

モノクローナル抗体を用いた *Chattonella* 属藻類の 識別に関する研究

長崎 慶三

An Identification of Genus *Chattonella* by Means of Monoclonal Antibodies

Keizo NAGASAKI

Chattonella marina and *C. antiqua* (Raphidophyceae) are the major red tide organisms in the coastal waters of Japan, and they often damage cultured yellowtails, sea breams and so on. Though it is important to identify the causative algae in biological and ecological studies of red tides, the morphological identification of them has been very difficult. Because these organisms show variety in cell size, and lack rigid cell walls, their shapes can easily change according to environmental conditions. Therefore, many of the *Chattonella* strains isolated from red tide regions remain unidentified. We have approached this problem by the use of the immunological technique, preparing specific monoclonal antibodies to the organisms. In this study, identification of red tide algae *C. marina* and *C. antiqua* by means of monoclonal antibodies is discussed. Seven kinds of monoclonal antibodies (MR-17a, MR-17b, MR-17c, MR-18, MR-21, AT-83 and AT-86) reactive with the cell surface of genus *Chattonella* were obtained by the use of the hybridoma technique. Indirect fluorescent immunoassay and dot-immunoassay were used to examine the reactivity of each antibody against various strains of genus *Chattonella*. Four kinds of monoclonal antibodies showed highly species-specific reactivity, i.e. MR-17a, MR-17b and MR-18 were specifically reactive with *C. marina*, but not with *C. antiqua*, and AT-86 was specifically reactive with *C. antiqua*, but not with *C. marina*. Comparing the reaction spectrum of each strain to the seven kinds of monoclonal antibodies, eighteen strains, which had been morphologically identified as genus *Chattonella*, could be divided into six groups. It was notable that *C. marina* and *C. antiqua* were divided into two groups, respectively. Especially, two strains of *C. marina* obtained from Kagoshima Bay especially showed different reaction spectra from those obtained from the Seto Inland Sea region. The monoclonal antibody technique was also applied to the live samples. Dealing with the samples obtained from red tide regions of Akashi and Buzen, it was shown that this method could also be applied to the live samples. But it was very important to examine as fresh samples as possible.

Western-blotting method, dot-immunoassay, competitive enzyme-linked immunosorbent assay and immuno-electron microscopy were used to characterize the antigenic determinants (epitopes) recognized by MR-18, MR-21 and AT-86. All the antibodies recognized several kinds of molecules by the Western-blotting method. In spite of their high stability to heat-treatment and pronase-treatment, drastic degradation of antigenicities was caused by periodate-treatment in each case. Electron microscopic observation revealed that the antigens were located not only on the cell surfaces but also at the inner membrane systems. Therefore, it was strongly suggested that these antibodies recognized glycoproteins, and antigenic determinants might be located in the carbohydrate side chains.

The monoclonal antibody technique was also applied to genus *Gymnodinium*. A monoclonal antibody GN-89 was obtained, which was specifically reactive with the cell surface of *G. nagasakiense* in the coastal seas of Japan. But it was not reactive with *G. breve*, *G. catenatum*, and a north-European species, *G. cf. nagasakiense* (*Gyrodinium cf. aureolum*).

From the results of this study, it was shown that the monoclonal antibody technique was useful for an inter- and intra-species identification of red tide algae, and identification of genus *Chattonella* was highly clarified.

Key words: Monoclonal antibody, Red tide, Immunoassay, *Chattonella marina*, *Chattonella antiqua*, *Gymnodinium nagasakiense*

目 次

第I章 序 論	134
第II章 モノクローナル抗体を用いた <i>Chattonella</i> 属藻類の群別	138
第1節 <i>Chattonella</i> 属藻類の細胞表面に特異的に反応する モノクローナル抗体の調製	140
第2節 調製されたモノクローナル抗体による <i>Chattonella</i> 属の識別	147
第III章 現場海水中の <i>Chattonella</i> 試料へのモノクローナル抗体の応用	151
第IV章 認識抗原の性状解析	156
第1節 ウェスタンブロッティング法を用いた抗原解析	156
第2節 各種処理による抗原性の変化	160
第3節 免疫電子顕微鏡法による抗原分子の細胞内分布の解析	166
第V章 モノクローナル抗体を用いた赤潮渦鞭毛藻 <i>Gymnodinium</i> 属の 識別の試み	171
第VI章 総 括	179
摘 要	181
謝 辞	182
文 献	183

第I章 序 論

海洋や湖沼等の諸水域において微小な生物の異常増殖により生ずる水の着色現象は「赤潮」と呼ばれ、しばしば重篤な生態構造のアンバランスを引き起こすことが知られている。赤潮原因生物としては、藻類、原生動物、細菌、下等甲殻類等が挙げられるが、とりわけ微細藻類（植物プランクトン）による赤潮は、その発生頻度および被害の大きさにおいて他を圧倒している（柳田1976）。したがって、有効な赤潮対策の推進や赤潮防除法の確立をめざすためには、こうした微細藻類の生物学的特性を様々な角度から明らかにする必要があることはいままでもない。

現在、微細藻類を対象とした多くの研究が進められているが、そうした研究者個々の学問的背景は極めて多岐にわたっている。そのため扱う生物の分類学について、各研究者が共通の定規を持ち、情報の提供および交換が有効に行われることが望ましい。微細藻類の分類学では、光学顕微鏡レベルで得られる情報に基づく形態分類がその基礎になっており、また近年では電子顕微鏡

の導入により、より詳細な外部および内部形態の比較も行われるようになってきた (WILLY 1980, 福代他 1990 等)。しかし、一方で、多くの分類群について形態特性に関する知識の不足から分類に曖昧さを残しているとの指摘があり (結城・小野 1980)、諸形質の外観上の差異に基づく種間区分の困難さを示している。それゆえに、赤潮原因微細藻類に関する生物学的、あるいは生態学的研究を進めていく上で、より信頼性および客観性に富み、かつ簡易な同定・識別法の確立が強く望まれる。

わが国の沿岸海域において発生する赤潮の原因となる生物の代表種として知られる *Chattonella* 属藻類は、しばしばその大発生によりハマチ、タイ等の養殖魚類に甚大な被害を与えてきた。本属は1969年8-9月に、広島湾で初めてその大量発生が確認されて以来 (高山 1972)、播磨灘を中心とした瀬戸内海各地で頻りに様々な規模の赤潮を形成し、播磨灘では1972年に71億円、1977-1979年にかけては計77億円の漁業被害をもたらしたほか、1977年には鹿児島湾でも大量発生がみられた (伊藤・今井 1988)。1980年代に入り被害額は減少しているものの、ほとんど毎年、本属による赤潮がみられ、*Chattonella* 赤潮はわが国における沿岸漁業の抱える重要問題の一つとなっている。

Chattonella 属は、ラフィド藻綱 (Raphidophyceae)、ラフィドモナス目 (Raphidomonadales)、バキューラリア科 (Vacuolariaceae) の1属であり、2本の鞭毛を使い遊泳する。栄養細胞は、円形から紡錘形を基本とするが、強固な細胞壁を持たないため様々な環境条件の変化によりたやすく変形、崩壊する。また近年、耐久細胞の存在が確認され、seed population としての役割を果たしている可能性が示唆されている (IMAI and ITOH 1987, 1988 等)。

本藻類の1種である *Chattonella antiqua* は、わが国では1970年に初めて発見され (池田他 1971)、HADA (1974) によりミドリムシ類に属する新属新種として *Hemientreptia antiqua* HADA の学名で記載された。その後、高野 (1975) により本種は SUBRAHMANYAN (1954) により報告された *Hornellia marina* と類似することが指摘された。しかし、この *H. marina* も文献調査が進むにつれ BIECHELAR (1936) の発見記載した *Chattonella subsalsa* と同一種であるとすでに指摘されていたことがわかり (HOLLANDE and ENJUMET 1957)、これらの背景をもとに ONO *et al.* (1980) は *H. marina* が *Chattonella* 属に属するべきものであると主張し、*C. antiqua* と命名した。一方、HARA and CHIHARA (1982) は、*H. marina* と *C. subsalsa* とが別種である可能性を指摘し、*H. marina* を新種 *Chattonella marina* と呼称すべきであると主張した。現在、*Chattonella* 属には *C. marina*、*C. antiqua*、および *C. subsalsa* の3種が記載されているが、このほかにもワラジ型 *Chattonella*、小型 *Chattonella*、球形 *Chattonella* が報告された (原・千原 1982, 1987)。現在、後者3種を含む計6種をそれぞれ *Chattonella* 属内の独立種とみなし、新種としての命名手続きが行われている (福代他 1990, 千原 1990)。このように *Chattonella* 属藻類の分類および種名の決定には古くから多くの混乱が伴ってきた。

これらの中で、わが国において最も普通にみられる *C. marina* と *C. antiqua* は、その細胞内外の微細構造に明確な差異が認められず、その同定には細胞のサイズの差と、尾部の形状の差が基準とされてきた。しかるに *Chattonella* 属藻類は、強固な細胞壁を欠くため、細胞の形状が環

境条件の変化に伴い変化しやすく (NAGASAKI *et al.* 1989, 高山 1972), また同一クローン内においても, とりわけ定常期の培養中ではその形状やサイズが一定でない (NAGASAKI *et al.* 1989, 結城・小野 1980)。また, 現場海中において, 球形細胞や細胞密度の減少に伴う色素の薄い小型の細胞(「小型化細胞」と呼ばれている)の出現が報告されている(吉松 1981, 松本・吉松 1989)。こうした理由により, 本属藻類の識別および同定には熟練した観察者の鑑定眼が必要であり, 現在も多くの分離株が未同定のまま各地に保存されているのが現状である。

種レベルでの分類を行う場合, 高度の表現型の類似性を共有している個体の集団を「種」と考える。今日では, 単に表現型の類似性のみならず, 2群間の生殖質の合体の能不能, 地理的分布圏の相違をも考慮することが, 種レベルでの生物分類を行う上で必要であると考えられている。藻類学の分野においても, 接合現象の確認されているものについては交配実験の結果に基づく群別に関する報告が多くなされてきた (ICHIMURA 1983, SAKO *et al.* 1989 等)。しかし, *Chattonella* 属藻類の場合, 休眠細胞(シスト)の存在は確認されているものの(今井・伊藤 1984, IMAI *et al.* 1989, IMAI and ITO 1987, 1988, IMAI 1989), その形成が有性的に行われるか無性的に行われるかについては研究途上であり (NAKAMURA *et al.* 1990) 雌雄接合の可否で本属の種レベルでの分類を行うことは現在の時点では難しい。したがって, *Chattonella* 属藻類の種決定は, それらの遺伝子型および表現型に関する情報を比較検討することにより行われるべきであると考えられる。

その中でも形態という表現型は C. von Linne' の時代より種決定の根拠として重要視され, *Chattonella* 属のみならず, 現在でも多くの生物について形態学的比較に基づく種分類が定着している。形態は様々な遺伝情報の発現の結果としての総合的形質であり, また直接画像としてとらえられることから, 生物を研究対象とする多くの場合には第一に注目されるべき形質とすることができる。これに対して, 対象生物のある特定の相同形質の差を生化学的手法を用いて解析し比較することにより, 分類同定のためのより詳細な情報を得ることを目的とした「比較生化学」が, 近年注目されるようになった。一部の生物については, 分子生物学の発展に伴い, DNA (あるいは RNA) そのものに着眼した手法, すなわち制限酵素によって切断された DNA 断片の泳動パターンの比較, ハイブリダイゼーションの割合, 究極的にはその塩基配列の直接比較といった手法に種決定の根拠を求めた報告も多くなされている (GOFF and COLEMAN 1988, EZAKI *et al.* 1988, GIOVANNONI *et al.* 1988, WOESE *et al.* 1985 等)。一方, 遺伝子産物である細胞タンパク質の比較を行うことにより種決定の根拠を求める方法も広く用いられてきた。表現型としてのタンパク質から遺伝子型を推定する方法の一つとしてアイソザイム分析が知られている(沼知 1973, 1974)。これは酵素の多分子型を生物間で比較することによりその遺伝子型の隔たりを推定する方法であり, *Gymnodinium nagasakiense*, *Protogonyaulax catenella/tamarensis*, *Peridinium bipes* (SAKO *et al.* 1989), *Peridinium volzii* (HAYHOME *et al.* 1987), *Alexandrium tamarense*, *A. fundyense*, *Protogonyaulax affinis* (HAYHOME *et al.* 1989) 等の微細藻類に対するこの手法の応用が報告されている。複数の手法による群別の比較を行った例として, SAKO *et al.* (1989) は, 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の *A. catenella* と *A. tamarense* の2種の計24株のアイソザイムパターンを明らかにし, その類似度を株間の接合, 胞子形成の可否に基づく交配実験の結果と比較した。

また、遺伝物質以外の細胞内高分子の性状を比較する方法の一つとして、抗体の反応特異性を利用する方法が古くから用いられてきた。対象生物が細菌である場合、種の分類はその形態、染色性、生理学的性状および生化学的性状に基づいて行われるが、より詳細な分類（すなわち株間の識別）が要求される場合には、血清学的手法が応用される場合が多い（STANIER *et al.* 1976）。とりわけ、原核生物の一種であるマイコプラズマのように、不定かつ微細で形態学的識別が困難なものについては、種の分類はその血清学的性状に大いに依存したものとなっている（LEACH 1973）。また、真核微生物として知られる酵母についても、従来形態および糖の同化能等の差に基づく分類に血清学的手法の導入が古くから試みられ（BENHAM 1931, 飯塚・後藤 1973）、形態、糖同化能等がまったく等しい *Saccharomyces delbrueckii*, *S. exiguus*, *S. rosei* の3菌種の正しい分類には現在も血清学的検討が欠かせないとされている（土屋他 1967）。天然試料への応用例としては、土壤中の菌類に対する応用（SCHMIDT and BOHLOOL 1980）、コレラ菌の水圏における生態解析への利用（COLWELL *et al.* 1981）、外洋におけるアンモニア酸化細菌の分布に関する研究（WARD and PERRY 1980, WARD 1982）等血清学的手法を用いた多くの研究が知られている。また、藻類学分野においては、比較的その応用例が少ないものの、近年、海産の超微細藻の分類への血清学的手法の導入が試みられ、形態および色素組成に基づく分類ときわめて高い相関を示す結果が報告されている（SHAPIRO *et al.* 1989）。

多くの研究者がこうした血清学的手法の有効性を主張する一方で、長谷川（1974）は「すべての研究室で共通の抗血清を保持することが望ましい」と述べているが、そうした研究態勢の実現は現実には困難である。なぜなら、抗血清は1匹の免疫動物から採取できる量が限られており、また同一抗原によって同じ条件のもとで免疫操作を行った場合でも、個体間で抗血清中に含まれる抗体組成には差が生ずるからである（真崎 1987）。加えて抗血清は、それまでに免疫動物の経験したあらゆる異物に対する抗体を含んでいるため、反応特異性を増すために、吸収操作（アフィニティクロマトグラフィー）等により部分精製を行う必要がある（FUKAZAWA *et al.* 1968）。

1975年にケンブリッジの分子生物学研究所において、特定の反応特異性をもち化学的性状の一定な種類の抗体を無限に生産する方法が考案された（KÖHLER and MILSTEIN 1975）。彼らの開発したハイブリドーマ法により得られる「モノクローナル抗体」は、「オーダーメイド・プローブ」として医学、生物学、農学にたずさわる研究者に大いに歓迎され、現在もあらゆる分野で精力的に応用されている。モノクローナル抗体の登場により、それまで抗血清（ポリクローナル抗体）の使用に伴っていたいくつかの問題点（前述）が解決され、より厳密な条件下での抗体の使用が可能になった。当然、微生物分類学の中にもこれを応用しようとする動きがみられた。虫菌原因菌 *Streptococcus* 属については、従来の各血清型に特異的に存在する多糖抗原に反応するモノクローナル抗体が作製され、詳細な抗原解析が行われた（KATO *et al.* 1986, OTA *et al.* 1987）。また、VELEZ *et al.* (1988) は、抗血清による群別が困難であるとされていた根粒菌 *Bradyrhizobium* 属に対して特異的に反応する13種のモノクローナル抗体を作製し、それらに対する反応性の差に基づき *Bradyrhizobium* 属20株を5グループに分けることができたことを報告した。

こうした化学的手法の導入により得られる情報は、無論それ単独で分類・識別のための根拠と

して必要十分なものではないが、他の情報と合わせ比較検討することにより、より真の姿を映し出す群別が可能になると思われる。このような背景から、本研究は *Chattonella* 属藻類に特異的に反応するモノクローナル抗体を作製し、本属藻類の分類・識別に応用することを目的とした。また、得られたモノクローナル抗体の認識抗原の性状を解析することにより、方法論としての信頼性を増すよう試みた。

本論文では、第Ⅱ章においてモノクローナル抗体の作製と、得られた抗体の反応性に基づく *Chattonella* 属保存株の群別について述べた。第Ⅲ章においては同法の現場 *Chattonella* 試料への応用例を示した。第Ⅳ章では得られたモノクローナル抗体の認識抗原の性状を解析した。そして第Ⅴ章では *Chattonella* 属藻類と同様の理由でその分類に混乱を生じている赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium* 属への同法の応用の可能性を論じた。

第Ⅱ章 モノクローナル抗体を用いた *Chattonella* 属藻類の群別

現在わが国でその発生が報告されている *Chattonella* 属藻類としては、*C. marina*, *C. antiqua*, 球形 *Chattonella*, わらじ型 *Chattonella*, および小型 *Chattonella* 等が挙げられる(原・千原 1987)が、その分類・同定は形態学的特徴に基準を置いて行われてきた。原・千原(1982)は、電子顕微鏡観察による内部構造の比較を行い、詳細な知見を報告しているが、特に最重要種である前二者についても明瞭な差が見られず、その類縁性の高さと、識別の難しさを指摘している。現在、各水産研究機関において、現場海水中にみられる *Chattonella* 属藻類の識別は、細胞長の違いと尾部の形状の差に基づいて行われているが、細胞の形態変化が著しいため、より簡易で、明確な同定識別法の確立が望まれている(NAGASAKI *et al.* 1989, 高山 1972, Fig. 1, Fig. 2 参照)。

こうした背景の中、本研究では形態分類の困難な *Chattonella* 属藻類に対し、その細胞表面に反応するモノクローナル抗体を作製し、種間、および株間の性状比較のためのプローブとすることを目的として行われた。幸いなことに、1983年1月に、国立環境研究所にわが国初の環境微生物の系統保存施設が設置され(渡辺 1990)、この研究に着手した1984年には、同研究所より20株近い *Chattonella* 株を分譲していただくことができた。これらの株のほとんどはその形態学的特徴により種まで同定されたものであり、また無菌化されたものであった。本章では、公害研より得たこれらの株に対して特異的に反応するモノクローナル抗体の作製と、得られた抗体の各株に対する反応性の比較を行った結果について論ずる。

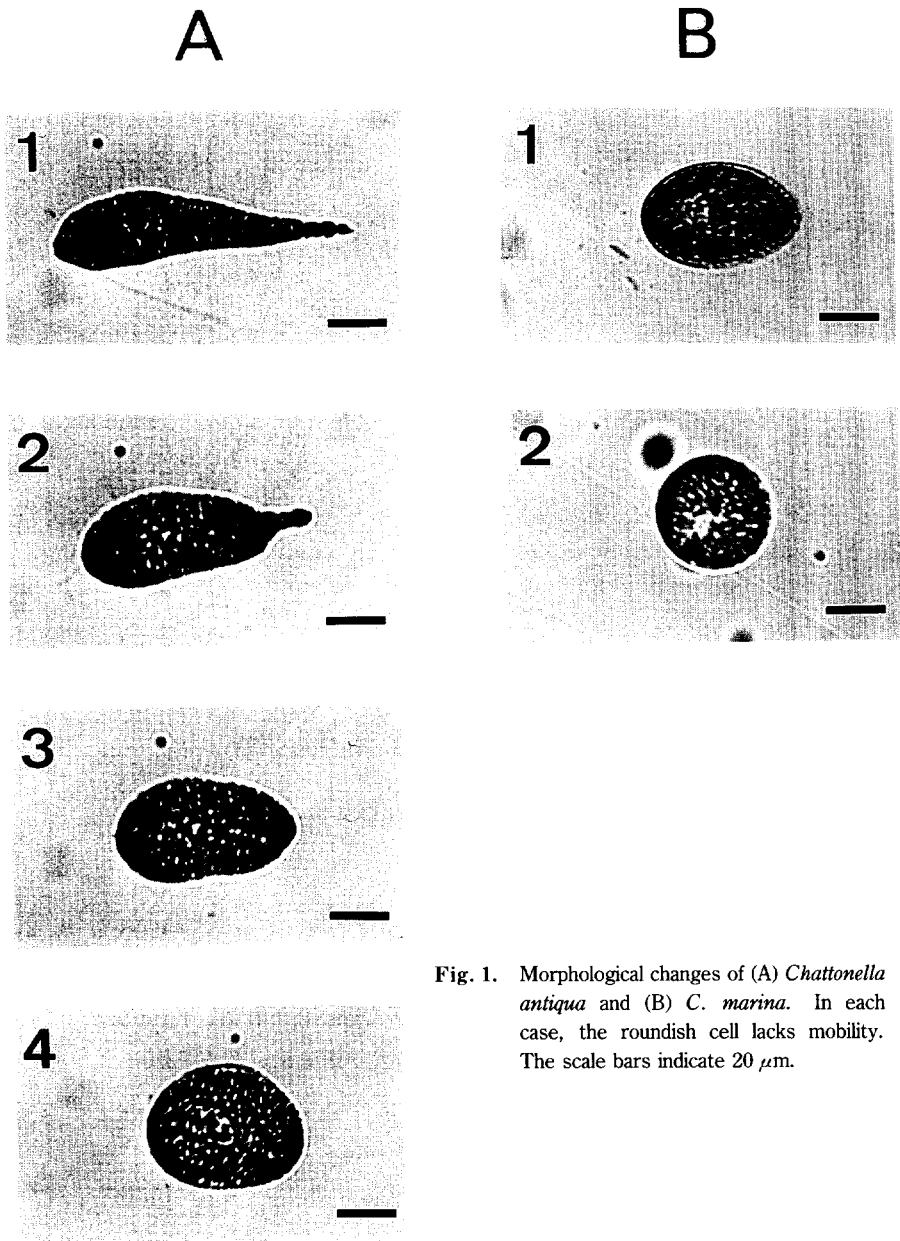


Fig. 1. Morphological changes of (A) *Chattonella antiqua* and (B) *C. marina*. In each case, the roundish cell lacks mobility. The scale bars indicate 20 μm .



Fig. 2. Optical microscopical photograph of the stationary phase cells of *C. marina* NIES-121. Note the variation of size and shape of each cell. The scale bar indicates 20 μ m.

