

夜光虫(*Noctiluca miliaris*)の毒性について

誌名	日本プランクトン学会報
ISSN	03878961
著者	岡市, 友利 西尾, 幸郎
巻/号	23巻2号
掲載ページ	p. 75-80
発行年月	1976年12月

夜光虫 (*Noctiluca miliaris*) の毒性について¹⁾

岡市友利・西尾幸郎

香川大学農学部

Identification of Ammonia as the Toxic Principle of Red Tide of *Noctiluca miliaris*

Tomotoshi OKAICHI and Sachio NISHIO

Faculty of Agriculture, Kagawa University, Kagawa

Abstract

Occurrences of red tide of *Noctiluca miliaris* are very common in the Seto Inland Sea from spring to summer, and sometimes the organism cover several square kilometers of the sea. Red tide of *N. miliaris* in the coast of Madras has been reported to be toxic to fishes and marine invertebrates by AIYER (1936), and the species is also listed to be one of the toxic organisms by HALSTEAD (1967).

But the chemical characteristics of toxic substance(s) in *N. miliaris* have not been examined up to present. It was affirmed by the present authors that acidic extract of *N. miliaris* was not only toxic to killifishes immersed in the extract but also to mice by intraperitoneal injection. This paper deals with the extraction and the characterization of the toxic substance in the red tide of *N. miliaris*.

Acidic extract of *N. miliaris* was purified by successive treatment with charcoal, Sephadex G-10 and Cu-Chelex-100 resin. After that the toxic substance was identified as ammonia on amino acid liquid chromatography.

Ammonia, total nitrogen and ichthyotoxicity were determined on five samples of *N. miliaris* collected from red tides which appeared along the coast of Kagawa Prefecture in 1972 and 1975 (Table 1). Ammonia contents varied from 6.6 to 68.9 mg $\text{NH}_3\text{-N/g}$ on dry basis, and the ichthyotoxicity was found to be closely related to the contents of ammonia in *N. miliaris*. It is concluded from these results that the most part of the toxicity of *N. miliaris* is due to ammonia contained. The accumulation of ammonia in the cell of *N. miliaris* is also very interesting on the stand point of marine nitrogen cycle.

緒言

夜光虫 (*Noctiluca miliaris*) は春先から夏にかけてよく出現する渦鞭毛藻の一種で、瀬戸内海では近年赤潮となることが多く、瀬戸内海漁業調整事務局の調査では昭和50年度の赤潮発生総数 300 件中 113 件を占めている。夜光虫赤潮による漁業被害の報告はあまり見当たらないが、AIYAR (1936) はマドラス沖の魚類の大量斃死が夜光虫赤潮によることを報告しており、HALSTEAD (1967) は *Noctiluca miliaris* を有毒あるいは有毒と思われる鞭毛藻類種の中の一つに数えている。我が国では、夜光虫の赤潮中を通る時に活魚槽内のモジャコが急に苦悶して死ぬことがあると、徳島県水産試験場 (1968) が漁業者に警告している。

著者らは 1972 年および 1975 年に香川県各地の沿岸に発生した夜光虫赤潮を採取し毒性を調べマウス、メダカに対し致死作用があることを知った。そこで、有毒成分をメダカを用いた生物試験結果に基づいて分離・精製し、その本体が夜光虫体内に著量に含まれるアンモニアであることが明らかになったのでその結果を報告する。

¹⁾ 香川大学農学部庵治臨海実習施設業績第 5 号

材料および方法

試料: 1972年の4月, 香川県相生, 橘, 引田の沿岸部に発生した夜光虫赤潮を採取した。1975年には4月末より5月にかけて小田および大角で採取した。採取地点を合わせて Figure 1 に示す。採取した夜光虫赤潮を目の粗いカンレイシヤ布地でろ過して藻体を濃縮し, 20 l のポリ容器に集め, ただちに研究室に持ち帰り -20°C に凍結保存した。夜光虫の毒性, 毒成分の分離には相生で採取した試料を用いた。

