

# 赤潮およびアオコが產生する毒性化合物ならびに活性酸素種の 魚類およびヒトへの細胞レベルにおける影響

小松 正治

国立大学法人 鹿児島大学水産学部 食品・資源利用学分野  
〒890-0056 鹿児島市下荒田 4-50-20  
TEL: 099-286-4200

## 要旨

赤潮およびアオコは水棲生物ばかりでなく、ヒトをはじめ様々な生物に健康被害を与えるが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多く残されている。そこで本研究では、赤潮およびアオコが產生する毒性化合物ならびに活性酸素種の魚類およびヒトの細胞レベルにおける影響について、ゼブラフィッシュ胚、魚類由来株化培養細胞、およびヒト由来株化培養細胞を用いて解析した。赤潮プランクトンの一種の *Karenia Brevis* が產生する神経毒ブレベトキシンは、ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞に対して細胞毒性を発揮しなかつたが、ウワバインとの複合曝露によりウワバインの毒性を増強した。また、ブレベトキシンはゼブラフィッシュ胚の発生を促進する傾向を示したものの催奇形性が認められた。一方、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に肝細胞取り込み輸送体タンパク質 OATP1B1 または OATP1B3 を強制発現させた細胞を用いた解析において、藍藻毒マイクロシスチン LR は OATP1B1 または OATP1B3 を介して細胞内に取り込まれ、細胞毒性を発揮した。また、マイクロシスチン LR はゼブラフィッシュ胚の発生を促進する傾向が観察された。さらに、キンギョ鱗由来線維芽細胞 GAKS はヒト由来 HEK293 と比較して過酸化水素曝露のストレスに対して約 8 倍の感受性を示した。

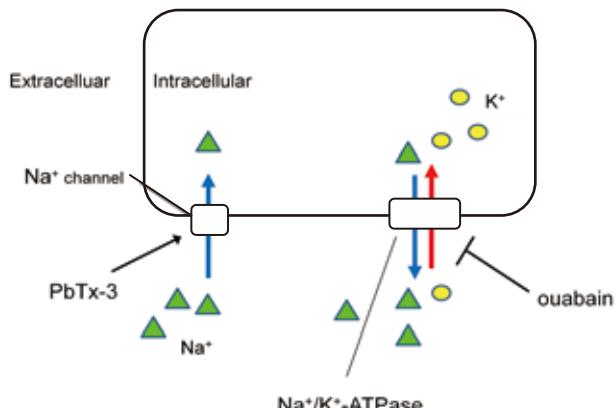
## 1. 緒言

例年、夏場を中心に鹿児島湾や長島沖の八代海をはじめとして赤潮の発生による漁業・養殖被害が出ているが、珪藻類、渦鞭毛藻類、およびラフィド藻類などのいわゆる赤潮プランクトン類による魚類への毒性発現のメカニズムは、単なる魚類の窒息だけでは説明できない部分があり、不明な点が多く残されている。一部の赤潮プランクトン類は、毒性化合物および活性酸素種を產生することが知られている<sup>1)</sup>が、これらの魚類およびヒトへの影響を詳細に解析した研究は少ない。一方、湖などの淡水域においては藍藻類が異常増殖したアオコが発生しやすく、水圈生物はもちろんのこと、それ以外にもアオコが発生した水を利用する野

生生物ならびにヒトへの健康影響が危惧される。そこで、本研究では赤潮プランクトン類およびアオコを形成する藍藻類が産生する毒性化合物ならびに活性酸素種が魚類ならびにヒトに細胞レベルで与える影響を、ゼブラフィッシュ胚、魚類由来株化培養細胞、およびヒト由来株化培養細胞を用いて解析した。