第1節 *Chattonella* 属藻類の細胞表面に特異的に反応する モノクローナル抗体の調製

材料および方法

1. 藻類

本研究に用いた藻類 *C. marina* 7株, *C. antiqua* 9株, および *Chattonella* sp. 2株は国立環境研究所より分譲されたものである。株のリストを Table 1 に示した。全ての株の培養には, ESM 培地 (Table 2; OKAICHI *et al.* 1982) を用い, 14 h Light: 10 h Dark, 4,000 lux, 20°C の条件下で静置培養を行った。そのうちの6株の栄養細胞の光学顕微鏡写真を Plate I に, また各株の細胞長を Table 1 に付記した。

2. 免疫と細胞融合

約 10^5 細胞/ml の藻体の培養を, 7日おきに4-6回, 6週齢の BALB/c 系マウス (雌) の腹腔内に 1 ml ずつ注入することによりマウスを免疫した。免疫には, *C. marina* NIES-117, *C. marina* NIES-118, *C. marina* NIES-121, *C. antiqua* NIES-83 および *C. antiqua* NIES-86 を用いた。定期的にマウスの尾より採取した血液を遠心分離して得た血清画分を段階的に希釈し, 後述の間接蛍光抗体法により抗体活性の上昇をモニターした。十分に抗体活性の上昇が確認されたマウスについては, KÖHLER and MILSTEIN (1975) の方法にしたがい最終免疫の3日後に脾臓を摘出し, メッシュを通し細胞をほぐした後, ミエローマ (X63-AG8.653) と 10:1 の割合で混合し, 50% ポリエチレングリコール存在下, 37°C で細胞融合した (Fig. 3)。融合細胞は, HIROISHI *et al.*

Table 1. The list of *Chattonella* strains obtained from National Institute of Environmental Science

Strains	Habitat	Year	Cell size (μm)
<i>Chattonella marina</i> NIES-3	Osaka Bay	1982	25-42
<i>C. marina</i> NIES-14	Harima-Nada	1983	33-56
<i>C. marina</i> NIES-115	Kagoshima Bay	1978	44-56
<i>C. marina</i> NIES-116	Harima-Nada	1981	40-80
<i>C. marina</i> NIES-117	Naoshima Isl.	1983	45-72
<i>C. marina</i> NIES-118	Harima-Nada	1982	48-72
<i>C. marina</i> NIES-121	Kagoshima Bay	1982	40-52
<i>C. antiqua</i> NIES-1	Harima-Nada	1978	83-88
<i>C. antiqua</i> NIES-2	Osaka Bay	1982	56-88
<i>C. antiqua</i> NIES-83	Harima-Nada	1977	80-95
<i>C. antiqua</i> NIES-84	Harima-Nada	1972	n.d.*
<i>C. antiqua</i> NIES-85	Harima-Nada	1978	64-90
<i>C. antiqua</i> NIES-86	Uranouchi Bay	1980	48-88
<i>C. antiqua</i> NIES-113	Naoshima Isl.	1982	56-72
<i>C. antiqua</i> NIES-114	Harima-Nada	1983	n.d.
<i>C. antiqua</i> NIES-161	not known		56-88
<i>Chattonella</i> sp. NIES-93	Kagoshima Bay	1982	48-80
<i>Chattonella</i> sp. NIES-454	Harima-Nada	1984	50-80

* not determined.

Table 2. Composition of ESM medium*

Ingredient	Concentration (in 1000 ml)
NaNO ₂	120 mg
K ₂ HPO ₄	5 mg
Vitamin B ₁₂	1 μg
Biotin	1 μg
Thiamine-HCl	100 μg
Fe-EDTA	259 μg
Mn-EDTA	332 μg
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	1 g
Soil Extract	10 ml
Sea Water	990 ml

* adjusted to pH 8.0.

(1984) の方法にしたがい、96穴平底プレート (Nunc 社) 中で HAT 培地 (Table 3; 岩崎他 1983) を加えて選択し、CO₂ インキュベーター (ナプロ社 Model 5100) 内で 37°C で培養した。プレート内の乾燥を防ぐため、周囲のウェルには滅菌蒸留水を加えた。約10日後に HAT 培地による選択を終え、HT 培地 (Table 3; 岩崎他 1983) による約3日間の培養を経て、それ以降は通常の RPMI1640 培地 (Table 3; 岩崎他 1983) による培養を行った。

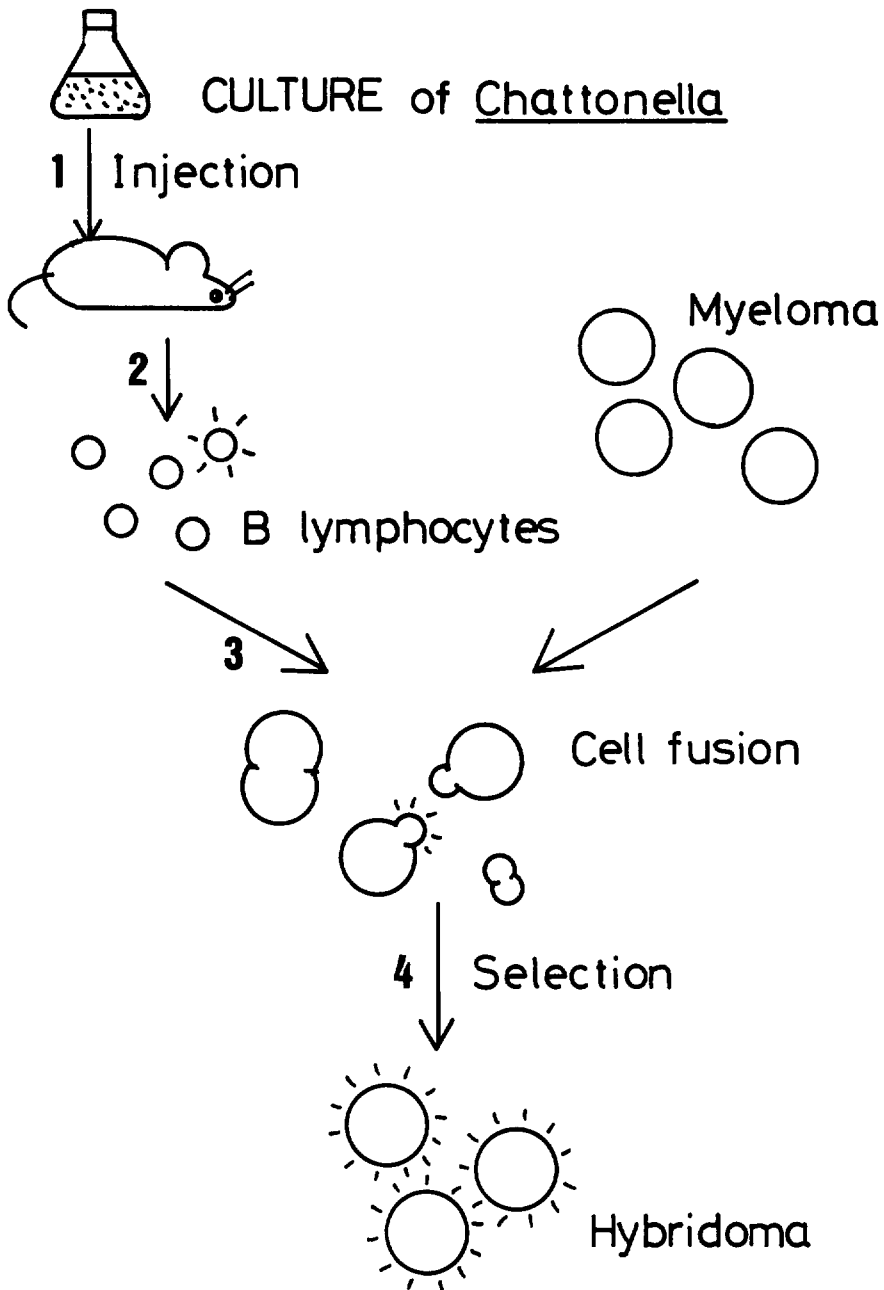


Fig. 3. Schematic diagram of hybridoma technique. Step 1, Female mouse (Balb/c) was immunized with the algal cells 4–6 times at an immunization. About 10^6 cells were injected to the mouse at an immunization; Step 2, Spleen was removed 3 days after the last immunization; Step 3, Spleen cells were fused with the mouse myeloma line X63-AG8.635 with 50% polyethylene glycol; Step 4, Hybrid cells were incubated in a selective medium as described by HIROISHI *et al.* (1984).

Table 3. Composition of the media for cultivation of myeloma cells and hybridoma cells*¹

Ingredient	Concentration (in 450 ml* ²)		
	RPMI1640 medium	HT medium	HAT medium
RPMI1640 (NISSUI)	4.68 g	4.68 g	4.68 g
NaHCO ₃	0.9 g	0.9 g	0.9 g
Sodium pyruvate	49.5 mg	49.5 mg	49.5 mg
L-Glutamine	132.75 mg	132.75 mg	132.75 mg
Penicillin	22,500 units	22,500 units	22,500 units
Streptomycin	22.5 mg	22.5 mg	22.5 mg
Thymidine		1.94 mg	1.94 mg
Hypoxanthine		6.8 mg	6.8 mg
Aminopterin			88 μg
Distilled water	450 ml	450 ml	450 ml

*¹ Each medium was adjusted to pH 7.0.

*² When used, 50 ml of fetal-calf serum was added to each medium.

3. 抗体産生細胞の選別

ハイブリドーマが十分に増殖したウェル (Fig. 4) の培養上清を採取し、以下に述べる間接蛍光抗体法 (Fig. 5) に供した。雑菌の繁殖による劣化を防ぐため、採取された培養上清にアジ化ナトリウム (NaN₃) を終濃度0.1%となるよう加えた。

新しい培地に植え継いで2-3日後の *Chattonella* 細胞懸濁液 (約 2000 細胞/ml) を、96穴マイクロタイタープレートに1ウェルあたり 100 μl となるよう分注し、等量の 0.25M マンニトリン酸緩衝液 (PBS; Table 4) を加えて洗浄後、約1分間静置した。洗浄液との接触により運

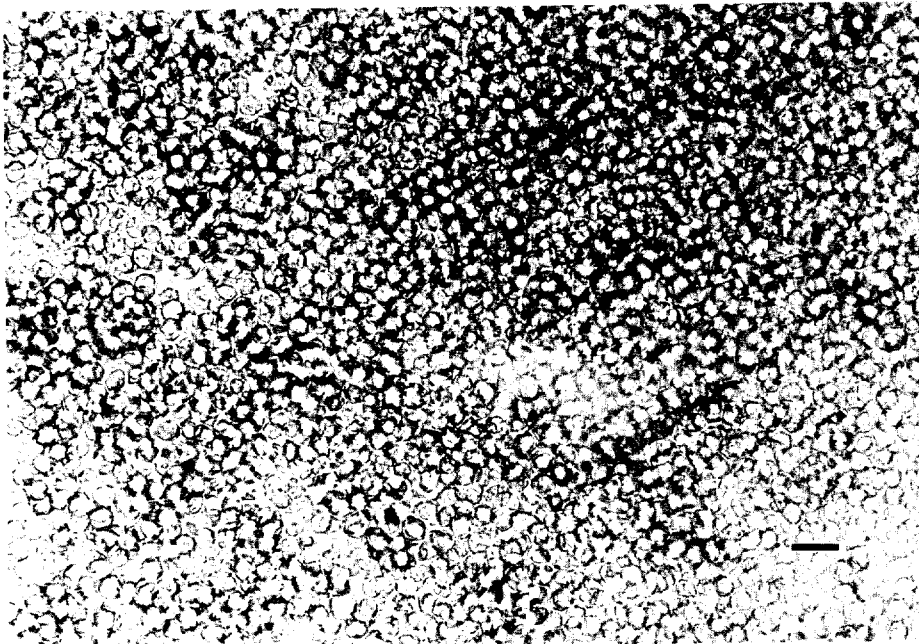


Fig. 4. Optical microscopical photograph of hybridoma cells. The scale bar indicates 50 μm.

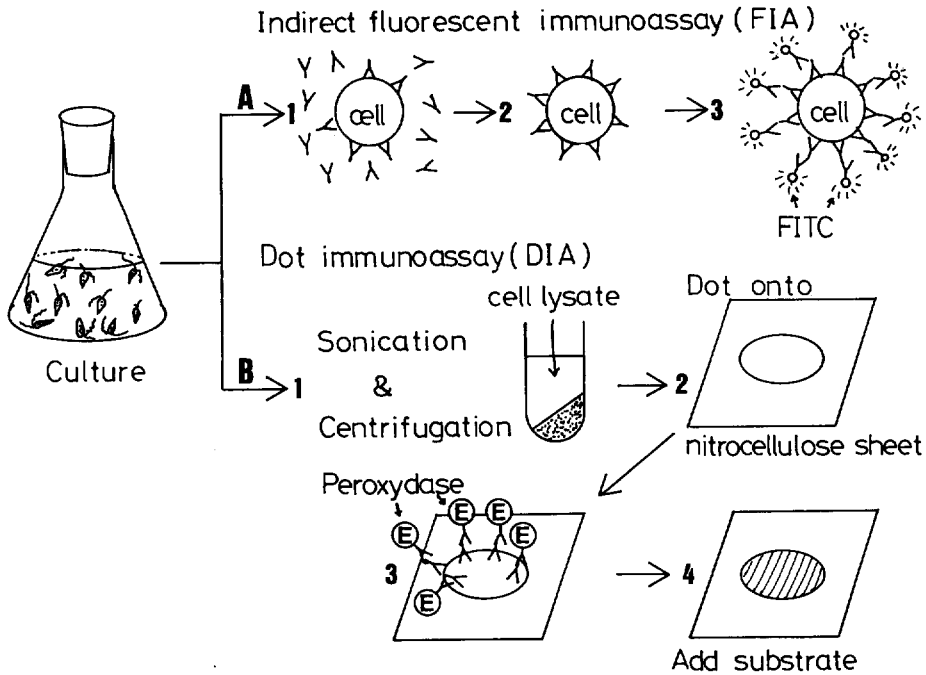


Fig. 5. Schematic diagram of (A) indirect fluorescent immunoassay (FIA) and (B) dot-immunoassay (DIA). (A) Step 1, Algal cells were incubated with monoclonal antibody solution; Step 2, After the incubation, the cells were washed with 0.25M mannitol in PBS; Step 3, FITC-conjugated goat anti-mouse Ig antibody was added to the cell suspension. After the incubation, the cells were observed by fluorescence microscopy. (B) Step 1, Algal cells were harvested by centrifugation, sonicated with TB, and the suspension was centrifuged again; Step 2, The cell suspension was diluted and dotted onto the nitrocellulose sheet; Step 3, Sheets were overlaid with antibody solution. After washing, it was incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody solution; Step 4, Specific antibody binding was revealed with substrate solution.

Table 4. Compositions of PBS, TB, bicarbonate buffer, and acetate buffer

Buffer	Ingredient	Concentration (l)
[PBS]	Na ₂ HPO ₄	8.06 g
	KH ₂ PO ₄	1.01 g
	NaCl	6.82 g
[TB]	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	2.42 g (adjusted to pH 7.4 with HCl)
[bicarbonate buffer]	Na ₂ CO ₃	5.3 g (adjusted to pH 9.5 with NaOH)
[acetate buffer]	CH ₃ COONa	1.64 g (adjusted to pH 4.5 or 5.0 with CH ₃ COOH)

動性の低下した藻体が、静置により大部分ウェルの底に沈んだのを確認後、上澄み 150 μ l を静かに吸引除去し、ハイブリドーマ培養上清 50 μ l を加え 20°C で 20 分間反応させた。さらに 2 回洗浄後、2 次抗体溶液として FITC 標識ヤギ抗マウス IgG+A+M(H+L) (ORTHO 社) を洗浄液で 40 倍希釈したものを 50 μ l ずつ加え、10 分間室温で反応させた。インキュベート終了後、3 回洗浄し、藻体を落射式蛍光顕微鏡 (Nikon 社) で B-2 励起光により観察した。判定は、細胞外

周の黄緑色のコロナの有無により行った (Plate II-B, E)。判定の際に、クロロフィルの発する赤色自家蛍光が邪魔になって観察が困難な場合には、400-550 nm の波長光を遮断する -550IF Objective Filter を使用した (Plate II-C, F)。対照実験には、一次抗体のかわりにミエローマ培養上清を用いたが、細胞の崩壊が著しい場合には洗浄液で代用した。

間接蛍光抗体法により陽性と判定されたウェル中の細胞を常法 (岩崎他 1983) にしたがいきローニングした。確立された細胞株を大量培養しモノクローナル抗体を得た。ハイブリドーマの一部はプルーフリーザー (タバイ社) 内で -90°C で凍結保存した。このとき凍結保護剤としてジメチルスルホキシドを加えた。

4. 抗体のクラス決定

得られた抗体は Streptavidin-Biotin System/MonoAb-ID EIA Mouse Kit (Zymed Laboratories 社) を用いた Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) によりクラスを決定した。

まずプレート作製のため、それぞれの免疫株の培養 50 ml を 1,200 rpm, 10分間遠心して得られたペレットに Table 4 に示した pH 7.4 のトリス緩衝液 (TB) 2 ml を加え超音波破碎を行った後、1,000 rpm で10分間遠心し、得られた上清を細胞粗破碎液として得た。これを希釈し、Nunc-Immunoplate Maxisorp F96 (Nunc 社) の各ウェルに 50 μl ずつ加え、 37°C で2時間反応させ、抗原の固相への吸着を行った。測定時の抗体の非特異的結合を防ぐため、反応終了後、2% 牛血清アルブミン (BSA)/50 mM ビカーボネート緩衝液 (Table 4) で各ウェルを1回洗浄後、同液を 200 μl /ウェルとなるよう加え、 4°C で一夜反応させ、マスキングを行った。

ウェルに抗体液を加え2時間反応させ、0.15% ツイン 20/TB で2回洗浄した後、各サブクラス抗体の立体構造に対して特異的に反応するビオチン化抗体を加え2時間反応させた。3回洗浄後、パーオキシダーゼ標識アビジンを加え1時間反応させ、4回洗浄後、基質液 (10 mg ABTS, 12.8 μl 30% H_2O_2 , 12.8 ml クエン酸緩衝液) を 100 μl /ウェルずつ加えた。室温で約10分間反応させた後、酵素-基質反応による発色の度合をモデル450マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 社) を用い、吸光度 (405 nm) により測定した。測定結果をもとに各抗体のクラスを決定した。

結果および考察

無処理の藻体を用いた免疫によるマウスの死亡例はほとんどなく、藻体は低毒性なものであると考えられた。免疫開始後、約3-6週間で血清中の抗体活性の上昇がみられた。ただし2カ月以上免疫を続けたマウスは、その脾臓が若干肥大している場合があり、融合効率も低かった。

抗体価の十分に上昇したマウス個体の脾臓細胞とマウスミエローマとをポリエチレングリコール存在下で細胞融合し、一回の融合で96穴プレート計240ウェルに分散して培養した。そのうちハイブリドーマの増殖がみられたウェルは約60-160ウェルであった (Table 5)。免疫には、*C. marina* NIES-117, NIES-118 と NIES-121, および *C. antiqua* NIES-83 と NIES-86 の5株を用い、それぞれにより免疫されたマウスの脾臓細胞を用いた細胞融合により、MR-17a, 17b, 17c, MR-18, MR-21, AT-83 および AT-86 の計7抗体を産生するハイブリドーマがそれぞれ得られた

Table 5. Population of positive wells in hybridoma technique

Strains used for immunization	Total	Number of wells growth observed	Positive	Number of monoclonal antibodies obtained
<i>C. marina</i> NIES-117	240	160	6	3*
<i>C. marina</i> NIES-118	240	80	2	2*
<i>C. marina</i> NIES-121	240	78	1	1
<i>C. antiqua</i> NIES-83	240	52	1	1
<i>C. antiqua</i> NIES-86	240	102	1	1

* One hybridoma cell line was lost during cloning procedure in each case.

Table 6. The list of monoclonal antibodies

Antibodies	Strains used for immunization	Class
MR-17a	<i>C. marina</i> NIES-117	IgG
MR-17b	<i>C. marina</i> NIES-117	IgG
MR-17c	<i>C. marina</i> NIES-117	n.d.*
MR-18	<i>C. marina</i> NIES-118	IgM
MR-21	<i>C. marina</i> NIES-121	IgG
AT-83	<i>C. antiqua</i> NIES-83	IgG
AT-86	<i>C. antiqua</i> NIES-86	IgG

* not determined.

(Table 6)。間接蛍光抗体法の結果を Plate II に示した。いずれの場合も細胞外周に黄緑色のコロナがみられたが、MR-21 および AT-86 については特にコロナが鮮やかであった。また、AT-86 の結合部位は、検鏡時に微妙にフォーカスをずらすことにより *C. antiqua* NIES-86 の細胞表面にパッチ状に分布しているのが観察された。

ハイブリドーマは培養後、上清のみを採取し、細胞は -90°C で凍結保存した。しかし、MR-17c 産生細胞は保存する前に死滅した。凍結細胞は少なくとも半年から 1 年に 1 回、融解し増殖させた後、再び凍結保存した。抗体価の低下がみられた場合には、随時、再クローニングにより選択を行った。

また、各抗体のクラスを調べた結果を Table 6 に付記した。今回得られた 7 抗体のうち、5 種が IgG、1 種が IgM (MR-17c は不明) であった。免疫開始後約 4 - 6 週間と比較的長い時間において細胞融合を行ったため、初期産生抗体である IgM がマイナーグループになったものと考えられた。

免疫に 5 株の *Chattonella* 属藻類を用い、計 7 種のモノクローナル抗体を得たが、この抗体回収率は一般的に評価して低い値である。この理由として、まず抗体産生細胞の選別に間接蛍光抗体法を用いたことが挙げられる。今回用いた間接蛍光抗体法は、ハイブリドーマ上清中に含まれる「細胞表面を認識する」抗体のみを選択する方法である。*Chattonella* 属藻類は細胞表面に「グリコカリックス」と呼ばれる多糖層を持つことが知られている (YOKOTE and HONJO 1985, 本城 1985)。したがって、今回のように間接蛍光抗体法を用いた選別により得られた抗体はその細胞表面多糖に対するものである可能性が高いと考えられる。一般にタンパク質抗原に対する抗体

と比較して、多糖に対する抗体はその作製が困難であることが報告されており（神奈木他 1987）、これが融合効率が高かった割に目的とする抗体があまり多く得られなかった理由の一つであろう。抗体の認識部位を細胞表面に限らず、細胞内成分にまで広げて、例えば ELISA 法等を用いたスクリーニングを行えばより多くの抗体が得られたことは疑いないが、今回は第 II 章で述べるように現場海域で得られた藻体の迅速な分類・識別のための「藻体表面に対する」抗体を得ることを目的としたため間接蛍光抗体法のみによる選別を行った。

また本実験では、無処理の藻体を直接、マウスの腹腔内に注射して免疫を行ったが、免疫時にアジュバント処理等の抗原性を高めるための処理を施すことも有効な方法であろうと考えられる（山川 1986）。

第 2 節 調製されたモノクローナル抗体による *Chattonella* 属藻類の識別

材料および方法

前節で調製された各モノクローナル抗体の、*Chattonella* 属藻類 18 株に対する反応性を、間接蛍光抗体法とドットイムノアッセイ法 (Fig. 5) を用いて検討した。

間接蛍光抗体法については、前述の方法にしたがった。

ドットイムノアッセイ法の手順は SMITH *et al.* (1984b) の方法にしたがった。まず 50 ml の *Chattonella* 細胞懸濁液を 1,200 rpm で 10 分間遠心分離し集藻した。次に、得られたペレットに PBS 2 ml を加え、超音波破碎して得られた細胞粗破碎液を、10,000 rpm で 10 分間遠心分離した。こうして得られた上清を希釈し、ニトロセルロースシート上に 1 ドットあたり 2 μ l となるようマイクロピペットでしみこませ、常温下で風乾した。2% BSA/TB でマスキング後、1 次抗体としてハイブリドーマ培養上清を 10 分間反応させ、洗浄後、2 次抗体として Peroxidase-conjugated Rabbit anti-Mouse IgG+A+M(H+L) (Zymed 社) を 500 倍希釈したものを反応させた。再び洗浄を行った後、常温下、基質液 (4 mg ジアミノベンチジントラクロライド, 2 mg NiCl₂, 15 μ l H₂O₂) 中で反応させ、ドット上の発色を肉眼で判定した。対照実験には、1 次抗体のかわりにミエローマ培養上清を用いた。

細胞周期または増殖段階によって抗体との反応性のばらつきの有無を確認するために、7 抗体のうち MR-18, MR-21 および AT-86 について、8 時間ごと、および増殖段階ごとの反応性を間接蛍光抗体法により調べた。各増殖段階における細胞密度は直接計数法により求めた。

結果および考察

得られた 7 種の抗体に対する各株の反応性を、間接蛍光抗体法およびドットイムノアッセイ法で調べたが、その結果を前者では全細胞中の陽性細胞の割合で、後者ではドット上の発色の強さで評価した (Table 7)。しかし、間接蛍光抗体法の場合、その蛍光環の鮮やかさは株と抗体の組合せにより様々であり、特に各抗体とも Table 6 に示した免疫株との組合せでは極めて鮮明な蛍光環が観察された。この反応性の強弱の差は、抗原量の差、あるいは抗体との親和性の差と考え

Table 7. Reactivity of 7 kinds of monoclonal antibodies against 18 strains of genus *Chattonella* by means of indirect fluorescent immunoassay and dot-immunoassay

Strains	Assay	Reactivity							Type
		MR-17a	MR-17b	MR-17c	MR-18	MR-21	AT-83	AT-86	
<i>C. marina</i> NIES-3	FIA	+++* ¹	+++	n.t.* ²	+++	+++	-	-	I
	DIA	++	++	n.t.	+++	-	-	-	
<i>C. marina</i> NIES-14	FIA	+++	+++	n.t.	+++	+++	-	-	I
	DIA	++	++	n.t.	+++	-	-	-	
<i>C. marina</i> NIES-116	FIA	+++	+++	n.t.	+++	+++	-	-	I
	DIA	+++	+++	n.t.	+++	-	-	-	
<i>C. marina</i> NIES-117	FIA	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	I
	DIA	+++	++	++	+++	-	-	-	
<i>C. marina</i> NIES-118	FIA	+++	+++	++	+++	+++	-	-	I
	DIA	+++	++	+++	+++	-	-	-	
<i>C. marina</i> NIES-115	FIA	+	+++	-	+++	+++	+++	-	II
	DIA	+	+	-	+++	+++	+	-	
<i>C. marina</i> NIES-121	FIA	+	+	-	+++	+++	+++	-	II
	DIA	+	+	-	++	+++	+	-	
<i>C. antiqua</i> NIES-85	FIA	-	-	++	-	+++	+++	+++	III
	DIA	-	-	++	-	-	++	++	
<i>C. antiqua</i> NIES-113	FIA	-	-	n.t.	-	+++	+	+++	III
	DIA	-	-	n.t.	-	-	+	+	
<i>C. antiqua</i> NIES-1	FIA	-	-	++	-	-	+++	+++	IV
	DIA	-	-	n.t.	-	-	+	+	
<i>C. antiqua</i> NIES-2	FIA	-	-	n.t.	-	-	++	+++	IV
	DIA	-	-	n.t.	-	-	+	++	
<i>C. antiqua</i> NIES-83	FIA	-	-	n.t.	-	-	+++	+++	IV
	DIA	-	-	n.t.	-	-	++	+++	
<i>C. antiqua</i> NIES-84	FIA	-	-	n.t.	-	-	+++	+++	IV
	DIA	-	-	n.t.	-	-	+	+	
<i>C. antiqua</i> NIES-86	FIA	-	-	++	-	-	+++	+++	IV
	DIA	-	-	++	-	-	+	+++	
<i>C. antiqua</i> NIES-114	FIA	-	-	n.t.	-	-	+++	+++	IV
	DIA	-	-	n.t.	-	-	+	+	
<i>C. antiqua</i> NIES-161	FIA	-	-	n.t.	-	-	+++	+++	IV
	DIA	-	-	n.t.	-	-	+	+	
<i>Chattonella</i> sp. NIES-454	FIA	++	++	++	-	-	-	-	V
	DIA	+++	+++	+++	+++	-	-	-	
<i>Chattonella</i> sp. NIES-93	FIA* ³								VI
	DIA	-	-	-	-	-	-	-	

*¹ In FIA; + + +, positive cell ratio 80-100%; ++, 50-80%; +, 10-50%; -, 0%.
In DIA, number of "+" indicates the intensity of the color on dot.