生物試験法: 試験生物にはメダカとマウスを用いた。試験液の調製およびマウスに対する毒性試験は A.O.A.C. (1975) のマヒ性貝毒の方法を参考にし, 魚毒性試験法は HASHIMOTO *et al.* (1968) の方法に従った。夜光虫 10 g (湿重量) に 0.1 N HCl 20 ml を加え, 沸騰浴水中 5 分間加熱抽出し, 急冷後遠心分離した。マウスに対する毒性試験は上澄夜の 0.5 ml (pH 6) を 20 g のマウスに腹腔内投与し致死時間を観察した。魚毒性試験はこの上澄液にトリス緩衝液 (I=0.1, pH 9.0) を 1 ml 加え, 6N NaOH で pH 9.0 に調整後蒸留水で 50 ml とし, 100~200 mg のメダカ 5 尾を入れ水温 25°C における致死時間を測定した。

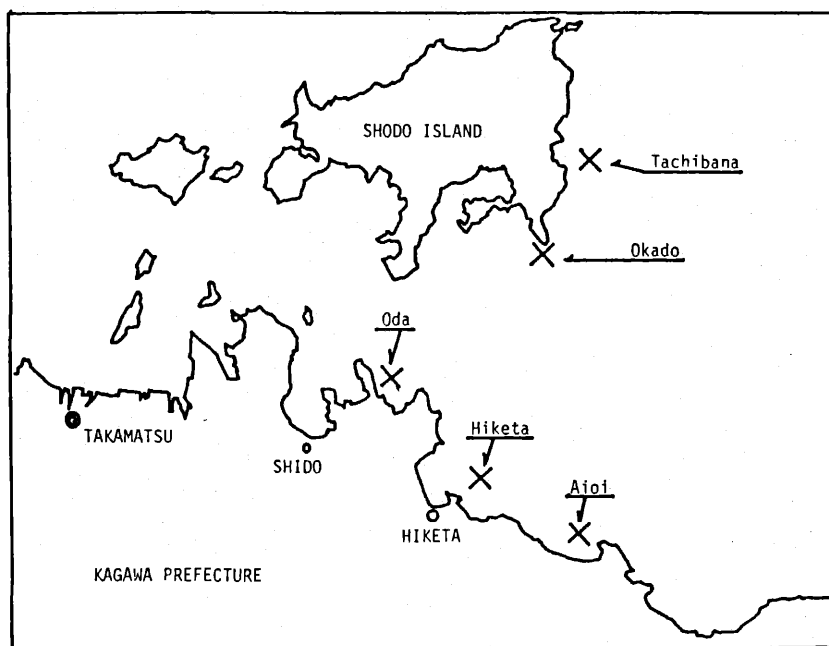


Fig. 1. Sampling stations of red tide of *Noctiluca miliaris*.

分離・精製法: N/100 HCl 酸性加熱抽出, エタノール抽出, 活性炭処理, Sephadex G-10 によるゲルろ過, Chelex-100 (Cu 型) によるアミノ酸類の除去およびカチオン交換樹脂 (Hitachi 2611) によるカラムクロマトグラフィーの操作により有毒物質を分離・精製した。カラムクロマトグラフィーには日立液体クロマトグラフ 034 型を使用した。

全窒素およびアンモニアの定量: 先に述べた方法で集めた夜光虫を 3% NaCl で洗浄した後, 全窒素をマイクロケルダール法で定量し, アンモニアは 0.1 N HCl で抽出し日立液体クロマト 034 型による塩基性アミノ酸分析法にて定量した。

結 果

魚毒性試験: a) 症状 メダカは最初体色が黒化し, 徐々に動きが鈍くなり, 死ぬ直前容器内を激しく旋回し体を痙攣させ, 時には激しく飛び上がりながら硬直状態になり死亡した。

b) pH の影響 前記の方法により調製した試験液を希 NaOH 溶液で pH 7.0, 8.0, 9.0 に調整し毒性を検討した。pH 7.0 では体色が黒化し活動が弱まるが、12 時間以内には 1 尾も死亡しなかった。一方、pH 8.0, 9.0 では 5 尾とも死亡し、その平均致死時間は各々 100 分と 106 分で大差なく、微アルカリ側で有毒であることが明らかとなった。

c) 用量致死時間曲線 前記毒性試験法に従い用量致死時間曲線を作製した (Figure 2)。平均 3 時間でメダカ 5 尾が死亡する毒量を 1 魚毒単位 (Ichthyotoxic Unit; ITU) とした。

