

加茂湖漁協等現場関係者と勉強会を開き、現場で試験を実施することを検討し決定した。7月2日の定期観測ではヘテロカプサの増殖が認められ、7月16日の調査においても増殖が見られた。7月は底層の貧酸素化が進み、好天、微風など湖内が安定しており、ヘテロカプサの増殖に好適な条件が揃っていたため、高密度化が予想された。昨年度に愛知県水産試験場で実施した天然のヘテロカプサ赤潮海水を用いた底質散布試験の結果より、低密度期に底質を散布するとその後のヘテロカプサの増殖が抑えられることが示唆されたことから、今年度の試験は、低密度期に底質散布を開始することとした。さらに、昨年度までの成果より、加茂湖では HcRNAV 感染タイプの季節変動が認められたため、調査期間中 7~10 月に月に一度の間隔で 3 回底質散布を実施した。散布地点は、10 年間の調査から得られた結果より、毎年のヘテロカプサ初期発生域である St.6 (湖奥)、毎年の調査定点である St.2 (湖央)、加茂湖の中で流れなどにより毎年赤潮後期にヘテロカプサが集積する St.7 とした。底質は、一回に約 1.5 kg ずつ散布した。底質は比重が高めで、流し入れる際、ゆっくり沈みながら分散した。底質の分散については、別途試験が必要である。加茂湖の面積は、約 23 km² であり、今回投入した底質は、1 回に約 5 kg (約 1.5 kg×3 定点) である。散布する底質に含まれる HcRNAV の密度は、 2.4×10^5 copies/g であり、総量約 10^8 個の HcRNAV が、一回の散布によって撒かれたことになる。近年、加茂湖においてヘテロカプサは、初夏 (6~7 月頃) の初認から低密度で推移し、秋 (9~10 月) のブルーム形成に続く傾向だが、今年度は、7 月中旬から 8 月上旬にかけてブルームを形成し、その後一旦終息、初秋 9 月 18 日に再び増殖し始めたが、高密度化することなく終息した。6 月上旬には、加茂湖に HcRNAV が低密度に存在していたため、底質散布より供給された HcRNAV とともにヘテロカプサの密度減少に貢献したことが推察できる。一方で、現場での散布試験では、対照区を設けることが極めて困難であり、ヘテロカプサの減少における底質散布の効果を評価することは難しい。しかしながら、2019 年のヘテロカプサの発生状況や HcRNAV の密度、ウイルスの特性や過去の知見などをもとに、今年度の底質散布効果について考察を試みた。

6 月上旬にヘテロカプサの初認があり、7 月上旬からヘテロカプサが増え始め、7 月中旬から 8 月上旬に掛けてブルームを形成した。第 1 回底質散布は 7 月 30 日に行われた。同日の最高細胞密度は St.2 (湖央) の 760 cells/mL であり、底質は同地点を含む湖内 3 カ所に撒かれた。この日加茂湖内のヘテロカプサは、St.2 の 6 m 層に集積しており、底質散布によるウイルス感染には好適であったと考えられる。その後ヘテロカプサは増殖することなく一週間程度細胞密度を維持したが徐々に減少し、8 月 16 日の 2 回目の底質散布以降急激に減少し、ヘテロカプサは一旦終息した。このとき、湖水には十分な HcRNAV が存在し、特に底質中の HcRNAV は増加し高密度に存在した。初秋 9 月 10 日頃に湖奥で再びヘテロカプサが低密度で検出され、徐々に増加し、9 月 18 日の調査では全域で検出されたが (St.2 最高細胞密度 112 cells/mL)、高密度化することなく、終息に向かった。このとき、湖水中には十分な密度の HcRNAV が存在していたこと、湖水が濁っていたため、9 月中旬の台風の影響による強風によって湖水が攪拌され、HcRNAV を高密度に含んだ底質表層が巻き上がったことも、ヘテロカプサ密度減少の一要因として考えられるかもしれない。9 月 25 日 3 回目の底質接種以降、ヘテロカプサは高密度化することなく完全に終息した。10-11 月の底質には高密度の HcRNAV が蓄積された (図 3, 4, 6)。

