

赤潮生物の毒性因子

赤潮プランクトンの毒性因子に関する生理学的
および生化学的研究

小田達也

長崎大学水産学部海洋生物機能科学講座

Physiological and biochemical studies on toxic factors produced
by red tide phytoplankton

Tatsuya ODA

*Division of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Nagasaki,
Nagasaki 852-8521, Japan*

Tel: 095-819-2831. Fax: 095-819-2831. Email: t-oda@nagasaki-u.ac.jp

赤潮（レッドタイド：red tide）は古くから日本のみならず世界各地で観察されている自然現象である。国際的には Harmful algal blooms (HABs) との表現が一般的である。赤潮の定義は必ずしもはっきりしていないが、一般的には光合成能力を有する、いわゆる植物プランクトンのうちの一種類あるいは複数種が異常増殖し、海水の色がその生物の持つ色に変色する現象と考えられている。従って、その色は必ずしも赤とは限らず、褐色や緑色の場合もあり、また、淡水に発生する水の華も赤潮現象ととらえられることもある。赤潮の原因となる植物プランクトンはこれまでに多数知られており、その細胞の大きさや生物学的諸性質も多様性に富んでいる。比較的大型の細胞種では 1 ml 当たり数千～数万細胞、小型のものでは数十万～数百万にまで達する場合もある。

近年、世界各地で有害な赤潮が多発しており、地球温暖化や環境汚染など人間活動との因果関係も指摘されている。有害赤潮の害作用の一つは異常発生した赤潮プランクトンによって自然界あるいは養殖されている魚介類が斃死する被害、いわゆる赤潮漁業被害である。一方、発生した赤潮プランクトンが他の生物に対して直接毒作用を及ぼさずに、毒素を有する植物プランクトンを魚介類が摂取し、毒素がこれら魚介類の体内に蓄積し、それら毒化した魚介類を人間が食することにより、下痢や麻痺など食中毒症状を引き起こす場合もある。いずれにしろ、赤潮の発生は、その規模と種類により大きな社会問題に発展することもある。ここでは、特に前者の漁業被害を引き起こす代表的赤潮プランクトンであり、九州各地で頻発する、シャットネラ (*Chattonella*) 赤潮の魚毒性発現機構について、これまでの私どもの研究結果を中心に紹介したい。また、二枚貝に対して特異的に強い毒性を示す赤潮プランクトンとして知られているヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ (*Heterocapsa circularisquama*) や魚類や貝類に毒性を示すカレニア・ミキモトイ (*Karenia mikimotoi*) についても、若干紹介したい。

1. シャットネラ赤潮

シャットネラ (*Chattonella*) は、ラフィド藻綱（緑色鞭毛藻類）に属し、光合成能力を有する独立栄養型の単細胞植物プランクトンの一種であり、日本近海で発生する代表的な赤潮原因プランクトンとして知られている。細胞は紡錘状で長さは 30-150 μ m, 頭部に 2 本の鞭毛を持ち、海水中を活発に遊泳している。細胞表層に粘性の糖被膜（グリコキヤリックス）を有するのみで強固な細胞壁を欠くため、水温や塩分の変化、培養条件の悪化、攪拌などの物理的刺激によって容易に球状に変形したり、遊泳能力を失い培養器の底に沈んだりする。細胞の形態的特長によって何種類かに分類されるが、赤潮の原因となり、比較的良く研究されているのは、シャットネラ・マリーナ (*Chattonella marina*) とシャットネラ・アンティクワ (*Chattonella antiqua*) の 2 種であり、両者は細胞の大きさ、形態に若干の相違がある。シャットネラの培養は比較的容易で、海水

にビタミンや鉄などの金属イオン、場合によっては土壌抽出液を添加した培地にて、光照射下で増殖し、1 ml 当たり数万細胞に達する。春から夏にかけて、瀬戸内海～九州の沿岸域を中心に海域によっては大量発生し、その濃度は時には数万細胞/ml にも達する。秋から冬季に水温の低下とともに自然消滅するが、一部のシャットネラは栄養細胞からシストを形成し、海底に沈む。翌年、水温の上昇とともに再びシストから栄養細胞が発芽し、赤潮を形成する。従って、一度赤潮が発生した海域では、再び次の年にも同様な赤潮が発生する可能性があり、海底堆積物中のシストの分布状況を調査することはシャットネラの大量発生を予測する上で重要である。