*² not tested.

*³ Cells were too weak to examine by FIA method.

られる。ただし、その数値化が困難であったことと、過度の細分化による混乱を避けるため、後述する群別は蛍光環の有無に着目して行った。

間接蛍光抗体法を行った際の問題点として、藻体が非常に壊れやすいことが挙げられる。細胞

の洗浄に PBS をそのまま用いた場合には細胞の崩壊が著しく、場合によっては全くその反応性をみる事ができなかった。本実験では 0.25M マンニットを加えることにより細胞の崩壊を減らすことができたが、それでも検体の増殖段階が対数増殖期中期以後の場合には観察が困難である場合が多く、また、*Chattonella* sp. NIES-93 株については最初の洗浄段階で全ての細胞が瞬時に壊れたためその反応性を間接蛍光抗体法で調べることができなかった。強固な細胞壁を欠くラフィド藻類に本法を応用する場合、藻体に直接接する処理溶液の浸透圧の調整には十分な配慮が必要であると思われる。

MR-17a, MR-17b と MR-18 の 3 抗体は、従来の形態学的分類法により *C. marina* と同定された 7 株に対し間接蛍光抗体法、ドットイムノアッセイ法ともに反応した。これらは、瀬戸内海産の *C. marina* である NIES-117 と NIES-118 により免疫されたマウスの脾臓細胞とミエローマの融合細胞より産生された抗体であった。また、MR-17a と MR-17b がいずれも両法による測定において *Chattonella* sp. NIES-454 に対して反応したのに対し、MR-18 はドットイムノアッセイ法においてのみ同株に対する反応性が確認された。これに対して *C. antiqua* にはこれらの抗体は全く反応せず、形態分類にしたがえば、これら 3 抗体は *C. marina* に特異的に反応する抗体であると考えられた。

対照的に AT-86 は、従来の形態学的分類により *C. antiqua* と同定された 9 株に対し両法による測定において反応したが、*C. marina* には全く反応しなかった。したがって、同様に AT-86 は *C. antiqua* に特異的に反応する抗体と考えられた。ただし、ドットイムノアッセイ法での発色は全体的に弱かった。

AT-83 は、*C. antiqua* 全株と *C. marina* のうち NIES-115 と NIES-121 の 2 株に反応した。ただし、AT-83 も AT-86 と同様にドットイムノアッセイ法での発色は弱かった。この結果から、形態学的に種分類された 2 種の間共通抗原の存在が示されたことになる。*C. marina* 各株の AT-83 に対する反応性の有無に注目すると、この種を 2 グループ (I 型および II 型) に分けることができる。すなわち、I 型には *C. marina* NIES-3, NIES-14, NIES-116, NIES-117 と NIES-118 の 5 株が、また II 型には *C. marina* NIES-115 と NIES-121 の 2 株が属した。さらに MR-21 がドットイムノアッセイで II 型のみ反応し、I 型には反応しなかったこと、MR-17c が両アッセイで II 型および VI 型を除く全ての株に反応したことも、I 型と II 型が同種に分類されながらも異なる形質を持つことを示す結果であった。とりわけ、I 型が全て瀬戸内海産であったのに対し、II 型の 2 株がいずれも鹿児島湾産であったという結果が、地域性による差を反映している可能性があるという点で注目される。このほかにも、培養中の培養液の色調が他の株のそれのように茶褐色を帯びておらず、むしろラフィド藻 *Olisthodiscus luteus* の培養にみられるような黄緑色をしていること、細胞崩壊時の溶出色素が他の株のそれとは異なり鮮やかな赤紫色をしていること等 II 型に独特のいくつかの性質が観察された。

MR-21 は間接蛍光抗体法では、*C. marina* 全株と *C. antiqua* 9 株のうち NIES-85 と NIES-113 の 2 株に反応した。また、ドットイムノアッセイ法では *C. marina* NIES-115 と NIES-121 の 2 株に対してのみ反応性が確認された。したがって、*C. antiqua* の場合も MR-21 に対する間接蛍

光抗体法での反応性の有無に注目すれば *C. marina* の場合と同様に2グループ(Ⅲ型とⅣ型)に分けることが可能であった。すなわちⅢ型には *C. antiqua* NIES-85 と NIES-113 の2株が、またⅣ型には *C. antiqua* NIES-1, NIES-2, NIES-83, NIES-84, NIES-86, NIES-114 と NIES-161 の7株が属した。しかしドットイムノアッセイでは MR-21 は両グループに対し全く反応せず、またⅠ型とⅡ型でみられたような際だった性質の差もⅢ型とⅣ型の間にはみられなかった。全体に、*C. antiqua* の形態は頭部がでこぼこで前後に長いものから、比較的小型で風船型のものまで様々であった。

MR-17c は凍結保存に至らしめることができなかったため、一部の株に対する反応性を確認したのみであるが、Ⅱ型およびⅥ型を除く全ての株に反応した。したがって、MR-17c の認識抗原は、*Chattonella* 属にかなり広範に分布しているものと考えられた。

Chattonella sp. NIES-454 は、その反応性がⅠ型とかなり似ていたが、間接蛍光抗体法で MR-18 に対する反応性が確認できなかったためⅤ型とした。この株は、培養当初、1細胞に含まれる色素体が極めて少なく、形態学的には他の株と全く別種であるような印象を与えたが、継代培養を重ねるにつれ、色素体を多く含む細胞が普通にみられるようになった。7種のモノクローナル抗体に対する反応性はⅠ型のそれと極めてよく似たものであった。

Chattonella sp. NIES-93 は、他の株に比べ浸透圧の変化にきわめて鋭敏で、間接蛍光抗体法を行った際には瞬時にして細胞の崩壊が起こったためその反応性を間接蛍光抗体法で調べることができなかった。また、ドットイムノアッセイでは7抗体に対する反応性が全く確認されなかったためⅥ型とした。形態的には、扁平で、色素体がきわめて疎であったことから、原・千原(1987)の報告したワラジ型 *Chattonella* および南西海区水産研究所で単離された *Chattonella* sp. NH-1 株と同じグループに属するものではないかと考えられた。

また、MR-18, MR-21 および AT-86 については藻体の増殖段階における反応性の違いを調べた。Fig. 6 に示した藻体の増殖曲線上にプロットした時期の細胞についてそれぞれ間接蛍光抗体法を行ったが、全ての増殖段階において高い反応性が確認された。しかしながら、藻体の増殖段

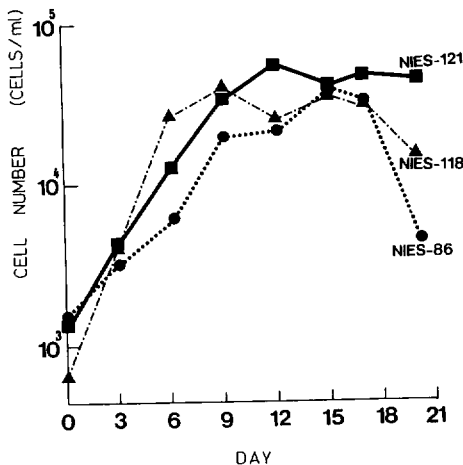


Fig. 6. Growth of *C. marina* NIES-118, *C. marina* NIES-121 and *C. antiqua* NIES-86 in ESM medium.

階が対数増殖期中期以後の場合には細胞の崩壊が多くみられ、観察が困難であった。また、藻体の細胞周期による各抗体に対する反応性の変化を間接蛍光抗体法により調べた結果、細胞周期に関わらず高い反応性が確認された。これらの結果から、本法をあらゆる試料に対して普遍的に用いることができるものと思われた。

このように7種のモノクローナル抗体を用いて各株の反応性を比較することにより、18株の *Chattonella* 属藻類を6グループに分類できたわけであるが、その群別の意味について次のように考察した。結果的に、従来の形態学的分類ときわめて一致した群別がなされたこと述べたが、例えば MR-21 や AT-83 といった種間にまたがった反応をする抗体の反応性にのみ注目すると、従来の形態分類とは異なる群別が可能である。また、仮に形態分類という背景が全くない状態でこうした試験を試みたならば、MR-17a, MR-17b, MR-18 および AT-86 が種特異的抗体で、残りがグループ特異的抗体であるということは有り得ない。なぜなら、各抗体の認識抗原がどのような物質であるかが明らかにされていない場合には、各抗体の反応性の持つ意味に優先順位をつけることができないからである。各抗体を用いて得られたデータの重要性が全く均等であると考えた場合、本実験により分類された6グループは各々独立した対等のグループということになる。

しかし、本研究の目的は、形態学的分類を無視して新たな分類体系を作り出すことではなく、免疫学的手法を用いて知り得た各株の性状をもとに組み上げた *Chattonella* 属藻類の群別を形態分類の結果と比較検討することにより、より簡易で、かつ詳細な分類・識別法を確立することにある。比較生化学が比較形態学を無視することは決してできない。なぜなら形態はその生物の持つゲノム中のあらゆる情報の総合の表現型であり、比較生化学で扱われる表現型に関与する遺伝情報量に比べ圧倒的な量の情報の集大成といえるからである。それゆえに形態分類の際には、その表現型の差がしばしば過大評価あるいは過小評価されるが、それを補う意味でこそ比較生化学の意義があるのではなからうか。そうした意味で、本実験の結果が従来の形態分類と高い相関性を示したことは、本法と形態分類法が互いに裏付けあう結果をもたらしたと考えることができるとともに、より細かい群別を行う際に、本法により与えられる藻体の細胞表面に関する情報がその一助となり得る可能性を示唆している。

第三章 現場海水中の *Chattonella* 試料への モノクローナル抗体の応用

赤潮対策については様々な試みが現在なされており、その実用化のための基礎研究が行われている。しかし、そうした試み以前に、赤潮の動態を十分に把握するための海況の物理学的、化学的、そして生物学的なモニタリングが重要であることはいままでもない (安楽 1985a, b)。わが国においても各海区水産研究所や県の水産試験場で定期的な海況調査が行われており、赤潮発生の予報を行う上で不可欠な情報が蓄積されつつある。また、室内実験として、各赤潮原因藻の水温、塩分、照度、栄養塩等の要求性に関する多くの研究がなされており (中村・渡辺

1984a, b, 山口・本城 1989, 1990 等), 現場データとの比較が行われている。*Chattonella* 赤潮についても, 採水した現場海水を直接検鏡して *Chattonella* 細胞数を計数するとともに, 水質, 海況の記録を行い, それらを比較することにより赤潮発生のメカニズムの解明が試みられている。その調査項目は, 天候, 風, 水温, 塩分等の物理的環境から, 有機物, 窒素, リン, pH, クロロフィル等の水質にいたるまで多岐にわたり, 赤潮予察のための基礎資料として多くのデータが蓄積されつつある。

しかし, こうした資料を比較した場合, 藻体の名称に関する記載が, 時期あるいは発行する機関によりまちまちであることに気付く。これは, 本属藻類の命名に関して現在までに多くの混乱があったこともその一因であるが, 多くは第 I 章で述べた本属藻類の形態分類に伴う難しさによるものと思われる。とくに現場海水中の藻体の場合, 保存状態, 採取から観察までの時間等により藻体の形態変化が起こる可能性が高い上に, 培養株と天然株との形態差を指摘する報告もあり(結城・小野 1980), 正確な識別と計数を大量のサンプルについて行うには研究者の多くの時間と労力が必要とされる。*Chattonella* 属藻類の形態分類において最も誤りやすいのは, 鋭角的に尖った尾部をその特徴とする *C. antiqua* が, 環境変化により球形化した場合であり, 尖った尾部を持たない *C. marina* あるいは球形 *Chattonella* と同定される可能性が高いと考えられる。また, 上述の理由により本属藻類の正確な識別には観察者の熟練が要求されるだけに, 観察者間の熟練度の差によって生ずる誤りは避けられない。よって, 観察者の熟練度やサンプルの状態の善し悪しにより結果に誤差をもたらすことのない識別法を導入し, 異なる研究者に共通の判定基準を提供する試みは有意義であると思われる。

本章では, 第 I 章で紹介した *Chattonella* 属藻類細胞表面に対して反応するモノクローナル抗体を赤潮現場海水中の藻体に直接応用することにより, 赤潮構成種の推定を試みた。その結果を形態識別法による結果と比較し, 本法のフィールドワークへの応用の可能性について論ずる。

材料および方法

1. モノクローナル抗体

第 I 章で作製した 7 種のモノクローナル抗体のうち, MR-18, MR-21, AT-83 および AT-86 の 4 抗体を用いた。

2. 藻 体

1987年 8 月に福岡県豊前沖で発生した *Chattonella* 赤潮現場海水を豊前水産試験場寺田和夫氏より, また同月兵庫県明石沖で発生した赤潮の現場海水を兵庫県立水産試験場真鍋武彦氏より, それぞれ供与頂いた。試水はブルーム後期の現場海水であり, いずれの場合も常温で研究室に輸送された。

試料の一部については, マイクロピペッティング法によるクローニングおよび無菌化を行った。豊前産クローン株として 9 株 (FC-1~FC-9) を, 明石産クローン株として 5 株 (AC-1~AC-5) をそれぞれ得ることができた。

3. 間接蛍光抗体法

間接蛍光抗体法の手順は第 I 章で述べた方法にしたがった。海水試料に対して直接、間接蛍光抗体法を応用する場合には、50 ml の海水を 1,200 rpm で 3 分間遠心分離することにより細胞を濃縮した後、下層をマイクロピペットでゆっくり吸い上げ測定に供した (Fig. 7)。

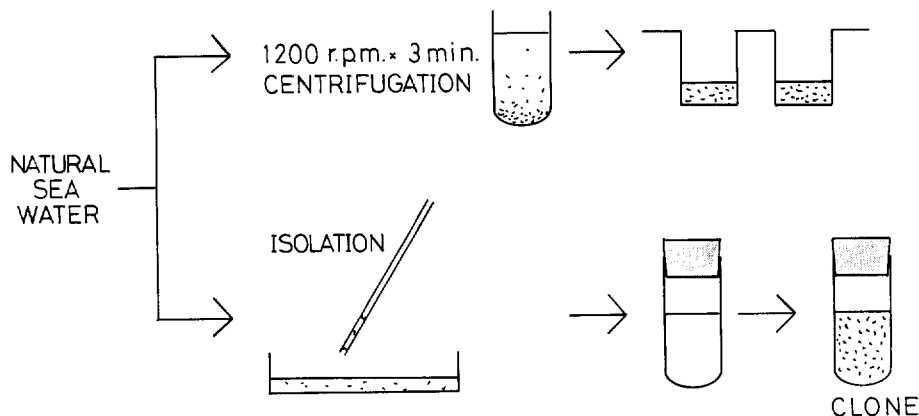


Fig. 7. Schematic diagram of pre-treatment of the field samples. (A) Fifty ml of natural sea water was centrifuged at 1,200 rpm for 3 min, and then the concentrated cells in lower stratum of the tube were quietly pipetted into the wells of the Nunc plate. (B) Isolation of algal cells from the natural sea water was also performed by the use of micropipetting method.

結果および考察

供与された海水はいずれも赤潮末期のものであり、また採取後約 3 日を経ていたため、球形化した細胞や崩壊した細胞が多くみられた。両者とも軽く遠心して細胞密度を高くした現場海水をそのまま間接蛍光抗体法に供したが、明石沖の試料では細胞の崩壊が著しく結果を得ることができなかった。豊前沖の海水中の藻体を用いた抗体反応では Table 8 に示したように、AT-86、AT-83 および MR-21 に対して反応したが MR-18 には反応しなかった。

またマイクロピペティング法により無菌分離された各株 (豊前株 9 株, 明石株 5 株) は、ESM 培地中で通常の保存株と同様に培養し、植え継ぎ後 2 - 3 日目の対数増殖期初期の培養細胞について間接蛍光抗体法で反応性を調べた。その結果を Table 8 および Table 9 に示した。豊前沖から得られた 9 株はすべて AT-86、AT-83 と MR-21 に対して反応した。明石沖から得られた 5 株のうち AC-1、AC-4 と AC-5 は AT-86 と AT-83 に対し、AC-2 と AC-3 は AT-86、AT-83 と MR-21 に対してそれぞれ反応した。これらの培養細胞は、光学顕微鏡観察により、すべて対数増殖期に鋭角の尾部を持つこと、すなわち形態学的に *C. antiqua* の特徴を示すことが確認された。

これらの結果から、1987年 8 月に発生した *Chattonella* 赤潮は、豊前沖では *C. antiqua* III 型が、また、明石沖では *C. antiqua* III 型および IV 型がそれぞれ末期に優占したものと推定された。現場海水サンプルをそのまま遠心分離して得られた藻体について行った抗体反応の結果は豊前沖

Table 8. Reactivity of MR-18, MR-21, AT-83 and AT-86 against *Chattonella* obtained from off Buzen

Samples	Reactivity			
	MR-18	MR-21	AT-83	AT-86
<i>Chattonella</i> algae* ¹ [Isolates]	—* ²	++	+++	++
<i>Chattonella</i> sp. FC-1	—	++	+++	+++
FC-2	—	+++	+++	+++
FC-3	—	+++	+++	+++
FC-4	—	+++	+++	+++
FC-5	—	+++	++	+++
FC-6	—	+++	+++	+++
FC-7	—	++	+++	+++
FC-8	—	+++	+++	+++
FC-9	—	++	+++	+++

*¹ Cells were collected by centrifugation at 1,200 rpm for 3 min.*² +++, positive cell ratio 100%; ++, 50–80%; —, 0%.**Table 9.** Reactivity of MR-18, MR-21, AT-83 and AT-86 against *Chattonella* obtained from off Akashi

Samples	Reactivity			
	MR-18	MR-21	AT-83	AT-86
[Isolates]				
<i>Chattonella</i> sp. AC-1	—*	—	+++	+++
AC-2	—	+++	+++	+++
AC-3	—	+	+++	+++
AC-4	—	—	+++	+++
AC-5	—	—	++	+++

* +++, positive cell ratio 100%; +, 10–50%; —, 0%.

サンプルのみに限られたが、単離株で得られた結果とほぼ一致しており、現場海水中の *Chattonella* についての抗体反応でも赤潮の優占種をある程度推定することは可能であると思われる。しかし細胞の状態の良否により視野に入る崩壊していない細胞の数が少ない場合もあるため、同一のサンプルについてウェルの数を複数個設けることが望ましい。今回の実験では、24穴プレートを用いて通常の5倍量の系で反応を行い、各ウェルにつき約20細胞を観察することにより判定を行うことができた。

赤潮発生の生の記録として現場株の保存培養を残すことは重要であり、そのためには藻体の単離および無菌化を行う必要がある。今回もマイクロピペティング法によるクローニングを約50株について行い計14株を得た。他はピペティングの際に与えられるストレス等により死滅した。したがって、生存能力の低い細胞に対して選択圧がかかり、同一種のみが培養できたとも考えられる。そのため、赤潮からの単離株がその赤潮の優占種と一致しているかどうかについては、サンプリング直後に顕微鏡下で多数の細胞について形態を初めとする諸形質を付記する必要がある

う。今回のマイクロピペッティングによる単離操作ではできるだけランダムなサンプリングが行われたが、それでも単離後増殖したものは半数以下であったため、選択圧がかかった可能性は否めない。こうした問題点を踏まえた上で、本法を用いて赤潮優占種を推定した結果と、現場からのサンプリング直後の形態分類の結果との比較について以下に検討した。現場試水中の *Chattonella* 細胞の形態についての記述はそれぞれ寺田氏と真鍋氏からの私信に基づくものである。

寺田氏によると、豊前の赤潮現場試水では *C. marina* が優占していた。これに対して、モノクローナル抗体法による測定では *C. antiqua* のみが存在する赤潮であったと判定された。真鍋氏によると、明石の赤潮現場試水は、サンプリング直後に直接計数され、*C. marina* が 24 細胞/ml、*C. antiqua* が 54 細胞/ml であった。すなわち、形態観察の結果、両種の混在した赤潮であったと判定された。これに対して、モノクローナル抗体法による測定では *C. antiqua* のみが存在する赤潮であると判定された。すなわち、両試料ともに採取後の光学顕微鏡観察により *C. marina* の存在が確認されたにも関わらず、モノクローナル抗体法ではいずれの場合も *C. marina* を検出することができなかった。この結果の食い違いがどのような理由によるかについては推測の域を出ないが、つぎの3つの可能性が考えられる。①輸送の際のストレスにより *C. marina* が淘汰された。②単離操作の過程で選択圧がかかり *C. marina* が淘汰された。③光学顕微鏡観察による同定時に *C. antiqua* がなんらかの刺激により変形し、鋭角の尾部を失った結果 *C. marina* と判定された。特に③のケースは、現場株 (Fig. 8) のみならず、培養細胞においてもしばしばみられる現象である (Fig. 1)。

今後、モノクローナル抗体を用いた *Chattonella* 属藻類の識別を現場海水中の試料に対して応

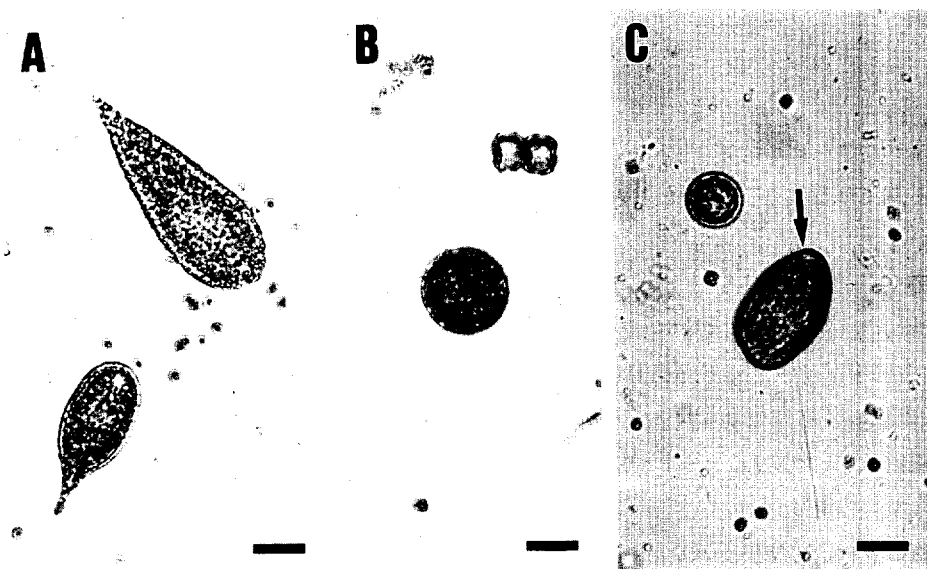


Fig. 8. Differential interference microscopical photographs of *Chattonella* in natural sea water from offshore Akashi in August, 1987. (A) Cells with sharp tails. Note the difference of size between the cells. (B) A round cell. (C) A cell that lost sharp tail under light microscopic observation (arrow) and a round cell. Note the difference of size between the cells. The scale bars indicate 20 μ m.