対照区を設定することが難しく、厳密な効果を評価することは困難であるが、自然界に存

在する HcRNAV や環境因子、ウイルスの特性を考慮して底質を散布することによって、より効果的且つ効率的な散布法に改善できるものと考えている。散布された底質の量は、加茂湖面積に対して非常に少ないが、ウイルスは感染して増えながら拡散するので、底質をヘテロカプサが低密度の段階で初期発生域や集積箇所に撒き、数回に分けて散布することが重要である。これより、HcRNAV のヘテロカプサへの遭遇率の向上や、早期段階におけるヘテロカプサ増殖の抑制が促進されることが期待できるとともに、加茂湖内に HcRNAV を恒常的に存在させることによって、ヘテロカプサ終息の促進や高密度化の抑制に繋がると考えられる。

3) ヘテロカプサウイルス HcRNAV の多様性に関する研究

<NGS 解析による HcRNAV 多様性の変化およびサブクローニングによる結果との比較>

これまでの多様性に関する調査は、分離した HcRNAV をいくつかの感染型のヘテロカプサ培養株に感染させることで評価してきたが、それは培養株に感染可能な範囲でのグループ分けに限られていた。続いて、分離した HcRNAV の変化領域を標的にした系統解析や野外試料から直接全 RNA を抽出しサブクローニングを介した系統解析など、より解像度の高い解析を行ってきた。その結果は、加茂湖では、過去 5 年の間に、UA2 型に分布する配列が圧倒的に多く得られるようになった。そのため、昨年度、経時的に試料を採取し、HcRNAV の多様化について調査した。2018 年における加茂湖のヘテロカプサ非発生時期(7月10日)、低密度期(8月21日)、赤潮開始時期(10月16日)、赤潮終息期(11月6日)、および三河湾の赤潮発生時期(8月9日)に採取された底泥試料から、直接 RNA を抽出したのち、サブクローニングにより、系統解析を行ったところ、7月10日、8月21日、11月6日に得られたクローンは全て UA2 型に分布し、10月16日に得られたものは全て CY に分布した(図 7)。すなわち、ヘテロカプサ非発生時期、低密度期には UA2 型が優占し、赤潮発生期には CY 型が出現し、衰退後に再び UA2 型が優占する結果が得られた。この傾向は、2016 年に加茂湖で得られた結果と同様であった。したがって、加茂湖では UA2 あるいは UA2 派生型が主体であること、時期によって CY 型が優占することが明らかになった。これまで、HcRNAV は、感染交差試験により大きく 3 つの感染型(UA1, UA2, CY グループ)に分けられることが知られており、それらは遺伝子解析の結果とほぼ一致していた(Nakayama et al. 2013)。したがって、UA2 型の感染範囲の拡大に加え UA2 型に感染されやすいタイプのヘテロカプサが優占するようになってきていると考えられた。また、愛知県三河湾から得られた HcRNAV クローンの解析結果は、ヘテロカプサや HcRNAV が地域によって異なる感染型を有することを示した。

今年度行った次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディング解析の結果は、加茂湖の HcRNAV は UA2 型が主体であるという点でクローンライブラリーの結果と概ね一致した(表 2)。試料は、加茂湖の赤潮開始時期(2018 年 10 月 16 日)、三河湾の赤潮発生時期(2018 年 8 月 9 日)を用いた。両試料とも、リード数に対して OTU 数は非常に少なかった。加茂湖は、リード数 43,323 に対し OTU の数はわずか 3OTU (OTU1 ; 84%, OTU2 ; 3%, OTU3 ; 13%)であった。リード数全体の 87%を占めた OTU1 および 2 は、UA2 型の HcRNAV と高い相同性を示し(96.2 - 99.6%), OTU3 は CY 型と相同性が高く(98.6 %), 全体の 13%であった。すなわち、NGS 解析による結果も、加茂湖に存在する HcRNAV は UA2 が主体になってき

ていることを示した。一方、三河湾の試料は、リード数 29,416 に対して OTU の数は 5 OTU (OTU1 ; 42%, OTU2 ; 30%, OTU3 ; 12%, OTU4 ; 13%, OTU23 ; 2%, others ; 1%)であった。リード数全体の 85% (OTU1, OTU2, OTU4) が UA2 型の HcRNAV に、15%が CY に近縁であった。したがって、三河湾の HcRNAV も UA2 型が主体であると考えられた。しかしながら、三河湾の OTU4 や OTU23 は、UA2 型や CY 型に近縁でありながらも、加茂湖のそれらとは異なり、また、相同性も低いことから (92.5~95.9%), 新規の系統グループに属するものと示唆された。サブクローニングより得られた系統樹の結果と同様に、三河湾から得られたクラスターは、加茂湖とは異なるクラスターを形成するなど概ね一致した。いずれの解析結果でも UA-1 クラスターに入る配列は得られなかった。