マウスに対する毒性試験: 腹腔内投与直後から後肢が麻痺し、挙尾反応を示すものもあった。3 分後より次第に呼吸が激しくなり数回跳躍後横臥し、四肢を痙攣させながら死亡した。体重 20 g のマウスに夜光虫として 330 mg (湿重量) を含む粗抽出液を投与したところ約 10 分で死亡した。20 g のマウスが 15 分で死亡する毒量を 1 MU とするマヒ性貝毒に関する SOMMER [A.O.A.C. (1975)] の表より換算すると、夜光虫 1 g (湿重量) に含まれる毒量は約 4.5 MU に相当した。

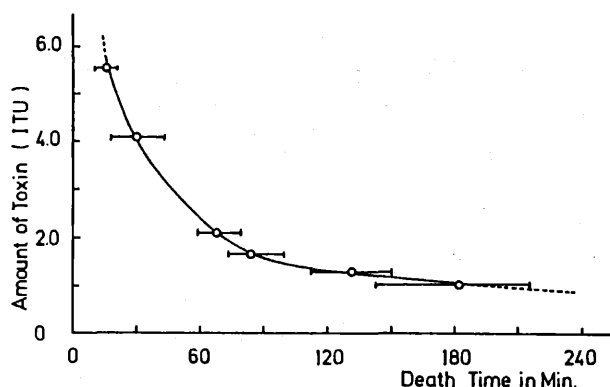
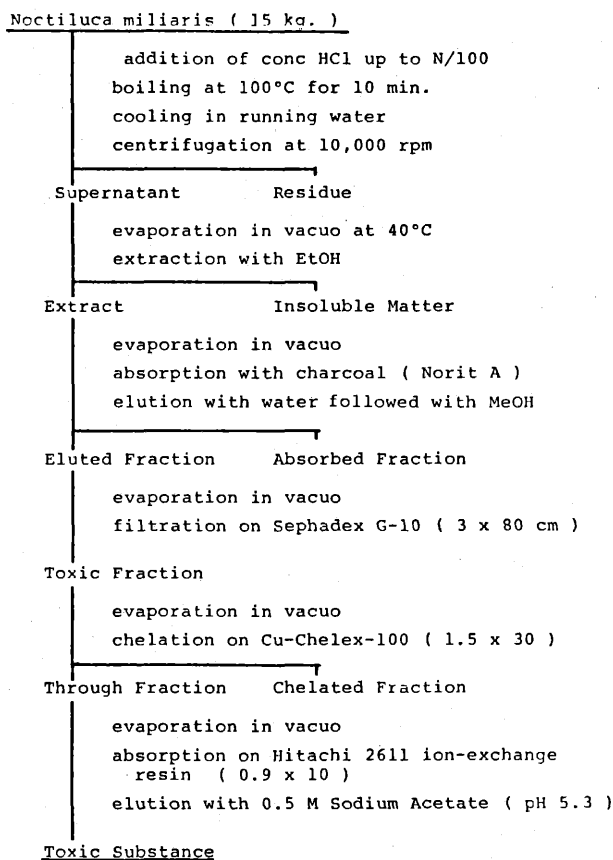


Fig. 2. Dose death time relationship.

Twenty ml of 0.1 N HCl was added to 10 g of wet *N. miliaris* and boiled to extract at 100°C for 5 min. After cooling, the extract was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. One ml of 1 M Tris buffer was added to 49 ml of the extract diluted appropriately, and the pH was adjusted to 9.0 with 6 N NaOH solution. Five killifishes (100-200 mg) were immersed in the solution, and the average death time was determined. Minimum lethal dose was defined as one ichthyotoxic unit (ITU), in which the mean death time was 180 min.