用する場合には、できるだけサンプリング直後に集藻して間接蛍光抗体法に供することにより、藻体に対する選択圧を下げ、現場の藻相を結果に正確に反映させることが重要であると考えられる。

第IV章 認識抗原の性状解析

7種のモノクローナル抗体を用いることにより、*Chattonella* 属藻類の群別を行うことができ、また同法を現場海水試料に応用することができたことを第II章、第III章でそれぞれ述べた。この群別は、藻体と得られたモノクローナル抗体との間の反応性の有無に基づいているが、この反応性の有無が何を意味しているのかについて検討を加えることは、本法の方法論的裏付けを行う上で重要であると考えられる。免疫反応は、抗原の立体構造の末端を抗体が認識する反応である。したがって、用いたモノクローナル抗体の認識抗原の性状を明らかにすることにより、各反応の意味を知る手がかりが得られると考えられる。

本章では、用いたモノクローナル抗体のうち MR-18, MR-21 および AT-86 の認識する抗原について、ウェスタンブロッティング法、ドット免疫アッセイ法、競合 ELISA 法、免疫電子顕微鏡法等の手法を用いることによりその性状解析を行った結果について論じる。

第1節 ウェスタンブロッティング法を用いた抗原解析

MR-18, MR-21 および AT-86 の3抗体の認識抗原の分子量をウェスタンブロッティング法により調べた。

材料および方法

1. モノクローナル抗体

第1章で作製した7種のモノクローナル抗体のうち、MR-18, MR-21 および AT-86 の3抗体を用いた。

2. 藻 体

原則的に、抗体を得る際に免疫に用いた株を使用した。すなわち、MR-18, MR-21 および AT-86 の3抗体を用いた各実験において *C. marina* NIES-118, *C. marina* NIES-121 および *C. antiqua* NIES-86 を抗原側試料株としてそれぞれ用いた。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

(1) 試料の調製

各株の定常期の培養 1,000 ml を 3,000 rpm で20分間、10°C で遠心し集藻を行った。ペレットを葉さじで集めた後、pH 7.0 に調整した SDS 処理液 (10% ショ糖, 10% SDS, 10% メルカプトエタノール/10 mM PBS) 2 ml を加え、氷冷下で超音波破碎した。10,000 rpm で10分間冷却遠心分離後、上清を泳動用試料とした。

(2) 電気泳動

LAEMMLI (1970) の方法にしたがって SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動には10%ポリアクリルアミドゲルを使用し、常温下、定電流 40 mA で、泳動先端がゲルの陽極側に十分近づくまで行った。泳動用試料は1 コームあたり 5 μ l を用いた。

4. 転写と免疫染色

(1) 転写

電気泳動終了後のゲルのうち、一部のレーンをマイクローム用カッターで切り出し、クマシーブリリアント青 (Imperial Chemical Industries 社) によりタンパク染色を行った (FAIRBANKS *et al.* 1971)。残りのレーンは、WINSTON *et al.* (1987) の方法にしたがいニトロセルロース膜への平行転写を行った (Fig. 9)。以下に手順の概略を示す。

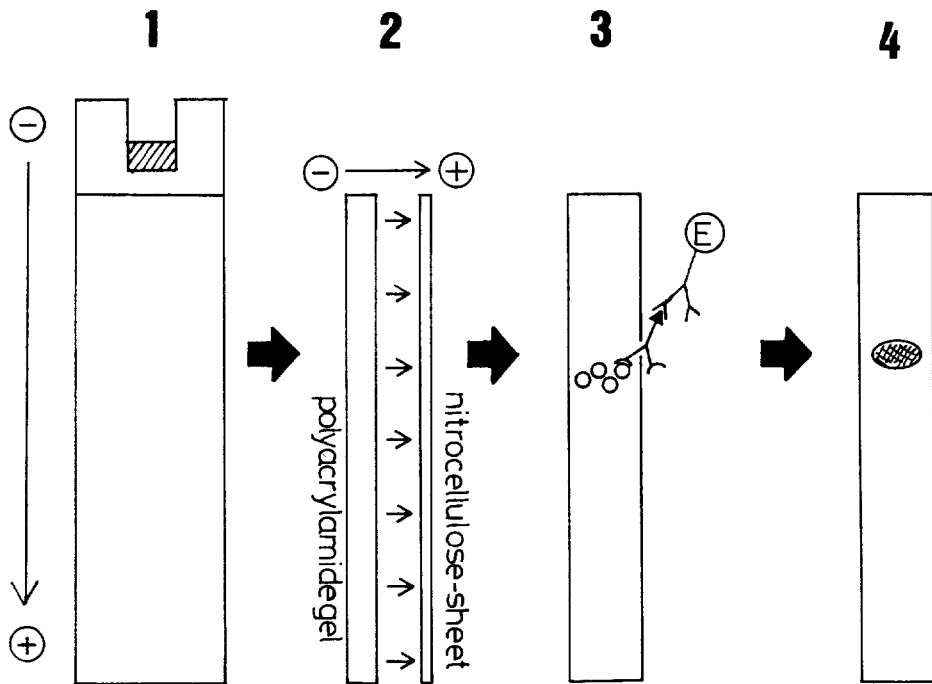


Fig. 9. Schematic diagram of Western-blotting method. Step 1, The algal cell lysates were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; Step 2, The substances separated in Step 1 were transferred to nitrocellulose sheet; Step 3-4, The sheets were immunostained according to the method shown by SMITH *et al.* (1984b).

① ゲルを転写液 (2.4 g トリス, 11.5 g グリシン, 200 ml メタノール/1000 ml) 中に浸析し、緩やかに振とうしながら約20分間平衡化した。同時に、適当な大きさに切り出した濾紙とニトロセルロース膜も転写液に浸析しておいた。

② Bio-Rad 社製 Transblot SD Cell の陽極側に、転写液を浸した濾紙3枚を敷き、エタノールでよく拭いた試験管の側面を転がし気泡を抜いた。

③ 濾紙の上にニトロセルロース膜を敷き、同様にして気泡を抜いた。

④ ニトロセルロース膜上に平衡化したゲルを置き、気泡を抜いた後、レーンの位置がわかるよう膜上に細い注射針で印をつけた。

⑤ ゲル上に、濾紙3枚を、気泡を残さないよう、またゲルとニトロセルロース膜との接触面をずらさないよう注意しながら重ねた。

⑥ 陰極側の電極をセットし安全カバーをかけ、14 V で7～10分間転写を行った。

(2) 免疫染色

転写されたニトロセルロース膜は、0.5%ノニデット P-40/PBS 中に常温で1時間浸析して SDS を除去した後(尾形他 1983)、2% BSA/TB 中で4°C 一夜マスキングを行った。以下、免疫染色法についてはドットイムノアッセイ法の操作手順にしたがった (Fig. 9)。

結果および考察

MR-18, MR-21 および AT-86 を用いたウェスタンブロッティングの結果を Fig. 10 に示した。免疫染色の結果、3抗体いずれの場合にもニトロセルロース膜上に複数のバンドの発色がみられた。

MR-18 は、7.5%ポリアクリルアミドゲル上に展開された免疫株 *C. marina* NIES-118 中の計

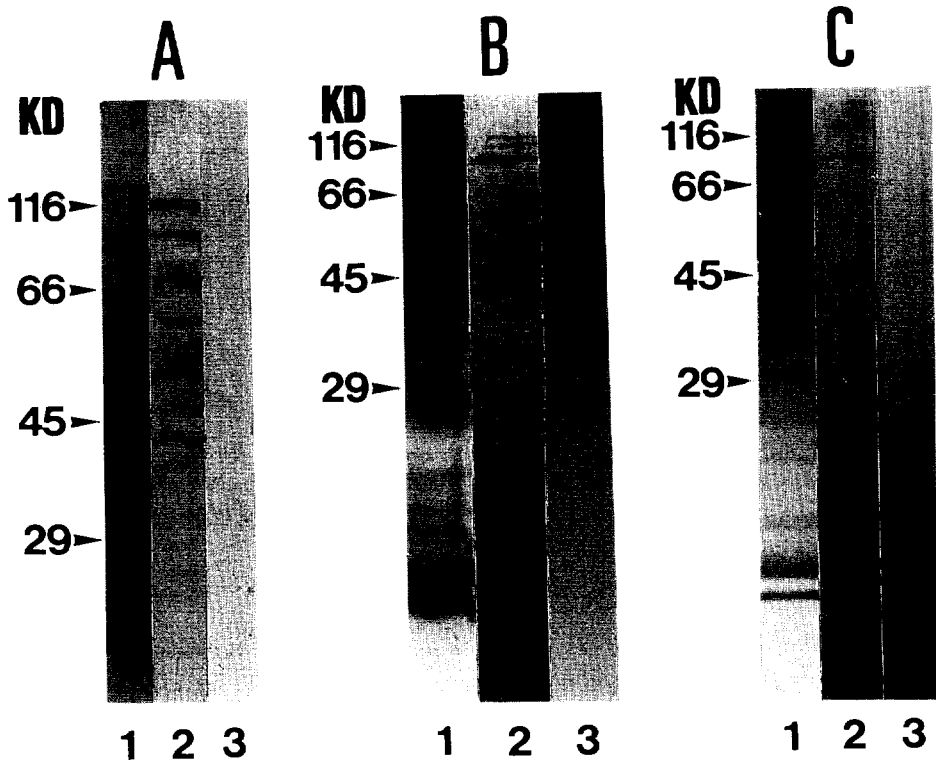


Fig. 10. Western blots of SDS extraction of the cell lysates of (A) *C. marina* NIES-118, (B) *C. marina* NIES-121, and (C) *C. antiqua* NIES-86, respectively. Lane 1, stained with Coomassie brilliant blue; Lane 2, immunostained with (A) MR-18, (B) MR-21, and (C) AT-86, respectively; Lane 3, stained with only peroxidase-conjugated secondary antibody as negative control.

8本のバンドに対して反応した。Rf値は0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.21, 0.26および0.28であった。したがって、50 kd以上の少なくとも分子量の異なる8種以上の高分子にMR-18の認識する抗原決定基が存在しているものと考えられた。

MR-21は、10%ポリアクリルアミドゲル上に展開された免疫株 *C. marina* NIES-121中の計8本のバンドに対して反応した。Rf値は0.09, 0.10, 0.13, 0.19, 0.23, 0.29, 0.34および0.57であった。したがって、28 kd以上の少なくとも分子量の異なる8種以上の高分子にMR-21の認識する抗原決定基が存在しているものと考えられた。

AT-86は、10%ポリアクリルアミドゲル上に展開された免疫株 *C. antiqua* NIES-86中の計4本のバンドに対して反応した。Rf値は0.04, 0.06, 0.07および0.14であった。したがって、66 kd以上の4種以上の高分子にAT-86の認識する抗原決定基が存在しているものと考えられた。

このように、ウェスタンブロットリングの結果、用いた3抗体すべてについて、複数のバンドに発色がみられることが確認された。一般的に、複数のバンドが検出された場合には以下のような可能性を考える必要がある。①ハイブリドーマがクローン化されていない。②二次抗体の非特異的反応。③実際に多くの抗原分子上に共通のエピトープが存在する。④ペルオキシダーゼ活性をもつ抗原が失活せず膜上に存在している。⑤タンパク質抗原のタンパク質分解による部分的な低分子化。⑥S-S結合によるポリマー形成 (CAMPBELL 1989, 口野他 1987)。

このうち、①については、数度のクローニングを行ったことから、また、②については、コントロールに全く発色がみられなかったことからそれぞれ否定できる。③については、仮にそのような分子が存在したとしてもSDS処理+熱処理により酵素活性の残存の可能性は極めて低いと思われる。⑤についてはプロテアーゼ阻害剤非存在下で実験をおこなったので完全には否定できないが、集藻後、氷水中で冷却しながら破碎し、SDS処理、加熱、泳動までの操作を短時間内に行ったことから、膜にみられたような激しい低分子化が生じた可能性は低いと考えた。また、⑥については、試料をメルカプトエタノールで処理していることからS-S結合は切断されていると思われた。したがって、③の可能性が考えられたので以下に検討した。

BREWING *et al.* (1985)は根粒中のペリバクテロイド膜に反応するモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いたウェスタンブロットリングの結果、複数のバンドが発色することを報告した。この結果について彼らは、プロテアーゼおよび過ヨウ素酸処理による抗原性の変化を確認した上で、次の3つの可能性を示唆した。①モノクローナル抗体の認識抗原決定基は1種のポリペプチド鎖上にあり、異なる分子量の糖鎖が結合している。②モノクローナル抗体の認識抗原決定基は糖鎖上にあり、異なる分子量のポリペプチド鎖が結合している。③部分的なタンパク質の分解により低分子化が起こった。

今回用いた抗体はすべて *Chattonella* 属藻類の細胞表面に対して反応したことから、細胞表面に存在するグリコカリックスが抗原であるとする、抗原分子が糖鎖をもつ可能性は高い。第2節において、本節で考察した抗原が糖鎖であるという仮説を、各種処理による抗原性の変化の有無によって検証する。

第 2 節 各種処理による抗原性の変化

第 I 章および第 II 章で行った *Chattonella* 属藻類の群別は、藻体とモノクローナル抗体との間の反応性に基づいている。例えば、抗体 MR-18 が *C. marina* NIES-118 と *C. marina* NIES-121 に対して反応するという事は、この 2 種の藻体に MR-18 の認識する抗原が共通に存在していることを示している。すなわち、Table 7-9 に示したモノクローナル抗体と各株との交差反応性の結果は、用いたモノクローナル抗体の認識する特定の分子構造の藻体細胞表面または藻体細胞内における有無を表している。したがって、用いたモノクローナル抗体の認識抗原の性状を知ることは、こうした結果の本来の意味を知る上で重要であると考えられる。

免疫反応は、抗体が認識抗原の立体構造の末端を認識する反応であるから、その立体構造の変化は抗原性の著しい低下をもたらす。そこであらかじめ構造変化の対象が明らかな処理を抗原に対して施し、その抗原性の変化を調べることにより、抗体の認識する立体構造の末端、すなわち抗原決定基の性状を推定することが可能である。

本節では、種々の酵素処理、あるいは化学処理を抗原に施した場合の抗原性の変化から推定された MR-18, MR-21 および AT-86 の認識抗原の性状について論じた。

材料および方法

1. モノクローナル抗体

第 I 章で作製した 7 種のモノクローナル抗体のうち、MR-18, MR-21 および AT-86 の 3 抗体を用いた。

2. 粗抗原液の調製

藻体としては原則的に、抗体を得る際に免疫に用いた株を使用した。すなわち、MR-18, MR-21 および AT-86 の 3 抗体を用いた各実験において、抗原として *C. marina* NIES-118, *C. marina* NIES-121, および *C. antiqua* NIES-86 をそれぞれ用いた。

各藻体の培養 50 ml を、1,200 rpm, 5°C, 10 分間遠心分離することにより集藻し、得られたペレットに 1 ml の 20 mM TB (pH 7.4) を加え、超音波破碎を行った。このようにして得られた細胞粗抽出液を 10,000 rpm, 10 分間遠心し、得られた上清を粗抗原原液とした。原液は TB で希釈し、3. で述べる各種処理を施した後、ドットイムノアッセイに供した。

また競合 ELISA 用の抗原サンプルは上記粗抗原原液を DEAE セルロースカラムによって部分精製した。樹脂 (Whatman 社, DE23) は 20 mM TB (pH 7.4) で膨潤させた後、カラムに充填した。

各藻体の培養 2,000 ml を、前述の方法で粗抗原原液とし、流速 0.8 ml/分でカラムにかけた後、ステップワイズで溶出させた (0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.35M, 0.4M, 0.45M, 0.5M と 1.0M NaCl/20 mM TB)。得られた各画分についてドットイムノアッセイを行い、反応性の高い画分を 20 mM TB に対して透析し、部分精製抗原とした。

3. 各種処理

2. で調製した粗抗原液に対して以下の処理を施した。対照区として(1)については常温下で60分間放置した粗抗原液を、また(2)から(11)についてはすべて処理用酵素または試薬のみを除き、等温、等 pH で処理した粗抗原液を用いた。また処理用酵素および試薬のみの抗原性についても測定を行った。

(1) 熱処理

粗抗原液を 100°C で60分間加熱した。加熱終了後、氷水中につけた。

(2) プロナーゼ処理

20 mM TB (pH 7.4) にプロナーゼ (Calbiochem 社) を0.1%となるよう溶かしたものを酵素原液とし、粗抗原液と等量混合した後、30°C で2時間反応させた。反応停止は、100°C、5分間処理で行った。

(3) α -グルコシダーゼ処理

50 mM TB (pH 6.8) に α -グルコシダーゼ (Sigma Chemical 社) を0.2%となるよう溶かしたものを酵素原液とし、粗抗原液と等量混合した後、25°C で2時間反応させた。反応停止は、100°C、5分間処理で行った。

(4) β -グルコシダーゼ処理

50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0; Table 4) に β -グルコシダーゼ (Sigma Chemical 社) を0.1%となるよう溶かしたものを酵素原液とし、粗抗原液と等量混合した後、37°C で2時間反応させた。反応停止は、100°C、5分間処理で行った。

(5) α -ガラクトシダーゼ処理

50 mM TB (pH 7.4) に α -ガラクトシダーゼ (Sigma Chemical 社) を0.002%となるよう溶かしたものを酵素原液とし、粗抗原液と等量混合した後、25°C で2時間反応させた。反応停止は、100°C、5分間処理で行った。

(6) β -ガラクトシダーゼ処理

50 mM TB (pH 6.5) に β -ガラクトシダーゼ (Sigma Chemical 社) を0.045%となるよう溶かしたものを酵素原液とし、粗抗原液と等量混合した後、37°C で2時間反応させた。反応停止は、100°C、5分間処理で行った。

(7) α -マンノシダーゼ処理

50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に α -マンノシダーゼ (Sigma Chemical 社) を0.05%となるよう溶かしたものを酵素原液とし、粗抗原液と等量混合した後、25°C で2時間反応させた。反応停止は、100°C、5分間処理で行った。

(8) ヒアルロニダーゼ処理

50 mM TB (pH 7.4) にヒアルロニダーゼ (Sigma Chemical 社) を0.1%となるよう溶かしたものを酵素原液とし、粗抗原液と等量混合した後、37°C で2時間反応させた。反応停止は、100°C、5分間処理で行った。

(9) リゾチーム処理

50 mM TB (pH 6.2) にリゾチーム (Sigma Chemical 社) を0.1%となるよう溶かしたものを酵素原液とし、粗抗原液と等量混合した後、37°C で2時間反応させた。反応停止は、100°C、5分間処理で行った。

(10) 過ヨウ素酸処理

80 mM 過ヨウ素酸ナトリウム水溶液を原液とし、粗抗原液と等量混合した後、4°C で一夜反応させた。反応後、20 mM TB に対して透析した。

(11) アルカリ処理

0.4M NaBH₄, 0.2M NaOH 水溶液をアルカリ処理用原液とし、粗抗原液と等量混合した後、4°C で一夜反応させた。反応後、20 mM TB に対して透析した。

4. ドットイムノアッセイ

3. で得られた各種処理粗抗原液を1ドットあたり2 μ l ずつしみこませて風乾した後、第II章第2節で述べた方法にしたがい、ドットイムノアッセイを行った。

5. 競合 ELISA

一部の試料については競合 ELISA 法により抗原性の数値化を行った。

(1) 競合抗原

競合 ELISA 用の競合抗原には、2. で得られた部分精製抗原を20 mM TB (pH 7.4) で希釈して用いた。部分精製抗原の各種処理は3.(2)と3.(10)に示した方法にしたがって行った。

(2) 競合 ELISA 用プレート

各藻体の培養50 ml を集藻し、得られたペレットに2 ml の0.5% Triton X-100/20 mM TB を加え超音波破碎を行った後、得られた細胞粗抽出液を10,000 rpm で10分間遠心し、上清を50 mM ピカーボネート緩衝液 (pH 9.5) に対し透析した。こうして得られたプレート作製用粗抗原液を同緩衝液で希釈した後、Immunoplate Maxisorp F96 (Nunc 社) の各ウェルに50 μ l ずつ加え、37°C で2時間反応させ、抗原の固相への吸着を行った。測定時の抗体の非特異的結合を防ぐため、反応終了後、2% BSA/50 mM ピカーボネート緩衝液 (pH 9.5) で各ウェルを1回洗浄後、同液を200 μ l/ウェルとなるよう加え、4°C で一夜反応させ、マスキングを行った。すぐに使用しないプレートは、-90°C で保存した。

(3) 測定手順

(2)で作製したプレートを、0.15%ツイン 20/TB で2回洗浄後、各ウェルに(1)で得られた競合抗原液を25 μ l、希釈抗体液を25 μ l 加え37°C で2時間反応させた。同液で3回洗浄後、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG (または抗 IgM) 抗体を2% BSA/TBS で1,000倍希釈した液を、50 μ l/ウェルずつ加え、37°C で1時間反応させた。4回洗浄後、基質液 (10 mg ABTS, 12.8 μ l 30% H₂O₂, 12.8 ml クエン酸緩衝液) を100 μ l/ウェルずつ加え、酵素-基質反応による発色をモデル450マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 社) を用い、吸光度 (405 nm) を測定した (Fig. 11)。競合抗原液として、①処理抗原液、②無処理抗原液、③処理用酵素液または試薬、の3種について測定し、得られた吸光度をそれぞれ A, B および C としたとき、処理による抗原性の低下の割合を $C-A/C-B$ の値で評価した。

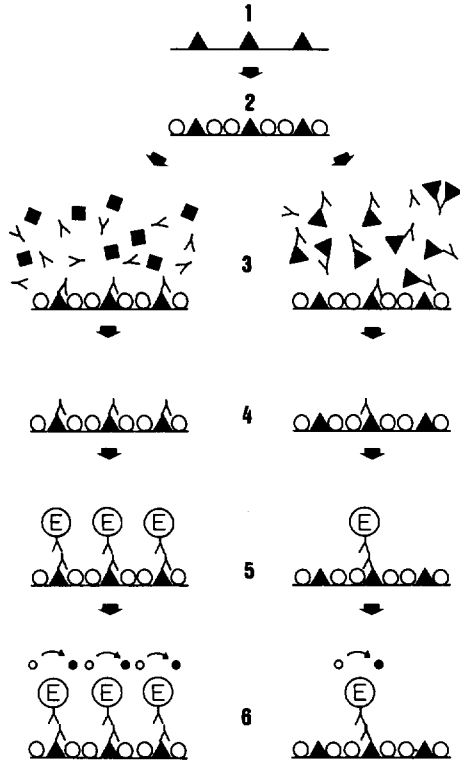


Fig. 11. Schematic diagram of competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Step 1, Antibody was bound to the bottom of polystyrene plate; Step 2, Masking procedure was performed by the use of bovine serum albumin solution; Step 3, Antibody and the sample were added to the well and incubated for 2 h at 37°C; Step 4, After the incubation, the well was washed with 0.15% Tween 20 in TBS; Step 5, Enzyme-linked secondary antibody was added to the well and incubated for 1 h at 37°C; Step 6, Substrate solution was added to the well and incubated for 5-15 min at room temperature. Then it was examined for absorbance by using microtiter plate spectrophotometer. ▲, antigen; ○, bovine serum albumin; ◁, antibody; ⓔ◁, enzyme-linked secondary antibody.