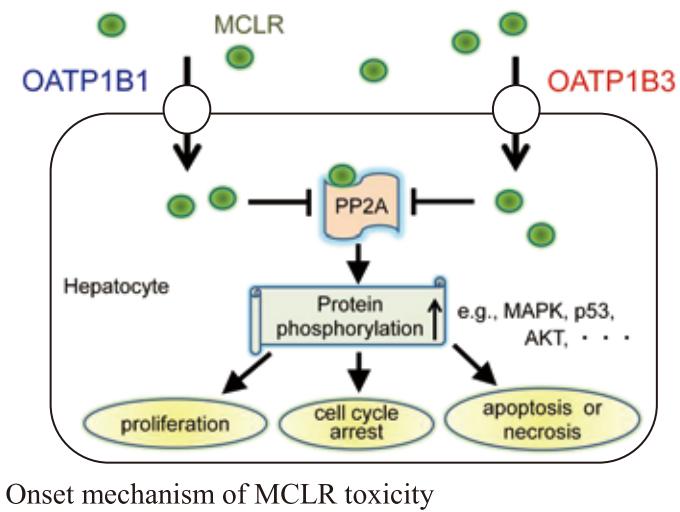
## 2. 理論

*Karenia Brevis* は神経毒ブレベトキシンを産生する。ブレベトキシンは、シガテラ毒のシガトキシンと同様に中枢・末梢神経系の細胞膜上の電位依存性ナトリウムイオンチャネルを開放し、細胞内へのナトリウムイオンならびにカルシウムイオンの流入を促進し、細胞内外のイオンバランスを崩壊させると同時にこれらのイオンがセカンドメッセンジャーとなり、細胞毒性を発揮する。また、エアロゾル化し大気中に移動したブレベトキシンがヒトを含めた陸生動物へ悪影響を及ぼすことも知られている<sup>2)</sup>。また、赤潮プランクトンが魚毒性を発揮する機構の一つとして、赤潮プランクトンが魚類の鰓に物理的に吸着することに起因する窒息ばかりでなく、赤潮プランクトンが活性酸素種(ROS)を産生し、ROS の毒性シグナリングが関わっていることが示唆されている。



Onset mechanism of PbTx-3 toxicity

肝臓毒マイクロシスチン LR は、肝細胞の毛細血管側の類洞基底膜にのみ特異的に発現している有機陰イオン輸送体タンパク質 OATP1B1 および OATP1B3 を介して肝細胞内に選択的に取り込まれ、タンパク質脱リン酸化酵素 PP1 および PP2A を特異的かつ不可逆的に阻害することを引き金にして、細胞内にリン酸化タンパク質を蓄積させ、細胞の正常な営みを乱すことにより、細胞毒性を誘導することが知られている<sup>3)</sup>。マイクロシスチン LR は、ヒトをはじめ家畜や野生動物に肝毒性を発揮するが、魚類はマイクロシスチン LR に対して感受性が低く、また種差が大きいことが知られており、なかにはマイクロシスチン LR に対して感受性を示さない魚種も知られている<sup>4)</sup>。



Onset mechanism of MCLR toxicity

### 3. 実験

培養細胞を用いたストレス評価は MTT 法に準じて実施した。ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞を 96 穴プレートに播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間 DMEM/F-12-10%FCS を用いて培養後、ヒトの細胞外 Na<sup>+</sup>濃度が 145mM であることを考慮し、終濃度 145mM の NaCl、各終濃度の PbTx-3、および各終濃度のウワバインを曝露し、さらに 3 日間培養した。培養後に MTT アッセイにより細胞毒性を評価した。

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に OATP1B1 または OATP1B3 を強制発現させた HEK293-OATP1B1 または HEK293-OATP1B3 細胞を 96 穴プレートに播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間 MEM-10%FCS を用いて培養後、各終濃度の MCLR を曝露し、さらに 3 日間培養した。培養後に MTT アッセイにより細胞毒性を評価した。対照には空ベクターを導入した HEK293-CV 細胞を用いた。

