

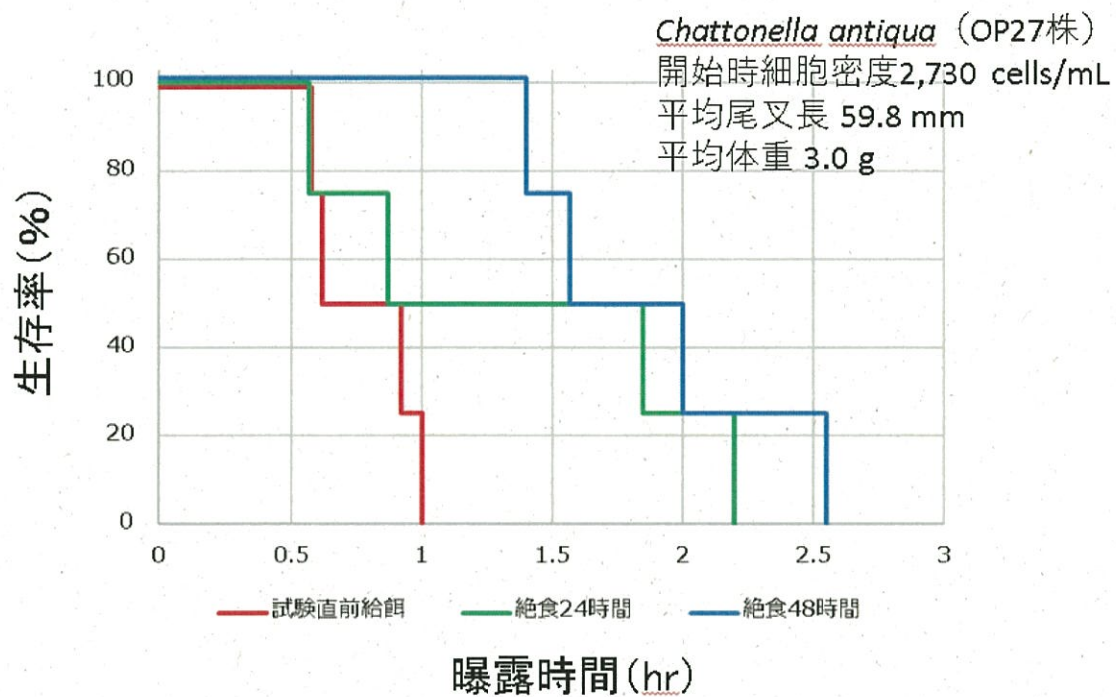


図 1 絶食処理後に *Chattonella antiqua* へ曝露されたブリ稚魚の生存率

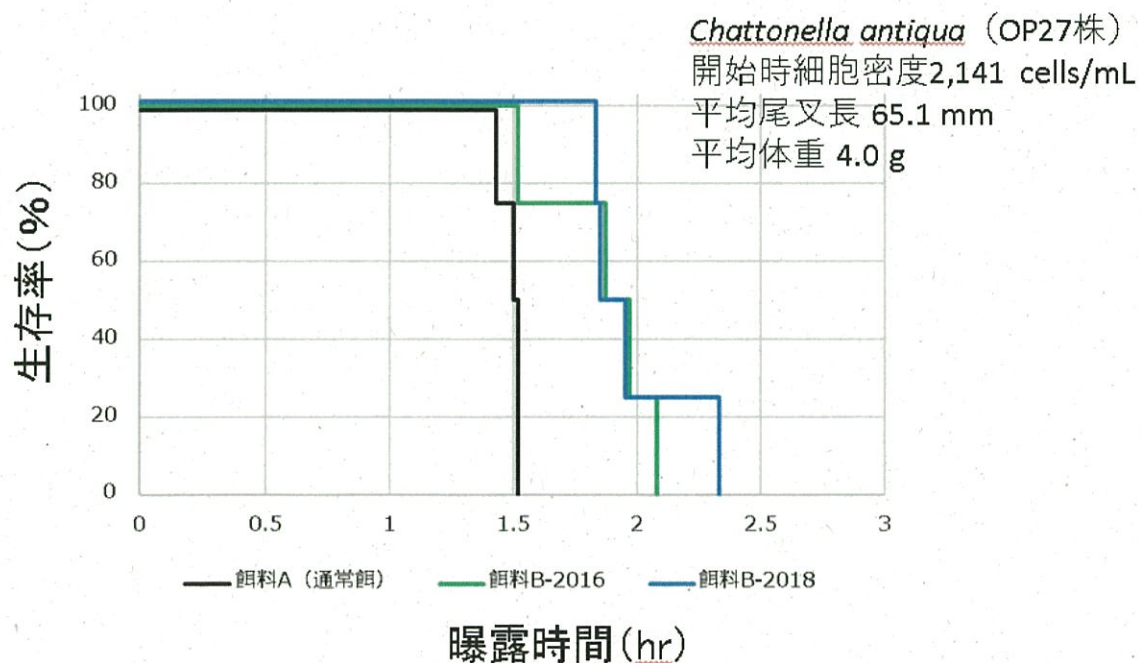


図 2 異なる餌料 B の給餌 (7 日間) がブリ稚魚の生存率に与える影響
 (*Chattonella antiqua* 曝露時)