結果および考察

各種処理を施した粗抗原液のドット免疫アッセイの結果を Table 10 に示した。MR-18, MR-21 および AT-86 の 3 抗体の認識する抗原は、熱に対して極めて安定であり、100°C, 60分の処理で抗原性を全く失わなかった。また、過ヨウ素酸処理により抗原性の低下が確認された。MR-21

Table 10. Reactivity of monoclonal antibodies to the dots of cell lysates subjected to some treatments by means of dot-immunoassay

Treatments	Reactivity*		
	MR-18	MR-21	AT-86
Heat (100°C, 1 h)	+	+	+
Pronase (1 mg/ml, 30°C, 2 h)	-	-	-
α -Glucosidase (1 mg/ml, 25°C, 2 h)	+	+	+
β -Glucosidase (1 mg/ml, 37°C, 2 h)	+	+	+
α -Galactosidase (20 μ g/ml, 25°C, 2 h)	+	+	+
α -Mannosidase (500 μ g/ml, 25°C, 2 h)	+	+	+
Hyaluronidase (1 mg/ml, 37°C, 2 h)	+	+	+
Lysozyme (1 mg/ml, 37°C, 2 h)	+	+	+
Sodium periodate (40 mM, 4°C, 24 h)	±	-	±
Alkali (0.2N NaOH + 0.1N NaBH ₄ , 4°C, 24 h)	±	+	+

* +, the staining reaction was intensive; ±, very weak; -, not detected.

認識抗原については、過ヨウ素酸の濃度を変えた場合の抗原性の低下の様子を競合 ELISA 法により調べた (Fig. 12)。その結果、無処理抗原が高濃度の場合に強く競合し、シグモイド曲線を描いたのに対し、終濃度 20 mM で競合度の低下がみられ、40 mM 以上では抗原性が全く失われた。前節で述べたウェスタンブロッティングの結果およびこれらの結果から、3 抗体の認識抗原決定基が糖タンパク質の糖鎖上にある可能性が示唆された。そこで、各種糖分解性酵素を用いた抗原処理を行ったが、今回用いたいずれの酵素によっても著しい抗原性の低下は確認されなかった (Table 10)。

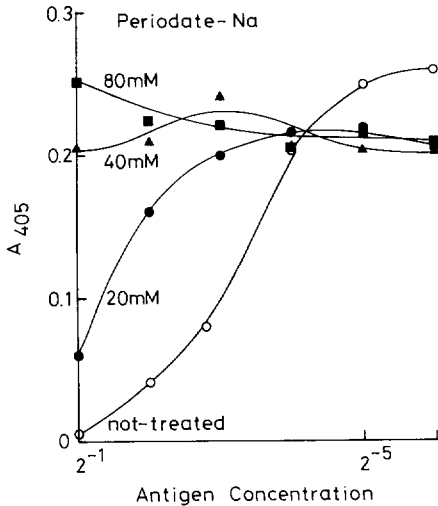


Fig. 12. Degradation of antigenicity of antigens recognized by MR-21 which was caused by periodate treatment. Antigen solution was incubated with 80 mM (■), 40 mM (▲), 20 mM (●), or 0 mM (○) sodium metaperiodate.

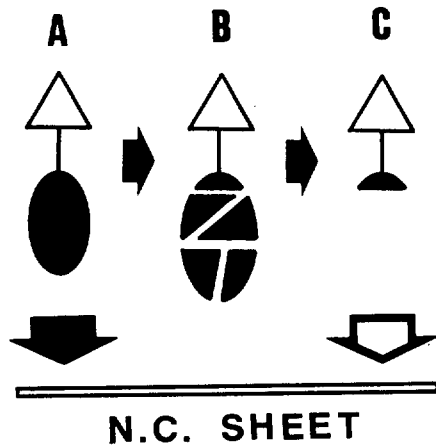


Fig. 13. Models for antigens treated with pronase. (A) Intact antigen has a hydrophobic polypeptide component, but (B) when treated with pronase, (C) it would lose hydrophobic site necessary to stay on nitrocellulose sheet. Δ , polysaccharide; \bullet , polypeptide.

また、プロナーゼ処理抗原の抗原性はドットイムノアッセイでは検出することができなかった。この結果から次の二つの可能性が考えられた。①プロナーゼ処理によりポリペプチド鎖中の抗原決定基が破壊されたため反応性が検出されなかった。②プロナーゼ処理によりポリペプチド鎖が切断され、抗原決定基を含む糖鎖がニトロセルロース膜に結合するための疎水性部分を失ったため反応性が検出されなかった (Fig. 13)。

したがって、プロナーゼ処理による抗原性の変化を調べるためには、処理抗原の固相への吸着を伴わないアッセイ法による確認が必要である。そこで液相中の抗原性をそのまま測定することのできるアッセイ法として競合 ELISA 法を用いた。

競合 ELISA 法に用いた抗原の DEAE セルロースによる部分精製の結果を Fig. 14 に示した。各抗原の溶出画分の食塩濃度は、MR-18 認識抗原では 0.30-0.50M, MR-21 認識抗原では 0.35-0.50M, および AT-86 認識抗原では 0.30-0.50M であった。これらの部分精製抗原をプロナーゼ処理し、その抗原性を競合 ELISA 法で調べた結果、いずれの場合にもプロナーゼ処理に

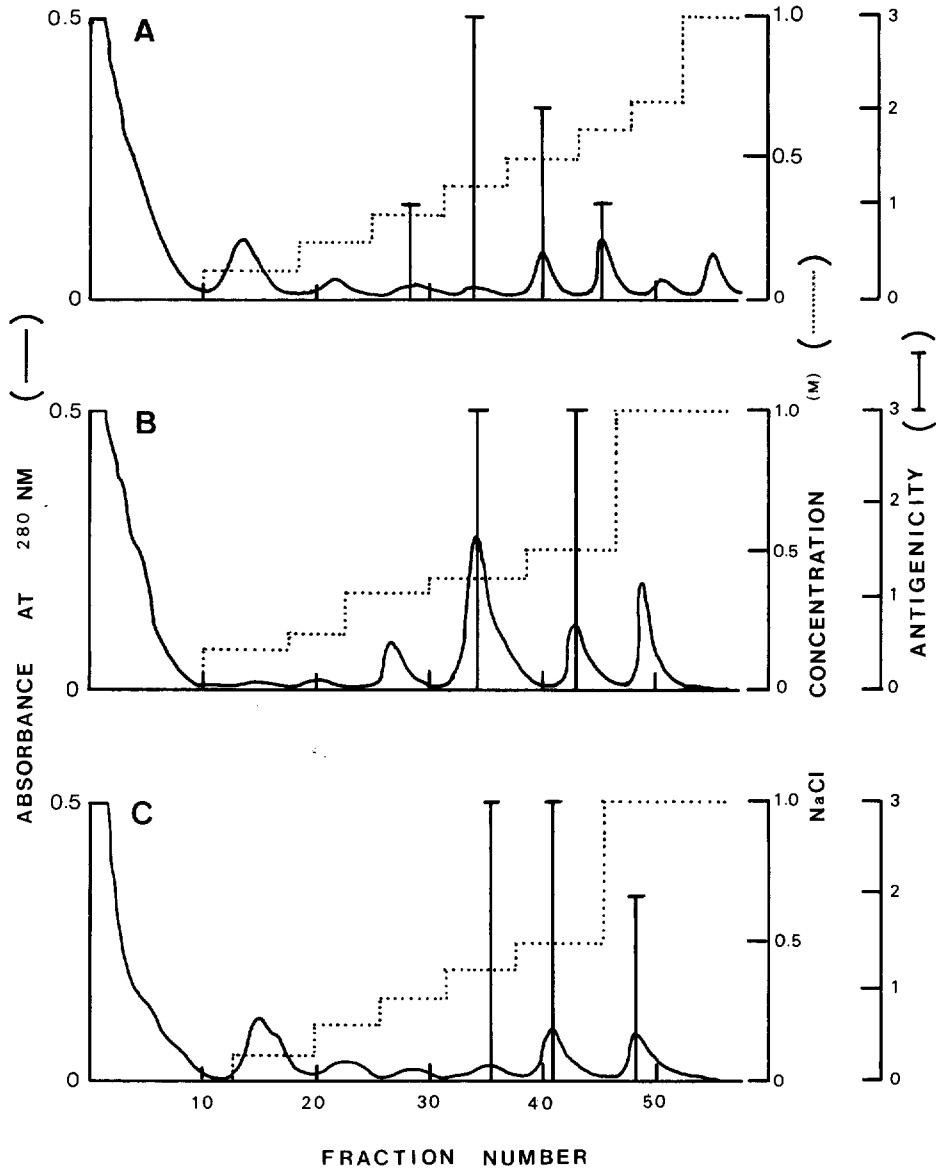


Fig. 14. Chromatography of cell lysates of (A) *C. marina* NIES-118, (B) *C. marina* NIES-121, and (C) *C. antiqua* NIES-86 on DEAE-cellulose column ($\phi 15 \text{ mm} \times 140 \text{ mm}$) by stepwise elution. Antigenicity of each fraction was examined by means of dot-immunoassay and intensity of the color on dots were also indicated.

よる著しい抗原性の低下は確認されなかった (Table 11)。したがって、可能性①は消去され、可能性②を裏付ける結果が得られた。

また、アルカリ処理により MR-18 認識抗原の抗原性は若干低下したが、MR-21 と AT-86 では抗原性に变化はみられなかった (Table 10)。アルカリ処理は、糖タンパク質の糖鎖とポリペプチド鎖との間の O-型結合を切る処理であり、この結果から、抗原部位が O-結合型糖鎖上に存在している可能性は低いことが示唆された。

Table 11. Antigenicity of pronase-treated cell lysates measured by means of competitive enzyme-linked immunosorbent assay

Antibody	Antigen (Strain No.)	A* ¹	B* ²	C* ³	Antigenicity* ⁴
MR-18	NIES-118	.006	.005	.066	0.98
MR-21	NIES-121	.016	.010	.092	0.93
AT-86	NIES-86	.012	.006	.056	0.88

*¹ The competition ratio of antigen samples subjected to pronase-treatment.

*² The competition ratio of intact antigen samples.

*³ The competition ratio of pronase solution.

*⁴ Antigenicity of pronase-treated antigen samples was estimated by the formula $(C-A)/(C-B)$.

第3節 免疫電子顕微鏡法による抗原分子の細胞内分布の解析

この実験に用いたモノクローナル抗体は、すべて間接蛍光抗体法によりスクリーニングを行い得られたものである。したがって、細胞表面に認識抗原が分布していることは明らかであるが、その細胞内における抗原の分布を知ることはできない。抗原分子の細胞内における分布を知ることにより、抗原の生合成経路を推定することが可能であると考えられる。本節では免疫電子顕微鏡法による細胞内抗原の金コロイド標識を行い、その局在を明らかにするとともに、抗原分子の生合成経路に関する考察を行った。

材料および方法

1. モノクローナル抗体

第I章で作製した7種のモノクローナル抗体のうち、MR-18, MR-21 および AT-86 の3抗体を用いた。非特異的な反応を最小限に抑えるために、各抗体の精製を行った。IgMであるMR-18を含む培養上清を限外濾過により濃縮した後、pH 8.0に調整したPBSよりNaClのみを除いた緩衝液(10 mM PB)で平衡化したDEAEセルロースカラムにかけた。PBで十分に洗浄した後、150 mM PBで溶出される画分を抗体画分として得た。次にセファデックス G-100によるゲル濾過を行い、得られた各画分の抗体価をELISA法により測定した。発色の十分高かった画分を精製抗体画分とし、20 mM TBに対して透析後、-20°Cで凍結保存した。

MR-21とAT-86はともに免疫グロブリン型がIgGであるが、これを含む培養上清を限外濾過により濃縮した後、アフィゲルプロテインA MAPS-TMIIキット(Bio-Rad社)により、アフィニティークロマトグラフィーを行った。その溶出パターンの一例をFig. 15に示した。精製抗体は20 mM TBに対して透析後、-20°Cで凍結保存した。

2. 電子顕微鏡用試料

MR-18, MR-21とAT-86の3抗体を用いた各実験において、抗原として*C. marina* NIES-118, *C. marina* NIES-121 および *C. antitqua* NIES-86をそれぞれ用いた。

各藻体の固定は、オスミウム酸固定の操作を除き、HARA and CHIHARA (1982)の方法にしたがっ

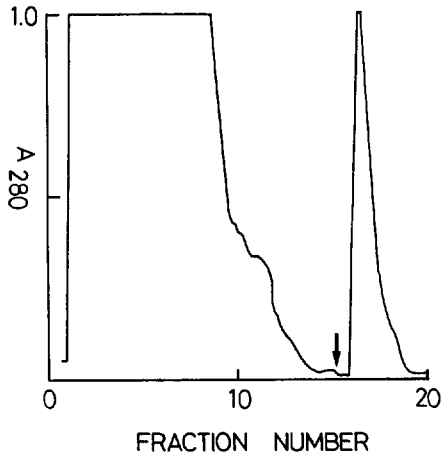


Fig. 15. Chromatography of monoclonal antibody MR-21 on Protein A-affinity column. At the point indicated by the arrow, elution buffer was used to elute the bound antibody.

た。いずれの試料についても、対数増殖期初期から中期の培養を 250 rpm で10分間遠心して集藻した後、固定を行った。*C. marina* NIES-118, *C. antiqua* NIES-86 は1%ホルムアルデヒドと1%グルタルアルデヒドによる2段階固定を行い、*C. marina* NIES-121 は2%グルタルアルデヒドによる1段階固定を行った。固定後、試料の一部はPBで洗浄し、間接蛍光抗体法に供し、抗原性の残存の確認を行った。また、ローイクリル K4M 樹脂の紫外線重合にはウルトラバイオレットポリメライザーモデル TUV-100 (堂阪イーエム社)を使用した。

重合後の試料をガラスナイフで薄切し、ホルムバル支持膜を張りカーボンコーティングを施した銅メッシュにすくい、免疫染色に供した。

3. 金コロイド標識

金コロイド標識は、ROBERTSON *et al.* (1984) の方法にしたがった。以下にその概略を述べる。3% H₂O₂ で10分間エッチングを行った後、3% BSA/PB 中で30分間マスキングを行った。1次抗体を室温で20分間反応させた後、PBで十分に洗浄し、再度マスキングを行った。抗原抗体反応の標識には、金コロイド (φ 20 nm) 標識ヤギ抗マウス IgM+A+G (E. Y. Laboratories 社) を1% BSA/PB で20倍に希釈したものを2次抗体として使用し、室温で20分間反応させた。反応終了後、PBで十分に洗浄し、2.5%グルタルアルデヒドで15分間固定を行い、蒸留水で洗浄した。

免疫染色終了後、ウラン鉛染色を施し、日立 H-700H 電子顕微鏡で観察した。

HARA and CHIHARA (1982) の方法にしたがい2%グルタルアルデヒドと2%オスミウム酸による2段階固定を *C. marina* NIES-121 に対して行った場合には、免疫染色の結果、金コロイドの特異的結合が全くみられなかった。この結果から、固定処理により抗原性の失活が生じたものと判断し、より温和な条件下での固定を検討した。オスミウム酸処理を省略し、2%グルタルアルデヒドのみによる固定の結果、*C. marina* NIES-121 については比較的鮮明なコントラストが得られ、なおかつ抗原性の保持された試料を作製することができた。これに対して、*C. marina* NIES-118 と *C. antiqua* NIES-86 については、固定および脱水過程における細胞の破損が著しく、また抗原性の保持も *C. marina* NIES-121 の場合に比較して悪かった。そこで、1%ホルムアル

デヒドで弱く固定した後、1%グルタルアルデヒドで本固定を行った。その結果、若干画像は改善されたものの、コントラストは *C. marina* NIES-121 の場合に比べ劣った。なお、3種の試料いずれの場合も、固定後の試料の抗原性の保持は間接蛍光抗体法により確認された。

電子顕微鏡像にみられた各細胞小器官の特定については MIGNOT (1976) の報告を参考にした。

結果および考察

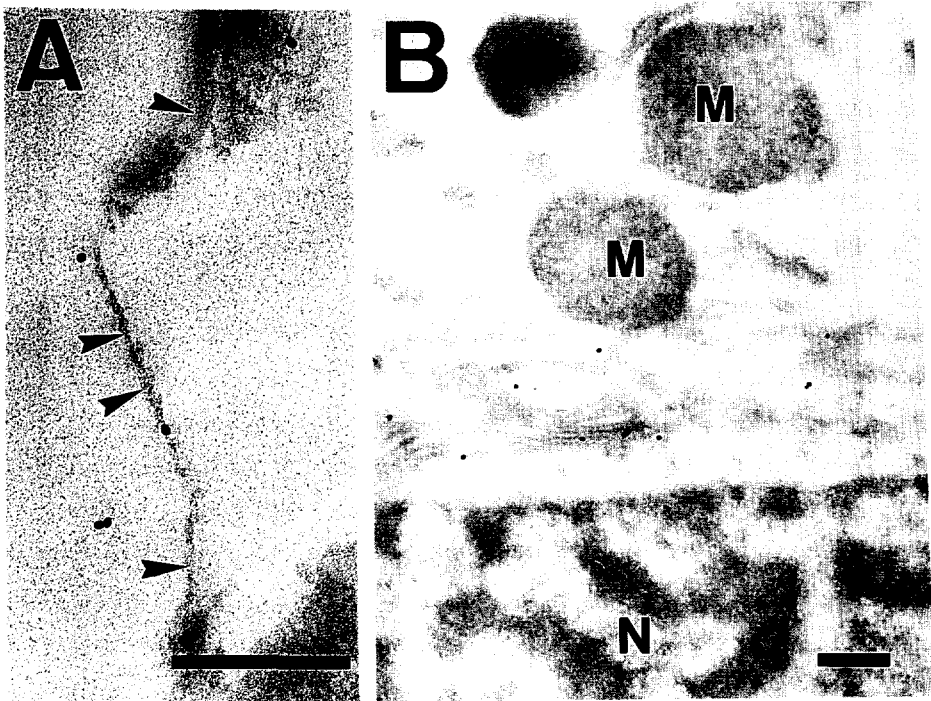
金コロイド標識後の電子顕微鏡写真を Fig. 16 に示した。

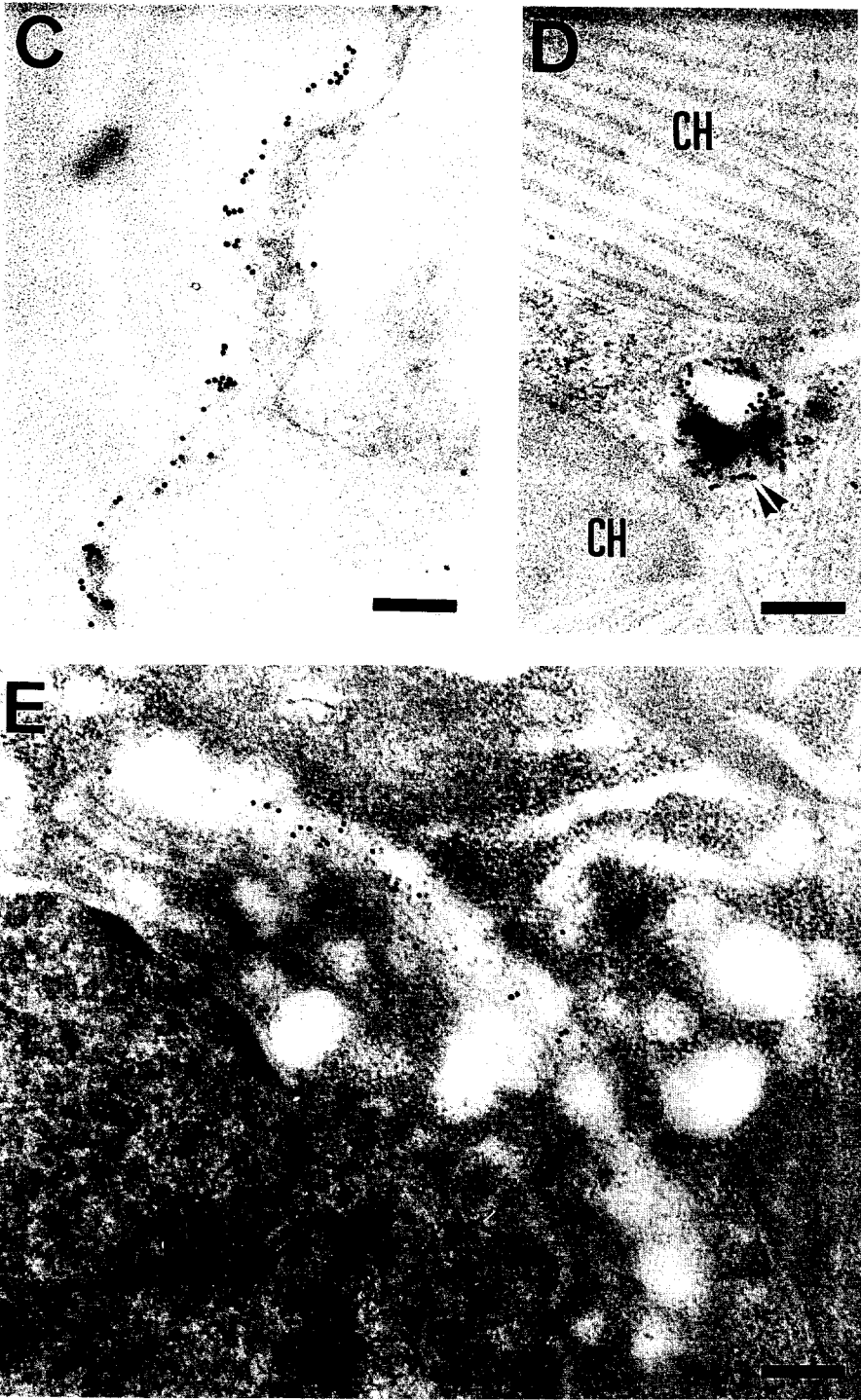
C. marina NIES-118 の超薄切片を MR-18 を用いて金コロイド標識した結果、結合粒子数は少なく抗原性の低下が示唆された。細胞表面および核周辺の膜構造に対して金コロイドによる標識がみられた (Fig. 16-A, B) が、また、ミトコンドリア、色素体等の細胞内小器官に対する特異的な標識はみられなかった。

C. marina NIES-121 の超薄切片の MR-21 による免疫染色の結果、細胞表面、核周辺の膜構造および細胞質内の小胞に対して金コロイドによる標識がみられた (Fig. 16-C, D, E) が、ミトコンドリア、色素体等の細胞内小器官に対する特異的な標識はみられなかった。

C. antiqua NIES-86 の超薄切片の AT-86 による免疫染色の結果、細胞表面、核周辺の膜構造および細胞質内の小胞に対して金コロイドによる標識がみられた (Fig. 16-F, G) が、ミトコンドリア、色素体等の細胞内小器官に対する特異的な標識はみられなかった。

いずれの場合にも細胞表面に対する抗体の反応性が間接蛍光抗体法により確認されたことから、細胞表面、特に細胞壁に金コロイドによる標識がみられたのはその結果を反映したものと





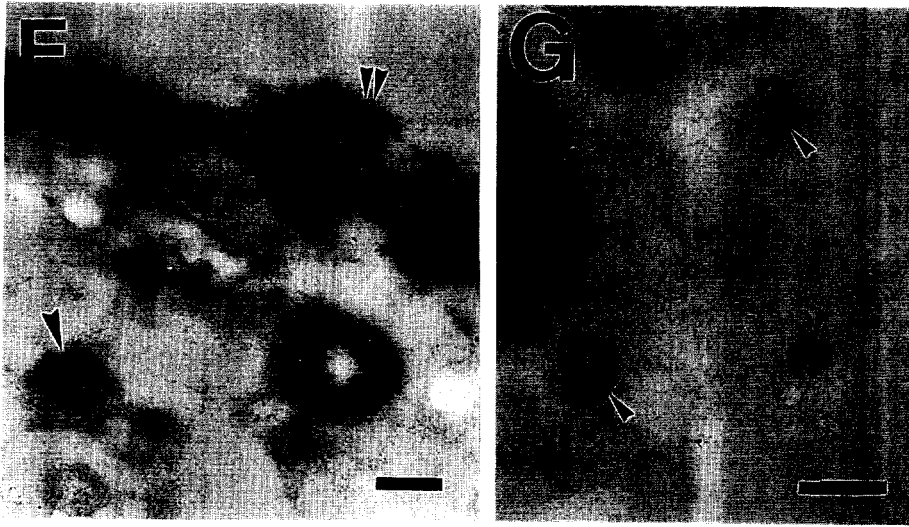


Fig. 16. Electron micrographs of ultrathin sections from Lowicryl K4M-embedded (A-B) *C. marina* NIES-118, (C-E) *C. marina* NIES-121, and (F-G) *C. antiqua* NIES-86. (A, C, F) Cell surface region, (B, E, G) secretory vesicles and (D, F) the complex membrane systems around the nuclear (N) were labelled by the immunogold technique. Chloroplasts (CH) were not stained. The scale bars indicate 0.5 μm .

