

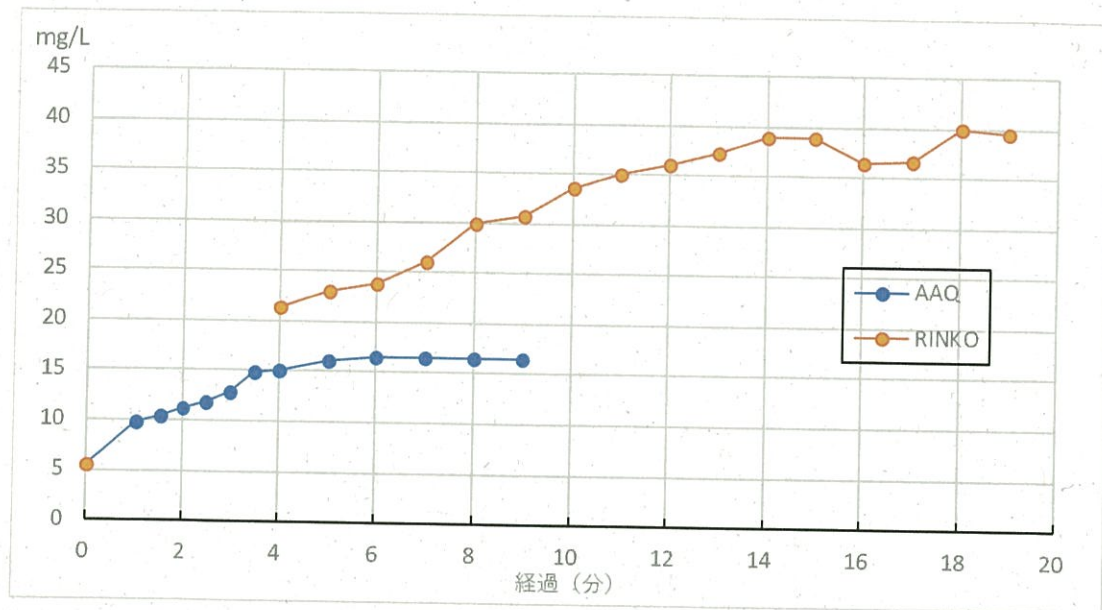


図 3 現地海域の試験生簀内部の酸素濃度上昇
 試験開始時の DO : 5.6 mg/L (AAQ), 5.6 mg/L (RINKO)
 2 分後 : 11.2 mg/L, 4 分後 : 21.4 mg/L, 14 分後 : 38.8 mg/L