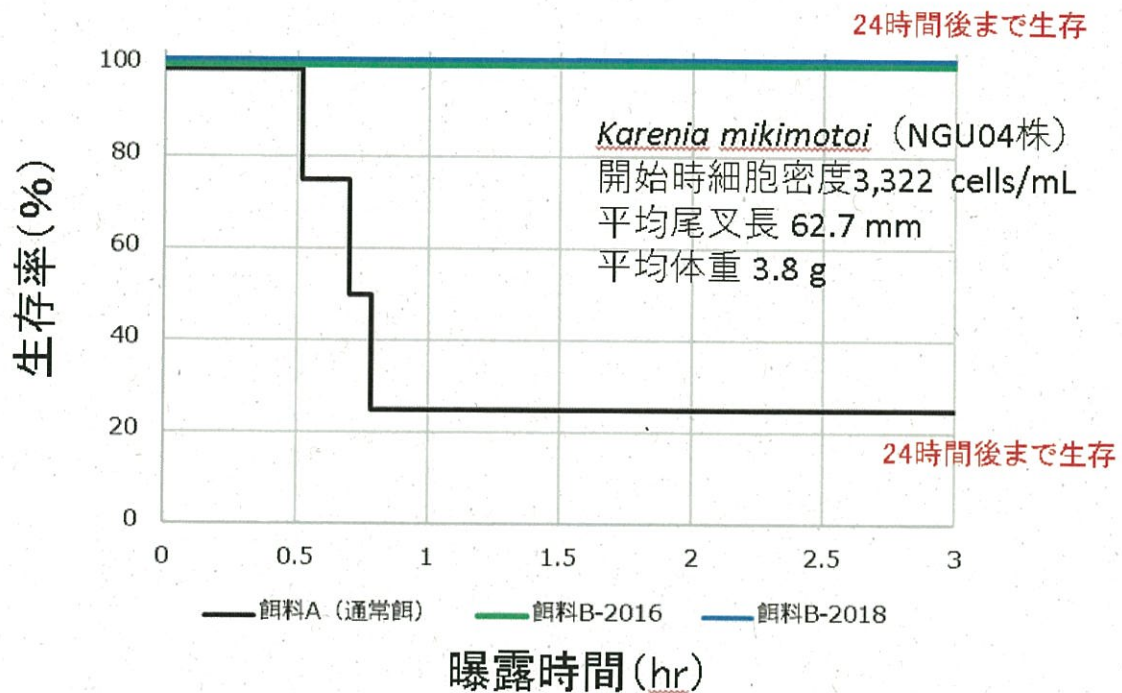


図 3 異なる餌料 B の給餌（7 日間）がブリ稚魚の生存率に与える影響
(*Karenia mikimotoi* 曝露時)

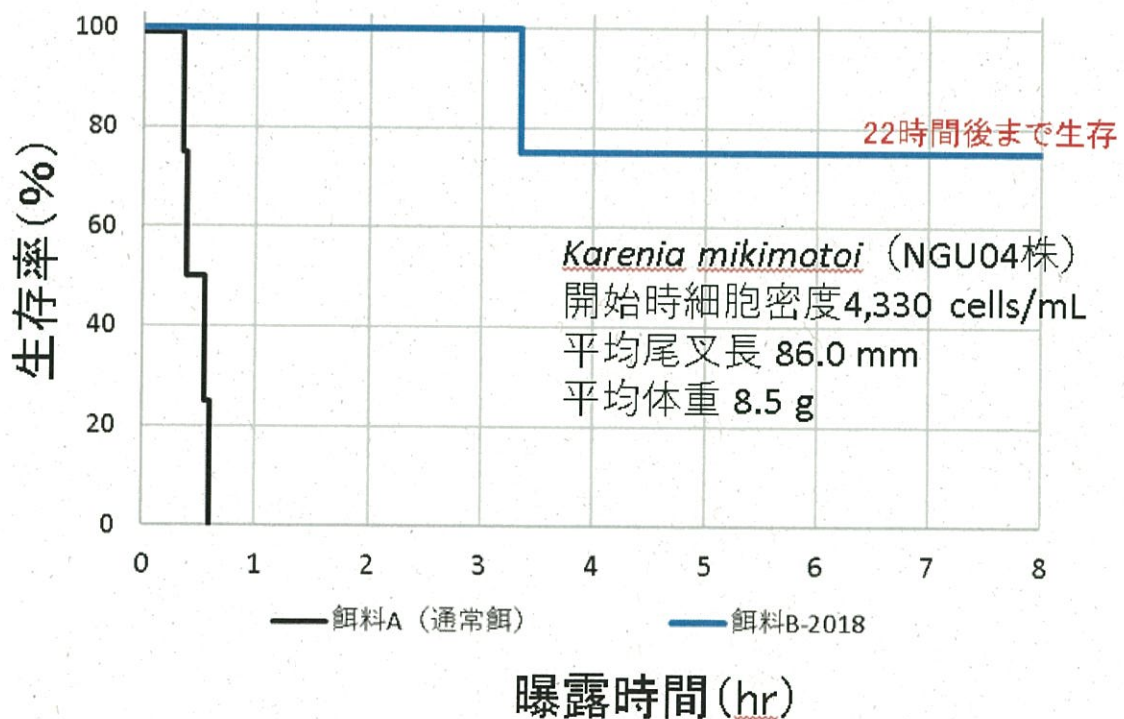


図 4 餌料 B の給餌（3 日間）がブリ稚魚の生存率に与える影響
(*Karenia mikimotoi* 曝露時)

3) 有害赤潮プランクトンのモニタリング技術の開発・実証および普及とデータ利活用の促進

ア. モニタリング技術の開発・実証

水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所

坂本節子, 外丸裕司

広島大学

小池一彦

1 全体計画

(1) 目的

日本沿岸では、これまで赤潮の形成や漁業被害が報告されていなかった新奇有害プランクトンによる漁業被害が発生しており、このようなプランクトンの中には渦鞭毛藻 *Karenia digitata* のように、不定期に発生して漁業被害の原因となってきた種も存在する。しかし、その分布や生態、発生環境、増殖生理特性、毒性などの発生予察の基盤となる情報はほとんど蓄積されていない。その要因として、1) 細胞形態による種同定が難しくモニタリングが困難、2) 発生が不定期であり継続性がないため十分な調査研究がなされていない、3) 原因種の培養株確立や維持が困難で安定した培養条件が把握できていない、など複数の要因が挙げられる。本課題では、*K. digitata* を含む新奇有害プランクトンの分布や生態を把握し、発生リスクを評価する。また、難培養の有害プランクトンについて培養株を確立し、安定して維持培養するための培養条件を明らかにするとともに、安定した培養株が確立できれば基本的な増殖生理特性を室内培養実験で把握し、発生予察に必要な基盤的情報を蓄積する。種同定が困難な種についてはDNAを標的とした分子検出・同定手法を確立・導入する。