これまでの、感染交差試験、サブクローニング、NGS による網羅的解析の結果、加茂湖や三河湾における HcRNAV は UA2 型が主体になってきている傾向があり、ヘテロカプサの発生時期や発生場所によっても異なる感染型の HcRNAV が存在する可能性が見出された。一方で、HcRNAV は一本鎖 RNA ウイルスであり、最も変異することが知られており、HcRNAV の配列は今後限りなく多様化して行くことが予想された。しかしながら、NGS による網羅解析より、一般的には、本法では非常に多くの OTU が得られることが想定されるが、本結果では 3~5 OTU しか得られなかったことから、HcRNAV はある規則性をもって多様化していることが推察された。いくつかの研究は、一本鎖 RNA ウイルスは、一つの遺伝子型からなるのではなく、準種と呼ばれるごく似通った塩基配列をもつ個体の集団として、宿主に感染し変異しながら、種を存続していることを提案している (Vlok et al. 2019)。特に、Vignuzzi et al. (2006) らは数理モデル解析を行い、ウイルス準種集団は単なる多様な突然変異体の集団ではなく、相互作用する変異型個体の一群であり、すなわち、宿主との相互作用の結果変異した個体の集まりがその種を特徴付けていると報告している。これより、HcRNAV 個体群は、HcRNAV 個体がヘテロカプサ個体に感染しながら変異する集団であり、すなわち、HcRNAV の感染多様性は、共存する宿主ヘテロカプサとの感染に密接に関わっており、その地域特有の個体群として存続および進化し続けていると推察できる。これらの考察と過去の結果より明らかにされてきた HcRNAV の 3 グループの知見より (Nakayama et al. 2013), HcRNAV は 3 つ程の感染グループに大別され、その中で、宿主との相互作用の結果生じる変異と突然変異を繰り返しながら多様化し、個体群として感染性を維持しながら、進化していると考えられる。

まとめ

ヘテロカプサ防除法の開発および被害軽減に向けて、今年度は大きく 3 つの成果が得られた。①2016 年に開発したリアルタイム PCR 装置を用いた HcRNAV の定量法を野外の調査や野外試験でも利用可能となった。②底質散布を加茂湖で実施したところ、2019 年はヘテロカプサが高密度化することなく、終息した。ヘテロカプサや HcRNAV の密度推移、ウイルスの特性や環境因子等から、底質散布の効果を評価した。底質散布については、散布された底質の量は、加茂湖面積に対して非常に少ないが、ウイルスは感染して増えながら拡散するので、底質をヘテロカプサが低密度の段階で初期発生域や集積箇所に撒き、数回に分けて散布することが重要であると評価した。そのため、HcRNAV のヘテロカプサへの遭遇率の向上や、早期段階におけるヘテロカプサ増殖の抑制が促進されることが期待できるとともに、

加茂湖内に HcRNAV を恒常的に存在させることによって、ヘテロカプサ終息の促進や高密度化の抑制に繋がると考えられた。

③多様性評価について、NGS 解析による HcRNAV 多様性の変化およびサブクローニングによる結果との比較を行ったところ、加茂湖や三河湾における HcRNAV は UA2 型が主体で、その中でも時期や地域によって異なるクラスターで分布することが明らかになった。すなわち、HcRNAV は 3 つの感染グループに大別され、その中で、宿主との相互作用の結果生じる変異や突然変異を繰り返しながら多様化し、個体群として感染性を維持しながら、進化していると考えられる。これらの結果より、本防除対策に用いる底質を採取する時期や場所を特定し、散布する時期や場所を選定することにより、より効果的かつ効率的な防除対策に繋がるものと考えられる。

謝辞

本研究の実施にあたり、現場調査および現場試験にご協力いただきました、新潟県佐渡水産技術センター、加茂湖漁業協同組合、佐渡市農林水産課、新潟県水産課、新潟県佐渡地域振興局水産庁舎の皆様、赤潮に関する情報提供及び現場調査にご協力いただきました愛知県水産試験場や三重県水産研究所の関係者の方々に深くお礼申し上げます。