わが国におけるシャットネラ赤潮は、1969年に広島湾において初めて報告されて以来、播磨灘、瀬戸内海、鹿児島湾、及び九州沿岸域においても頻繁に発生している。特にブリ養殖に対する漁業被害は数十年以上に渡っており、近年においても、九州沿岸域を中心に2009、2010年と連続して大規模に発生し、その被害総額が数十億円にも及んでいる。シャットネラの毒性原因物質に関してはこれまで様々な仮説が提唱されてきたが、未だ定説に至っていない。シャットネラ細胞に含まれる高度不飽和脂肪酸あるいは brevetoxin 様の神経毒が魚類斃死を引き起こす毒性原因物質であるとの報告もある。

^{1,2)}しかしながら、これらの物質は大量のシャットネラ細胞から微量抽出されたものであること、破壊されたシャットネラ細胞は全く魚毒性を示さないなどの点から、これらの毒性物質だけではシャットネラの毒性機構を完全には説明できないようである。シャットネラ赤潮の大量発生のメカニズムの詳細についても不明な点が多く、有効な防除法が見いだされていないのが現状であり、沿岸養殖漁業が盛んなわが国においては、いまだ大きな問題となっている。毒性物質の存在に加え、シャットネラが活性酸素を放出することが見出され、魚毒性との関連性が示唆されている。以下にシャットネラの活性酸素に関連するこれまでの知見について紹介する。

2. シャットネラによる活性酸素産生

1989年、島田らによって通常の条件下で培養中のシャットネラ・アンティクア (*Chattonella antiqua*) にチトクロームC還元能が観察され、その還元はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 添加によって阻害されたことから、活性酸素の一つであるスーパーオキシドの産生が明らかにされた。³⁾我々もシャットネラ・マリーナ (*Chattonella marina*) について同様に調べたところ、スーパーオキシドの他、過酸化水素の産生を検出した。^{2,3)}さらに、活性酸素の検出法として最も信頼性が高いとされる電子スピン共鳴 (ESR) 法においても活性酸素産生が確認された。⁶⁾これまでのこれら一連の研究からシャットネラが活性酸素を産生することは間違いないようである。シャットネラ以外にもラフィド藻類に属するヘテロシグマ・アカシオ (*Heterosigma akashiwo*)、フィブロカプサ・ジャポニカ (*Fibrocupsa japonica*)、オリストディスカス・ルテウス (*Olisthodiscus luteus*) から高い活性酸素産生が検出されたことから、

活性酸素産生はラフィド藻類に共通した生化学的性質と考えられる。⁷⁾ シャットネラや他のラフィド藻類における活性酸素産生の生物学的意義については現在も不明であるが、活性酸素消去酵素であるカタラーゼやSOD添加により、シャットネラの細胞分裂が著しく阻害されたことから、活性酸素産生はシャットネラ自身の細胞分裂時に重要な役割を担っていると推定される。⁸⁾ 一方、シャットネラの活性酸素産生はレクチン (Con A, WGA, CBH)⁹⁾ や魚鰓由来粘液物質¹⁰⁾ などの存在下で著しく上昇することが見出されている。^{9, 10)} これらの知見から、シャットネラ細胞表層には外部からの刺激に応答して活性酸素産生量を上昇させるシグナル伝達機構が存在することが示唆された。^{9, 10)} また、シャットネラの魚類粘液物質に対する応答は魚毒性発現機構を考える上でも興味深い知見であり、シャットネラが鰓組織を通過する際、粘液物質との接触によって、より多くの活性酸素を産生し、結果的に鰓組織に強く傷害を与えると推察することも出来る。