また、分子同定手法の一つであるLAMP法については、有害赤潮原因藻 *Karenia mikimotoi* および *Chattonella* 属の検出試薬がキット化され、赤潮モニタリングにおける種判別や低密度時の検出に活用されつつあるが、この技術をさらに生産者レベルまで普及するためには作業の簡便化や細胞密度レベルの判定技術の開発など、改良が必要である。そこで、本課題では既存のLAMP法を用いた現場実証試験等を通して検出技術の現場普及に向けた問題点を抽出し、技術改良点を整理する。

2 平成31年度計画及び結果

(1) 目的

全体計画と同じ

(2) 方法

1) 新奇有害プランクトンに関する情報収集

①広島県東部海域における *K. digitata* のモニタリング

過去に日本や中国で繰り返し漁業被害の原因となっているものの、生態や増殖生理特性が分かっていない *K. digitata* の生態を解明するため、2015年より本種が繰り返し発生している福山沿岸において下記の調査を実施した。

①-1. 月例港調査（4月～継続中）

渦鞭毛藻類 *K. digitata* を対象として広島県福山市沿岸に位置する田島漁港および田尻漁港の2定点（図1）において月1回の海洋調査を実施した。調査は2020年3月まで継続予定だが、本報告書では2019年1～12月までの調査結果を示す。港調査は月1回、可能な限り下旬に実施したが、9月下旬は調査をせず、かわりに10月は1日および31日の2回実施した。また昨年6月にLAMP法にて*K. digitata*が検出されたため、6～7月には月に2～3回、高頻度に調査し、初夏の本種の出現時期の詳細な把握を試みた。各点において、多項目水質計（DS5, Hydrolab または AAQ-RINKO, JFE アドバンテック）を用いた水温、塩分、クロロフィル *a* 蛍光値の鉛直的な測定に加え、水深1 m から海底直上1 (B-1) m までを2 m おきに採水した。採水した試水は、オートアナライザー（SWAAT, BLTEC）による溶存態無機栄養塩濃度（DIN: $\text{NO}_3 + \text{NO}_2 + \text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ）の測定、*K. digitata* を含む植物プランクトン種または属ごとの細胞数計数を行った。また水深1, 3, 5 m の試水を用いてLAMP法を用いた*K. digitata* の検出を以下の手順で実施した。各点、各層の試水を75 μm のふるいにかけて、ろ液100 mL を目合い5 μm のメンブレンフィルター上にろ過した。このフィルターを5% Chelex 入りリン酸緩衝液（PBS）を用いて加熱し、得られたDNA粗抽出液を*K. digitata* のrDNA LSUを標的配列として検出するLAMP法で分析した。なお、地図およびグラフの作成にはOcean Data Viewを使用し（Schlitzer, 2018）、図2～4では2018年4～12月の港調査の結果も含めた。

①-2. 広域調査（2019年1月, 10月）

養殖ノリの収穫期である1月と過去に*K. digitata*が高密度で出現した10月に広域調査を行った。調査は1月31日と10月10日に、図1に示した3定点（St. 2, St. 3, St. 4）にて実施した。各点において3層（1, 3, 10 m）から採水し、船上にて光学顕微鏡下で試料1 mL を検鏡し*K. digitata*の有無を確認した。またLAMP法を用いた*K. digitata*の検出を、月例港調査と同様の手法にて実施した。

2) 現場試料の分析による*K. digitata* 定量PCRの検出・定量性の実証

昨年度に確立した*K. digitata*の定量PCR検出系について、現場試料の定量に使用できることを実証するため、現場試料を分析して検証を行った。2018年9月以降の調査で得られた試料も含め、2019年12月までの調査で得られた以下の現場試料を対象とした：①2018年9月～2019年12月に福山沿岸で実施した月例港調査の採水試料（計93検体）、②2018年12月に*K. digitata*の発生が確認された山口県油谷湾において2019年4～12月に月1回採水した表層海水（0 m）（計9検体）、および③これまで本種の発生が確認されていない広島湾（瀬戸内海区水産研究所浮き桟橋）で2018年10月～2019年12月に月1回、3層（0, 2, B-1 m）で採水した海水試料（計45検体）を用いた。各調査の定点を図1に示す。採水した海水500 mLを目合い3.0 μm のメンブレンフィルターでろ過してプランクトンを回収した。フィルター試料は分析するまでの間、マイクロチューブに入れて-20℃で凍結保存した。フィルター試料に200 μL の5% Chelex PBSを添加し、ベッスルホモジナイザーでホモジナイズした。これを15分間加熱抽出し、抽出液を遠心分離（10,000 rpm, 1 min）して得られた上清をDNA粗抽出液とした。定量PCRにはStepOnePlus（Thermo Fisher Science）とTaqMan Gene Expression Master Mix（Thermo Fisher Science）を用い、通常のプロトコルに従い反応液を調製した。反応液中の

プライマーおよびプローブの終濃度はそれぞれ 0.9 μM および 0.25 μM とした。プライマーおよびプローブは下記の配列で作製した：プライマー Kdi-LSU-MGBF: 5'-TCTGGTCGTCAGTGCTCTCA-3', Kdi-LSU-MGBR: 5'-ACCATTTTGTCATCGTACTTATGTCA-3', プローブ Kdi-LSU-MGBP: 5'-CCTCGGCTCYTCCT-3'。プローブは 5'末端に FAM を標識した Taq-Man MGB プローブとした。PCR 反応はプレヒート 95°C-10 min の後、95°C-15 sec と 60°C-1 min の PCR 反応を 40 サイクルとし、60°C 反応の間に蛍光値を測定した。検量線には *K. digitata* の rDNA LSU D1-D2 領域を増幅した PCR 産物から調製した既知 DNA 濃度標品 ($2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^7$ copies/ μL の間の 4 段階) を用いた。DNA 濃度から細胞数への換算は、昨年度の検討結果で得られた *K. digitata* 1 細胞当たりの推定コピー数 5,500 copies/cell (坂本ら 2019) を用いて算出した。また、福山沿岸より得られた試料については、同じ DNA 試料を *K. digitata* の rDNA LSU を標的配列とした LAMP 法に供し、qPCR の結果と比較した。

(3) 結果及び考察

1) 新奇有害プランクトンに関する情報収集

① 広島県東部海域における *K. digitata* のモニタリング

①-1. 月例港調査 (4 月～継続中)

