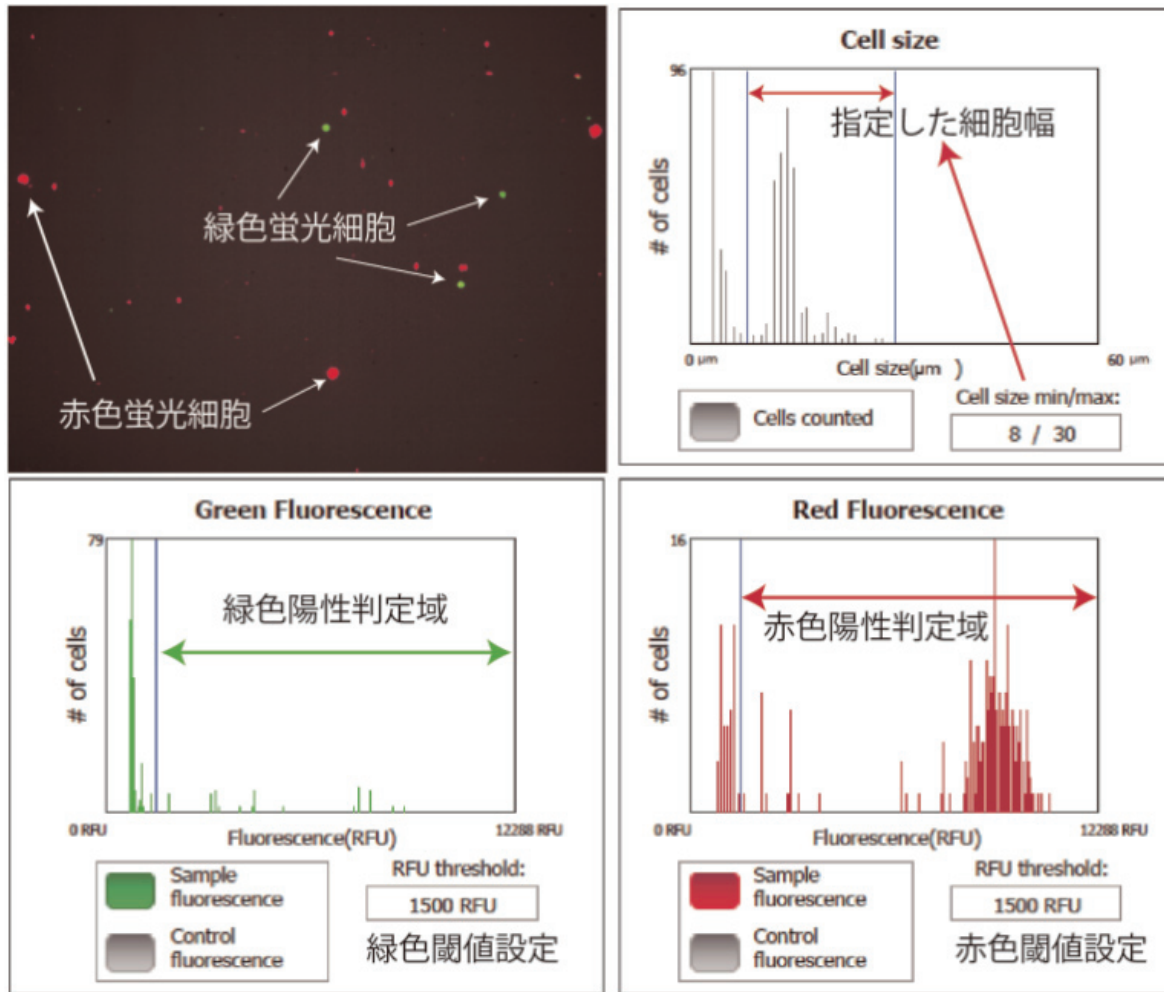


図 1. イメージサイトメーターによる測定イメージ (実際の測定画面を編集)
 左上: 同機による蛍光観察画像の一部
 (サンプル: 2014年2月7日, 徳山湾, 水深 4.4m, *Karenia mikimotoi* 2,760 cells/mL)
 右上: 細胞サイズヒストグラム
 左下: 細胞サイズゲートに入っている粒子が持つ緑色蛍光強度の分布
 右下: 細胞サイズゲートに入っている粒子が持つ赤色蛍光強度の分布
 生細胞: 細胞サイズゲート内にあり, 赤色蛍光陽性かつ緑色蛍光陰性
 死細胞: 細胞サイズゲート内にあり, 緑色蛍光陽性 (赤色蛍光の有無は問わない)