シャットネラから放出されるスーパーオキシド及び過酸化水素量は、細胞数当たり換算すると、貪食殺菌能が知られているマクロファージのそれに匹敵するものであった。⁶⁾ そこで、海洋細菌の一種であるビブリオ菌 (*Vibrio alginolyticus*) に対するシャットネラの影響について調べた。本菌はシャットネラ培地で増殖するのに対して、シャットネラ細胞浮遊液中では増殖が顕著に抑制された。また、超音波処理によって破壊したシャットネラでは活性酸素は検出されず、ビブリオ菌に対する毒性も認められなかった。⁴⁾ このことは、破壊あるいは死細胞となったシャットネラは魚毒性を示さないとする従来報告¹¹⁾ と一致する。少なくともシャットネラは活性酸素を介して海洋細菌の増殖を抑制するようであり、貪食殺菌能を有する哺乳類の白血球とシャットネラとの類似性があるようにも見受けられる。事実、シャットネラのスーパーオキシド産生を司る酵素系とヒト好中球細胞膜に存在する活性酸素産生酵素である NADPH oxidase との類似性を示す知見が特異抗体を用いた免疫学的手法により得られている。¹²⁾ シャットネラ細胞の表層がグリコキャリックスと呼ばれる糖被膜で覆われていることは古くから知られていた。しかもこのグリコキャリックスは、攪拌やある種の化学物質の刺激に反応して容易にシャットネラ細胞本体から脱落すること、さらに脱落后グリコキャリックスは数時間でシャットネラ細胞上に再生することが分かっている。¹³⁾ そこで温和な条件で超音波処理後、シャットネラ細胞本体を遠心により除去し、無細胞系グリコキャリックス画分を調整した。興味あることに、このグリコキャリックス画分に NADPH を添加すると活性酸素産生が誘導された。さらに、ヒト好中球 NADPH oxidase のサブユニットの 1 つ gp91phox に対する抗体で認識されるタンパク質がこのグリコキャリックス画分に存在することが見出された。これらの結果から、シャットネラ細胞にはヒト好中球など哺乳類の貪食細胞の膜に存在する活性酸素産生酵素である NADPH oxidase と類似した酵素系が存在し、おそらくそのような酵素系はグリコキャリックスに局在する可能性が高いと推定された。一方、無細胞系グリコキャリックス画分を抗原としてラット皮内に免疫し、

抗グリコキリックス抗体を調整した。間接蛍光抗体染色において、本抗体はシャットネラ細胞を認識することが確認された。次いで、シャットネラ暴露後のブリ鰓組織を本抗体による間接蛍光抗体染色で調べたところ、シャットネラ暴露後のブリ鰓組織のみにグリコキリックスの存在を示唆する強い蛍光が観察された。¹⁴⁾ これらの結果は、シャットネラ細胞がブリの鰓を呼吸水と共に通過する際、一部のシャットネラ細胞のグリコキリックスが脱落して鰓表面に付着する可能性を示唆する。付着したグリコキリックスが持続的に活性酸素を産生することで鰓機能に損傷を与える可能性も考えられるが、この点も含めシャットネラの魚毒性発現機構についてはさらに検討が必要である。

3. シャットネラによる魚類斃死機構

シャットネラによる魚類斃死機構に関しては、未だ定説に至っていないが、最終的には窒息死であるという点については多くの研究者の一致した見解のようである。シャットネラ曝露時におけるブリの生理学的な検討から、シャットネラに曝露されたブリにおいて最も初期に観察される生理的变化は動脈血酸素分圧の急激な低下であることが明らかにされた。¹⁵⁾ さらに、シャットネラ曝露時におけるブリの鰓を組織学的に検討した結果、唯一認められた組織学的変化は入鰓弁動脈側の一次鰓弁間における多量の粘液物質の存在であることが見出されている。^{16, 17)} 従って、鰓弁間に粘液物質が詰まることにより呼吸水の流通障害が起こり、鰓組織における酸素の取り込みなどのガス交換能が阻害され、その結果、動脈血酸素分圧が低下する可能性が考えられる。シャットネラに曝露されたブリの鰓表面が粘液物質で覆われることは古くから観察されており、シャットネラ細胞が鰓を通過する際、何らかの機構によって鰓の粘液細胞からの粘液物質の分泌を引き起こし、その結果鰓におけるガス交換能が低下し、窒息死に至るといふ仮説が成り立つかもしれない。シャットネラが産生する活性酸素が鰓粘液細胞からの粘液の過剰分泌を引き起こす可能性も充分考えられる。また、鰓表面を覆う粘液物質がシャットネラ由来という可能性も考えられ、今後、これらの点についてはさらに検討する必要がある。

4. ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ赤潮

ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ (*Heterocapsa circularisquama*) は渦鞭毛藻類に属する植物プランクトンで、特にアコヤガイやカキ等の二枚貝に対して強い致死作用を発現するが、魚類に対しては全く毒性を示さないなどの特徴を有している。¹⁸⁾ これまでの研究により、その毒性には本赤潮プランクトンの細胞表層に存在すると考えられている貝類の生理状態を悪化させるタンパク質性の毒性因子の関与が推定されている。¹⁹⁾ 一方、ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマは二枚貝の成体に対する毒性の他、卵や幼生、稚貝に対しても毒性を発現することが見出されている。興味あることに、暴

露されたアサリのトロコフォア幼生において、細胞内カルシウムイオンの急激な上昇が観察されたとの報告がある。²⁰⁾ この知見は、ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマがある種のカルシウムイオンチャンネル、あるいはトランスポーターに作用する可能性を示唆する。一般にその様な作用物質は、種々の赤血球に対してイオンバランスを変化させることにより溶血活性を示すことが知られている。そこで、ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマの溶血活性について調べた。

5. ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマの溶血活性

ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマが種々の動物赤血球に対して細胞濃度及び時間に依存した強い溶血活性を発現することを見出した。興味あることにヘテロカプサ・サーキュラリスカーマの溶血活性は種特異的で、高い感受性を示す種と比較的耐性を示す種とに分類された。²¹⁾ 比較的高感受性赤血球はウサギ、モルモット、マウス由来で、これらの赤血球はいずれも細胞内の主要なカチオンとしてカリウムイオンを含んでいることが知られている。一方、耐性を示したウシ、ヒツジ赤血球はカリウムイオンよりもナトリウムイオンを細胞内主要カチオンとして含んでいる。種特異的溶血活性を示す毒素としては、これまでに腔腸動物の一種イワスナギンチャク (*Palythoa tuberculosa*) が産生するパリトキシンが知られている。ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマと同様、パリトキシンもウサギ、モルモット、マウス赤血球に対して強い溶血活性を示すが、ウシ、ヒツジ赤血球に対しては著しく弱い活性か、ほとんど溶血活性を示さない。²²⁾ このパリトキシンの溶血機構に関しては完全に解明されていないものの、ナトリウムイオンの流入とカリウムイオンの流出を引き起こすことを見出されている。²²⁾ さらに、ナトリウムイオンの流入がカルシウムイオンの細胞内濃度の上昇を引き起こし、さまざまな生理的变化をもたらすと推定されている。²²⁾ ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマに暴露されたアコヤガイでは、最終的には心臓停止により死に至ることが観察されており、この変化はカルシウムイオン濃度変化と関連していると推察されている。²⁰⁾ これまでのところ、ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマにパリトキシン様毒素の存在を示す知見は得られていないが、渦鞭毛藻の一種である *Ostreopsis siamensis* がパリトキシンと構造的に類似した毒素を産生するとの報告もある。²³⁾ 一方、細胞構造は類似しているが二枚貝に対して全く無毒であるヘテロカプサ・トリケトラ (*H. triquetra*) は、全く溶血活性を示さなかった。²¹⁾ さらに、ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマの培養上清あるいは超音波処理により破壊した細胞破壊液は、二枚貝に対する毒性が著しく低下、あるいは消失することが知られており、溶血活性も生細胞浮遊液に比べ弱い活性であることが分かった。²¹⁾ 従って、ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマの溶血活性と二枚貝に対する毒性との間には相関性があると推定される。ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマが有する溶血毒素の生化学的諸性質については未だ多くの点が不明であるが、これ