2019 年 1～12 月の調査期間中、光学顕微鏡下での *K. digitata* の有無を確認したところ、2019 年 6 月 10, 19, 25 日の両港で 1 mL あたり 1 細胞以下で、10 月 1 日の田尻港で 1 mL あたり 4 細胞が確認された。また LAMP 法の結果を図 2 に示した。2019 年 1 月から 2019 年 12 月の 1 年間に於いて、本種は 1 月に検出されたのち一時終息し、6 月までは検出されなかった。7 月 3 日には田島漁港の水深 5 m でのみ本種が検出されたのち一時終息し、10 月 1 日に両港、全水深で検出された。その後 10 月 31 日でも検出されたが 11 月以降は再び検出されなくなった。昨年度のモニタリングでは 6 月末および 9～12 月に検出されており、今年度は昨年度と比べると秋から冬の出現時期が短かった。また二年度分の結果から、初夏は 6～7 月上旬頃に本種が出現することが示唆された。2018, 2019 年の調査結果から、本海域において *K. digitata* は初夏と秋の年 2 回出現し、それ以外の時期にぱったりと出現しなくなる空白の期間があることが示された。この空白期間を本種がどのように生残し、どのようにして再び数を増やすのかは不明であり、今後の課題である。

また、調査期間中の田島漁港、田尻漁港の水温、塩分、クロロフィル *a* 蛍光値、溶存態無機栄養塩濃度 (DIN, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{SiO}_2\text{-Si}$) の鉛直プロファイルを図 3 に示した。水温は 8 月に最も高く、1 月または 2 月に最も低かった。塩分は 7～12 月で比較的 low、2019 年は 2018 年に比べると相対的に塩分が低かった。また水深が浅く近くに芦田川 (図 1) の河口が位置する田尻漁港では、水温も塩分も田島漁港より大きく変動し、低塩分であった。クロロフィル *a* 蛍光値は田尻漁港の方が田島漁港よりも年間を通して値が高く、植物プランクトンが高密度に出現していた。溶存態無機栄養塩濃度 (DIN, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{SiO}_2\text{-Si}$) のうち、DIN と $\text{PO}_4\text{-P}$ は 10, 11 月に高く、 $\text{SiO}_2\text{-Si}$ は 7, 8 月に高かった。

次に、検鏡の結果および図 2 の LAMP 法による *K. digitata* の検出結果と図 3 に示した水質環境の結果とを比較した。*K. digitata* は水温 19.6～26.7 °C の間で検出された。昨年度は 12.0～26.5 °C で検出されており、本種は 27 °C を超える高水温下や 12 °C を下回るような低水温下では出現しにくいことが示された。また本種は塩分 30.4～32.7 psu で検出された。昨年度は 29.6

～30.3 psu で検出されており、兩年度の結果を合わせると塩分 29.6～32.7 psu で出現した。さらにクロロフィル *a* 蛍光値と本種の検出結果を比較すると、田島漁港ではクロロフィル *a* 蛍光値が検出限界以下～8.49、田尻漁港では 3.09～58.3 と、クロロフィル *a* 蛍光値が低いときにも高いときにも本種は検出された。これは昨年度の結果と一致する。また栄養塩濃度と *K. digitata* の検出結果を比較した。田島漁港、田尻漁港両港において、DIN と PO₄-P の濃度が高い 10 月に検出された一方で、同様に栄養塩濃度が高い 8 月や 11 月には検出されず、栄養塩濃度と本種の出現に明確な傾向は認められなかった。ただし、本海域においてこれまで赤潮の形成と漁業被害が報告されているのは 10～11 月であり (Yang et al. 2000, 岩野 2017)、昨年度もこの時期に広域で本種が出現したことから、比較的栄養塩が豊富な時期に多く出現している可能性はあると考えられる。また図 4 は珪藻類と非珪藻類 (渦鞭毛藻類, ラフィド藻類など) の鉛直分布を示している。*K. digitata* が検出されたときに多く出現していた他の植物プランクトンは、珪藻類 *Skeletonema* 属, *Pseudo-nitzschia* 属, 渦鞭毛藻類 *Prorocentrum shikokuense*, *Prorocentrum triestinum*, *Alexandrium* 属など様々で、他の植物プランクトンが低密度な時期にも高密度な時期にも検出された。よって昨年度と同様に本種と他の植物プランクトンとの競合関係については明確な考察が得られなかった。

①-2. 広域調査 (10 月)

光学顕微鏡下での検鏡では 2019 年 1 月、10 月ともに *K. digitata* は確認できなかった。LAMP 法による検出では、1 月は全点で非検出、10 月の調査では St. 2 の全水深、St. 3 の 1 m、および 3 m で検出された。昨年 10 月、および 11 月に実施した広域調査では LAMP 法により全点・全水深で本種が検出されており、今年度の調査を合わせると、秋には漁港内だけでなく福山市沖の広い範囲で本種が出現していることが示された。

2) 現場試料の分析による *K. digitata* 定量 PCR の検出・定量の実証

定量 PCR 法により複数の海水試料から *K. digitata* の遺伝子を検出した。福山沿岸の田尻漁港では 2018 年 10 月～2019 年 1 月および 2019 年 9～12 月に *K. digitata* が 0.06～56 cells/L の密度で検出され、田島漁港では 2018 年 10 月～2019 年 1 月および 2019 年 9～11 月に 4.2～1500 cells/L の密度で検出された (図 5)。両漁港ともに秋季の試料にのみ *K. digitata* が検出され、検鏡で *K. digitata* が確認された 6 月の試料からは定量 PCR では検出されなかった。このことから、2019 年 6 月に検鏡で観察された *K. digitata* の一部は誤認である可能性もある。また、同じ DNA 抽出試料を LAMP 法で分析した結果、LAMP 法で検出されたが定量 PCR では検出されなかった試料が 2 検体 (2018 年 10 月 31 日の田尻漁港 2 m、および 2019 年 6 月 25 日の田島漁港 3 m)、LAMP 法で検出されなかったが定量 PCR で検出された試料が 1 検体 (2019 年 1 月 23 日の田尻漁港 3 m) あった。これら 3 検体以外の試料 (97%) は、LAMP 法と定量 PCR とで検出・非検出が一致した。結果が一致しなかった 3 検体についてはその要因を検討する必要がある。