引用文献

- Nakayama N, Fujimoto A, Kawami H, Tomaru Y, Hata N, Nagasaki K. High interaction variability of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* strains and their single-stranded RNA virus HcRNAV isolates. *Microbes Environ.* 2013; 28: 112-119.
- Nakayama N, Hamaguchi M. Multiplex reverse transcription quantitative PCR detection of a single-stranded RNA virus HcRNAV infecting the bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 2016; 14: 370-380.
- Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. 2006 *Nature* vol. 439, 344-348.
- Volk M, Lang AS, Suttle CA 2019 Marine RNA Virus Quasispecies Are Distributed throughout the Oceans 2006 *Appl. Environ. Sci.* vol. 4, 1-18.

a)

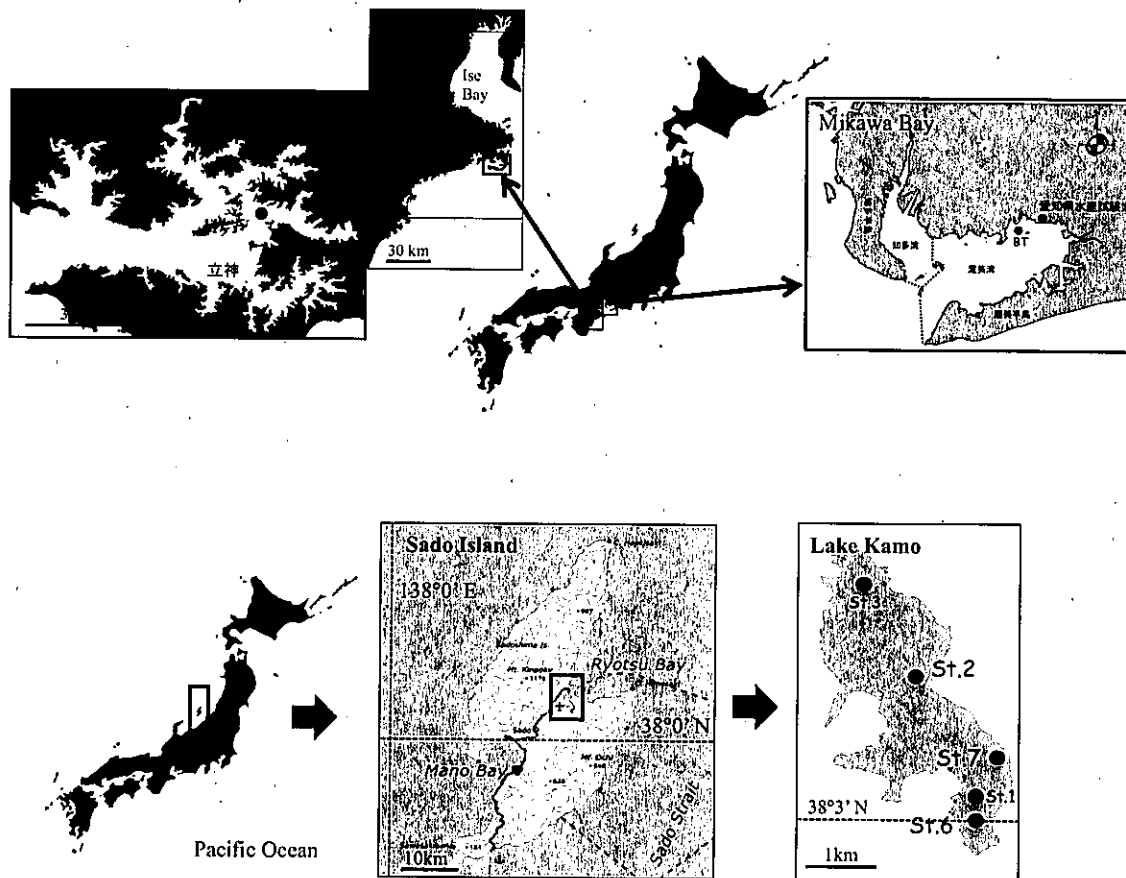


図 1. 試料採取および試験実施地点

a) 三重県英虞湾立神定点 (左), 愛知県三河湾 BT 地点 (右)

b) 新潟県佐渡市加茂湖 St.2 ; 湖央, St.6 ; 湖奥, St.7 ; 工場前, St1.St.2 St.3 ; 定期観測点

表 1. HcRNAV の定量および系統解析に用いたプライマーおよびプローブ.