考えられる。ただし、MR-21 の場合には極めて多くの金コロイド粒子の結合が観察されたが、他の2抗体については結合粒子数は少なかった。この結果は、試料作製過程における *C. marina* NIES-118 と *C. antiqua* NIES-86 の抗原性の低下、または抗原の試料からの離脱によるものと考えられる。

このうち MR-21 認識抗原の局在については、「ゴルジ体」→「輸送小胞」→「細胞表面」といういわゆる糖タンパク質の *N*-結合型糖鎖合成経路にきわめてよく一致した (Fig. 17)。一般に *N*-結合型糖鎖は、小胞体で母核を、ゴルジ体で側鎖を付加され様々な修飾を受ける。その後、

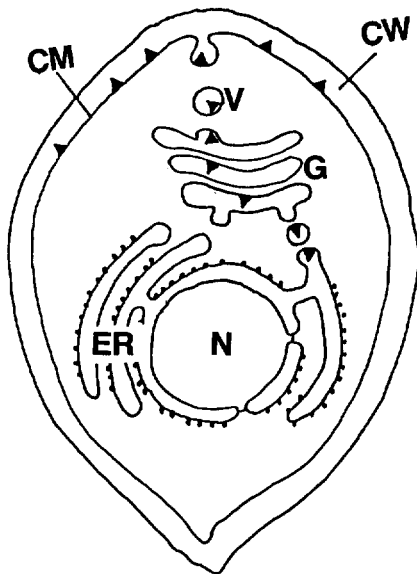


Fig. 17. Schematic diagram of biosynthesis pathway of *N*-linked polysaccharide chain.

輸送（分泌）小胞に濃縮され細胞内を輸送され細胞膜との膜融合を経て細胞表層に露出する（HUBBARD and IVATT 1981, TABAS and KORNFELD 1978, PALADE 1975）。細胞表層に特異的に多く存在するこの抗原は、細胞内で生合成され、細胞内輸送を経て細胞表層に供給されていると考えられる（SMITH *et al.* 1984a, GRIEF *et al.* 1987）。

第V章 モノクローナル抗体を用いた赤潮藻 *Gymnodinium* 属の識別の試み

前章までに赤潮原因藻の一種である *Chattonella* 属藻類の識別へのモノクローナル抗体の導入と、その利用による *Chattonella* 属藻類の群別および抗原解析の結果について論じてきた。本章では、モノクローナル抗体法その他属藻類への応用の可能性について検討する。

日本沿岸海域で発生する赤潮の中には「渦鞭毛藻」によるものがあり、その代表種の一つとして *Gymnodinium* 属があげられる。わが国では本属藻類として *G. nagasakiense*, *G. breve*, *G. catenatum* ほか数種が報告されているが、特に前者2種が赤潮原因藻として重要視されてきた。中でも *G. nagasakiense* は、長崎県大村湾で1965年にその大発生が確認されて以来（飯塚・入江 1966）、西日本を中心に熊野灘（本城 1987）、周防灘（MATSUOKA *et al.* 1989）等で大規模な赤潮を形成し甚大な漁業被害をもたらしてきた。とくに1984年には熊野灘を中心に三重県五カ所湾から和歌山県田辺湾にかけて本種による大規模な赤潮が発生し、その発生海域の推定がなされたが、十分な解析には至らなかった（水産庁他 1986）。東京湾においても *G. nagasakiense* の出現が報告されており、赤潮発生が北方へ拡大する可能性が指摘されている（保坂 1990）。こうした被害を回避するために、*Gymnodinium* 赤潮の発生機構を明らかにする上で必要な増殖生理および生態についての詳細な研究が現在までに多くなされてきた（IIZUKA 1972, HIRAYAMA and NUMAGUCHI 1972, 山口・本城 1989, HONJO *et al.* 1990）。

しかしながら、従来から *Gymnodinium* 属およびその類似属 (*Gyrodinium* 属, *Ptychodiscus* 属) の分類は困難で、命名の統一が十分に図られていないのが現状であった。これは本属藻類が、培養条件、増殖段階の違いにより形態変化を示すにもかかわらず（KIMBALL and WOOD 1965, 結城・小野 1980, TAKAYAMA and ADACHI 1984）、光学顕微鏡または電子顕微鏡観察によるその形態学的特徴（横溝の位置と段差、縦溝の長さ、細胞の長短、シストの形状等）の比較に基づいて分類同定が行われてきたことによると考えられる（高山 1981, 福代・高橋 1987, ANDERSON *et al.* 1988, GARDINER *et al.* 1989）。*Gymnodinium* 属内における種間分類についても、*G. catenatum* のように有性生殖を行うことが知られ、交配実験により種の識別を検討することが可能な種も一部報告されているが（BLACKBURN *et al.* 1989）、*G. nagasakiense* ではまだシストが発見されておらず、栄養細胞のまま越冬すると考えられている（山口・本城 1989, 寺田他 1987, 中田・飯塚 1987）。そのため、本種ではもっぱら上述の形態分類が行われてきた。

命名の混乱の一例として、ノルウェーの北海で赤潮を形成する *Gyrodinium cf. aureolum* HUL-

BURT は、その形態が日本産 *G. nagasakiense* に酷似していることから、その名称が *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* TAKAYAMA et ADACHI と変更された。しかるに、*G. cf. nagasakiense* には日本産種に酷似した形態を持つ「大型細胞」と、日本産種ではみられない「小型細胞」が存在すること、および北海産種ではその DNA 量が日本産種の約1.4倍にも及ぶことが報告された (PARTENSKY and VAULOT 1988, 1989)。これは、形態学的特徴にのみ基づく種分類の難しさを示すものであり、また、形態以外の形質に注目することにより株間の差を明らかにした例でもある。

また、1965年の長崎県大村湾で大発生した *Gymnodinium* Type-'65 は *G. mikimotoi* (尾田 1935) との類似性が指摘されながらも、丸みを帯びた五角形であり、燐光を放つことから、独立した一種 *G. nagasakiense* として記載された (TAKAYAMA and ADACHI 1984)。しかしながら近年、*G. mikimotoi* と *G. nagasakiense* との類似性を指摘した報告がなされ (MATSUOKA et al. 1989, 寺田他 1987)、2種が同じ種であるとの解釈が多くの研究者の間で定着しつつある (高山 1990)。

このように分類の混乱した *Gymnodinium* 属に対し、客観的識別法の確立の試みとしてモノクローナル抗体の反応特異性を利用した形質の比較を行った。前章までに、*Chattonella* 属藻類の細胞表面に反応するモノクローナル抗体を作成し、その「オーダーメイド・プローブ」に対する反応性の差に基づく群別を行い成果を得たことをすでに述べてきた。本章では *Gymnodinium* 属藻類に対するモノクローナル抗体を作製し、それを発生地域の異なる同種および近縁種に適用した結果を述べた。

材料および方法

1. 藻 類

本章で用いた藻類のうち、*G. nagasakiense* I-1~I-3 株は今井一郎氏 (南西海区水産研究所) より、*G. nagasakiense* G-303-ax2 株は山口峰生氏 (同) より、*G. nagasakiense* HB 株は板倉茂氏 (同) より、*G. nagasakiense* GB 株および *Gyrodinium* sp. AB 株は岩崎英雄氏 (三重大学生物資源学部) より、*Gymnodinium* Type-'65 OB 株および *G. breve* NB 株は平山和次氏 (長崎大学水産学部) より、*Gymnodinium* Type-'65 GB 株は西村昭史氏 (三重県水産技術センター) より、*G. catenatum* SN 株は池田武彦氏 (山口県内海水産試験場) より、*Gymnodinium* cf. *nagasakiense* (*Gyrodinium* cf. *aureolum* HULBERT) は Mrs. Venda (Instituto Nacional de Sande, Portugal) より、また、*G. nagasakiense* NIES-249, *Chattonella marina* NIES-121 および *C. antiqua* NIES-86 は国立環境研究所よりそれぞれ御厚意により分譲していただいたものである。また、*Alexandrium catenella* TNX-22 株と *Cryptocodinium cohnii* ATCC e30021 株は京都大学農学部水産学科水産微生物学教室の保存株を使用した。

G. catenatum SN 株と *C. cohnii* ATCC e30021 株を除くすべての株の培養には、ESM 培地 (Table 2; OKAICHI et al. 1982) を用い、14 h Light: 10 h Dark, 4,000 lux, 20°C の条件下で静置培養を行った。*G. catenatum* SN 株は、細菌の混在が認められたため、マイクロピペティング法により無菌化したものを実験に用いた。*A. catenella* TNX-22 株の培養には SWII_m 培地 (Table 12; IWASAKI 1961) を用いた。また、*C. cohnii* ATCC e30021 株の培養には A₂E₆ 培地 (Table 13)

Table 12. Composition of SW IIm medium

Ingredient	Concentration (in 1000 ml)
KNO ₃	72 mg
KH ₂ PO ₄	4.5 mg
Sodium glycerophosphate	10.5 mg
Fe-EDTA	0.5 mg
Vitamin B ₁₂	0.6 μg
Biotin	1 μg
Thiamine-HCl	0.1 mg
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	1 g
Soil extract	30 ml
Sea water	970 ml

(adjusted to pH 7.8–7.9)

Table 13. Composition of A₂E₆ medium (American Type Culture Collection)

Ingredient	Concentration (in 1000 ml)	Ingredient	Concentration (in 1000 ml)
NaCl	23.48 g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.5 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.63 g	ZnCl ₂	0.1 mg
Na ₂ SO ₄	3.92 g	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.15 mg
CaCl ₂ (anhydrous)	1.11 g	Na-glycerophosphate	0.15 g
KCl	0.66 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05 g
NaHCO ₃	0.19 g	Tris buffer	3.0 ml
KBr	0.10 g	K ₂ HPO ₄	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.03 g	Glutamic acid	1.5 g
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.04 g	Glucose	3.0 g
Na ₂ EDTA	0.03 g	Biotin	3 μg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	11.5 mg	Thiamine-HCl	1 mg
H ₃ BO ₃	0.03 g	Distilled water	1000 ml

を用いた。

2. 免疫と細胞融合

第Ⅱ章第1節で述べた方法にしたがい、*G. nagasakiense* G-303-ax2 株の培養 (10⁴ 細胞/ml) を7日おきに4回、6週齢のBALB/c系マウス(雌)の腹腔内に1mlずつ注入することによりマウスを免疫した。被免疫マウスの血清中の抗体価が十分に上昇したことを間接蛍光抗体法により確認した後、摘出した脾臓細胞とマウスミエローマとの細胞融合を行った。HAT培地により非融合細胞を淘汰した後、ハイブリドーマの増殖が十分にみられたウェルの培養上清のスクリーニングを間接蛍光抗体法(第Ⅱ章第1節, Fig. 5参照)により行った。得られた陽性細胞はクロニング(岩崎他 1983)を行った後、大量培養して抗体を集めた。ハイブリドーマの一部はジメチルスルホオキシド存在下、-90°Cで凍結保存した。

3. 得られたモノクローナル抗体の反応性の検討

得られたモノクローナル抗体の各種藻体に対する反応性を、間接蛍光抗体法を用いて調べた。

Chattonella 属に対して同法を用いた場合と比較して同一クローン内での反応性のばらつきがほとんど認められなかったので、評価は蛍光の明るさを肉眼で判定して行った。

4. 得られた抗体の認識抗原の性状解析

(1) 粗抗原液の調製と処理

G. nagasakiense G-303-ax2 株の定常期の培養 50 ml を遠心 (1,200 rpm, 10分, 5°C) して集藻した後、ペレットに 2 ml TB を加え超音波破碎を行い細胞粗破碎液を得た。これを 10,000 rpm, 10分間遠心し、上清を粗抗原液とした。測定に際しては適宜 TB で希釈して実験に供した。

この抗原液に対して各種の処理を加え、その抗原性の変化を後述のドットイムノアッセイによって調べた。以下に、各種処理の方法を述べる。

① 熱処理：抗原液を 100°C で60分間処理した。

② プロナーゼ処理：抗原液にプロナーゼを 0.5 mg/ml となるよう加え、30°C で2時間定温放置した。その後、100°C で5分間加熱し反応を停止した。

③ 過ヨウ素酸処理：抗原液と 80 mM 過ヨウ素酸ナトリウム水溶液を等量混合し、4°C で24時間定温放置した。その後、20 mM TB に対して透析し、過ヨウ素酸を除いた。

この他に、藻体ペレットから70%エタノールを用いて抽出した画分をさらにエーテル可溶性画分と水溶性画分に分離し (UCHIDA *et al.* 1988)、その各々の画分についてもドットイムノアッセイにより抗原性を調べた。

(2) ドットイムノアッセイ

ドットイムノアッセイの手順については、原則として前述の方法にしたがった (第II章第2節参照)。ただし、0.15% Tween 20/TB を洗浄液として使用した場合には、無処理抗原に GN-89 を反応させた試料区の発色が低下し、また、ミエローマ上清を反応させた対照区において非特異的な発色がみられたため TB のみによる洗浄を1段階につき8回行った。

5. 免疫電子顕微鏡法による観察

(1) モノクローナル抗体

唯一得られたモノクローナル抗体 GN-89 のクラスが IgG であることが、第II章第1節に記載したキットを用いた ELISA 法で明らかになったので、アフィゲルプロテイン A MAPS-TMII キット (Bio-Rad 社) を用いて培養上清から抗体を精製し、実験に用いた。

(2) 電子顕微鏡用試料

G. nagasakiense G-303-ax2 の対数増殖期後期の培養を 1,200 rpm で10分間遠心し集藻した後、上清を除き、2%グルタルアルデヒド (または2%ホルムアルデヒド)、22%ショ糖/0.2M PB (pH 7.2) を加え、30分間常温で放置した。遠心により固定液を除いた後、ショ糖濃度のみを 11%、5.5%および0%となるよう調製した固定液によりそれぞれ20分間ずつ固定を行った。固定終了後、0.2M PB (pH 7.2) で十分に洗浄し固定剤を除去し、1%低温融解性アガロース (ニッポンジーン社) 中に包埋した。一部の細胞については抗原性の残存の有無を調べるため、そのまま間接蛍光抗体法に供した。

脱水は、50-100%エタノールシリーズを用いる方法と、デュルクパン (Ladd 社) を用いる方

法の2通りで行った。

エタノールシリーズを用いた区では脱水の各段階で15分間の処理を行い、100%の段階のみ新しい容器中で3回の処理を行った。脱水後、水溶性樹脂ローイクリル K4M レジンとエタノールの混合液 (1:2 → 1:1 → 2:1) で置換し、ローイクリル K4M レジン中で一夜浸透した。また、デュルクパンを用いた区では、レジンモノマー70%、90%および100% (v/v) で各1時間脱水を行った後、ローイクリル K4M レジン中で一夜浸透し、ローイクリル K4M レジンへの置換を行った。いずれの場合も浸透後、ゼラチンカプセル中で、ウルトラバイオレットポリメライザーモデル TUV-100 (堂阪イーエム社) により3日間紫外線重合を行った。

重合後の試料をガラスナイフで薄切し、ホルムバル支持膜を張りカーボンコーティングを施した銅メッシュにすくい、免疫染色に供した。

(3) 金コロイド標識

金コロイド標識法は、第IV章第3節で述べた方法にしたがって行った。

結果および考察

1. 得られたモノクローナル抗体の反応性

G. nagasakiense G-303-ax2 株により免疫したマウスの脾臓細胞とミエローマの融合により同株の細胞表面に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ1種が得られた。このモノクローナル抗体を GN-89 と命名した。間接蛍光抗体法の結果、GN-89 は同株の細胞表面全体を認識するのみならず (Plate III), 鞭毛に対しても強い反応性を持つことが明らかになった (Plate

Table 14. Reactivity of monoclonal antibody GN-89 against various strains of red tide algae

Strains (Habitat, Year)	Reactivity
<i>Gymnodinium nagasakiense</i> SN-1 (Suo-Nada, 1985)	++*
<i>Gymnodinium nagasakiense</i> SN-2 (Suo-Nada, 1985)	++
<i>Gymnodinium nagasakiense</i> SN-3 (Suo-Nada, 1985)	++
<i>Gymnodinium nagasakiense</i> G-303-ax2 (Suo-Nada, 1985)	++
<i>Gymnodinium nagasakiense</i> HB (Hiroshima Bay, 1988)	+
<i>Gymnodinium nagasakiense</i> GB (Gokasho Bay, 1984)	++
<i>Gymnodinium nagasakiense</i> NIES-249 (Harima-Nada, 1980)	++
<i>Gymnodinium</i> Type-'65 GB (Gokasho Bay, 1978)	++
<i>Gymnodinium</i> Type-'65 OB (Omura Bay, 1970)	++
<i>Gymnodinium</i> cf. <i>nagasakiense</i> (Lisbon, 1990)	-
(= <i>Gyrodinium</i> cf. <i>aureolum</i> HULBERT)	
<i>Gymnodinium breve</i> NB (Nagoya Bay, 1977)	-
<i>Gymnodinium catenatum</i> SB (Senzaki Bay, 1989)	-
<i>Gyrodinium</i> sp. AB (Ago Bay, 1978)	++
<i>Cryptocodinium cohnii</i> ATCC 30021	-
<i>Alexandrium catenella</i> TNX-22 (Tanabe Bay, 1987)	-
<i>Chattonella marina</i> NIES-121 (Kagoshima Bay, 1982)	-
<i>Chattonella antiqua</i> NIES-86 (Uranouchi Bay, 1980)	-

* ++, Fluorescence of corona around the cell was intensive; +, weak; -, not detected.

IV)。 *Gymnodinium* 属を用いた間接蛍光抗体法では、 *Chattonella* 属藻類を用いた場合に比べて、破損した細胞がほとんどみられなかった。また、遠心分離を行った場合、 *Chattonella* 属藻類は餅状のペレットになり間接蛍光抗体法が行えなかったが、 *Gymnodinium* 属は細胞同士が接着しにくいため再懸濁しやすく、間接蛍光抗体法に十分供することが可能であった (Plate V)。

各種藻体に対する GN-89 の反応性を間接蛍光抗体法により調べた結果 (Table 14)、 *G. nagasakiense* 6 株、 *Gymnodinium* Type-'65 2 株および *Gyrodinium* sp. に対してはいずれも陽性反応が確認された。このうち *G. nagasakiense* HB 株を除く 7 株についてはその蛍光がきわめて鮮明であったが、 *G. nagasakiense* HB 株の蛍光は微弱であった。一方、 *G. cf. nagasakiense*、 *G. breve* NB 株および *G. catenatum* SN 株に対しては反応性は全く確認されなかった。また、他属の海産微細藻類のうち *C. marina*、 *C. antiqua*、 *A. catenella* および *C. cohnii* に対しても全く反応しなかった。これらの結果から、モノクローナル抗体 GN-89 が、日本産 *G. nagasakiense* の細胞表面に特異的に存在する抗原に対して反応する抗体である可能性が示唆された。なかでも注目されるのは、その形態学的観察から同種であると判定された日本産 *G. nagasakiense* と欧州北海産 *G. cf. nagasakiense* を GN-89 が識別し得たことである。この結果は、PARTENSKY *et al.* (1988, 1989) が DNA 含有量、細胞のサイズ等を比較することにより両者が異種である可能性を指摘した報告を支持するものである。彼らは欧州北海産株のうち「大型細胞」のみが形態学的に日本産株に類似していると述べているが、本実験では観察された *G. cf. nagasakiense* のすべての細胞に蛍光環は見られなかった。

今後検体数を増やし、形態分類と抗体法との結果の相関をさらに裏付ける必要があるが、仮に GN-89 が *G. nagasakiense* に対して特異的な抗体であることが客観的に認められれば、現場試料をセルアフィニティクロマトグラフィー、または蛍光標識後、セルソーターにかけることにより、本種細胞のみを計数、濃縮することが可能であろう。

GN-89 が、形態学的に免疫株と同属異種に同定された 2 株 (名護屋湾産 *G. breve* および仙崎湾産 *G. catenatum*) に対して反応しなかったにもかかわらず、形態学的に他属に分類された英虞湾産の *Gyrodinium* sp. 株に対して反応したことから、GN-89 の認識抗原の有無という点にのみ着目すれば、形態分類によりなされた群別とは異なる群別を行うことが可能である。もちろん、単に GN-89 との反応性のみでは、群別を行うための根拠としては不十分であるが、こうした知見を従来の形態分類に加味して検討することにより、より信頼性の高い分類を行うことができると考えられる。現在、 *Gymnodinium* 属と *Gyrodinium* 属との識別の根拠としては、細胞表層の「横溝」の段差の細胞長に対する割合の差が用いられており、段差が 1/5 以下のものを *Gymnodinium* 属、1/5 以上のものを *Gyrodinium* 属と定めている (福代・高橋 1987)。しかし、細胞の形態の多様性により実際に両者の境界をまたぐ細胞集団も知られており、一定の線を引き同定の基準を定めたとしてもなお微妙な場合がある (福代他 1990)。同定識別のためのより客観的な形質の比較を行うための一手法として抗体法は、その簡易さからも、一つの試みとして意味のあるものであると思われる。

2. GN-89 の認識抗原の性状

G. nagasakiense G-303-ax2 株の細胞粗破砕液についてドット免疫アッセイを行った場合、通常の界面活性剤 (0.15% ツイン 20) を含む TB を洗浄液として使用した場合には、無処理抗原に GN-89 を反応させた試料の発色が低下し、ミエローマ上清を反応させた対照においても非特異的な発色がみられた。こうした結果が得られたのは、GN-89 の認識抗原がツイン 20 の存在下でニトロセルロース膜への吸着を保持し得なかったためであると思われる。すなわち、0.15% ツイン 20/TB による洗浄により抗原分子が離脱しニトロセルロース膜が露出した部分に、酵素活性をもった 2 次抗体が抗原抗体反応を介さず非特異的に吸着した可能性が高い。同様に試料区にみられた発色も、1 次反応により膜上に形成された抗原抗体複合体が 0.15% ツイン 20/TB による洗浄によりニトロセルロース膜から離脱したあとに生じた非特異的な発色であろうと考えられる。界面活性剤を除き TB のみによる洗浄を行った場合には、界面活性剤を用いた場合よりも洗浄効率が低いため、通常よりも多くの回数洗浄液の交換が必要であった。しかし、1 段階につき 8 回の洗浄液交換を行えば、対照における発色はほとんどみられず、試料にのみ鮮明な発色が認められた。よって以降の実験には洗浄液に TB を使用した。

抗原液に対して種々の処理を施し、その抗原性をドット免疫アッセイにより調べた結果を Table 15 に示した。100°C、60 分という極めて過激な熱処理を施した場合には無処理抗原とほぼ同程度の発色がみられたことから、抗原決定基の構造は熱に対して極めて安定であると考えられた。また、プロナーゼ処理を施した場合には、その抗原性をドット免疫アッセイにより検出することができなかった。この結果は、抗原分子中にポリペプチド鎖が存在していることを示している。しかし、熱に対して抗原決定基が極めて安定であるという前出の結果から、抗原決定基がポリペプチド鎖中に存在しているとは考えにくい。むしろ第 IV 章で述べた *Chattonella* 属に対する抗体の場合と同様に、ニトロセルロース膜へのバインダーとして作用していたポリペプチド鎖がプロナーゼ処理により失われたため、ドット免疫アッセイでその抗原性を検出できなかった可能性が高い。おそらくポリペプチド鎖に共有結合したなんらかの構造が抗原決定基であると考えられる。糖鎖である可能性を考慮し、過ヨウ素酸酸化による抗原性の変化を調べたが、予想されたような著しい抗原性の低下は認められなかった。