定量 PCR の結果から、調査の間、福山沿岸の定点では *K. digitata* の細胞密度は低密度であったことが明らかとなった。また、田尻漁港よりも田島漁港の方が本種の発生密度が高いこと、2019 年は 2018 年よりも発生密度が低かったことがわかった (図 5)。定量 PCR では低密度でも高感度に検出が可能であり、本種の量的な動態を把握することが可能であることが確

認された。*K. digitata* は小型で細胞形態による判別も難しいことから、定量 PCR 法を活用することにより、詳細な本種の発生動態を把握することが可能になると思われる。

K. digitata は広島湾および油谷湾の海水試料からも低密度ながら検出された (図 6, 7)。広島湾では 2018 年および 2019 年の 10~11 月に 0.25~29 cells/L の密度で *K. digitata* が検出された。検鏡による確認はできていないが、広島湾にも本種が存在していることが初めて確認された。また、2 年連続して同じ月に出現が認められたことから、本海域でも福山沿岸同様、発生の周期性が疑われる。一方、油谷湾でも 2019 年 6 月および 8 月に 0.11~0.96 cells/L の極低密度で *K. digitata* が検出された。本海域では夏季に本種が出現し、秋季には出現していない点で、瀬戸内海とは異なった。

これまでも山口県沿岸では本種の出現が複数報告されているが、高密度化した時期は 5~6 月が多い (馬場ら 1997, 岩野 2017)。一方、福山沿岸では過去の報告 (岩野 2017) や我々の調査から、本種の高密度発生が 9~11 月に確認されている。このように本種の発生には周期性、季節性があることが示唆される。一方で、海域による秋発生型と初夏発生型があり、その違いがどのような要因に基づくか、大規模発生に至る要因は何か、といった点についてはいまだ不明であり、今後の課題として残されている。これらの問題を解明するためにはさらなる調査が必要であろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、山口県油谷湾での調査海水をご提供いただいた山口県水産研究センター外海研究部・木原浩志氏、南部智秀氏、および広島湾での採水にご協力いただいた県立広島大学・内藤佳奈子氏に厚く御礼申し上げる。

引用文献

- 馬場俊典, 吉岡貞範, 矢尾宏志, 白木信彦. 1995 年初夏下関漁港内に発生した有害渦鞭毛藻 *Gymnodinium* sp. の赤潮と漁業被害. 山口県内海水産試験場報告 1997; 26: 42-47.
- 岩野英樹. 2014 年夏季に周防灘大分県海域で確認された有害渦鞭毛藻 *Karenia digitata* の出現時の環境特性と魚貝類への影響. 大分県農林水検セ研報 (水産) 2017; 6: 67-78.
- 坂本節子, 外丸裕司, 小池一彦. 3) 有害赤潮プランクトンのモニタリング技術の開発・実証および普及とデータ利活用の促進 ① モニタリング技術の開発・実証, 平成 30 年度漁場環境・改善推進事業「赤潮被害防止対策技術の開発」報告書, 赤潮共同研究機関, 水産庁, 東京. 2019; 317-325.
- Schlitzer, R. Ocean Data View. 2018: <https://odv.awi.de>.
- Yang ZB, Takayama H, Matsuoka K, Hodgkiss IJ. *Karenia digitata* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new harmful algal bloom species from coastal waters of west Japan and Hong Kong. *Phycologia*, 2000; 39: 463-470.

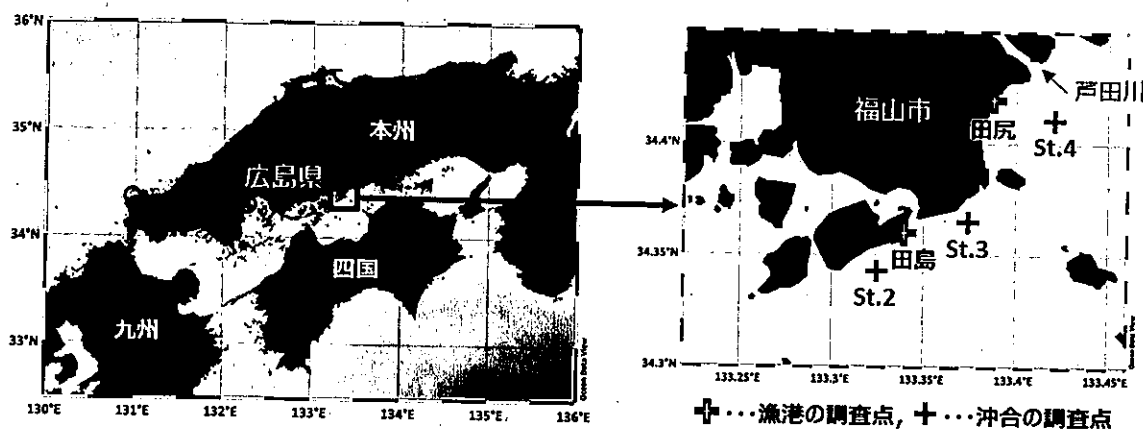


図1. 瀬戸内海（左図）と調査海域（右図）。右図には、港調査の調査点（田島漁港，田尻漁港）と広域調査の調査点（St. 2, St. 3, St. 4）。○は定量PCRによる *K. digitata* 出現動態調査実施定点。

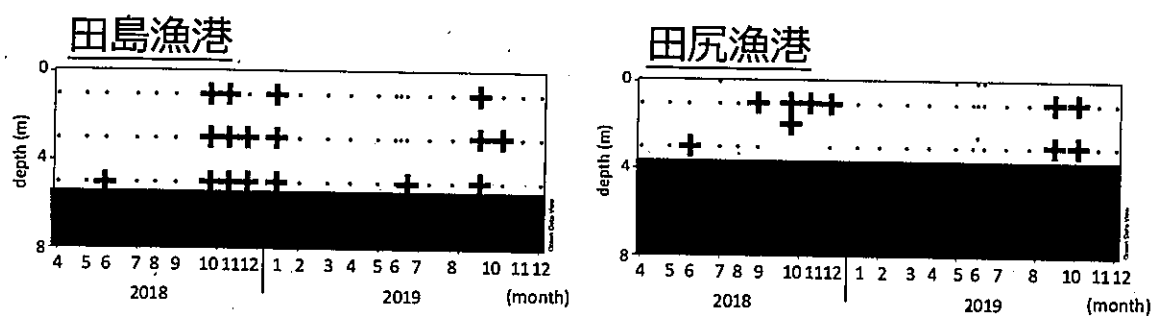


図2. 2018年4月24日から2019年12月18日までの田島漁港（左）および田尻漁港（右）における *K. digitata* 検出LAMP法の結果（+は検出あり）。