ゼブラフィッシュ受精卵を用いたストレス評価は以下のように実施した。まず、ゼブラフィッシュのオス 1 尾とメス 1 尾を産卵用水槽に移し、一晩または二晩産卵が確認されるまで飼育した。この産卵用飼育水槽の底部から数 cm の位置に網目サイズ 2mm のメッシュを設置し、親魚による卵の捕食を防いだ。産卵後の卵を観察し、白濁した未受精卵および糞便等を取り除きながら、受精卵をイオン交換水で数回洗浄した。洗浄後の受精卵を 96 穴プレートに 1 ウェルあたり 1 個ずつ蒔き、ただちに PbTx-3 または MCLR を曝露した。曝露後の経時的な孵化数を計測し、孵化速度ならびに孵化率を求めた。また、孵化した仔魚を実体顕微鏡で観察した。

キンギョ鱗線維芽細胞由来の GAKS 細胞および HEK293 細胞を 96 穴プレートに播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間 DMEM-10%FCS を用いて培養後、各終濃度の過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を曝露し、さらに 3 日間培養した。培養後に MTT アッセイにより細胞毒性を評価し

た。

#### 4. 結果および考察

SH-SY5Y 細胞に PbTx-3 を単独曝露した結果、 $10\text{pM} \sim 10\mu\text{M}$  の範囲内では細胞毒性は検出されなかった。一方、ウワバインの単独曝露条件下では濃度依存的に細胞の生存率が低下し、細胞の半数致死濃度は  $61.3\text{nM}$  であった。PbTx-3 とウワバインの複合曝露試験の結果、ウワバインの単独曝露に比べて PbTx-3 の濃度依存的に細胞毒性が増強された (Fig.1)。

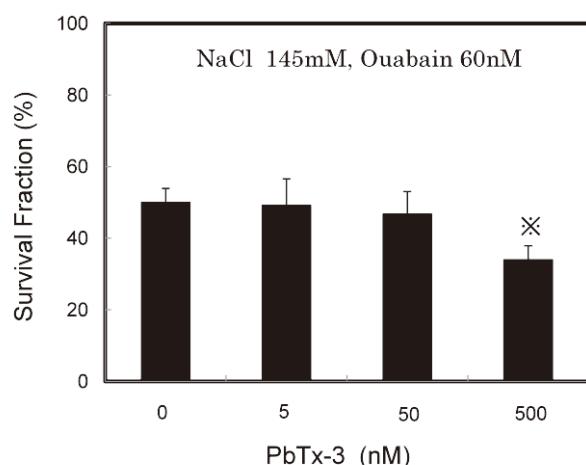


Fig.1. Cytotoxicity of co-exposure to ouabain and PbTx-3

50nM のブレベトキシンを曝露後 51 時間以降においてゼブラフィッシュ卵の孵化数が増加し、孵化速度が高まった (Fig.2)。また、ブレベトキシン曝露条件下では対照群に比べて有意ではないものの仔魚の小型化傾向が観察され、横たわり正常な姿勢を維持できない仔魚や体軸が湾曲した奇形仔魚が観察された。

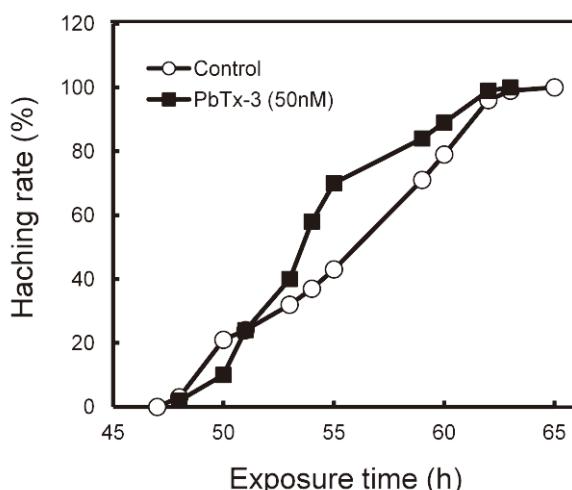


Fig.2. Hatching rate of zebrafish eggs after exposure to PbTx-3

MCLR は HEK293-OATP1B1 および HEK293-OATP1B3 細胞に対して細胞毒性を示した。一方、HEK293-CV 細胞に対して、少なくとも 200nM までの濃度において細胞毒性を示さなかった (Fig.3)。この結果は Komatsu ら<sup>5), 6)</sup>および Takumi ら<sup>7)</sup>の報告と一致する結果であった。