PBS 溶液 5mL を添加し, 常温で 10 分間振盪 (40rpm) した。その後, 上記の PBS 洗浄をさらに 2 回繰り返す, 適量の PBS に再懸濁した固定細胞を試料とした。

死細胞に対する SYTOX-Green による染色時間を決めるため, 以下の実験を行った。固定試料に対し, SYTOX-Green を最終濃度 0.5 μ M になるように添加し, 添加後 5, 10, 20, 30, 60 分後の全細胞の平均緑色蛍光強度を ICM で測定した。コントロールとして SYTOX-Green を添加していない固定細胞の緑色蛍光強度を測定した。*K. mikimotoi* に関する実験は 3 回繰り返す, *H. circuralisquama* の場合は 1 回のみ実施した。

藻類遊泳運動の固定と生細胞の SYTOX-Green 染色性への影響 ICM は顕微鏡による蛍光画像を基に, 画像解析を行うシステムである。そのため, 渦鞭毛藻のように遊泳運動を活発に行っている細胞に対しては, 解析を行

うための画像取得は困難となる。ここで求められる要件は, 1) 渦鞭毛藻の遊泳をグルタルアルデヒド (GA) で止めつつ, 2) GA 処理以前に生理活性を保持していた生細胞は SYTOX-Green により染色されず, 3) GA 処理以前から死んでいた細胞のみが特異的に染色されることである。これらの要件を満たす諸条件を以下のように検討した。

対数増殖後期の培養細胞に SYTOX-Green を最終濃度 0.5 μ M になるように添加し, 常温暗所で 10 分間培養した。SYTOX-Green 染色後の細胞に対し, 最終濃度 0.1% または 0.01% になるように GA を添加した。添加直後, 12, 24, 36, 48, 60 分後の全細胞の平均緑色蛍光強度を ICM で測定した。また蛍光強度 1500 以上を SYTOX-Green 染色陽性とした場合の, 全細胞集団に対する陽性細胞の割合を算出した。実験は 3 回繰り返した。

本実験では、蛍光顕微鏡観察下での死細胞の計数を、目視で迅速に行うことは現実的に不可能であった。そのため、ICMの測定と併行した蛍光顕微鏡を用いた死細胞の計数は実施しなかった。

生細胞への SYTOX-Green 添加の影響 SYTOX-Green 染色の生細胞に対する有効性または無効性を評価するため、以下の実験を行った。対数増殖中の培養に対し、SYTOX-Green を最終濃度 $0.5\mu\text{M}$ になるように添加して常温暗所に静置した。SYTOX-Green 添加直後、10、30 分後、1、2、3、6 時間後における全細胞の平均蛍光強度を ICM で測定した。実験は 3 回繰り返した。

ICM による生細胞数カウント ICM による生細胞数カウントと血球計数盤によるそれとを比較するため、以下の実験を行った。対数増殖後期の *K. mikimotoi* 細胞をそのまま、もしくは塩分変化のない SWM-3 培地で希釈し、生細胞数を倒立顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE Ti-U-Ph-2) 下でフックス-ローゼンタール血球計数盤を用いて計数した。そして同一サンプルについて、ICM による細胞数の自動カウントを行い、顕微鏡下計数と ICM 計数の値を比較した。*H. circularisquama* に関しては、下記に示すウイルス接種実験期間中に ICM 測定と同血球計数盤による細胞計数を併行して実施し、両計数値の関係を評価した。顕微鏡観察による生細胞の判定は、遊泳時の細胞と同様な本来の形態を細胞が保ち、さらに葉緑体が観察されることを基準とした。

低塩分ショックによる *K. mikimotoi* の死細胞検出 本論文で示した技術の実証例として、急激な塩分低下 (塩分ショック) が *K. mikimotoi* の死滅に与える影響について検討を行った。水温 20°C の下、塩分 30 の SWM-3 海水培地で培養していた対数増殖後期～定常初期の *K. mikimotoi* を、培地塩分 26 ~ 10 になるように SWM-3 蒸留水培地で塩分を希釈し、培養 1 時間後の死細胞を本

研究で開発した手法を用いて計数した。計数は 2 回行い、それらの平均値を測定値とした。実験開始時の *K. mikimotoi* 細胞密度は約 $12,000 \sim 24,000 \text{ cells/mL}$ になるように調整した。また塩分ショック後、培養 3 日目までの生細胞の密度変動から増殖速度 (1 日当たりの分裂回数) を算出した (Parsons *et al.* 1984)。対照区には塩分ショック区に添加した希釈用培地と等量の塩分 30 の SWM-3 海水培地を添加し、同様の操作を行った。実験は全て 3 回繰り返し、実験結果を統計学的に評価した。