分離・精製: 毒成分は水および希酸で抽出され、熱に安定であった。エーテルなどの溶剤には中、酸性溶液から転溶しない。これらの結果に基づき分離、精製法を検討した。その概要を Figure 3 に示す。夜光虫 15 kg を解凍後、N/100 HCl 酸性とし 10 分間沸騰させ、急冷後 10,000 rpm で遠心分離し抽出液を調製した。全毒力は 6,750 ITU であり、回収率の計算にはこれを 100% とした。減圧濃縮後、エタノール抽出を行い除塩した。エタノール抽出画分を濃縮後、活性炭 (Norit A) で色素成分を除去した。水およびメタノールで溶出した画分の毒力は 2,035 ITU で回収率は 30% であった。

この濃縮液を Sephadex G-10 (3×80 cm) を用いてカラムクロマトグラフィーを行った。蒸留水で展開し 10 ml ごとに分画した。有毒成分は 40~50 番の分画に溶出し、ニンヒドリン反応陽性であった。この画分の毒力は 1,020 ITU で、回収率は 15% であった。溶出位置から有毒成分は遊離のアミノ酸と混合していると考えられたので、SIEGEL (1966) の方法により Chelex-100 (Cu 型) を用いたカラムクロマトグラフィーを行った。有毒成分は Chelex にキレートされずに溶出し、なおニンヒドリン陽性であった。有毒画分を日立 034 型アミノ酸分析計を用いてアミノ酸を分析したところ、アンモニアの溶出位置にのみ強いピークが認められた。この際の実験条件を酢酸ナトリウム緩衝液 (I=0.5, pH 5.3) を使用する調製用条件に換え、分離された各分画の生物試験を行っ

Fig. 3. Purification procedure of toxic substance from *Noctiluca miliaris*.TABLE 1. ICHTHYOTOXICITY, FREE AMMONIA AND TOTAL NITROGEN CONTENTS IN RED TIDE OF *Noctiluca miliaris*

Sampling station	Date	Total nitrogen mg-N/g*	NH ₃ mg-N/g*	Ichthyotoxicity ITU/g*
Aioi	April, 1972	94.7	68.9	8.6
Tachibana	April, 1972	89.5	46.9	7.8
Hiketa	April, 1972	61.3	35.3	2.4
Oda	April, 1975	46.3	6.6	1.0
Okado	May, 1975	56.5	15.1	1.3

* dry weight

Collected and condensed samples of *N. miliaris* on cheese cloth were washed with 3% NaCl and then lyophilized. Determination of the total nitrogen was carried out by the micro Kjeldahl method, the free ammonia by amino acid analysis method on Hitachi 034 liquid chromatograph, and the toxicity by the use of the dose-death time curve. Sampling stations are shown in Fig. 1.

た結果、有毒成分はアンモニアであると同定された。

毒性とアンモニア含有量：以上のように夜光虫の毒性は含有されるアンモニアに由来することが判明したので、Figure 1 に示す香川県沿岸部5か所で発生した赤潮から夜光虫を採集し、毒性とアンモニア態窒素含有量、全窒素量を測定した。Table 1 に示すように毒性、アンモニア含有量の最も高い値を示したのは相生より採集された試料であり、1g 乾重当たり 8.6 ITU, 68.9 mg NH₃-N のアンモニアを含有していた。全窒素量の 73% がアンモニアに相当しており、極めて高い含量を示した。小田より採集された試料は 1 ITU, 6.6 mg NH₃-N で最も低く、全窒素量に対する割合は 14% であった。標品の塩化アンモニウムを用いて生物試験を行うと、夜光虫と同じ症状を示して死亡し、その 1 ITU は供試魚の状態により変動するが約 6.6 mg NH₃-N/50 ml (132 ppm) であった。上述の分離法によるアンモニアの回収率はかなり低い、夜光虫の毒性は含有されるアンモニア濃度で充分説明することができる。