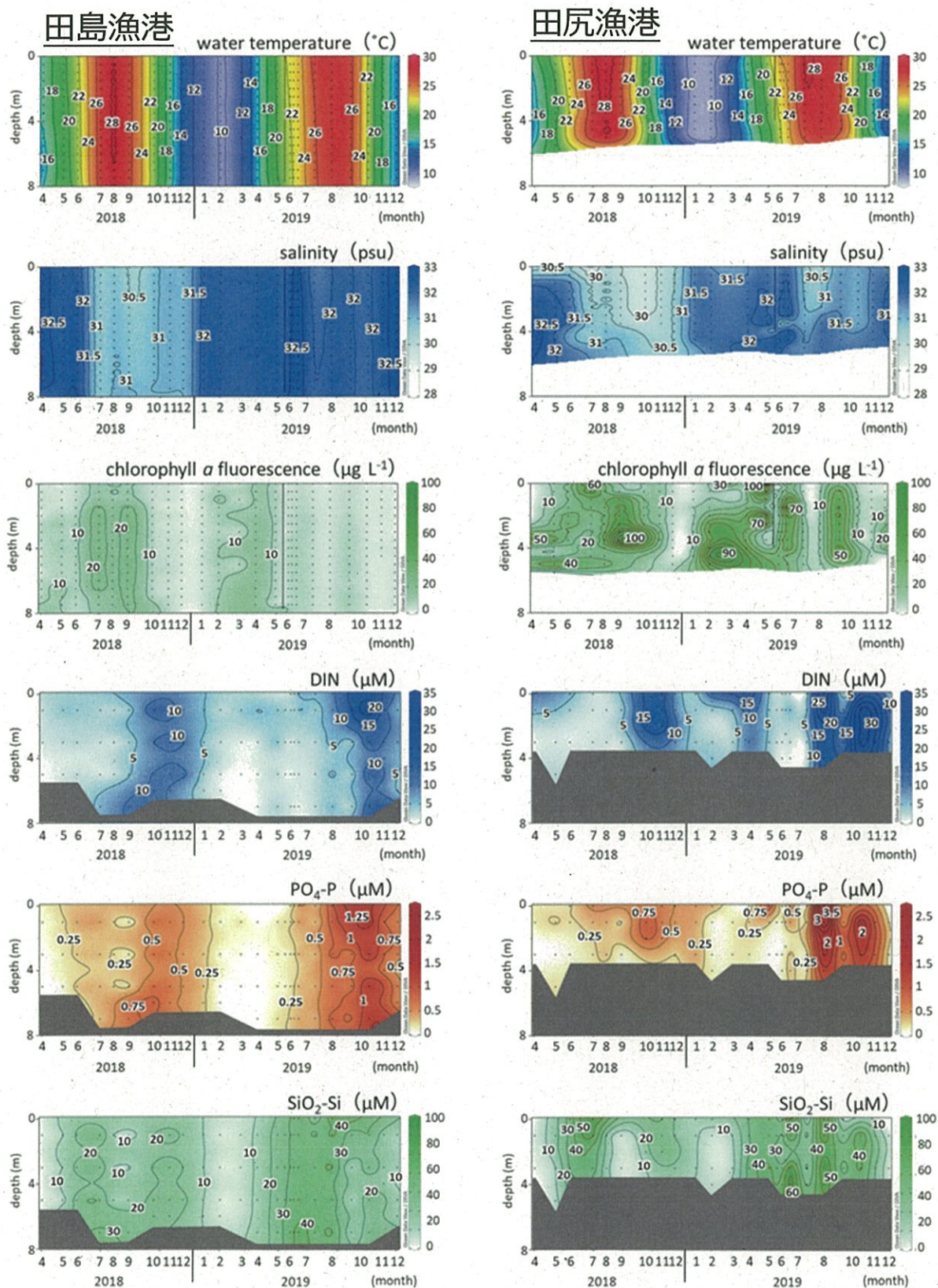


図 3. 2018 年 4 月 24 日から 2019 年 12 月 18 日までの田島漁港（左）および田尻漁港（右）における水温，塩分，クロロフィル *a* 蛍光値，溶存態無機栄養塩濃度（DIN，PO₄-P，SiO₂-Si）の鉛直プロファイル。

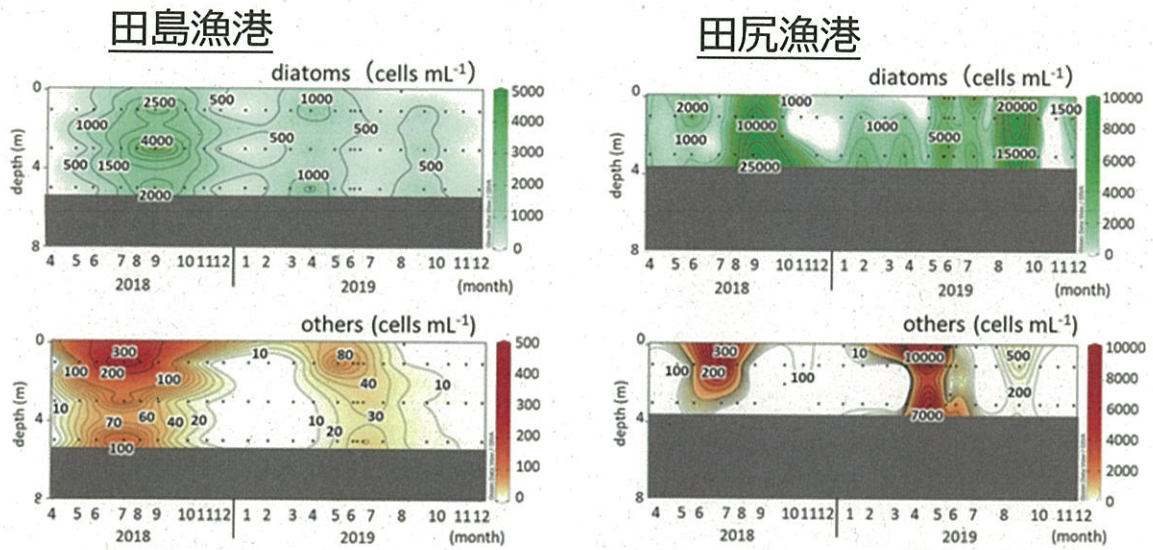


図4. 2018年4月24日から2019年12月18日までの田島漁港（左）および田尻漁港（右）における珪藻類（diatoms, 緑）および非珪藻類（others, 赤）の鉛直分布. 両港でスケールが異なる.