***H. circularisquama* 培養へのウイルス接種による死細胞増加の検証** 対数増殖中の *H. circularisquama* にウイルス HcDNAV 懸濁液を 2% 接種し、上記と同様の SYTOX-Green 染色を施し、培養に占める死細胞の割合を経時的に求めた。ウイルス懸濁液と同量の SWM-3 培地を接種した試験区を対照区とした。実験は 1 本立てで実施した。

結果と考察

死細胞の SYTOX-Green 染色性 染色前の *K. mikimotoi* 固定細胞の緑色蛍光強度は 1243 ± 10 であったが、SYTOX-Green 添加 5 分以降では約 10,000 になった (図 2)。染色時間 5 分以上において *K. mikimotoi* 細胞の平均緑色蛍光強度に有意差は認められなかった (One-way ANOVA, $p > 0.05$)。 *H. circularisquama* 固定細胞も同様に染色前の緑色蛍光強度は 978 であったが、その値は染色後 5 分で約 8800 にまで増加した。以上のことから、死細胞に対する SYTOX-Green の染色時間は 5 分で十分と判断されるが、より確実に死細胞を染色してカウントするためには、蛍光強度が確実に飽和する 10 分以上の染色が必要と判断された。

参考ではあるが、SYTOX-Green と同様に死細胞の膜

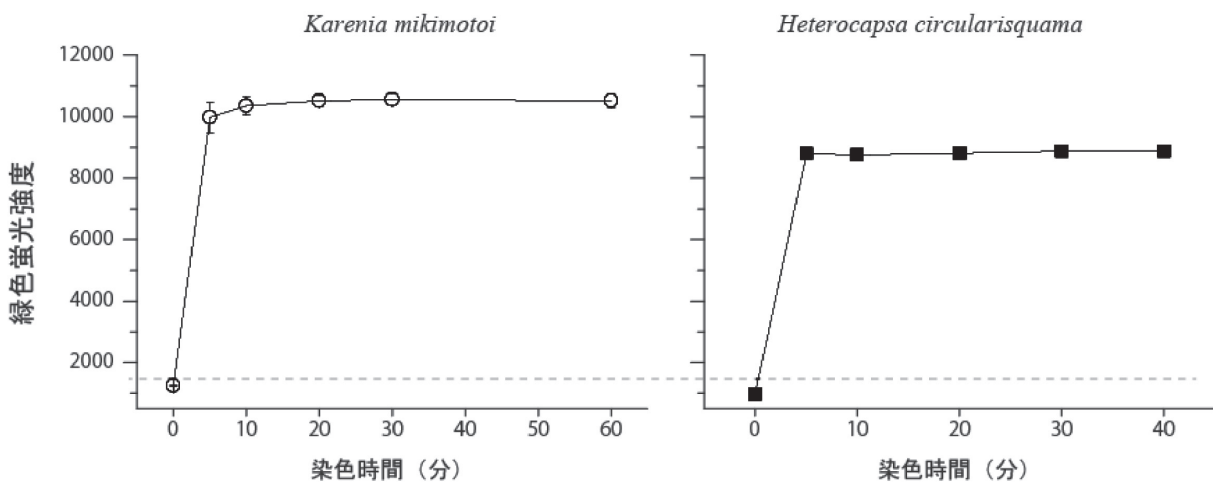


図 2. 固定処理した赤潮原因藻類に対する SYTOX-Green の染色性
点線は蛍光強度 1500 を示す
Karenia mikimotoi ($n=3$, エラーバーは標準偏差)
Heterocapsa circularisquama ($n=1$)

を特異的に透過し、核酸染色が可能な SYTOX-Blue 染色剤 (ライフテクノロジーズ) についても同様な検討を行った。その結果、後者の染色剤も前者と同様に使用可能であった (データ未発表)。

固定処理が生細胞の SYTOX-Green 染色に及ぼす影響
K. mikimotoi 細胞の動きを止めるための GA 添加処理が、SYTOX-Green 染色細胞数の増加に及ぼす影響を調べたところ、GA 終濃度 0.1% ならびに 0.01%、いずれにおいても、固定時間が長くなるほど、細胞の平均緑色蛍光強度は増加した (図 3)。なお、*K. mikimotoi* 細胞の遊泳運動は GA 処理を行った直後に停止することを、別途、通常の顕微鏡観察で確認した。GA0.01% 処理の場合、24 分後までは死と判定される細胞 (蛍光値 1500 以上の細胞) が若干増加するものの、実験開始時のそれと比べて差はなかった (One-way ANOVA, $p > 0.05$)。一方、GA0.1% 処理では固定処理 12 分後以降、GA0.01% 処理でも 36 分後以降には実験開始時よりも死細胞が有