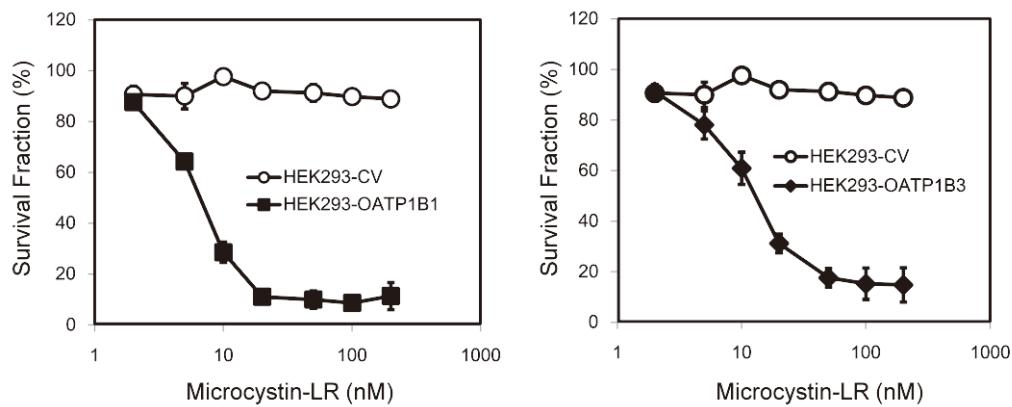


Fig.3. Cytotoxicity of microcystin-LR mediated by OATP1B1 and OATP1B3

100nM および 200nM の MCLR を曝露した条件において対照群と比較してゼブラフィッシュ卵の孵化速度が速まることを見出した (Fig.4)。対照群と MCLR 曝露群との間に孵化仔魚の体長に有意な差異は認められなかったものの、MCLR 曝露群において大型傾向が観察された。この結果は、比較的低濃度の MCLR は細胞増殖活性化作用を有すことに起因するものと推察された。

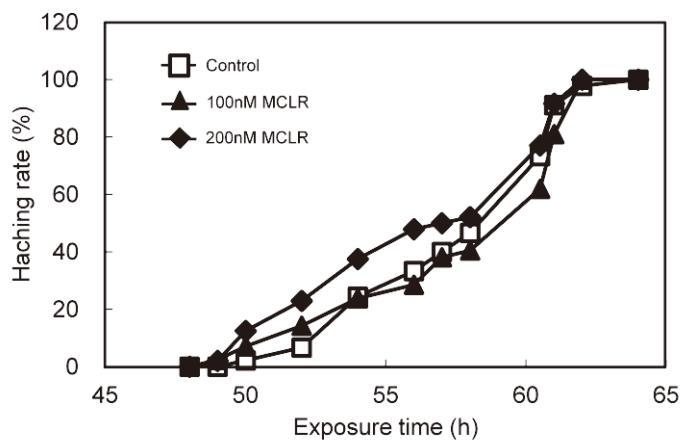


Fig.4. Hatching rate of zebrafish eggs after exposure to microcystin-LR

HEK293 細胞の  $H_2O_2$  に対する半数致死濃度は 55.6  $\mu M$  であり、GAKS 細胞の 6.8  $\mu M$  に対して約 8 倍の感受性を示した (Fig.5)。今後、各細胞の由来生物の違いに起因するものか否かを検証するために、多種の株化細胞を用いた検討が必要である。