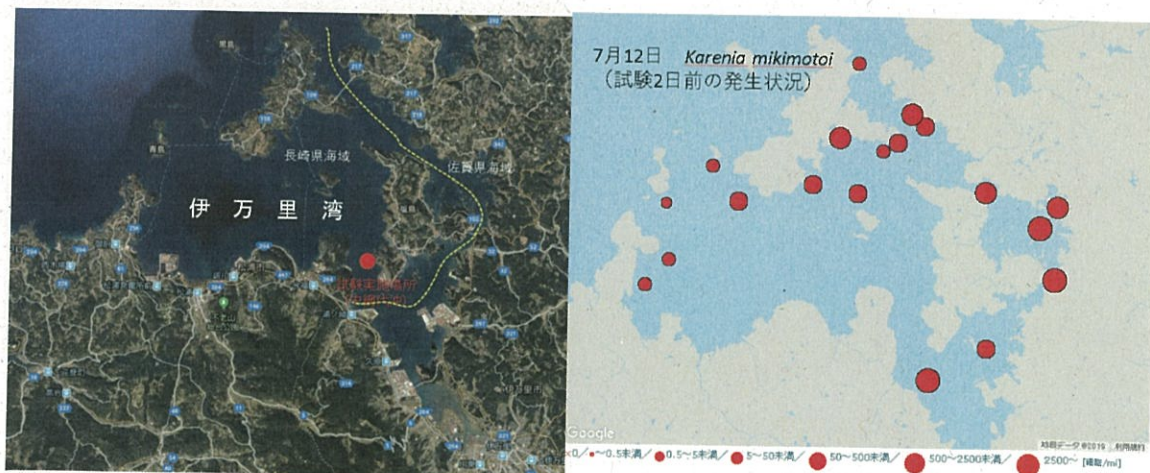


図 4 伊万里湾における現地試験場所 (左) および試験 2 日前の *Karenia mikimotoi* 赤潮発生状況



図5 試験を実施した遊魚用筏周辺の *Karenia mikimotoi* 赤潮発生状況

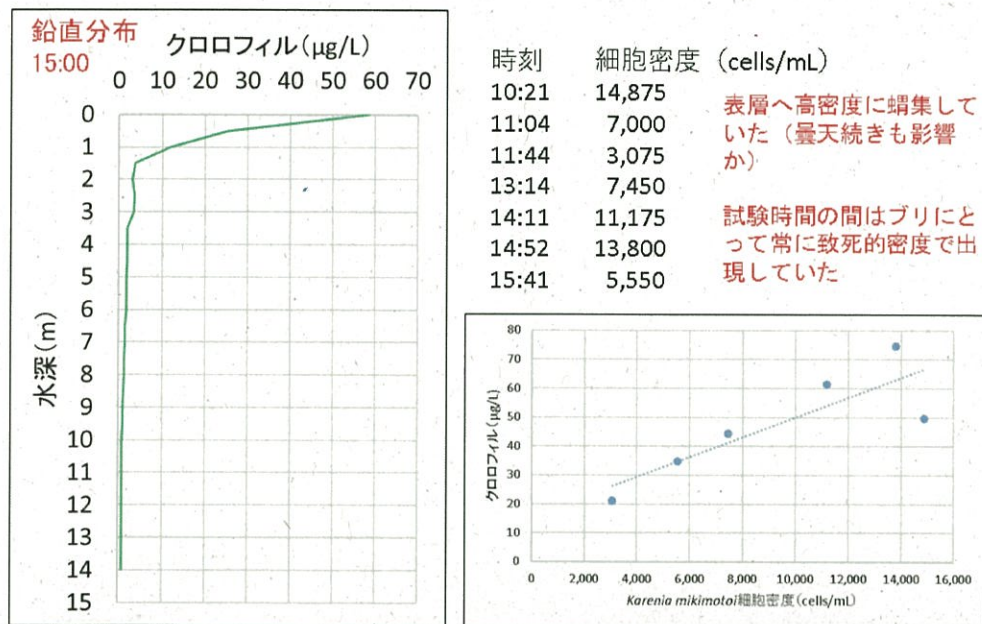
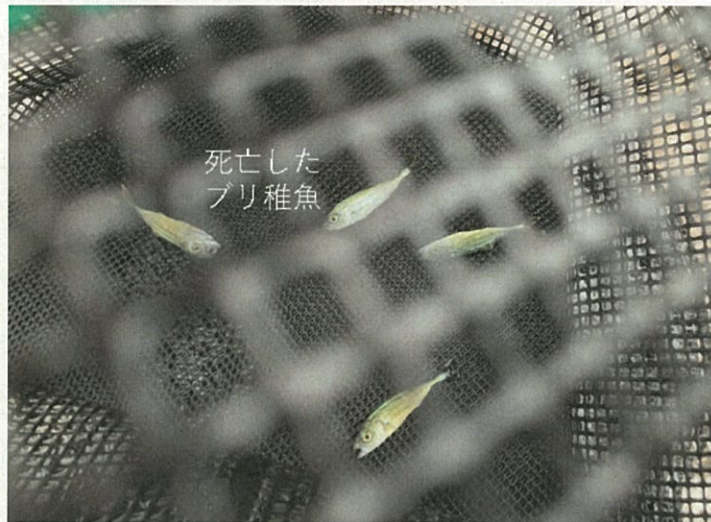


図6 遊魚用筏と試験生簀の設置状況



赤潮海水中のDO 8~9 mg/L → 40分後に全滅
 囲い膜なし高濃度酸素通気区のDO 10~11 mg/L → 59分後に全滅
 囲い膜あり高濃度酸素通気区のDO 13~15 mg/L → 2時間30分後まで全数生残