意に増加した (Tukey-test, $p < 0.05$)。そのため ICM で、活発な遊泳運動をしている *K. mikimotoi* 生細胞と死細胞を観察・検出する場合、SYTOX-Green による染色後、GA0.01% による固定処理を実施し、それから 12 分以内に測定を終えることが望ましいと思われた。

H. circuralisquama の場合も同様に、GA の添加により、遊泳運動が直ちに停止した。そして ICM 測定では緑色蛍光強度が経時的に上昇し、死細胞の割合も GA 添加 12 分後には実験開始時と比べて明らかに増加した (Tukey-test, $p < 0.05$) (図 3)。これらのことを考慮すると、*H. circuralisquama* の場合も、遊泳を停止させるために GA0.01% 処理を実施した後は、時間を置かず、速やかに ICM 測定を実施する必要がある。

次に、対数増殖にある *K. mikimotoi* 培養細胞に SYTOX-Green を添加し、6 時間後まで生細胞の染色の程度 (緑色蛍光強度) を観察した (図 4)。その結果、実験開始から 3 時間の間、*K. mikimotoi* 生細胞の平均蛍

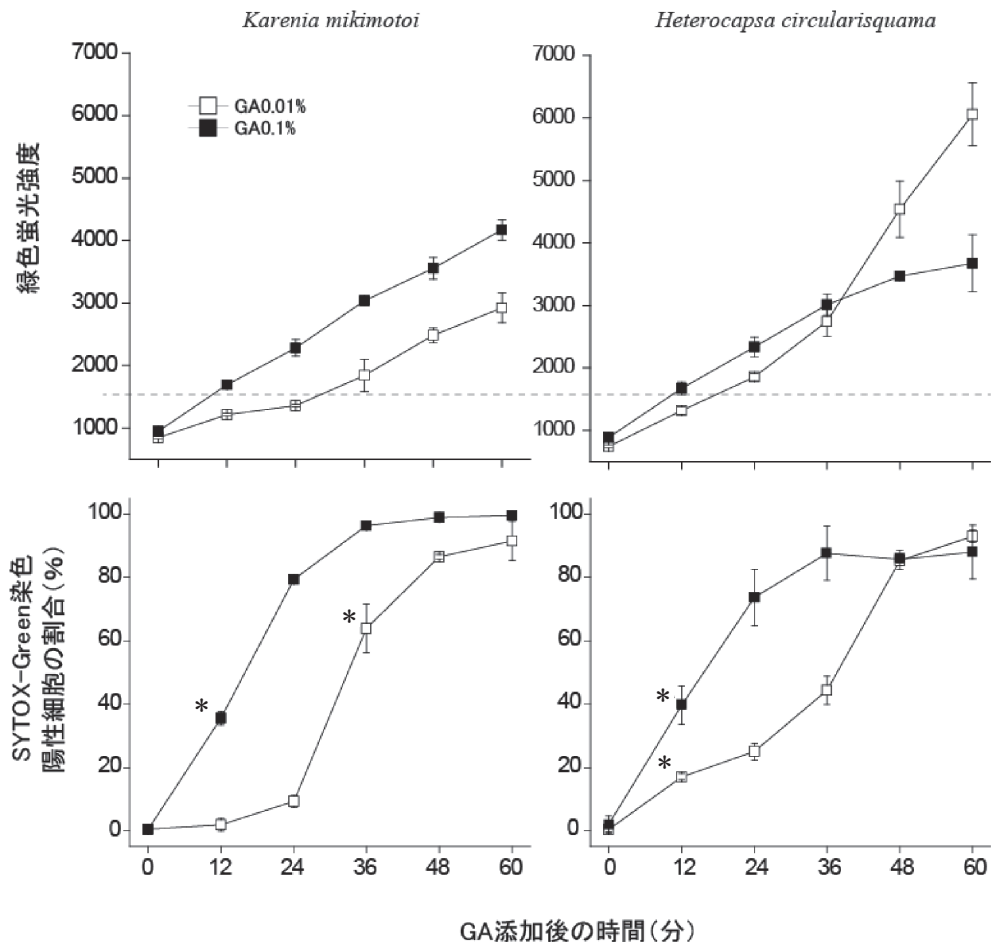


図 3. 赤潮原因藻類の生細胞を固定処理した直後からの SYTOX-Green 染色性、ならびに培養中に占める SYTOX-Green 染色陽性判定細胞 (緑色蛍光強度 ≥ 1500) の出現割合変化
 点線は蛍光強度 1500 を示す
 上段: 細胞の平均緑色蛍光強度, 下段: 培養中に占める SYTOX-Green 染色陽性細胞
 GA: グルタルアルデヒド (最終濃度)
 * $p < 0.05$ (Tukey-test): 実験開始時と比較して有意に SYTOX-Green 染色陽性細胞の割合が増加した最初の点
 $n=3$, エラーバーは標準偏差