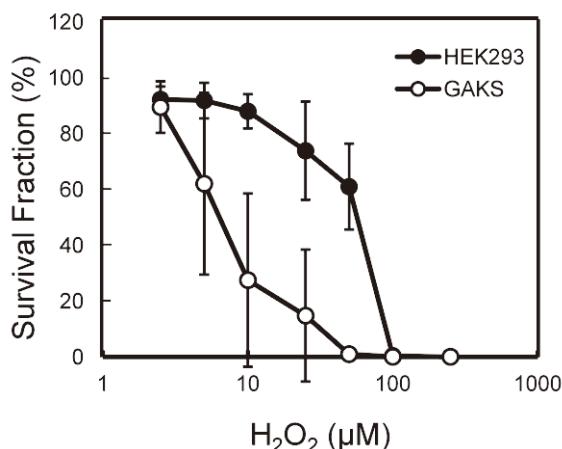


Fig.5. Susceptibility of HEK293 and GAKS cells to the  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress

## 5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいたサンケイ科学振興財団に厚く感謝申し上げます。

## 6. 引用文献

- 1) D. Kim, A. Nakamura, T. Okamoto, N. Komatsu, T. Oda, T. Iida, A. Ishimatsu, T. Muramatsu (2000) Mechanism of superoxide anion generation in the toxic red tide phytoplankton *Chattonella marina*: possible involvement of NAD(P)H oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1524, 220-227.
- 2) J. Zaias, LE. Fleming, DG. Baden, WM. Abraham (2011) Repeated exposure to aerosolized brevetoxin-3 induces prolonged airway hyperresponsiveness and lung inflammation in sheep. *Inhal. Toxicol.* 23, 205-211.
- 3) MM. Gehringer (2004) Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett.*, 557, 1-8.
- 4) CMI. Rabergh, G. Bylund, J.E. Eriksson (1991) Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio L.*) *Aquat. Toxicol.* 20, 131-145
- 5) M. Komatsu, T. Furukawa, R. Ikeda, S. Takumi, Q. Nong, K. Aoyama, S. Akiyama, D. Keppler, T. Takeuchi (2007) Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways in Microcystin-LR-Induced Apoptosis after its Selective Uptake Mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Toxicological Sciences* 97, 407-416.
- 6) M. Komatsu, N. Ichiyama, T. Kurimoto, S. Takumi, K. Shiozaki, Y. Sugiyama, T. Furukawa, S. Ando, S. Itonori, H. Saito (2013) Ceramide aminoethylphosphonate from jumbo flying squid

- Dosidicus gigas* attenuates the toxicity of cyanotoxin microcystin-LR. Fish. Sci., 79, 313–320.
- 7) S. Takumi, M. Komatsu, T. Furukawa, R. Ikeda, T. Sumizawa, H. Akenaga, Y. Maeda, K. Aoyama, K. Arizono, S. Ando, T. Takeuchi (2010) p53 Plays an Important Role in Cell Fate Determination after Exposure to Microcystin-LR. Environ Health Perspect 118, 1292–1298.

# Toxicological analysis of the products from red tide and blue-green algae

Masaharu Komatsu

Division of Food and Chemical Biology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University  
4-50-20 Shimoarata Kagoshima 890-0056, Japan

Red tide and blue-green algae are critical aspect not only to aquaculture but also to human health. In this report, we analyzed the toxicological effects of brevetoxin from red tide, microcystin-LR from blue-green algae to egg of zebrafish and cell lines from gold fish scale fibroblast (GAKS), human embryonic kidney (HEK293), and human neuroblastoma (SH-SY5Y).

Brevetoxin enhanced the cytotoxicity of ouabain to SH-SY5Y cells, but exposure to brevetoxin alone was not toxic to the cells. In addition, brevetoxin facilitated the development of zebrafish embryo in connection with teratogenesis. On the other hand, microcystin-LR induced the cytotoxicity depended on the expression of uptake transporter OATP1B1 and/or OATP1B3. Microcystin-LR enhanced development of zebrafish embryo. Furthermore, GAKS cells were sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress approximately 8-fold higher than HEK293 cells.