までの研究から、生化学的性質が異なる複数の溶血因子が存在すると推定されており、²⁴⁾ 実際に二枚貝斃死を引き起こす毒性因子の特定にはさらに検討が必要である。

6. カレニア・ミキモトイ及びその他の赤潮生物の毒性因子

カレニア・ミキモトイ (*Karenia mikimotoi*) は魚類及び貝類に強い毒性を発現することが知られている渦鞭毛藻類であり、前述のシャットネラやヘテロカプサとともに甚大な漁業被害をもたらす赤潮原因プランクトンである。過去にその毒性機構や毒性因子に関する多くの研究があるが、未だに多くの点が不明である。これまで述べてきたように、赤潮プランクトンの生物学的性質や毒性発現機構はその原因種毎に大きく異なる場合が多く、また、その毒性試験に用いられる魚介類の飼育維持には特別な施設が必要であり、それに伴う実験の高コスト化や規模の大型化が赤潮研究を困難にしている。そこで、赤潮の毒性因子を高感度に、しかも簡便に、多サンプルを同時に処理できる方法を探る目的で、動物プランクトンで種苗生産の現場では稚魚の餌として汎用されているワムシや種々の海洋細菌、培養細胞でのスクリーニングを実施した。その結果、カレニア・ミキモトイがワムシに致死作用を示すことが見出された。分離場所が異なる3株での比較から、株間でワムシ毒性が大きく異なることが分かった。興味あることに、強毒株は溶血活性や培養細胞に対する細胞毒性も他に比べて強いことが分かった。²⁵⁾ 最近の研究から本強毒株はアワビやエビに対しても強い致死毒性を発現することが分かり、ワムシ等を用いたバイオアッセイの有効性が支持された。この他、*Alexandrium* 属においても溶血活性を有する高分子毒素の存在が見出されている。^{26, 27)}

以上、赤潮生物の毒性因子についてこれまでの私どもの研究を中心に述べてきたが、赤潮の種類毎にその毒性機構や毒性因子は異なり、今後もそれらの1つ1つについて、より詳細な研究に取り組んで行きたいと考えている。

謝辞

ここに紹介した赤潮研究に対して、ご指導、ご助言、ご協力をいただきました本城凡夫先生(香川大学)、石松 惇先生(長崎大学)、松山幸彦氏(西海区水産研究所)、山口健一先生(長崎大学)に深く感謝致します。また、私の研究室に所属し、ともに研究に取り組んでくれた学生諸氏に心よりお礼申し上げます。

文献

- 1) 岡市友利, 西尾幸郎: *Nornellia* sp.によるハマチのへい死原因. 鹿児島湾赤潮発生原因調査研究報告, 77-81 (1978)

- 2) Endo M, Onoue Y, Kuroki A. Neurotoxin-induced cardiac disorder and its role in the death of fish exposed to *Chattonella marina*. *Mar. Biol.* 1992; **112**, 371-376.
- 3) Shimada M, Shimono R, Murakami TH, Yoshimatsu S, Ono C. Red tide, *Chattonella antiqua* reduces cytochrome C from horse heart. In: Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T. (eds). Red tides: biology, environmental science, and toxicology. Elsevier, New York. 1989; 443-446.
- 4) Oda T, Ishimatsu A, Shimada M, Takeshita S, Muramatsu T. Oxygen-radical-mediated toxic effects of the red tide flagellate *Chattonella marina* on *Vibrio alginolyticus*. *Mar. Biol.* 1992; **112**: 505-509.
- 5) Oda T, Ishimatsu A, Takeshita S, Muramatsu T. Hydrogen peroxide production by the red tide flagellate *Chattonella marina*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994; **58**: 957-958.
- 6) Oda T, Akaike T, Sato K, Ishimatsu A, Takeshita S, Muramatsu T, Maeda H. Hydroxyl radical generation by red tide algae. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; **294**: 38-43.
- 7) Oda T, Nakamura A, Shikayama M, Kawano I, Ishimatsu A, Muramatsu T. Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997; **61**: 1658-1662.
- 8) Oda T, Moritomi J, Kawano I, Hamaguchi S, Ishimatsu A, Muramatsu T. Catalase- and superoxide dismutase- induced morphological changes and growth inhibition in the red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995; **59**: 2044-2048.
- 9) Oda T, Nakamura A, Okamoto T, Ishimatsu A, Muramatsu T. Lectin-induced enhancement of superoxide anion production by red tide phytoplankton. *Mar. Biol.* 1998; **131**, 383-390.
- 10) Nakamura A, Okamoto T, Komatsu N, Ooka S, Oda T, Ishimatsu A, Muramatsu T. Fish mucus stimulates the generation of superoxide anion by *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo*. *Fish. Sci.* 1998; **64**, 866-869.