光強度に明らかな差は認められなかった (Tukey-test, $p > 0.05$)。SYTOX-Green 添加 6 時間後の細胞の平均蛍光強度は、添加 3 時間目までのそれらよりも有意に増大することが認められた (Tukey-test, $p < 0.05$)。一方, *H. circuralisquama* の場合, 染色 30 分後において実験開始時よりも有意な緑色蛍光強度の増大が認められた (Tukey-test, $p < 0.05$)。ただしいずれの場合も, 緑色蛍光強度の増大の程度は死細胞に判定される蛍光強度 1500 よりも十分低かった。6 時間後における *H. circuralisquama* 生細胞の緑色蛍光強度は, 染色 3 時間以前のそれらの値よりも有意に高くなることが確認された (Tukey-test, $p < 0.05$)。以上の結果から, いずれの種においても SYTOX-Green を添加した後は, 10 分間以上染色し, 遅くとも 3 時間以内に測定を終えることが望ましいと思われた。

上記の測定条件を総合すると, 遊泳しているいずれの渦鞭毛藻類の場合も, 遊泳運動を止めつつ生細胞と死細胞をそれぞれ分けて計測するためには, 次のような手順が必要になると思われた。1) 培養液に対し SYTOX-Green ストック溶液 (50 μ M) を 1% 量添加する (最終濃

度 0.5 μ M)。2) 暗所で試料を 10 分~3 時間静置 (染色) する。3) 試料に対し GA 1% 溶液を 1% 量添加し (最終濃度 0.01%), 直ちに十分攪拌する。4) 速やかに ICM 測定を実施し, 12 分以内に計測を終了する。

ICM による細胞数カウント 顕微鏡ならびに ICM で求めた *K. mikimotoi* 細胞数は, ほぼ 1:1 (0.98) の有意かつ密接な相関関係にあった ($r^2 = 0.929$, $p < 0.01$, $n = 40$) (図 5)。*H. circuralisquama* の場合も同様に両手法による計数値は有意な相関関係に ($r^2 = 0.980$, $p < 0.01$, $n = 10$) あった (図 5) もの, 計数値に 10% 程度のずれが生じたため, 今後のデータ蓄積がさらに必要と思われた。本機で推奨されている最低細胞密度は試料 1 mL 当たり 10^5 細胞である。それゆえ, 測定誤差を抑えるため, ICM による細胞数カウントは 1 つの試料に対して複数回行う必要がある。

低塩分ショックによる *Karenia mikimotoi* の死細胞検出

塩分の急激な低下が *K. mikimotoi* の死に与える影響を評価した結果, 塩分 30 から塩分 18 ~ 16 まで急激に低下した場合, 1 時間後には当該微細藻の総細胞数に対して死細胞は平均で約 4% 発生し, さらに塩分 14 ならび

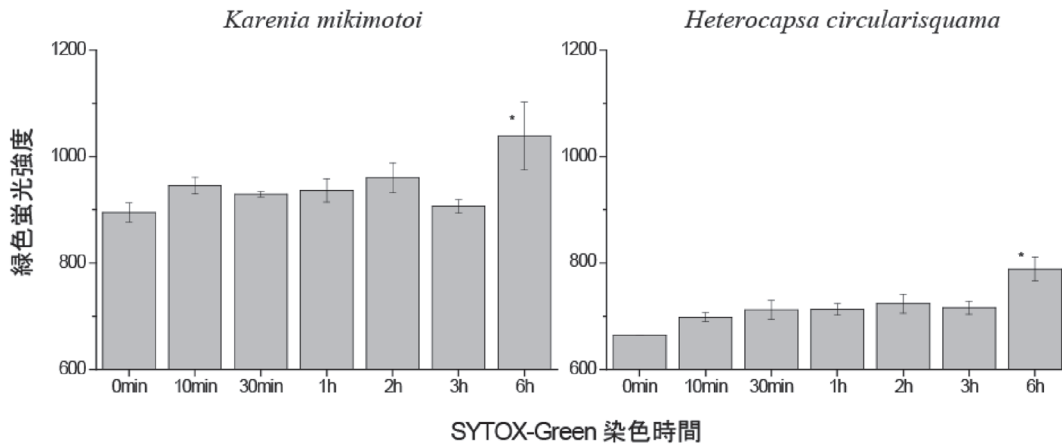


図 4. 赤潮原因藻類の生細胞に対する SYTOX-Green の染色性
* $p < 0.05$ (Tukey-test) : それ以前の緑色蛍光強度と比較して有意に蛍光強度が増加した点
 $n = 3$, エラーバーは標準偏差