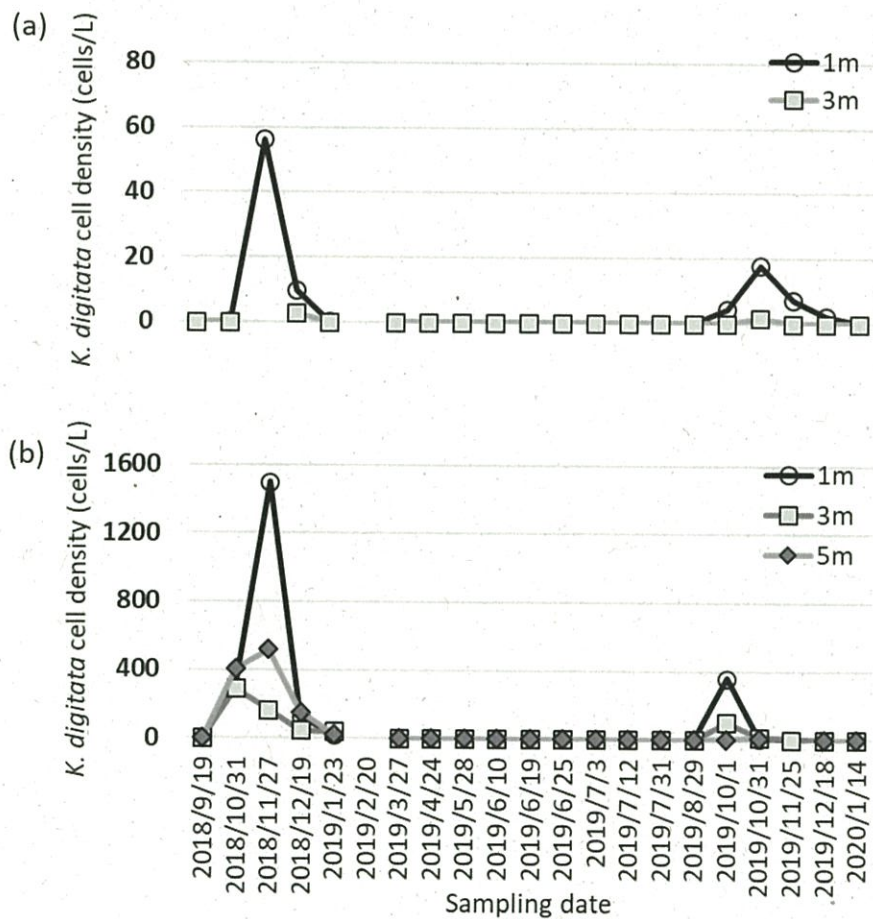


図5. 定量PCRにより得られた福山市沿岸の *K. digitata* の細胞密度の季節変化. (a) 田尻漁港, (b) 田島漁港.

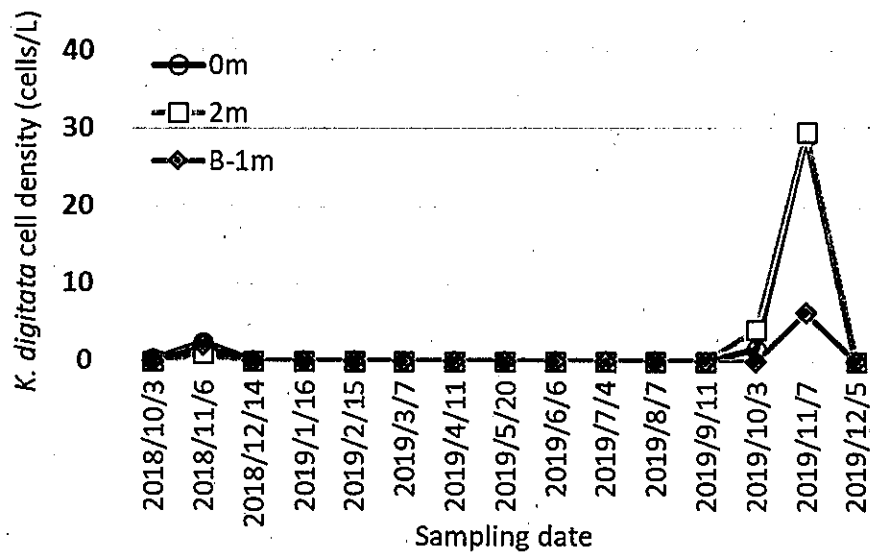


図 6. 定量 PCR により得られた広島湾における *K. digitata* の細胞密度の季節変化.