- 11) 石松 惇、小田達也. シャットネラの活性酸素産生と魚類へい死. 海洋 1998; **30**, 175-180.
- 12) Kim D, Nakamura A, Okamoto T, Komatsu N, Oda T, Iida T, Ishimatsu A, Muramatsu T. Mechanism of superoxide anion generation in the toxic red tide phytoplankton *Chattonella marina*: possible involvement of NAD(P)H oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; **1524**, 228-232.
- 13) Yokote M, Honjo T. Morphological and histochemical demonstration of a glycocalyx on the cell surface of *Chattonella antiqua*, a 'naked flagellate'. *Experientia* 1985; **41**, 1143-1145.
- 14) Kim D, Okamoto T, Oda T, Tachibana K, Lee KS, Ishimatsu A, Matsuyama Y, Honjo T, Muramatsu T. Possible involvement of the glycocalyx in the ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae): Immunological approach using antiserum against cell surface structures of the flagellate. *Mar. Biol.* 2001; **139**, 625–632.
- 15) Ishimatsu A, Maruta H, Tsuchiyama T, Ozaki M. Respiratory, ionoregulatory and cardiovascular responses of the yellowtail *Seriola quinqueradiata* to exposure to the red tide plankton *Chattonella*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 189-199.
- 16) Ishimatsu A, Sameshima M, Tamura A, Oda T. Histological analysis of the mechanisms of *Chattonella*-induced hypoxemia in yellowtail. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 50-58.
- 17) Hishida Y, Ishimatsu A, Oda T. Mucus blockade of lamellar water channels in yellowtail exposed to *Chattonella marina*. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 315-316.
- 18) Matsuyama Y, Nagai K, Mizuguchi T, Fujiwara M, Ishimura M, Yamaguchi M, Uchida T, Honjo T. Ecological features and mass mortality of pearl oysters during red tide of *Heterocapsa* sp. in Ago Bay in 1992. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; **61**, 35-41.
- 19) Matsuyama Y, Uchida T, Honjo T. Toxic effects of the dinoflagellate *Heterocapsa*

- circularisquama* on clearance rate of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1997; **146**, 73-80.
- 20) Matsuyama Y. The toxic effects of *Heterocapsa circularisquama* on bivalve mollusks. *Bull. Plank. Soc. Jpn.* 1999; **46**, 157-160.
- 21) Oda T, Sato Y, Kim D, Muramatsu T, Matsuyama Y, Honjo T. Hemolytic activity of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its possible involvement in shellfish toxicity. *J. Phycol.* 2001; **37**, 509-516.
- 22) Habermann E. Palytoxin acts through Na⁺/K⁺-ATPase. *Toxicon* 1989; **27**, 1171-1187.
- 23) Usami M, Satake M, Ishida S, Inoue A, Kan Y, Yasumoto T. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J. Am. Chem. Soc.* 1995; **117**, 5389-5390.
- 24) Sato Y, Oda T, Muramatsu T, Matsuyama Y, Honjo T. Photosensitizing hemolytic toxin in *Heterocapsa circularisquama*, a newly identified harmful red tide dinoflagellate. *Aquatic Toxicol.* 2002; **56**, 191-196.
- 25) Zou Y, Yamasaki Y, Matsuyama Y, Yamaguchi K, Honjo T, Oda T. Possible involvement of hemolytic activity in the contact-dependent lethal effects of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* on the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Harmful Algae* 2010; **9**, 367-373.
- 26) Katsuo D, Kim D, Yamaguchi K, Matsuyama Y, Oda T. A new simple screening method for the detection of cytotoxic substances produced by harmful red tide phytoplankton. *Harmful Algae* 2007; **6**, 790-798.
- 27) Emura A, Matsuyama Y, Oda T. Evidence for the production of a novel proteinaceous exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori*. *Harmful Algae* 2003; **3**, 29-37.