水溶性およびエーテル可溶性の各画分についてドット免疫アッセイを行った結果、エーテル

Table 15. Reactivity of monoclonal antibody GN-89 to the dots of cell lysates subjected to some treatments by means of dot-immunoassay

Treatments	Reactivity
Not treated	++
Heat (100°C×60 min.)	++
Pronase (1 mg/ml, 30°C×60 min.)	—
Sodium periodate (40 mM, 4°C×24 h)	+
Water-soluble fraction	—
Ether-soluble fraction	+

可溶性画分にのみ抗原性が検出された。この結果により、GN-89 認識抗原が高い疎水性を持つことが示唆された。

次に、免疫電子顕微鏡の結果について述べる。2%グルタルアルデヒド、または2%ホルムアルデヒドによって固定した後、間接蛍光抗体法により抗原性のチェックを行った結果を Plate VI に示した。写真から明らかなように、いずれの場合にも抗原性は十分に残存しており、アルデヒド系固定剤処理によっても抗原決定基の構造は高度に保持されたことを示している。ただし、エタノール脱水後の試料では全く間接蛍光抗体法による抗原性の検出はできなかった。この結果は、ドットイムノアッセイにより示された抗原分子の高い疎水性から考えて、抗原分子がエタノール中に溶出し、試料中に保持され得なかったことによると考えられる。そこで今回は、水溶性樹脂デュルクパンによる脱水を行い、電子顕微鏡用試料を作製した。

GN-89 および金コロイドで抗原を標識した薄切試料の電子顕微鏡写真を Fig. 18 に示した。全体的に金コロイド粒子による標識が疎であり、脱水以降の操作段階における抗原性の低下または抗原の離脱が示唆された。しかし、細胞表面において若干の標識がみられた (Fig. 18-A) のみならず、細胞内にも特異的に標識された顆粒が観察された (Fig. 18-B)。この結果は GN-89 認識抗原の細胞内における生合成系または輸送系の存在を示唆していると思われる。

以上の知見を要約すると、GN-89 認識抗原分子は *G. nagasakiense* の細胞表面に存在する糖または脂質を含む複合タンパク質であると考えられる。ただし抗原性が熱に対しても極めて安定に

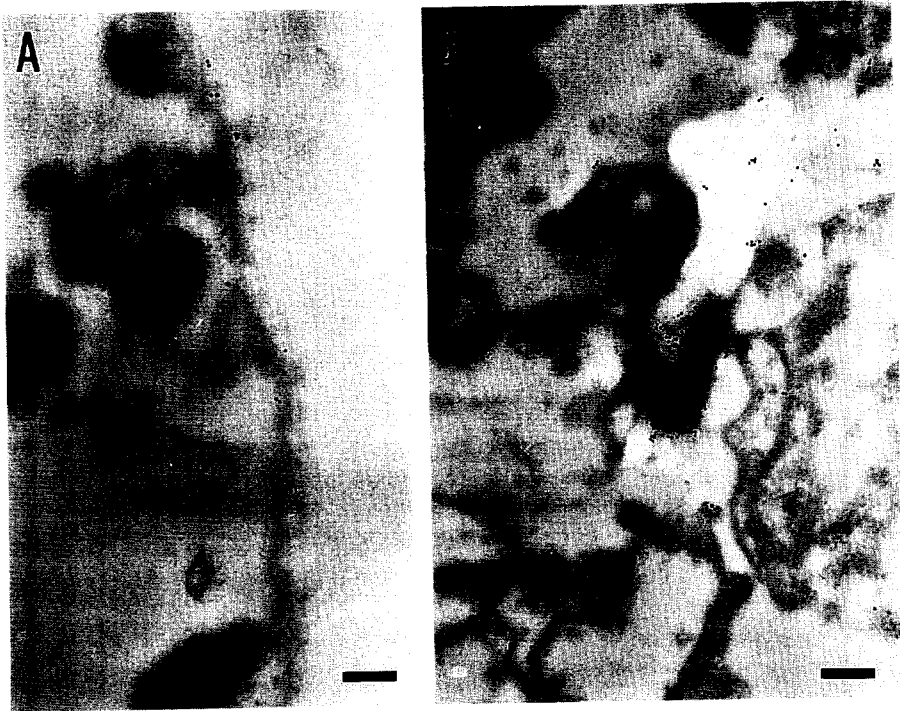


Fig. 18. Electron micrographs of ultrathin sections from Lowicryl K4M-embedded *Gymnodinium nagasakiense* G-303-ax2. Cell surface region (A) and vacuole-like compositions (B) were labelled by the immunogold technique. Chloroplasts (CH) were not stained. The scale bars indicate 0.5 μm .

保持されたことから、抗原決定基がポリペプチド鎖上に存在する可能性は低い。おそらく、ポリペプチド鎖部分が、細胞表面に抗原分子を安定に保持するための「根」として細胞膜中を貫通しているであろう。そして、抗原分子の高い疎水性はおそらくこのポリペプチド鎖部分の性質を強く反映したものであらうと思われる。

第Ⅵ章 総 括

Chattonella 属藻類は、わが国の沿岸海域において発生する赤潮の原因生物の代表種として知られている。本属藻類による赤潮は、その発生頻度およびもたらされる被害の甚大さから、1970年代以降、多くの研究者により重要視され、生物学および生態学的側面からの研究が精力的になされてきた。しかるに、研究者個々の学問的背景が多岐にわたるため、本属藻類の分類学について各研究者が共通の定規を持つことが望ましいにも関わらず、本属の形態分類は混乱を極めており、分類に曖昧さを残しているのが現状であった。そのため、より信頼性および客観性に富んだ簡便な識別法の確立が望まれてきた。

著者は、以上のような背景から、KÖHLER and MILSTEIN (1975) により確立されたモノクローナル抗体法の本属藻類の識別への応用を行い、混乱した本属藻類の群別を形態学的情報のみならず免疫生化学的情報を加味することにより総合的に検討すること、および同法の他属藻類への応用の可能性を検討することを目的として本研究に着手した。約5年間にわたる研究の結果、得られた成果の概要を以下に示す。

1. *Chattonella* 属藻類の細胞表面に特異的に反応する7種のモノクローナル抗体 (MR-17a, MR-17b, MR-17c, MR-18, MR-21, AT-83 および AT-86) が調製された。
2. 国立環境研究所より分譲された18株の *Chattonella* 属藻類に対して調製された7種のモノクローナル抗体の反応性を間接蛍光抗体法およびドットイムノアッセイ法を用いて調べた。その結果、各株の反応スペクトラムを比較することにより、18株を6グループ (I-VI型) に分けることができた。形態学的に *C. marina* に同定された株はすべてI型およびII型に分類された。また、形態学的に *C. antiqua* に同定された株はすべてIII型およびIV型に分類された。とくに、*C. marina* の種内分類の結果は、I型が瀬戸内海産、II型が鹿児島湾産であったことから、本法による群別の結果が地理的分布圏の差を反映したものと考えられた。
3. 赤潮現場海水中の *Chattonella* 細胞について間接蛍光抗体法による識別を試みた結果、本法を改良することにより現場の藻類相を知る上で有用な測定が可能であると考えられた。
4. 得られたモノクローナル抗体のうち MR-18, MR-21 と AT-86 の認識する抗原は糖タンパク質であり、いずれもその糖鎖部分を認識している可能性が強く示唆された。したがって、本法によって得られる差は藻体の細胞表層に存在する糖構造の差に基づくものと考えられた。
5. 同様の手法の *Gymnodinium* 属藻類に対する応用を試みた結果、日本産 *G. nagasakiense* の細胞表面に特異的に反応するモノクローナル抗体 GN-89 が得られた。GN-89 は、*G. breve*,

G. catenatum および欧州北海産 *G. cf. nagasakiense* に対しては反応しなかった。

6. GN-89 は, *G. nagasakiense* に特異的に存在する疎水性の強い複合タンパク質を認識していると考えられた。

以上の得られた結果から, 形態分類が困難であるとされてきた赤潮原因藻である *Chattonella* 属藻類および *Gymnodinium* 属藻類の識別にモノクローナル抗体法が応用できることが示され, 同法の赤潮藻類研究への応用の普遍性が示唆された。特に *Chattonella* 属藻類については予想以上に形態分類と一致した結果が得られた。すなわち *C. marina* および *C. antiqua* の2種の, 進化上きわめて近い位置にあると考えられる生物間において, 細胞表面に存在する糖構造が他の形態の変化をもたらすような形質の変異に伴い変異を生じてきたのではないかと考えられた。また, 形態分類では異種に分類されたにも関わらず, モノクローナル抗体法により共通抗原の存在が明らかにされたことから, 進化上近い位置にあることを伺い知ることができた。同様に *Gymnodinium* 属藻類についても, 日本産 *G. nagasakiense* に特異的に反応する抗体が得られたことから, 本法による群別の結果と形態分類の結果とが一致するに至った。無論, 他属に対してモノクローナル抗体法を応用する場合, 本文中でも述べたように, 本法により得られた結果のみに基づく分類・同定を行うことは危険であり, 他の様々な形質の比較と合わせ検討してその信頼性を計るべきであるが, 本研究で示されたように時間をかけ詳細に調べられた知見に基づく形態分類の結果との高い相関性が明らかになれば, 操作が簡易であるがゆえに本法の有用性は評価されるであろう。



Fig. 19. Distribution map of the 6 Types of genus *Chattonella*. ○, Type I; ●, Type II; △, Type III; ▲, Type IV; ■, Type V; □, Type VI.

第Ⅱ章および第Ⅲ章で、各地より得られた *Chattonella* 株について本法による群別を行ったが、その結果を Fig. 19 に分布図の形でまとめた。*C. marina* および *C. antiqua* はいずれも瀬戸内海を中心に西日本に広く分布していた。特筆すべきは、*C. marina* のうち瀬戸内海産のものはすべてⅠ型であり、鹿児島湾産の2株はいずれもⅡ型であった点である。これは、モノクローナル抗体法により得られた結果が地理的分布圏の差を明らかに反映しており、形態分類では判定し得なかった識別が本法により可能であることを示した例である。この他にも、舞鶴湾、五カ所湾等で本属藻類の発生が報告されており(田中他 1977, HONJO 1987)、今後、本法による解析を行うことで *Chattonella* 属藻類のわが国における分布についてより詳細な知見が得られるものと期待される。

本実験により作製されたモノクローナル抗体は、将来にわたり無限に得ることが可能である。すなわち、今後得られるすべての試料に対して均一な抗体を用いて反応性を調べることができるという点で、これらの抗体を用いた測定は長期にわたる赤潮の解析を行う上での有効な手段となる可能性をもつと考えられる。本研究により確立された手法が赤潮藻類の生物学的・生態学的研究を進めて行く上で有効に利用され、赤潮動態解明のための一戦略となれば幸いである。

摘 要

日本沿岸海域における赤潮の原因生物の代表種として知られる *Chattonella* 属藻類は、その発生頻度およびもたらす被害の大きさから、現在も多くの研究者の研究対象となっている。しかるにあらゆる研究を行う上での共通の定規たるべき本属藻類の分類体系は、現在に至るまで多くの混乱を伴ってきた。これは、本属藻類が形態学的に多様であるにも関わらず、もっぱら形態学的特徴に基づく識別・同定が行われてきたことによると考えられる。本研究は、モノクローナル抗体のもつ反応特異性を利用することにより、本属藻類の免疫学的側面からの識別を行った結果をとりまとめたものである。以下にその主な内容を示した。

Chattonella 属藻類の細胞表面に特異的に反応する7種のモノクローナル抗体を作製し、各抗体の *Chattonella* 属18株に対する反応性を間接蛍光抗体法およびドットイムノアッセイ法により調べた。各株の反応パターンを比較することにより、18株を6グループに分けることができた。*C. marina* および *C. antiqua* の2種はそれぞれ2グループに分けられた。なかでも、*C. marina* は瀬戸内海産のグループと鹿児島湾産のグループに分けられ、免疫学的手法による分類の結果と地理的分布圏とが一致する結果となった。また、本法の現場海水中試料に対する応用も可能であることが示されたが、現場の藻相をより正確に結果に反映させるためにサンプリング後できるだけ迅速に測定を行う必要があると考えられた。

本法の方法論としての信頼性を得るために、得られた7抗体のうち3抗体の認識抗原について性状解析を行った結果、いずれも糖タンパク質の糖鎖部分を認識している可能性が強く示唆された。したがって、本法で用いたモノクローナル抗体による識別の根拠となっているのは、藻体のもつ多糖構造の差であると考えられた。

また、同様のアプローチを *Gymnodinium* 属に対して試みることにより、本法が赤潮藻研究に普遍的に応用できることを示した。得られた抗体 GN-89 は、日本沿岸海域に由来する *G. nagsakiense* に対して特異的に反応したが、*G. breve*, *G. catenatum* および欧州北海産 *G. cf. nagsakiense* に対しては反応しなかった。

謝 辞

本研究を実施するにあたり御指導と御鞭撻を賜りました京都大学農学部石田祐三郎教授ならびに内田有恆助教授に心から感謝の意を捧げますとともに、常に適切な御助言、御指導を賜りました白井松新薬株式会社広石伸互博士に厚く御礼申し上げます。

モノクローナル抗体作成技術の習得につきましては、西野尾幸代氏、若菜美代子氏をはじめとする白井松新薬株式会社の皆様に、また酵素免疫学的手法の習得につきましては、奈良県立医科大学の前田裕子先生にそれぞれ懇切丁寧な御指導を賜りました。ここに心から感謝の意を表したく思います。

さらに、貴重な生物試料や単離株を分譲していただきました兵庫県立水産試験場（現 兵庫県但馬水産事務所）の眞鍋武彦博士、福岡県豊前水産試験場（現 環境テクノス株式会社）の寺田和夫氏、国立環境研究所の渡辺信博士、南西海区水産研究所の今井一郎博士、山口峰生博士、板倉茂氏、元三重大学生物資源学部の岩崎英雄教授、長崎大学水産学部の平山和次教授、三重県水産技術センターの西村昭史氏、山口県内海水産試験場の池田武彦氏ならびに Instituto Nacional de Sande の Mrs. Venda に厚く御礼申し上げます。

また、免疫電子顕微鏡法を行うにあたり多大なる御助言と御助力を賜りました京都大学食糧化学研究所の樋笠隆彦先生、三菱化成生命研究所の佐藤道夫博士と環境保健生物研究センターの谷口雄三博士に心より御礼申し上げます。さらに、糖タンパク質研究に関する最新の知見を与えていただきました京都大学医学部神奈木玲児博士に厚く御礼申し上げます。

また、著者の在籍しました研究室であります京都大学農学部水産学科水産微生物学研究室講師の左子芳彦博士、同助手の吉永郁生博士、高知大学農学部助教授の深見公雄博士、通産省工業技術院資源環境技術総合研究所の澤山茂樹博士を初めとする多くの皆様に多くの貴重な御助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。なかでも藻体のクローニングに御助力いただきました釜山水産大学増養殖学科の金昌勳博士、著者の研究を推進する上で精力的に御助力いただきました足立真佐雄氏をはじめとする多くの後輩諸氏に心からの謝意を示します。

最後に、本稿をとりまとめるにあたり貴重な御助言を賜りました新井 茂博士、本城凡夫博士をはじめとする南西海区水産研究所業績委員各氏に感謝いたします。

文 献

- ANDERSON, D. M., D. M. JACOBSON and J. H. WRENN, 1988: The Unique, Microreticulate of the Naked Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *J. Phycol.* **24**, 255-262.
- 安楽正照, 1985a: 環境調査とプランクトン (26). 海洋と生物, **7**, 183-188.
- 安楽正照, 1985b: 環境調査とプランクトン (27). 海洋と生物, **7**, 302-307.
- BENHAM, G., 1931: Certain *Monilias* Parasitic on Man. *J. Infect. Diseases*, **49**, 183-215.
- BIECHELER, B., 1936: Sur une Chloromonadine d'eau saumatre *Chattonella subsalsa* n. gen., n. sp. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, **78**, 79-83.
- BLACKBURN, S. I., G. M. HALLEGRAEFF and C. J. BOLCH, 1989: Vegetative Reproduction and Sexual Life Cycle of the Toxic Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia. *J. Phycol.*, **25**, 577-590.
- BREWIN, N. J., J. G. ROBERTSON, E. A. WOOD, B. WELLS, A. P. LARKINS, G. GALFRE and W. BUTCHER, 1985: Monoclonal Antibodies to Antigens in the Peribacteroid Membrane from *Rhizobium*-Induced Root Nodules of Pea Cross-React with Plasma Membranes and Golgi Bodies. *EMBO J.*, **4**, 605-611.
- CAMPBELL, A. M., 1989: エピトープの解析. 生化学実験法第10巻 モノクローナル抗体 (大沢利昭訳), 東京化学同人, 東京, 192-205.
- 千原光雄, 1990: シャットネラ赤潮のシスト形成要因および種の分類指標に関する研究. 赤潮対策技術開発試験報告書, 13 pp.
- COLWELL, R. R., R. J. SEIDLER, J. KAPER, S. W. JOSEPH, S. GARGES, H. LOCKMAN, D. MANEVAL, H. BRADFORD, N. REBERTS, E. REMMERS, I. HUQ and A. HUQ, 1981: Occurrence of *Vibrio cholerae* Serotype O1 in Maryland and Louisiana Estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 555-558.
- EZAKI, T., Y. HASHIMOTO, N. TAKEUCHI, H. YAMAMOTO, S. L. LIU, H. MIURA, K. MATSUI and E. YABUCHI, 1988: Simple Genetic Method to Identify Viridans Group *Streptococci* by Colorimetric Hybridization and Fluorometric Hybridization in Microdilution Wells. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1708-1713.
- FAIRBANKS, G., T. L. STECK and D. F. H. WALLACH, 1971: Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane. *Biochem.*, **10**, 2606-2617.
- FUKAZAWA, Y. et al. 1968: Response and Specificity of Antibodies for *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **95**, 754-763.
- 福代康夫・高野秀昭・千原光雄・松岡数充, 1990: 日本の赤潮生物. 内田老鶴圃, 東京, 407 pp.
- 福代康夫・高橋正征, 1987: 赤潮生物の生物学的特徴. 赤潮の科学 (岡市友利編), 恒星社厚生閣, 東京, 37-89.
- GARDINER, W. E., A. E. RUSHING and C. J. DAWES, 1989: Ultrastructural Observations of *Gyrodinium estuariale* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **25**, 178-183.
- GIOVANNONI, J. G., E. F. DELONG, G. J. OLSEN and N. R. PACE, 1988: Phylogenetic Group-Specific Oligodeoxynucleotide Probes for Identification of Single Microbial Cells. *J. Bacteriol.*, **170**, 720-726.
- GOFF, L. J. and A. W. COLEMAN, 1988: The Use of Plasmid DNA Restriction Endonuclease Patterns in Delineating Red Tide Algae Species and Populations. *J. Phycol.*, **24**, 357-368.
- GRIEF, C., M. A. O'NEILL and P. J. SHAW, 1987: The Zygote Cell Wall of *Chlamydomonas reinhardtii*: A Structural, Chemical and Immunological Approach. *Planta*, **170**, 433-445.
- HADA, Y., 1974: The Flagellata Examined from Polluted Water of the Inland Sea, Setonaikai. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **20**, 112-125.
- 長谷川武治, 1974: 酵母の血清学的分類. 微生物の新しい分類学 (土屋毅編), 講談社, 東京, 291 pp.
- 原 慶明・千原光雄, 1987: ラフィド藻. 赤潮生物研究指針. 日本水産資源保護協会, 秀和, 東京, 544-566.
- HARA, Y. and M. CHIHARA, 1982: Ultrastructure and Taxonomy of *Chattonella* (Class Raphidophyceae) in Japan. *Jap. J. Phycol.* **30**, 47-56.
- HAYHOME, B. A., D. J. WHITTEN, K. R. HARKINS and L. A. PFIESTER, 1987: Intraspecific Variation in the Dinoflagellate *Peridinium volzii*. *J. Phycol.*, **23**, 573-580.
- HAYHOME, B. A., D. M. ANDERSON, D. M. KULIS and D. J. WHITTEN, 1989: Variation among Congeneric

- Dinoflagellates from the Northeastern United States and Canada. *Mar. Biol.*, **101**, 427-435.
- HAWKS, R., E. NIDAY and J. GORDON, 1982: A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and Other Antibodies. *Anal. Biochem.*, **119**, 142-147.
- HIRAYAMA, K. and K. NUMAGUCHI, 1972: Growth of *Gymnodinium* Type-65, Causative Organism of Red Tide in Omura Bay, in Medium Supplied with Bottom Mud Extract. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **19**, 13-21.
- HIROISHI, S., S. MATSUYAMA, T. KANEKO, Y. NISHIMURA and J. ARITA, 1984: Inhibition of Cytotoxicity for Screening a Monoclonal Antibody to HLA Antigen. *Tissue Antigens*, **24**, 307-312.
- HIROISHI, S., A. UCHIDA, K. NAGASAKI and Y. ISHIDA, 1988: A New Method for Identification of Inter- and Intra-Species of the Red Tide Algae *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* by Means of Monoclonal Antibodies. *J. Phycol.*, **24**, 442-444.
- HIROISHI, S., A. UCHIDA, K. NAGASAKI and Y. ISHIDA, 1989: A New Method for Inter- and Intra-Species Identification of Red Tide Algae *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* by Means of Monoclonal Antibodies. In "Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology" (eds. by T. OKAICHI, D. M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 299-300.
- HOLLANDE, A. and M. ENJUMET, 1957: Sur une invasion des eaux du port d'alger par *Chattonella subsalsa* (= *Hornellia marina* sub.) Biecheler. Remarques sur la toxicite de cette chloromonade. *Bull. Trav. Publ. Stn. Aquicult. et N.S. Peche Castiglione*, **8**, 273-280.
- 本城凡夫, 1985: ラフィド藻類の細胞表層に存在するグリコカリックス. 水産の研究, **4**, 14-15.
- 本城凡夫, 1987: 赤潮種と発生環境 ギムノディニウム. 赤潮の科学 (岡市友利編), 恒星社厚生閣, 東京, 228-237.
- HONJO, T., 1987: Growth Potential of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) Collected in Gokasho Bay, Central Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **34**, 119-124.
- HONJO, T., S. YAMAMOTO, O. NAKAMURA and M. YAMAGUCHI, 1990: Annual Cycle of Motile Cells of *Gymnodinium nagasakiense* and Ecological Features during the Period of Red Tide Development. In "Toxic Marine Phytoplankton" (eds. by E. GRANÉLI *et al.*), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 165-170.
- 保坂三継, 1990: 東京湾における *Gymnodinium nagasakiense* TAKAYAMA *et* ADACHI の出現. 日本プランクトン学会報, **37**, 69-75.
- HUBBARD, S. C. and R. J. IVATT, 1981: Synthesis and Processing of Asparagine-linked Oligosaccharides. *Anni. Rev. Biochem.*, **50**, 555-583.
- ICHIMURA, T., 1983: Hybrid Inviability and Predominant Survival of Mating Type Minus Progeny in Laboratory Crosses between Two Closely Related Mating Groups of *Closterium ehrenbergii*. *Evolution*, **37**, 252-260.
- IIZUKA, S., 1972: 大村湾における *Gymnodinium* '65年型種赤潮の発生機構. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **19**, 22-33.
- 飯塚昭二・入江春彦, 1966: 1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害-II. 長大水研報, **21**, 67-101.
- 飯塚 廣・後藤昭二, 1973: 血清学的技法による同定法. 酵母の分類同定法, 東京大学出版会, 東京, 79-86.
- 池田武彦, 1971: 赤潮プランクトンに関する研究-III 海産ミドリムシの栄養生理について. 山口内海水試験報, **2**, 4-8.
- 今井一郎・伊藤克彦・安楽正照, 1984: 播磨灘における *Chattonella* 耐久細胞の分布と発芽温度. 日本プランクトン学会報, **31**, 35-42.
- IMAI, I., K. ITOH and M. ANRAKU, 1984: Dormancy and Maturation in the Cysts of *Chattonella* spp. (Raphidophyceae), Red Tide Flagellates in the Inland Sea of Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **31**, 123-124.
- IMAI, I., K. ITOH and D. M. ANDERSON, 1989: Dormancy and Maturation in the Cysts of *Chattonella* spp. (Raphidophyceae), Red Tide Flagellates in the Inland Sea of Japan. In "Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology", (eds. by T. OKAICHI, D. M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 289-292.
- IMAI, I. and K. ITOH, 1987: Annual Life Cycle of *Chattonella* spp., Causative Flagellates of Noxious Red Tides in the Inland Sea of Japan. *Mar. Biol.*, **94**, 287-292.
- IMAI, I. and K. ITOH, 1988: Cysts of *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae) in Sediments of the Inland Sea of Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **35**, 35-44.
- IMAI, I., 1989: Cyst Formation of the Noxious Red Tide Flagellate *Chattonella marina* (Raphidophyceae) in Cul-