Specificity	Primer or Probe		Expected amplicon size (bp)
ORF1	HcRNAV_ORF1-P-3	5'-(Cy5)-ACACCATCTCCTCGGGCGTCATCG-(BHQ1)-3'	103
	HcRNAV_ORF1-F-3	5'-GCCCCGTATTCTCCTTAGGTGC-3'	
	HcRNAV_ORF1-R-3	5'-TGACGAAAACATCTGTGGGGTC-3'	
ORF2	HcRNAV_ORF2-P-2	5'-(FAM)-ACCCCAACCCACTTATGTCCACCACTG-(BHQ1)-3'	78
	HcRNAV_ORF2-F-2	5'-GCGGCGTGTGTCAGTCCAG-3'	
	HcRNAV_ORF2-R-2	5'-GTGTGAACTGTGCCACCAAAG-3'	

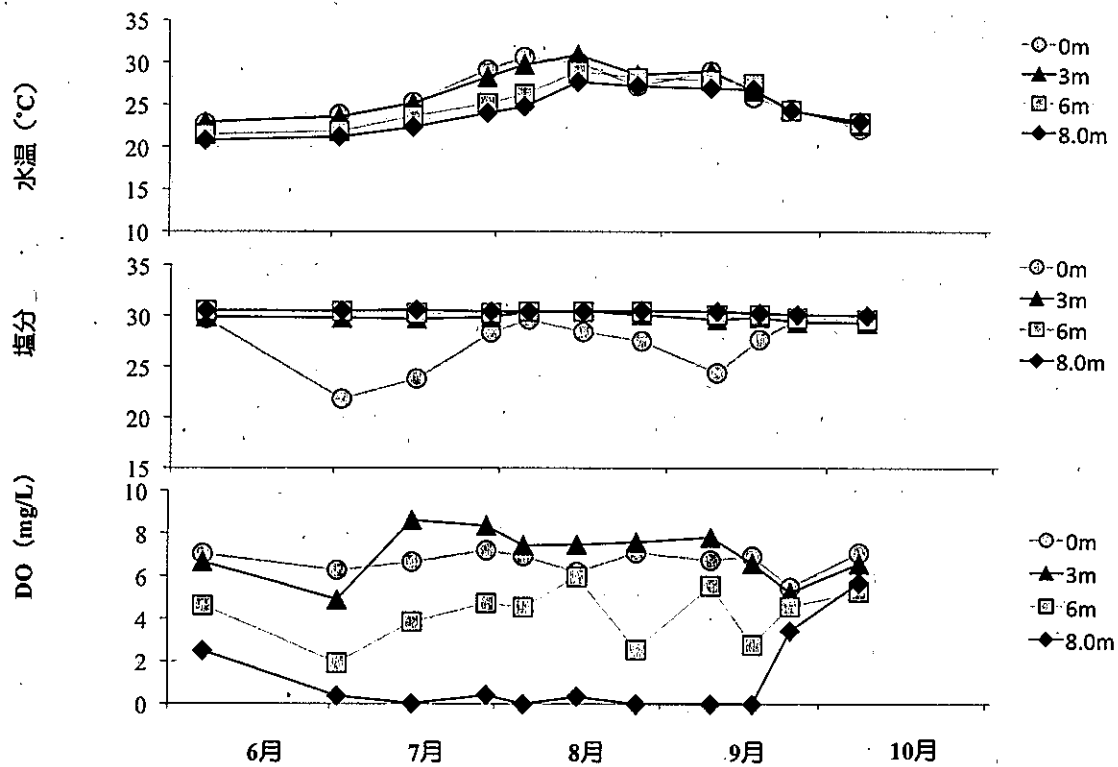


図 2. 2019 年の加茂湖原黒定点における水温，塩分，溶存酸素量の変動。

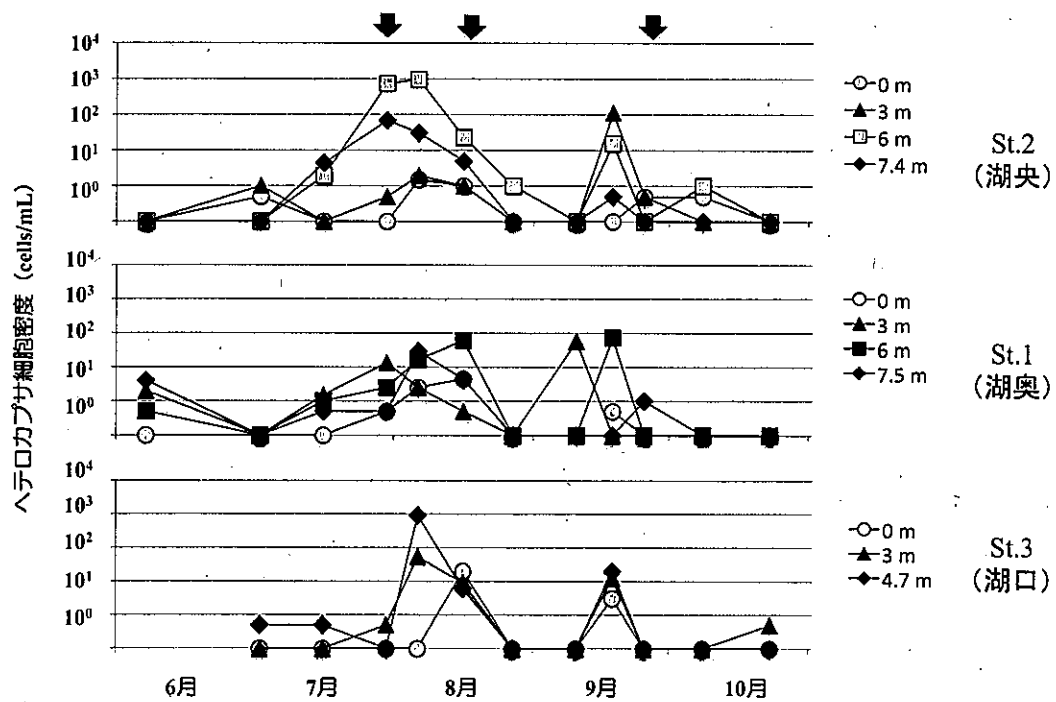


図 3. 2019 年 新潟県佐渡市加茂湖の 3 定点（上段から，St.2 原黒，St.1 湖奥，St.3 湖口）における，ヘテロカプサの発生状況．矢印は底質散布日．