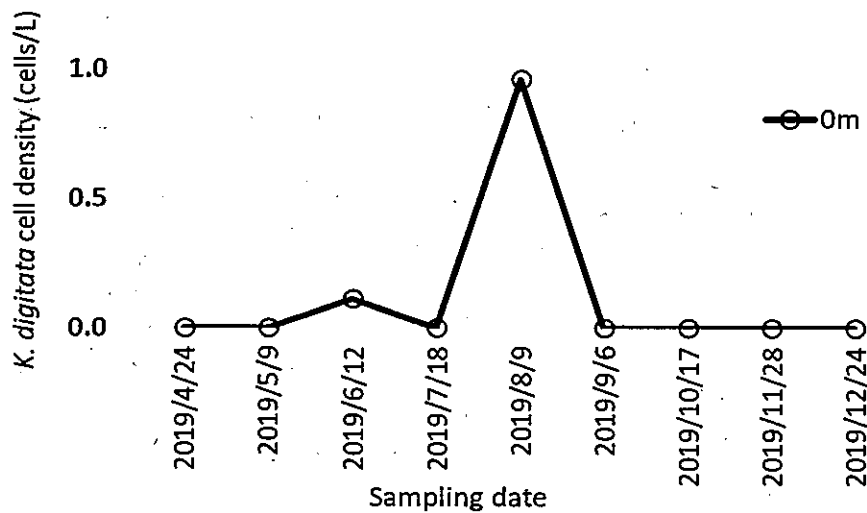


図 7. 定量 PCR により得られた油谷湾における *K. digitata* の細胞密度の季節変化.

3) 有害赤潮プランクトンのモニタリング技術の開発・実証および普及とデータ利活用 の促進

イ. 赤潮関連情報の提供および利活用の促進

水産研究・教育機構 西海区水産研究所

徳永貴久・岡村和麿・木元克則

水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所

持田和彦・鬼塚 剛

いであ(株)

水谷眞智子

(株) アイコック

山田実夫・一橋和子・前田亜貴子

1 全体計画

(1) 目的

近年、豊後水道など西日本の沿岸域（離島のマクロ養殖場を含む）において *Karenia* 等鞭毛藻による有害赤潮が頻発しており、有害赤潮による漁業被害の防止・軽減、及び有害赤潮の迅速な把握と予察のため、水温、塩分等の連続観測データ及び有害赤潮プランクトンの細胞数等の観測データの情報収集と迅速な提供が求められている。

本課題では、有害赤潮プランクトンによる漁業被害の防止・軽減、有害赤潮の迅速な把握と予察のため、漁業者や全国の都道府県等の行政担当者、試験研究機関の担当者及び広く一般に向けて、1)水質や赤潮原因プランクトンの細胞密度等の観測情報を迅速に収集するとともに、情報を提供することを目的とする。また、2)自動観測ブイネットワークによる広域的な水温等のリアルタイム情報の収集及び提供を継続して実施するとともに、自動観測ブイで測定された水温情報をもとにした「水温予報」の運用と予報精度の検証に取り組む。

上記の目的のために、本課題では以下のことを行う。

【サブテーマ①】「赤潮分布情報」の運用と改良

瀬戸内海及び九州西岸海域を対象に「赤潮分布情報」を運用して、最新の水温、塩分、有害赤潮プランクトンの細胞密度等の観測データを多数の提供者より収集してデータベース化し、一般向けに分かりやすく迅速に提供するとともに、「赤潮分布情報」の利活用を促進するためにシステムを改良する。

【サブテーマ②】瀬戸内海・有明海の水温速報と水温予報

瀬戸内海、有明海等の複数の定点を対象に、自動観測ブイ等の水温データを迅速に収集すると共に、水温予報についても提供を行う。また、実施した水温予報の精度を検証する。

2 平成31年度計画及び結果

(1) 目的

全体計画と同じ。

(2) 試験等の方法

1) 「赤潮分布情報」の運用と改良

最新の水温、塩分、有害赤潮プランクトンの細胞密度等の観測データを多数の提供者より収集してデータベース化し、一般向けに分かりやすく迅速に提供するため、平成 25 年度より開発し、九州西岸海域及び瀬戸内海域を対象に運用してきた「赤潮分布情報」を継続して運用した。また、システムの利活用を推進するために、スマートフォン用のユーザーインターフェースを改良した。

2) 瀬戸内海・有明海等の水温速報と水温予報

広域的な情報提供及び水温予報の基礎データの収集・蓄積を目的として、瀬戸内海域、有明海及び八代海の関係機関が管理・運営する自動観測ブイ等から観測データを収集し、ウェブサイトを通じて、水温・塩分等の観測情報をリアルタイムで提供した。また、各機関より提供された観測データを基に、データベースを構築し、データ提供機関とデータの共有を図った。また、漁業や養殖業の生産管理に向けた情報提供を目的として、気象庁の観測データ（アメダスデータ等）、気象予報データ等を入手するとともに、自動観測ブイ等の観測情報を入手し、水温の 1 週間予報もしくは 2 週間予報を行った。予報情報は、利用者の利便性を考慮し、ウェブサイトにより提供した。また、水温予報の精度を検証した。

(3) 結果及び考察

1) 「赤潮分布情報」の運用と改良

①「赤潮ネット（沿岸海域水質・赤潮観測情報）」

平成 27 年 6 月に開設した「沿岸海域水質・赤潮観測情報ポータルサイト」の名称を平成 30 年 2 月に「赤潮ネット（沿岸海域水質・赤潮観測情報）」に、「沿岸海域水質・赤潮分布情報」の名称を「赤潮分布情報」に改め、引き続き運用した（図 1）。

なお、「赤潮ネット」では、「水温速報」、「水温予報」、「赤潮分布情報」の他、「貧酸素情報」、「公共用水域水質調査情報」等の関係サイトが運用されており、赤潮及び環境データが迅速に収集、公表され、多岐にわたる情報を収集・公表する体制が整備、運用されている。

「赤潮ネット」の下部サイトの概要を表 1 に示す。

②「赤潮分布情報」の運用

ア. 「赤潮分布情報」の運用

「赤潮分布情報」は、平成 28 年度に「赤潮情報」の適用範囲を瀬戸内海東部及び周辺海域に拡張したことにより、九州西岸域や瀬戸内海域及び周辺海域における関係県や市の機関、漁業協同組合、大学、及び水産研究・教育機構などから水質や有害赤潮等の分布情報を迅速に収集し、公表することができるようになった。

「赤潮分布情報」の主な機能を表 2 に示す。

令和元年夏季には、伊万里湾及び豊後水道などの海域で、有害赤潮原因プランクトンの一種のカレニア ミキモトイによる赤潮が発生した。また、八代海ではシャットネラ属プランクトンの赤潮が発生したが、いずれも大規模な漁業被害は発生しなかった。関係機関の的確な観測と、「赤潮分布情報」等を用いた調査結果の迅速な公表が被害発生軽減に寄与したと思われる。