図7 試験生簀内の溶存酸素濃度とブリ稚魚の生残状況

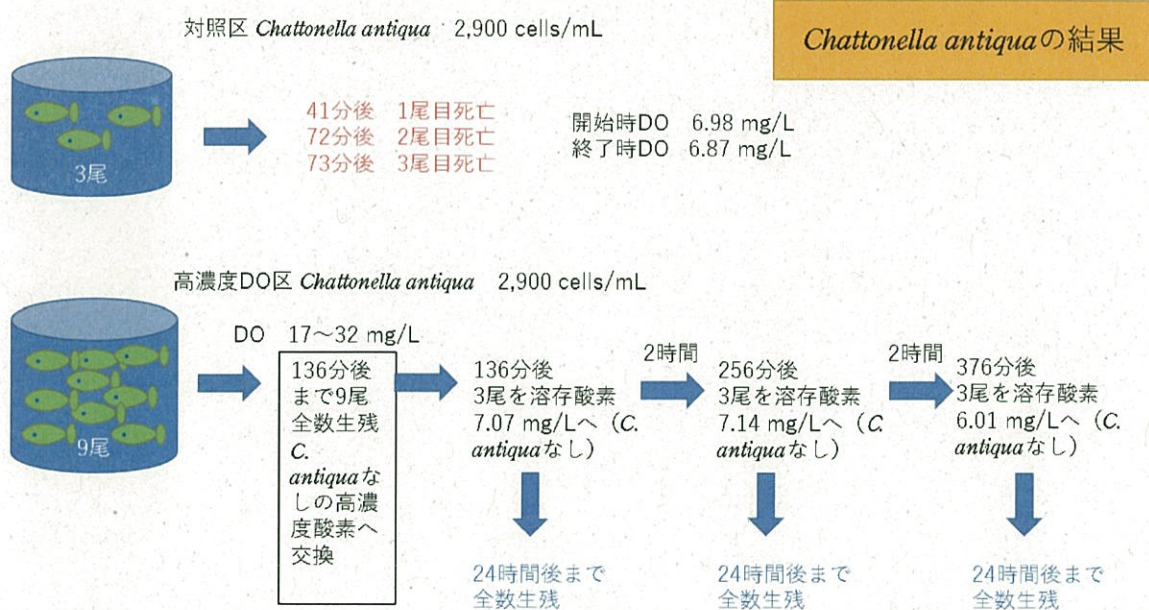


図8 *Chattonella antiqua* 存在下で高濃度酸素による救命後のブリ稚魚生残状況

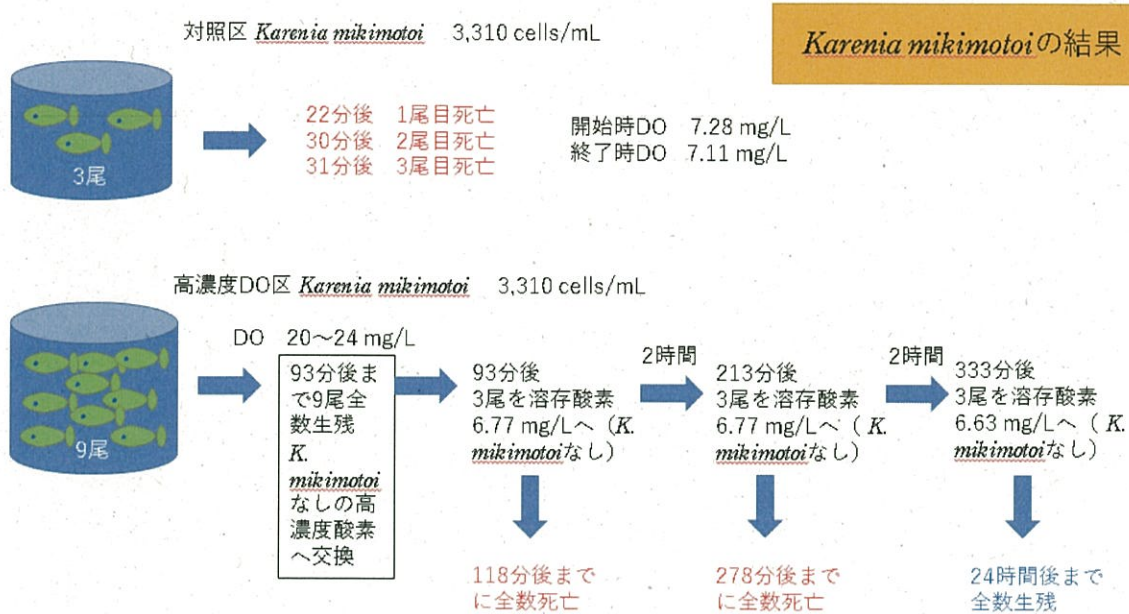


図9 *Karenia mikimotoi* 存在下で高濃度酸素による救命後のブリ稚魚生残状況

2) 有害赤潮の防除および漁業被害軽減のための技術開発
イ. 生簀等の魚介類を守る技術開発と実証
⑤ 給餌条件の改変による赤潮発生下での延命効果検証

水産研究・教育機構 西海区水産研究所

松山幸彦, 長副 聡

林兼産業株式会社

市来敏章, 吉田 歩

1 全体計画

(1) 目的

シャットネラ属, カレニア属, 及びコクロディニウム属による赤潮の発生規模拡大とこれに伴う魚類への死により, 全国的に漁業被害が拡大している。ブリやマグロなど, 魚類養殖の規模が年々拡大するなかで, 赤潮への対処療法的な対策として餌止めが指導されている。餌止めは室内試験においても延命効果が知られており, コストのかからない対策である。一方で, 稚魚など餌止めに対するストレスが大きい時期, あるいは魚病などの罹患歴があつて投薬を行っている養殖魚では, 餌止め自体がストレスとなって減耗を引き起こすリスクがある。加えて, 近年は周年出荷体制が普及するに従い, 餌止めによる品質低下も魚価下落や販路の喪失など, 漁家経営に対して甚大な悪影響を及ぼす。従って, 餌止めによる延命効果のメカニズムを解明し, 赤潮発生下でも給餌を行い, 延命効果を発揮させる手法が渴望されている。