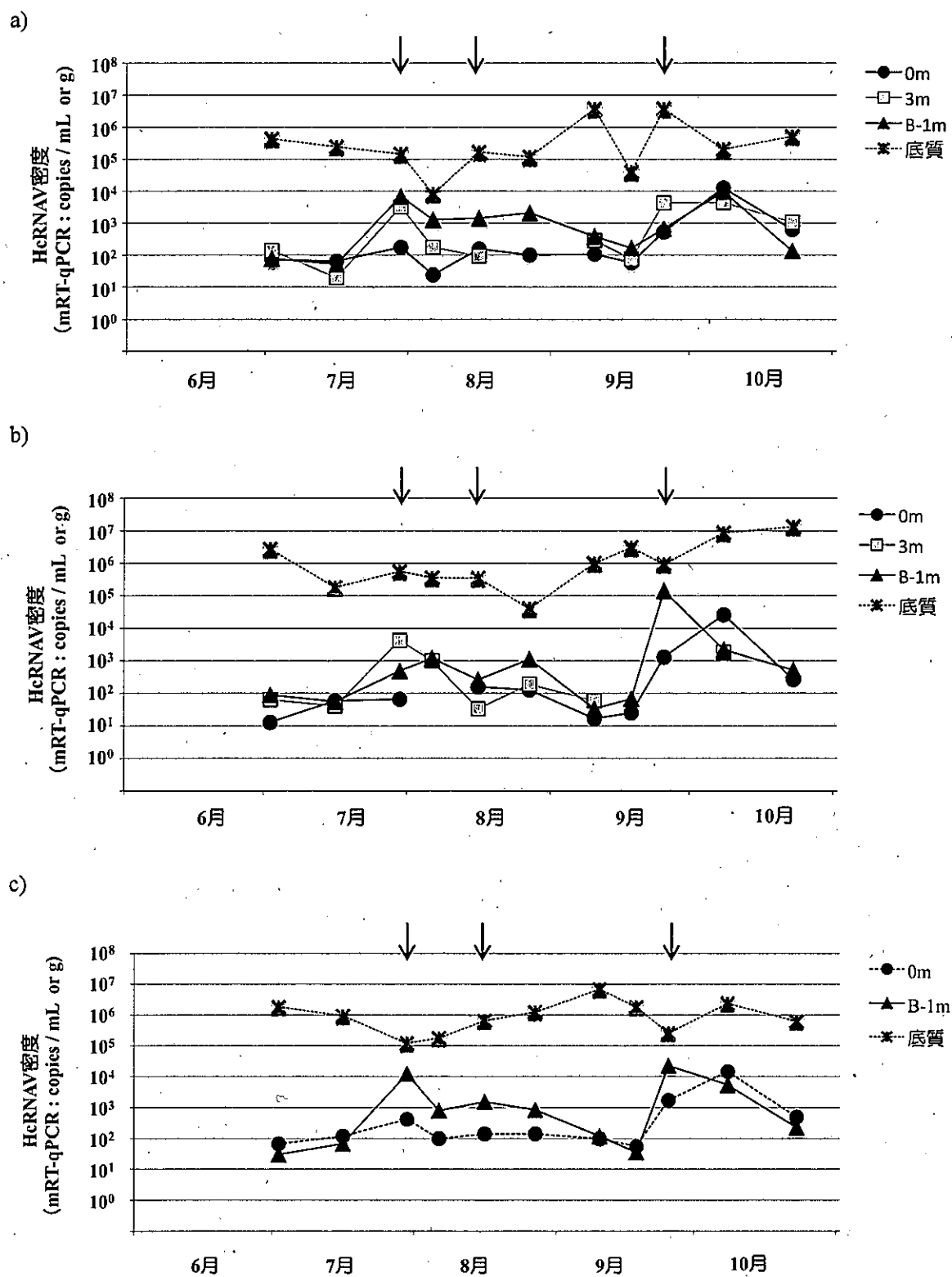


図 4. 2019 年 新潟県佐渡市加茂湖の 3 定点 St.2 湖央 a), St.1 湖奥 b), St.3 工場前 