考 察

有毒鞭毛藻の中で現在までに研究が進められているのは *Exuviaella mariae-lebouriae*, *Gonyaulax catenella*, *Gonyaulax tamarensis*, *Gymnodinium breve*, *Peridinium polonicum*, *Prymnesium parvum* などである。沿岸部に頻繁に発生する夜光虫赤潮も有毒であると指摘されていたが、その有毒成分の本体が体内に著量に含まれるアンモニアであることが明らかにされた。

藤田ら (1972) はアンモニアのコイ (0.41 g) に対する 24 時間 TL_m を測定して NH₄ として 68 ppm (2.7 mg NH₃-N/50 ml に相当) と報告している。本実験でメダカの 3 時間最少致死量は NH₄ として 160 ppm (6.6 mg NH₃-N/50 ml) であり、夜光虫に見いだされたアンモニア含有量 6.6~68.9 mg NH₃-N/g は充分魚業被害を起こし得る濃度である。事実、イシダイ稚魚、ペラなどの海産魚を用いた実験でも磨砕した夜光虫を海水中に 1/5 量添加した場合に 10~20 分で魚が死ぬことが観察された。

しかし、実際には夜光虫赤潮に魚類の大量斃死が伴うことは少ない。これは、夜光虫が赤潮になっても表層 0~10 cm に濃密な層を形成するため魚類の生棲域まで影響を及ぼしにくいこと、潮流や風により容易に流されること、夜光虫の体液の pH が 4~5 とかなり低く、毒性発現には pH 8~9 が必要であることなどがアンモニアの毒性を弱める原因になっていると考えられる。しかし、著者らの観測では夜光虫の赤潮時に海水中のアンモニア濃度が約 2 ppm に達したこともあり、夜光虫赤潮を通過して活魚運搬するようなことは、徳島県水産試験場の指示のように避けなければならない。

マウスに対する毒性を調べた結果では、夜光虫として 330 mg を含む粗抽出液を腹腔内投与すると神経性の中毒症状を示し、10 分以内に死亡することが観察された。この毒力は夜光虫の湿重量で約 11.5 g/kg であった。この値を含有されるアンモニア量で表示すれば 55 mg/kg に相当する。アンモニアのマウスに対する LD が皮下注射の場合で 160 mg/kg という高木ら (1974) の記載があり、注射部位の違いを考慮すると夜光虫の粗抽出液のマウスに対する毒性も魚毒性と同じく、アンモニアによって説明できると考えられる。

なお、夜光虫体内のアンモニアの作用として KROGH (1936) により滲透圧調節作用が指摘されているが、このような多量のアンモニアの存在は生化学的にも極めて興味深く、今後アンモニアの生成に関するいろいろな検討を行う必要がある。

本研究を行うに当たり、終始御激励を頂いた東京大学農学部故橋本芳郎教授に深く感謝の意を表す。なお、研究費の一部は文部省科学研究費によった。

文 献

- AIYAR, R.G., 1936: Mortality of fish of the Madras coast in June 1935. *Current Sci.*, 4, 488-489.
 藤田 巖, 1972: 水産環境水質基準. 29, 日本水産資源保護協会, 東京.
 HALSTEAD, B.W., 1967: *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*. Vol. 1, 160, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

- HASHIMOTO, Y., T. OKAICHI, LE DUNG DANG and T. NOGUCHI, 1968: Glenodinine, an ichthyotoxic substance produced by a Dinoflagellate, *Peridinium polonicum*. *Bull. Japan. Soc. Fisheries*, **34**, 528-534.
- HORWITZ, W. (ed.), 1975: *Official Methods of Analysis of A.O.A.C.* 12th. Ed., 319-321, A.O. A.C., Washington, D.C.
- KROGH, H., 1936: *Osmotic regulation in aquatic animals*. Cambridge Univ. Press, London.
- SIEGEL, A. and E.T. DEGENS, 1966: Concentration of dissolved amino acids from saline waters by ligand-exchange chromatography. *Science*, **101**, 1098-1101.
- 高木敬次郎, 小沢 光(編), 1974: 薬物学実験. p. 209, 南山堂, 東京.