過去の成果において, 餌料成分を改変することで, 飽食条件下においても, 餌止め時と同様にブリが延命する現象を把握している。こうした手法であっても, すべての漁業被害を完全に軽減することはできないが, モニタリングと予察を組み合わせることで, 中小規模の赤潮発生時に延命効果のある特殊餌料へ切り替えて, 赤潮被害低減策の基礎を確立することが, 赤潮による漁業被害のリスクを低減するうえで妥当な解決策である。

本課題では, シャットネラ属, カレニア属, 及びコクロディニウム属が魚類に与える有害性とこれに対する鰓組織上の炎症反応との関係に着目し, この炎症作業を極力軽減するのに有効な餌料成分の改変を行うことを提案・立証する。改変餌料と魚類死亡との関係を室内繰り返し試験で把握し, この特殊餌料を飽食させることで, 餌止めに匹敵もしくはそれを超える延命効果を発揮させ, 赤潮が発生しても養殖魚の被害を軽減する等の実用策の可能性を模索する。これらの革新的な取り組みによって, 漁業被害防止策の基礎を確立する。

2 平成31年度(令和元年度)計画及び結果

(1) 目的

シャットネラ属やカレニア属等有害赤潮プランクトンによる毒性を評価するために, 培養株を用いた繰り返し試験によってデータを蓄積し, 細胞密度とへい死時間との関係を指標に

魚毒性を評価する。小型魚の試験系はブリ稚魚によって構築された手法である(松山ら 2014)。過年度まで改変餌料の給餌で延命効果を確認しているため、今年度についても、室内曝露試験に基づいて再現性について評価する。

(2) 方法

1) 餌料成分を改変された餌の調製

過年度までに効果が検証された餌のうち、*Chattonella antiqua* や *Cochlodinium polykrikoides* 曝露時でも延命効果が認められた餌料 B について、*C. antiqua* と *Karenia mikimotoi* を用いて延命効果について検討する。平均粒径は対照区として給餌している餌料と同じ 1mm とした。