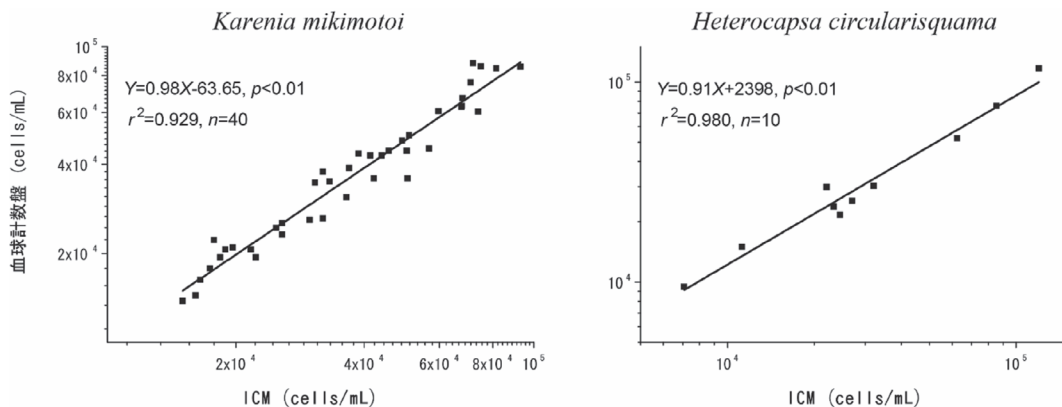


図 5. イメージサイトメーター (ICM) ならびに血球計数盤による細胞計数値

に塩分 10 ではそれぞれ約 10%, 約 50% の死細胞が発生した (図 6)。また塩分低下ショック後 3 日間の増殖速度は, 塩分 16 以下で顕著に低下した (図 7)。

本種の 20°C における増殖速度は, 塩分 15 以下 (塩分一定条件) の培養条件で急激に低下する傾向にあることが報告されている (山口 1994, 山口・本城 1989)。また, 塩分 10 における *K. mikimotoi* の増殖は確認されていない。本実験で示された急激な塩分低下による死細胞の発生, ならびにその後の生細胞の増殖は, 過去の知見に概ね合致していると思われる。そのため本実験で構築した *K. mikimotoi* の生死細胞カウントの手法は, 培養実験において有効な手法であると推察された。

K. mikimotoi は, 様々な環境変動が起こる沿岸域に分布している。本研究で構築した手法を用いることで, 物

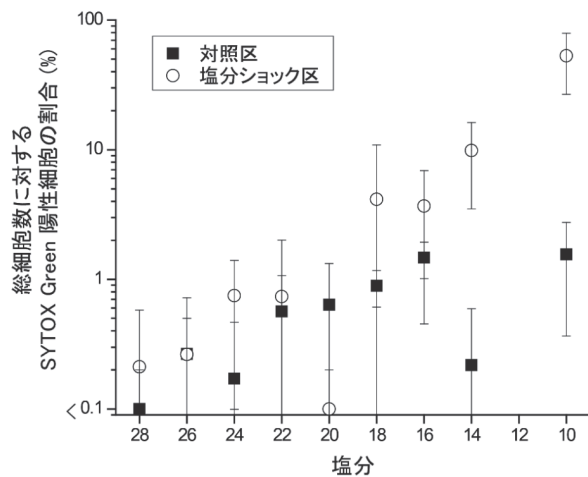


図 6. 低塩分ショック 30 分後の *Karenia mikimotoi* 培養中に占める SYTOX-Green 染色用生細胞 (死細胞) の割合
塩分 30 で培養中の *K. mikimotoi* 培養に対して蒸留水ベースの培地を添加し, 塩分を 28 から 10 までの各段階に急激に低下させた。対照区には等量の塩分 30 の培地を添加した。
 $n=3$, エラーバーは標準偏差