- ture. *Mar. Biol.*, **103**, 235-239.
- 伊藤克彦・今井一郎, 1988: 赤潮・その対策と研究の歩み. 21世紀の漁業と水産海洋研究, 水産海洋研究会, 228-237.
- IWASAKI, H., 1961: The Life-Cycle of *Porphyr a tenera in vitro*. *Biol. Bull.*, **121**, 173-187.
- 岩崎辰夫・安東民衛・市川かおる・保井孝太郎, 1983: 単クローン抗体 ハイブリドーマと ELISA. 講談社, 東京, 187 pp.
- 神奈木玲児・繁田勝美・山肩葉子, 1987: モノクローナル抗体を用いた糖鎖の特異的検出法とその臨床応用. 臨床検査, **31**, 646-655.
- KATO, H., F. OTA, K. FUKUI and K. YAGAWA, 1986: Monoclonal Antibody to *Streptococcus mutans* Type e Cell Wall Polysaccharide Antigen. *Infect. Immun.* **52**, 628-630.
- KIMBALL, J. F. and E. J. F. WOOD, 1965: A Dinoflagellate with Characters of *Gymnodinium* and *Gyrodinium*. *J. Protozool.*, **12**, 577-580.
- KÖHLER, G. and C. MILSTEIN, 1975: Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predifined Specificity. *Nature*, **256**, 494-497.
- 口野嘉幸・平井久丸・櫻林郁之介, 1987: 遺伝子・タンパク質 実験操作プロットィング法, ソフトサイエンス社, 東京, 361 pp.
- LAEMMLI, U. K., 1970: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
- LEACH, R. H., 1973: Further Studies on Classification of Bovine Strains of Mycoplasmatales, with Proposals for New Species, *Acholeplasma modicum* and *Mycoplasma alkalescens*. *J. Gen. Microbiol.*, **75**, 135-153.
- 真崎知生, 1987: ポリクローン, モノクローン抗体の選択, 使い分け. 生体の科学, **38**, 351-352.
- 松本紀男・吉松定昭, 1990: シャットネラ赤潮被害防止技術開発試験 現場海水による増殖能獲得試験. 香川県赤潮研究所, 15 pp.
- MATSUOKA, K., S. IZUKA, H. TAKAYAMA, T. HONJO, Y. FUKUYO and T. ISHIMARU, 1989: Geographic Distribution of *Gymnodinium nagasakiense* TAKAYAMA et ADACHI around West Japan. In "Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology" (eds. by T. OKAICHI, D. M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 101-104.
- MIGNOT, J. P., 1976: Compléments a l'étude des chloromonades ultrastructure de *Chattonella subsalsa* Biecheler flagelle d'eau saumâtre. *Protistologica*, **12**, 279-293.
- NAGASAKI, K., A. UCHIDA, S. HIROISHI and Y. ISHIDA, 1989: Identification of Red Tide Algae *Chattonella marina* and *Chattonella antiqua* by Means of Monoclonal Antibodies. In "Current Topics in Marine Biotechnology" (eds. by S. MIYAUCHI, I. KARUBE and Y. ISHIDA), Fuji Technology Press Ltd., Tokyo, 161-164.
- NAGASAKI, K., A. UCHIDA, S. HIROISHI and Y. ISHIDA, 1991: An Epitope Recognized by the Monoclonal Antibody MR-21 Reactive with the Cell Surface of *Chattonella marina* Type II. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 885-890.
- NAGASAKI, K., A. UCHIDA and Y. ISHIDA, 1991: A Monoclonal Antibody Which Recognizes the Cell Surface of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1211-1214.
- 中村泰男・渡辺 信, 1984a: *Chattonella antiqua* の増殖量に及ぼす栄養塩の効果. 国立公害研報, **63**, 79-86.
- 中村泰男・渡辺 信, 1984b: *Chattonella antiqua* の日周垂直移動——特にその生態的意味について. 国立公害研報, **63**, 87-96.
- NAKAMURA, Y., T. UMEMORI, M. WATANABE, D. M. KULIS and D. M. ANDERSON, 1990: Encystment of *Chattonella antiqua* in Laboratory Cultures. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **46**, 35-43.
- 中田憲一・飯塚昭二, 1987: 赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* の越冬に関する一考察. 日本プランクトン学会報, **34**, 199-201.
- 沼知健一, 1973: 魚類のアイソザイム研究. 海洋科学, **5**(10), 35-42.
- 沼知健一, 1974: アイソザイム——分子構造と遺伝. 魚類種族の生化学的判別, 日本水産学会編, 恒星社厚生閣, 49-64.
- 尾田方七, 1935: *Gymnodinium mikimotoi* MIYAKE et KOMINAMI n. sp. (MS) の赤潮と硫酸銅の効果. 動雑, **47**, 35-48.
- 尾形研二・笠原 忠・中野康平・荒川正明, 1983: SDS ポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース膜に

- 転写されたタンパク質抗原の高感度な酵素抗体法による検出. 免疫実験操作法, **12**, 3825-3833.
- OKAICHI, T., S. NISHIO and Y. IMATOMI, 1982: Methodology of Toxic Plankton-Preparation and Cultivation of Planktons. In "Toxic Phytoplankton Occurrence, Mode of Action, and Toxins", Jap. Soc. Sci. Fish, Koseisha-Koseikaku, Tokyo, 23-34 (in Japanese).
- ONO, C. and H. TAKANO, 1980: *Chattonella antiqua* (HADA) comb. nov., and Its Occurrence on the Japanese Coast. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **102**, 93-99.
- OTA, F., H. KATO and K. FUKUI, 1987: Immunological Study of Cross-Reactive Polysaccharide Antigens (Type a, d, and h) of Oral *Streptococcus* spp. with Monoclonal Antibodies. *Infect. Immun.*, **55**, 266-268.
- PALADE, G., 1975: Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science*, **189**, 347-358.
- PARTENSKY, F., D. VAULOT, A. COUTE and A. SOURNIA, 1988: Morphological and Nuclear Analysis of the Bloom-Forming Dinoflagellates *Gyrodinium* cf. *aureolum* and *Gymnodinium nagasakiense*. *J. Phycol.*, **24**, 408-415.
- PARTENSKY, F. and D. VAULOT, 1989: Cell Size Differentiation in the Bloom-Forming Dinoflagellate *Gymnodinium* cf. *nagasakiense*. *J. Phycol.*, **25**, 741-750.
- ROBERTSON, J. G., B. WELLS, T. BISSELING, K. J. F. FARNDEN and A. W. B. JOHNSTON, 1984: Immuno-Gold Localization of Leghaemoglobin in Cytoplasm in Nitrogen-Fixing Root Nodules of Pea. *Nature*, **311**, 254-256.
- SAKO, Y., A. UCHIDA and Y. ISHIDA, 1989: Electrophoretic Analysis of Isozymes in Red Tide Dinoflagellates. In "Red Tides" (eds. by T. OKAICHI, D. M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 325-328.
- SAKO, Y., C. H. KIM, H. NINOMIYA, M. ADACHI and Y. ISHIDA, 1989: Isozyme and Cross Analysis of Mating Populations in the *Alexandrium catenella/tamarense* Species Complex. In "Toxic Marine Phytoplankton" (eds. by E. GRANÉLI *et al.*), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 320-323.
- SCHMIDT, E. L. and B. B. BOHLOOL, 1980: In "Advances in Microbial Ecology" (ed. by M. ALEXANDER), Plenum Press, 203 pp.
- SHAPIRO, L. P., E. M. HAUGEN, M. D. KELLER, R. R. BIDIGARE, L. CAMPBELL and R. R. L. GUILLARD, 1989: Taxonomic Affinities of Marine Coccoid Ultraphytoplankton: A Comparison of Immunochemical Surface Antigen Cross-Reactions and HPLC Chloroplast Pigment Signatures. *J. Phycol.*, **25**, 794-797.
- SMITH, E., K. ROBERTS, A. HUTCHINGS and G. GALFRE, 1984a: Monoclonal Antibodies to the Major Structural Glycoprotein of the *Chlamydomonas* Cell Wall. *Planta*, **161**, 330-338.
- SMITH, E., K. ROBERTS, A. HUTCHINGS and G. GALFRE, 1984b: Monoclonal Antibody Screening: Two Methods Using Antigens Immobilized on Nitrocellulose. *Anal. Biochem.*, **138**, 119-124.
- STANIER, R. Y., E. A. ADELBERG, J. L. INGRAHAM and M. L. WHEELIS, 1976: 細菌の分類. 微生物学入門編, 培風館, 東京, 115-141.
- SUBRAHMANYAN, R., 1954: On the Life-History and Ecology of *Hormellia marina* gen. et sp. nov., (Chloromonadineae), Causing Green Discoloration of the Sea and Mortality among Marine Organisms of the Marabar Coast. *Indian J. Fish.* **1**, 182-203.
- 水産庁・三重県・和歌山県, 1986: 昭和59年熊野灘海域に発生したギムノディニウム・ナガサキエンセ赤潮に関する調査報告書, 140 pp.
- TABAS, I. and S. KORNFELD, 1978: The Synthesis of Complex-type Oligosaccharides, III. *J. Biol. Chem.*, **253**, 7779-7786.
- 高山晴義, 1972: 1969年および1970年広島湾に発生した赤潮ペン毛虫について. 広島県水産試験場試験報告, **3**, 1-7.
- 高山晴義, 1981: 走査電子顕微鏡による *Gymnodinium* 属 2 種の観察. 日本プランクトン学会報, **28**, 121-129.
- TAKAYAMA, H. and R. ADACHI, 1984: *Gymnodinium nagasakiense* sp. nov., A Redtide Forming Dinophyte in the Adjacent Waters of Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **31**, 7-14.
- 高野秀昭, 1975: 生物指標としての植物プランクトン. 環境と生物指標-2 水界編, 共立出版, 234-242.
- 田中俊次・藤田真吾・杉山元彦・西岡純・中西雅幸, 1977: 1975年10月, 舞鶴湾で発生した *Hemientreptia antiqua* 赤潮について. 京都府立海洋センター研究報告, **1**, 93-105.
- 寺田和夫・池内仁・高山晴義, 1987: 冬季の周防灘沿岸で観察された *Gymnodinium nagasakiense*. 日本プランクトン学会報, **34**, 201-203.

- 土屋 毅, 1967: 酵母学 (橋谷義孝編), 岩波書店, 東京, 694 pp.
- UCHIDA, A., A. SHIMADA and Y. ISHIDA, 1988: Antibacterial and Antialgal Substances Produced by the Dinoflagellate *Peridinium bipes*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1941-1945.
- UCHIDA, A., K. NAGASAKI, S. HIROISHI and Y. ISHIDA, 1989: The Application of Monoclonal Antibodies to an Identification of *Chattonella marina* and *Chattonella antiqua*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 721-725.
- VELEZ, D., J. D. MACMILLAN and L. MILLER, 1988: Production and Use of Monoclonal Antibody for Identification of *Bradyrhizobium japonicum* Strains. *Can. J. Microbiol.*, 34, 88-92.
- WARD, B. B. and M. J. PERRY, 1980: Immunofluorescent Assay for the Marine Ammonium-Oxidizing Bacterium *Nitrosococcus oceanus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 913-918.
- WARD, B. B., 1982: Oceanic Distribution of Ammonium-Oxidizing Bacteria Determined by Immunofluorescent Assay. *J. Mar. Res.*, 40, 1155-1172.
- WOESE, C. R., E. STACKEBRANDT, T. J. MACKE and G. E. FOX, 1985: A Phylogenetic Definition of the Major Eubacterial Taxa. *System. Appl. Microbiol.*, 6, 143-151.
- 渡辺 信, 1990: 海産微細藻類の系統保存・凍結保存. 月刊海洋, 22, 126-130.
- WILLY, R. L., 1980: Proposed New Identification Character for the Genus *Colacium* (Euglenophyceae). *J. Phycol.*, 16, 143-146.
- WINSTON, S. E., S. A. FULLER and J. G. R. HURRELL, 1987: Western Blotting. In "Current Protocols in Molecular Biology" (eds. by F. M. AUSUBEL, R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D. MOORE, J. G. SEIDMAN, J. A. SMITH and K. STRUHL), Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 10.8.1-10.8.6.
- 山川民夫, 1986: 免疫生化学実験法 続生化学実験講座, 5. 東京化学同人, 306 pp.
- 山口峰生・本城凡夫, 1989: 有害赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* の増殖におよぼす水温, 塩分および光強度の影響. 日水誌, 55, 2029-2036.
- 山口峰生・本城凡夫, 1990: 有害赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae) の同調的細胞分裂と分裂頻度による増殖速度の測定. 日本プランクトン学会報, 37, 3-18.
- 柳田友道, 1976: 赤潮. 講談社, 東京, 198 pp.
- YOKOTE, M. and T. HONJO, 1985: Morphological and Histochemical Demonstration of Glycocalyx on the Cell Surface of *Chattonella antiqua*, 'a Naked Flagellate'. *Experientia*, 41, 1143-1145.
- 結城勝久・小野知足, 1980: 海産鞭毛藻類のクローン培養中に見られる形態変異. 香川県水産試験場試験報告, 17, 1-22.
- 吉松定昭, 1981: 野外における *Chattonella antiqua* (HADA) ONO の球形細胞. 香川県水試報, 18, 27-37.

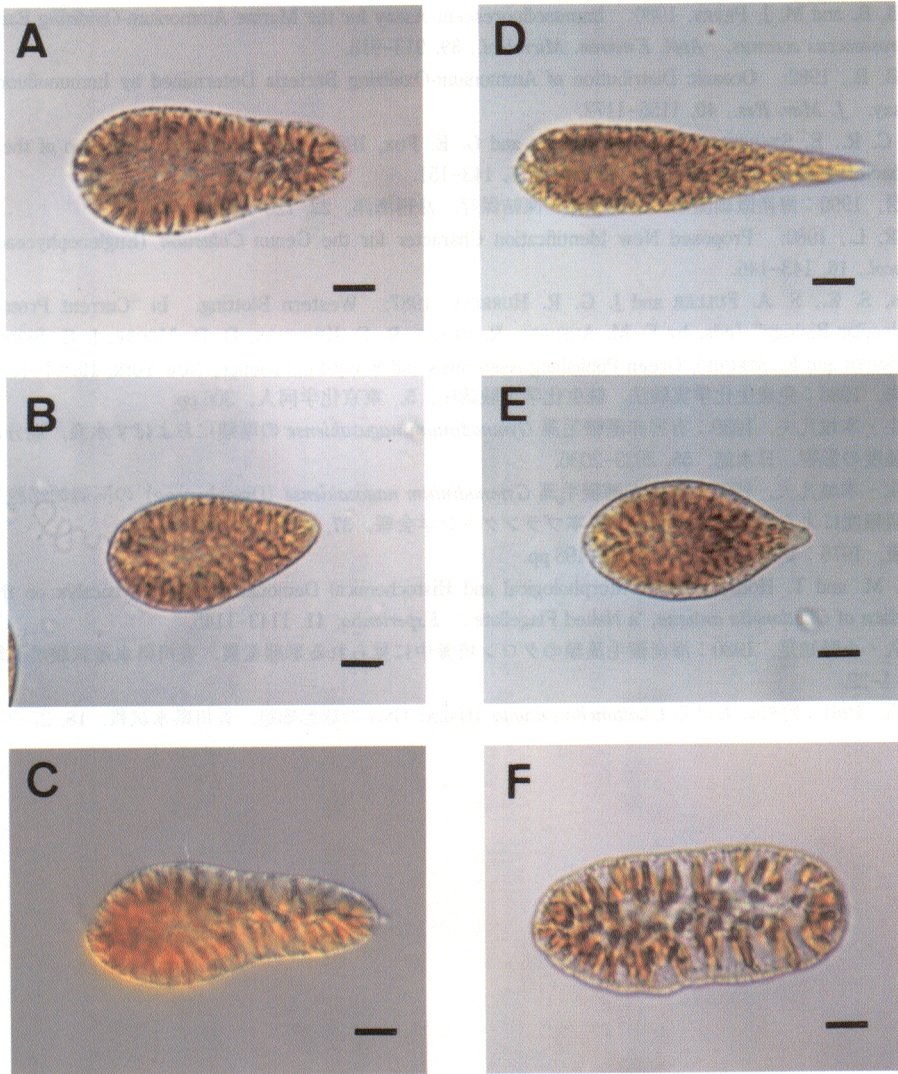


Plate I. Differential interference microscopical photographs of *Chattonella* strains. A, *C. marina* NIES-118; B, *C. marina* NIES-121; C, *Chattonella* sp. NIES-454; D, *C. antiqua* NIES-161; E, *C. antiqua* NIES-86; F, *Chattonella* sp. NIES-93. The scale bars indicate 10 μ m.

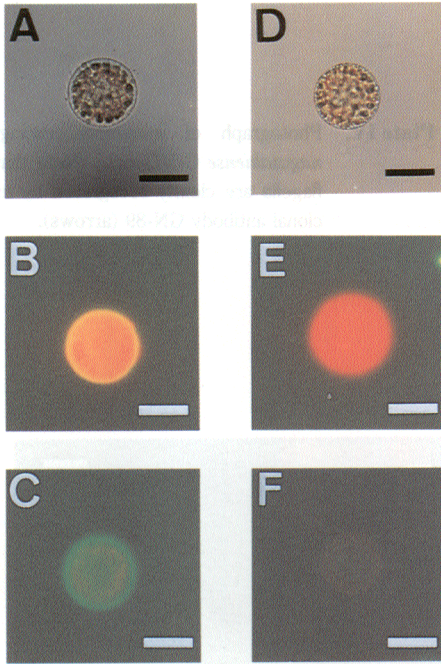


Plate II. Recognition of cell surface antigens of *C. marina* NIES-121 by monoclonal antibody MR-21. *C. marina* NIES-121 was incubated with MR-21 or AT-86 as described in Materials and Methods. The cell suspension, incubated with the monoclonal antibody, and then FITC conjugated goat anti-mouse Ig antibody was observed by the use of optical microscopy (OM) or by fluorescence microscopy (FM) with B-exciting light, with or without -550IF filter (OF). A: MR-21, OM; B: MR-21, FM without OF; C: MR-21, FM with OF; D: AT-86, OM; E: AT-86, FM without OF; F: AT-86, FM with OF. The scale bars indicate 20 μ m.

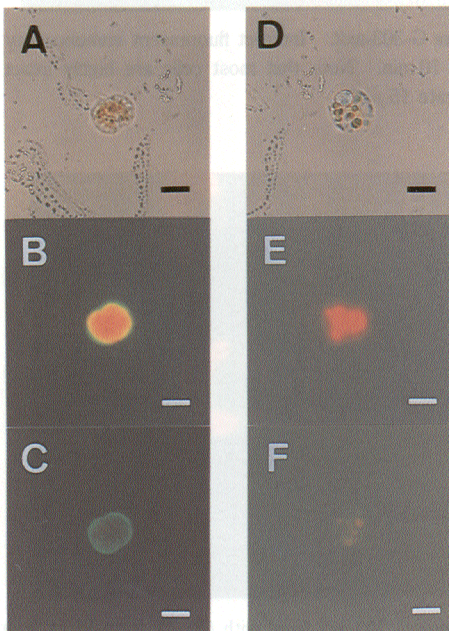


Plate III. Recognition of cell surface antigen(s) of *Gymnodinium nagasakiense* G-303-ax2 by monoclonal antibody GN-89. *G. nagasakiense* G-303-ax2 was incubated with GN-89 or supernatant of myeloma culture (negative control) as described in Materials and Methods. The cell suspension was then incubated with FITC conjugated goat anti-mouse Ig antibody, and was observed by the use of optical microscopy (OM) or by fluorescence microscopy (FM) with B-exciting light, with or without -550IF filter (OF). A: GN-89, OM; B: GN-89, FM without OF; C: GN-89, FM with OF; D: supernatant of myeloma culture, OM; E: supernatant of myeloma, FM without OF; F: supernatant of myeloma, FM with OF. The scale bars indicate 20 μ m.

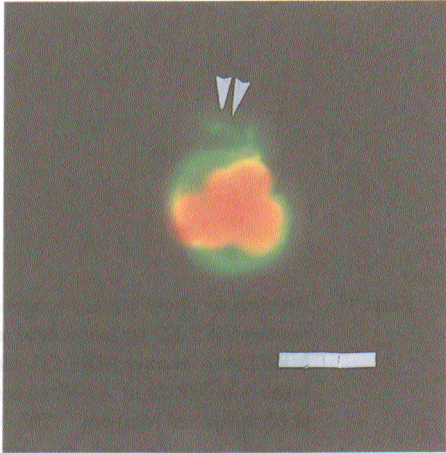


Plate IV. Photograph of immunofluorescing *G. nagasakiense* G-303-ax2. Note that the flagella are clearly recognized by monoclonal antibody GN-89 (arrows).

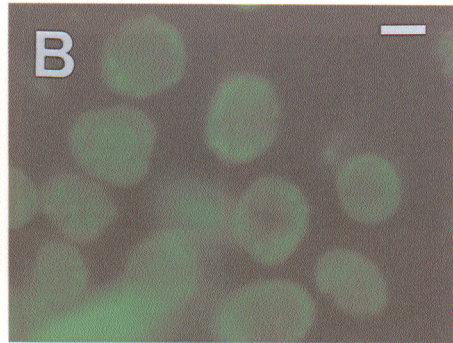
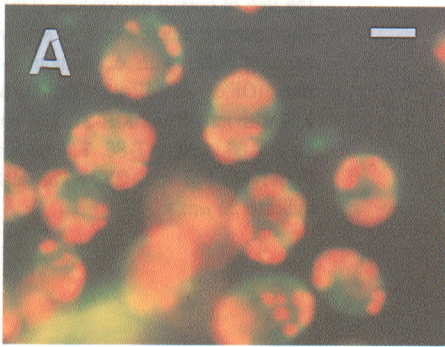


Plate V. Photograph of immunofluorescing *G. nagasakiense* G-303-ax2. Indirect fluorescent immunoassay was performed after centrifugation at 1,200 rpm for 10 min. Note that most cells are highly intact and separated from each other. The scale bars indicate 15 μ m.

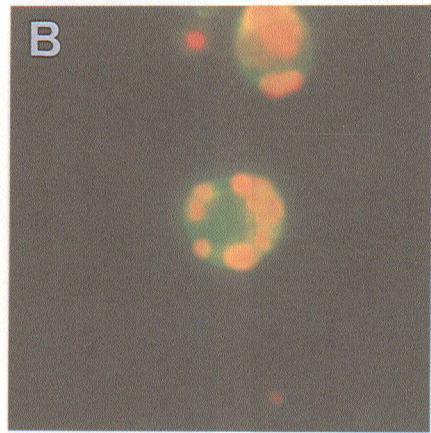
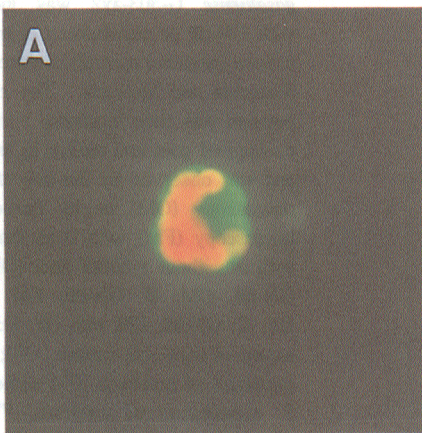


Plate VI. Photographs of immunofluorescing *G. nagasakiense* G-303-ax2 fixed with (A) 2% formaldehyde or (B) 2% glutaraldehyde. Note that the antigenicity is highly preserved in each case.