2) 試験魚の馴致および培養株の準備

ブリ(幼魚であるモジャコ)は、西海区水産研究所五島庁舎で生産された一系群の人工種苗を入手し、実験に供した。実験開始時まで 1 日 1 回(土日は原則給餌なし)、人工餌料(おとひめ C1: 日清丸紅社製)を総尾数の体重の 3% になるように給餌飼育した。試験に用いた個体の尾叉長は 59~91 mm、体重は 3.2~9.3 g であった。

今年度試験に用いた赤潮プランクトンは *C. antiqua* と *K. mikimotoi* である。*C. antiqua* は 2009 年に有明海佐賀県大浦港の表層堆積物中に含まれるシストから発芽させた栄養細胞を、キャピラリー分離法に基づいて 1 細胞ずつ顕微鏡下で単離してクローン株を作出し、これを活性酸素産生能と魚類への曝露試験でスクリーニングして確立された強毒株である。*K. mikimotoi* については、2012 年に長崎県大村湾長浦地先で採水された海水中からキャピラリー分離法によって 1 細胞ずつ遊泳細胞を顕微鏡下で単離することによりクローン培養株を作出した。得られた複数株については、シオミズツボムシ(S 型)への致死活性と魚類への曝露試験でスクリーニングし、大量培養が可能で魚毒性も高い強毒株を確立した(Kim et al. 2019)。

こうしてスクリーニングされた強毒株は、シャットネラ属の大量培養で実績のあるシビンを用いた培養法によって実施した。すなわち、250 mL の培養液が入ったシビンにフラスコ培養された *C. antiqua* や *K. mikimotoi* 強毒株を 20~25 mL 接種し、22 度、 $120 \mu \text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、14hL:10hD の明暗条件下で培養を行った。

3) 赤潮プランクトンの強毒株を用いた曝露試験の実施

改良餌料については、通常餌料と同様に体重の 3% となるように 1 日に 1 回給餌して飼育を行った。給餌は曝露試験を実施する前日午前の給餌を最後とし、試験開始前 24 時間は絶食状態とした。今年度はこの絶食期間がどの程度試験結果に影響するのかをみるため、試験当日給餌した試験区と試験開始前 48 時間から絶食させた 3 試験区を同時に曝露試験に供して差異を確認した。

大量培養された *C. antiqua* や *K. mikimotoi* については、目的の細胞密度となるよう GF/C ろ過海水で希釈して試験に使用した。希釈から曝露開始までは 2 時間以上静置して細胞集塊が水面に蟄集するのを確認後、試験魚を投入した。

曝露時間は概ね 6~8 時間とした。実験個体数は、各試験区 5 個体を 1 ターンとして実施した。曝露試験には、尾叉長 50 mm までは容量 10 L の透明バケツを、尾叉長 50 mm 以上では 30L パンライト水槽を用いた。赤潮プランクトンを含む試水を 5.0~15 L 注入し、実験時はバ

ケツの周囲に所内海水もしくはその調温海水 (25 ° C) を掛け流して水温を一定に保った (24 ~ 27 ° C の範囲)。試験中は緩やかな通気を施し、溶存酸素濃度が致死濃度でないことを確認するために溶存酸素計で適宜確認した。

ブリ幼魚は横転後徐々に鰓蓋の動きが弱まり、鰓蓋の動きが停止すると痙攣を引き起こして絶命することから、この痙攣が停止した段階で絶命と判断した。

(3) 結果及び考察

1) 餌料成分を改変された餌の調製

今年度は延命効果の高い餌料 B を中心に試験を実施した。餌料 B の延命効果の変動要因を絞り込むため、2016 年度に作成された餌料 B と 2018 年度の作成された餌料 B (いずれも密封状態で冷凍保存されていたもの) を比較検討した。

2) 試験魚の馴致および培養株の調製

昨年度は改変餌料の給餌中に死亡魚が 30% 以上発生するケースがあったが、今年度試験に用いたブリ稚魚では、死亡魚が多い傾向は認められなかった。また、*Chattonella antiqua* の強毒株と *Karenia mikimotoi* の強毒株についても、引き続きブリ稚魚に対する魚毒性を保持しており、魚毒性の経年劣化については認められていないものの、大量培養時の到達細胞密度はやや低下気味であった。それでも、いずれの種も接種後 7-8 日間で 2×10^4 cells/mL を超える細胞密度まで増殖した。