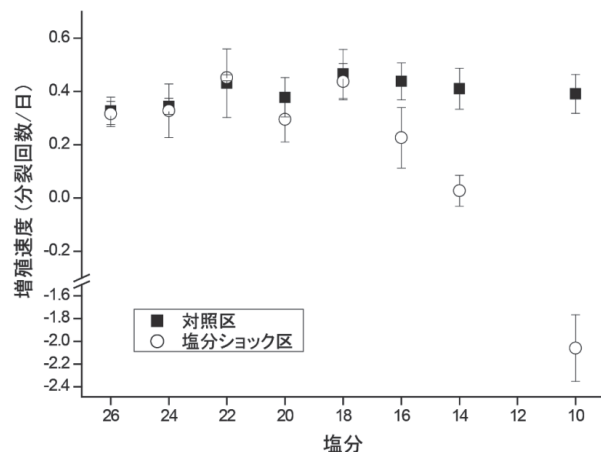


図 7. 塩分ショック後 3 日間の *Karenia mikimotoi* の平均増殖速度
 $n=3$, エラーバーは標準偏差

理・化学・生物学的要因, ならびにそれらの複合要因の変動が *K. mikimotoi* の死亡に影響する過程を, 室内実験で検証することが可能であると思われる。

H. circularisquama 培養へのウイルス接種による死細胞の増加 実験期間中の総細胞数に対する死細胞の割合は, ウイルス非接種区では 1.4% 以下であったのに対し, ウイルス接種区では接種 2 日後から 4 日後に 13 ~ 32% (2,140 ~ 4,717 cells/mL) になった (図 8)。その間, ウイルス接種区においては, 水中のウイルス感染単位の緩やかな上昇が確認されたため (データ非表示), *H. circularisquama* の死細胞はウイルス接種区で高頻度に発生していたものと推察された。HcDNAV の *H. circularisquama* に対する潜伏期間は 72 時間であることが報告されている (Nagasaki et al. 2003)。このことを踏まえると, ウイルス接種区で検出された死細胞は, ウイルス感染した *H. circularisquama* 細胞がバーストする以前の状態であり, 細胞の形態は維持されていたものの, ウイルス感染の進行により細胞膜の構造を維持可能な生理状態にはなかったと推察された。以上のことから, *H. circularisquama* の生細胞と死細胞が混在する場合でも, SYTOX-Green 染色と ICM により, 両者を客観的に区別しながら定量的に検出可能なものと判断された。

今回の SYTOX-Green 染色に関わる諸条件の検討により, 二種の赤潮原因渦鞭毛藻類について生細胞と死細胞が混在する条件でも, 測定者の主観に依存せず客観的・定量的に両細胞を検出する手法の確立に成功した。本技術開発により, 赤潮原因藻類の死滅に関わる各種要因の解析が効率化され, 赤潮終息の予察技術開発に大きく貢献するものと期待される。さらに, 本手法は細胞サイズ, 赤色蛍光 (クロロフィル自家蛍光量を反映) ならびに緑色蛍光 (生死状態判別) データを同時かつ簡便に取得可能なことから, 各種パラメーターに基づいた餌料用微細藻や現場で高密度に発生している赤潮等, 様々な場面における微細藻類の客観的状態診断技術の開発にも応用可能と思われる。

謝 辞

本研究の一部は, 平成 26 年度水産庁委託事業赤潮・貧酸素水塊対策推進事業により行われた。海水採取に御協力いただいた, 鬼塚剛博士に感謝いたします。

文 献

Berges JA, Falkowski PG (1998) Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: Induction of proteases in response to nitrogen or light limitation. *Limnol. Oceanogr.*, **43**, 129-135.
 Brussaard CPD, Marie D, Thyrhaug R, Bratbak G (2001) Flow cytometric analysis of phytoplankton viability following viral infection. *Aquat. Microb. Ecol.*, **26**, 157-166.
 Chen LCM, Edelman T, McLachlan J (1969) *Bonnemaisonia*