3) 赤潮プランクトンの強毒株を用いた曝露試験の実施

(絶食の有無がブリ稚魚の生存に与える影響評価: *C. antiqua* 強毒株)

試験の結果について図 1 に示した。試験魚の尾叉長と体重、曝露開始時の *C. antiqua* 細胞密度の情報についても図に示した。過年度までの曝露試験については、曝露試験開始 24 時間前に給餌を止めてから曝露試験を実施していたので、基本的には 24 時間絶食状態で赤潮プランクトンの影響評価を実施していた。そこで、今年度は当日給餌した場合と絶食を 48 時間行った場合の結果を比較した。試験結果を図 1 に示した。当日給餌区については、朝 9 時過ぎに給餌を行い、11 時過ぎから曝露試験を開始している。当日給餌区については、曝露開始 35 分後からへい死がはじまり、1 時間までに 4 尾全数が死亡した。24 時間絶食区については、曝露開始 34 分後から死亡が始まり、2 時間 12 分で 4 尾すべて死亡した。48 時間絶食区については、曝露開始 1 時間 24 分後から死亡が始まり、2 時間 33 分で 4 尾すべて死亡した。

このことから、当日給餌が最も *C. antiqua* 曝露による感受性が高い。魚類を用いた試験系では、できるだけ少量の培養藻体を用いて、曝露試験の感受性を高めたいという意向が働く。その結果として、当日給餌した試験魚を曝露試験に用いることも想定されるものの、当日給餌された試験魚は、曝露試験中に激しく吐水行動を示して摂餌した餌料をほとんど吐いてしまっており、この場合、赤潮プランクトンの形態変化を引き起こしてしまう可能性がある。従って、試験の再現性を保つという意味では、現状の試験前 24 時間前から絶食することが望ましいと考えられる。いずれにしても、赤潮被害軽減を目的とした絶食は、少なくとも赤潮プランクトンに曝露される 48 時間以上前に実施されることが望ましいことが伺える。

過年度までに延命効果のあった餌料 B について、試験毎にその効果に差異が認められていた。餌料 B については、2016 年と 2018 年に作成されたものを用いているが、製造ロットによる差異が認められる可能性もあるので、ロット間の比較を行った。

(改変餌料 7 日間の給餌による影響評価 : *Chattonella antiqua* 強毒株)

曝露試験による生存曲線を図 2 に示した。本試験の曝露開始時の細胞密度は 2,141 cells/mL, 試験に用いたブリの平均尾叉長は対照区で 65.1 mm, 平均体重は 4.0 g, 平均肥満度は対照区で 1.45, 2016 年ロットの餌料 B で 1.43, 2016 年ロットの餌料 B で 1.44 であった。各試験区の供試尾数はすべて 4 尾である。

対照区については、曝露開始 1 時間 26 分後からへい死がはじまり、1 時間 31 分までに 4 尾全数が死亡した。2016 年ロットの餌料 B 区については、曝露開始 1 時間 31 分後からへい死がはじまり、2 時間 5 分までに 4 尾全数が死亡した。2018 年ロットの餌料 B 区については、曝露開始 1 時間 50 分後からへい死がはじまり、2 時間 20 分までに 4 尾全数が死亡した。対照区と比較した場合、2016 年のロットは全滅までの生存時間が 34 分間（対照区の生存時間と比較して 137%）、2018 年のロットで 4 尾目が死亡したのが 49 分間（対照区の生存時間と比較して 153%）遅延していたものの、延命効果はやや軽微であると判断された。

(改変餌料 7 日間の給餌による影響評価 : *Karenia mikimotoi* 強毒株)

曝露試験による生存曲線を図 3 に示した。本試験の曝露開始時の細胞密度は 3,322 cells/mL, 試験に用いたブリの平均尾叉長は対照区で 62.7 mm, 平均体重は 3.8 g, 平均肥満度は 1.53 であった（他試験区は計測なし）。各試験区の供試尾数はすべて 4 尾である。