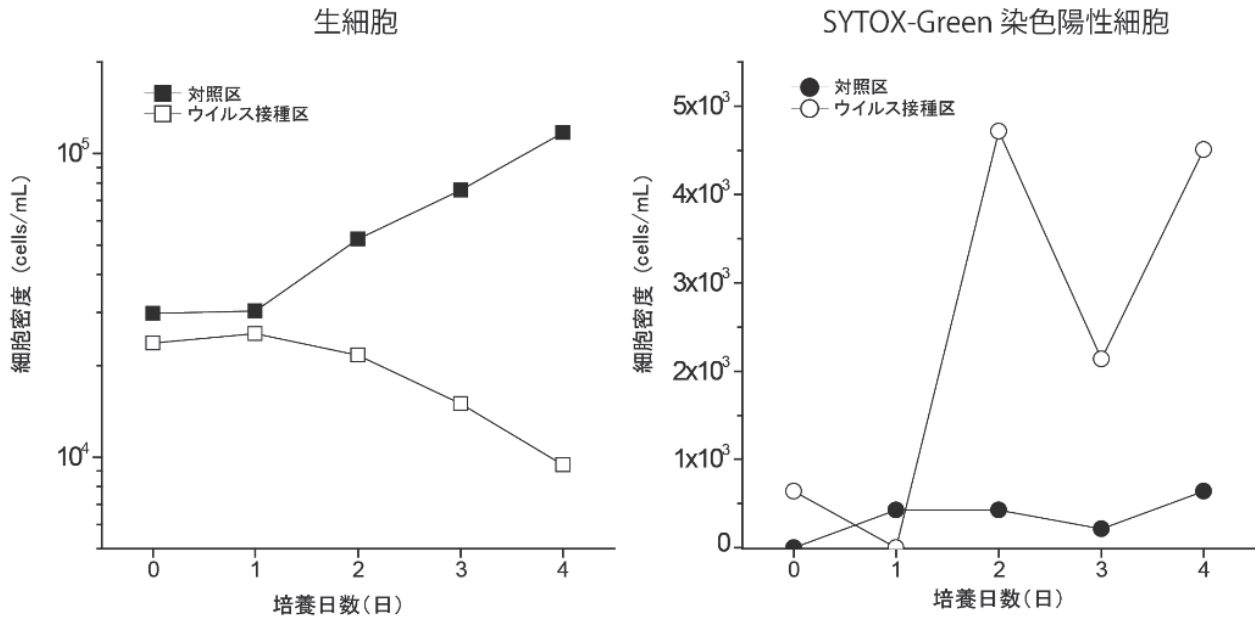


図 8. ウイルス HcDNAV 接種後の, *Heterocapsa circularisquama* 培養中に占める生細胞と SYTOX-Green 染色陽性細胞 (死細胞) 密度の変化
n=1

hamifera Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.*, **5**, 211-220.

Garces E, Alacid E, Bravo I, Fraga S, Figueroa RI (2013) Parvilucifera sinerae (Alveolata, Myzozoa) is a generalist parasitoid of dinoflagellates. *Protist*, **164**, 245-260.

今井一郎 (2000) 海洋植物プランクトンと細菌の関係. 月刊海洋, 号外 **21**, 169-177.

Imai I, Itakura S, Matsuyama Y, Yamaguchi M (1996) Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) in culture. *Fish. Sci.*, **62**, 834-835.

鏡味麻衣子 (2008) ツボカビを考慮に入れた湖沼食物網の解析. 日生態誌, **58**, 71-80.

Kimura K, Tomaru Y (2014) Coculture with marine bacteria confers resistance to complete viral lysis of diatom cultures. *Aquat. Microb. Ecol.*, **73**, 69-80.

Kimura K, Tomaru Y, Nagasaki K (2012) Ultrastructural observation of natural field phytoplankton cells by using rapid freezing and freeze substitution. *Plankton Benthos Res.*, **7**, 126-134.

Nagasaki K, Tarutani K, Yamaguchi M (1999) Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 898-902.

Nagasaki K, Tomaru Y, Tarutani K, Katanozaka N, Yamanaka S, Tanabe H, Yamaguchi M (2003) Growth characteristics and intraspecific host specificity of a large virus infecting the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2580-2586.

Parsons TR, Takahashi M, Hargrave B (1984) Biological oceanographic processes. Pergamon Press, Oxford, 330 p.

Tarutani K, Nagasaki K, Itakura S, Yamaguchi M (2001) Isolation of a virus infecting the novel shellfish-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **23**, 103-111.

Vardi A, Haramaty L, Van Mooy BA, Fredricks HF, Kimmance SA, Larsen A, Bidle KD (2012) Host-virus dynamics and subcellular controls of cell fate in a natural coccolithophore population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 19327-19332.

山口峰生 (1994) *Gymnodinium nagasakiense* の赤潮発生機構と発生予知に関する生理生態学的研究. 南西水研報, **27**, 251-394.

山口峰生・本城凡夫 (1989) 有害赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* の増殖に及ぼす水温, 塩分及び光強度の影響. 日水誌, **55**, 2029-2036.

Yamasaki Y, Nagasoe S, Matsubara T, Shikata T, Shimasaki Y, Ohshima Y, Honjo T (2007) Allelopathic interactions between the bacillariophyte *Skeletonema costatum* and the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **339**, 83-92.

Yamasaki Y, Shikata T, Nukata A, Ichiki S, Nagasoe S, Matsubara T, Shimasaki Y, Nakao M, Yamaguchi K, Ohshima Y, Oda T, Ito M, Jenkinson IR, Asakawa M, Honjo T (2009) Extracellular polysaccharide-protein complexes of a harmful alga mediate the allelopathic control it exerts within the phytoplankton community. *ISME J.*, **3**, 808-817.