対照区については、曝露開始 31 分後からへい死がはじまり、1 時間 40 分までに 3 尾が死亡した。しかしながら、残り 1 尾については観察終了となる 6 時間 27 時後まで生存し、そのままオーバーナイトで静置していたが、24 時間後まで生存していた。また 2 つの餌料 B 試験区については、すべての個体が 24 時間後まで生存するなど、顕著な延命効果が認められた。

(改変餌料 3 日間の給餌による影響評価 : *Karenia mikimotoi* 強毒株)

K. mikimotoi 試験区で顕著な延命効果が認められたことから、より赤潮ストレスの高い条件下で試験を実施した。給餌期間を 7 日間から 3 日間へ短縮し、曝露密度を高めた試験結果を図 4 に示した。本試験の曝露開始時の細胞密度は 4,330 cells/mL, 試験に用いたブリの平均尾叉長は対照区で 84.0 mm, 平均体重は 8.2 g, 平均肥満度は 1.38, 2018 年ロットの餌料 B の平均尾叉長は 88.0 mm, 平均体重は 8.7 g, 平均肥満度は 1.28 であった。各試験区の供試尾数はすべて 4 尾である。

対照区については、曝露開始 21 分後からへい死がはじまり、37 分までに全数が死亡した。2018 年ロットの餌料 B 区については、曝露開始 3 時間 22 分後に 1 尾へい死したものの、観察終了時となる 8 時間 0 分までに 3 尾が生存し、そのままオーバーナイトで静置していたが、22 時間後まで生存していた。このように、餌料 B の延命効果について再現性を確認することができた。

過年度までの試験結果から、この餌料 B の延命効果は、*C. antiqua* 曝露下では弱く、*K. mikimotoi* 曝露下で強く発現することが明らかとなった。赤潮プランクトンによる鰓組織の損傷像は原因プランクトンによって大きく異なり (Matsuyama and Oda 2020), その損傷度から、*K. mikimotoi* が最も強く影響を受けているとされる。また、本年の課題番号 2) -イ-④で示された高濃度酸素による救命試験においても、*C. antiqua* に曝露されたブリの稚魚は元の海水に戻されてもへい死することはないものの、*K. mikimotoi* については、曝露時に鰓の著しい鰓の損傷を受けているため、赤潮プランクトンが存在しない元の海水に戻されると、十分な酸素の取り込みができずに窒息死することが分かった。餌料 B が延命効果を示す科学的なメカニズムはまだ明らかとなっていないが、*K. mikimotoi* の曝露によって鰓が損傷する過程で、魚体側の生理特性によって、炎症や組織崩壊の進行が緩やかになっている可能性が示唆された。餌料 B の成分は複数からなり、そのどの成分が赤潮曝露下で延命効果に貢献しているのか明らかにする必要がある。いずれにしても、*K. mikimotoi* で見られた延命効果は絶食による延命効果を遙かに凌ぐものであり、今後赤潮被害軽減のための改良餌料の開発が大きく進展するものと期待される。

引用文献

松山幸彦, 永江 彬, 栗原健夫, 橋本和正, 山田勝雅, 島 康洋, 堀田卓朗, 吉田一範, 西川智, 太田耕平, 松原孝博. 小型魚を用いた曝露試験の確立. 平成 25 年度漁場環境・生物多様性保全総合対策委託事業 赤潮・貧酸素水塊対策推進事業 九州海域での有害赤潮・貧酸素水塊発生機構解明と予察・被害防止等技術開発「有害プランクトンによる魚介類へい死機構解明」報告書, 2014; 平成 26 年 3 月, 4-12.

Daekyung Kim, Li Wencheng, Yukihiro Matsuyama, Kichul Cho, Yasuhiro Yamasaki, Satoshi Takeshita, Kenichi Yamaguchi, Tatsuya Oda. Extremely high level of reactive oxygen species (ROS) production in a newly isolated strain of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *European Journal of Phycology* 54(4), 2019; 632 - 640

Yukihiro Matsuyama, Tatsuya Oda. Toxic effects of harmful algal blooms on finfish and shellfish (In: Konur, O., (Ed.), *Handbook of Algal Science, Technology and Medicine*), Academic Press (in press).