c) における湖水中、底質中の HcRNAV 密度。矢印は、底質散布日。

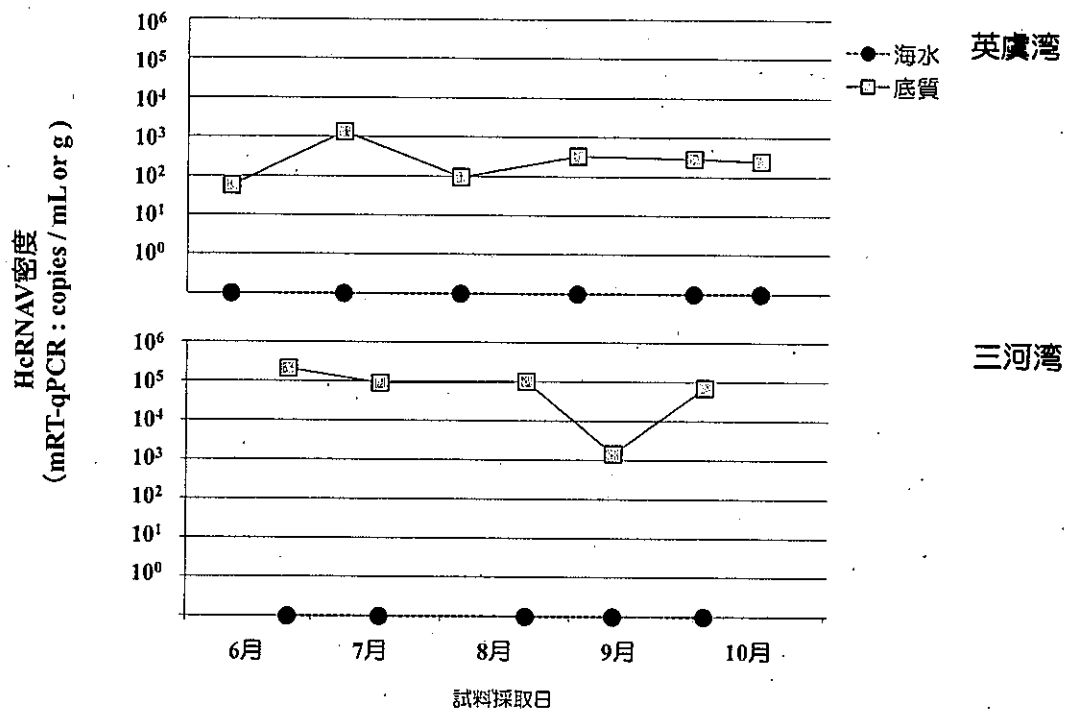


図 5. 2019 英虞湾・三河湾底質中の HcRNAV 発生状況.

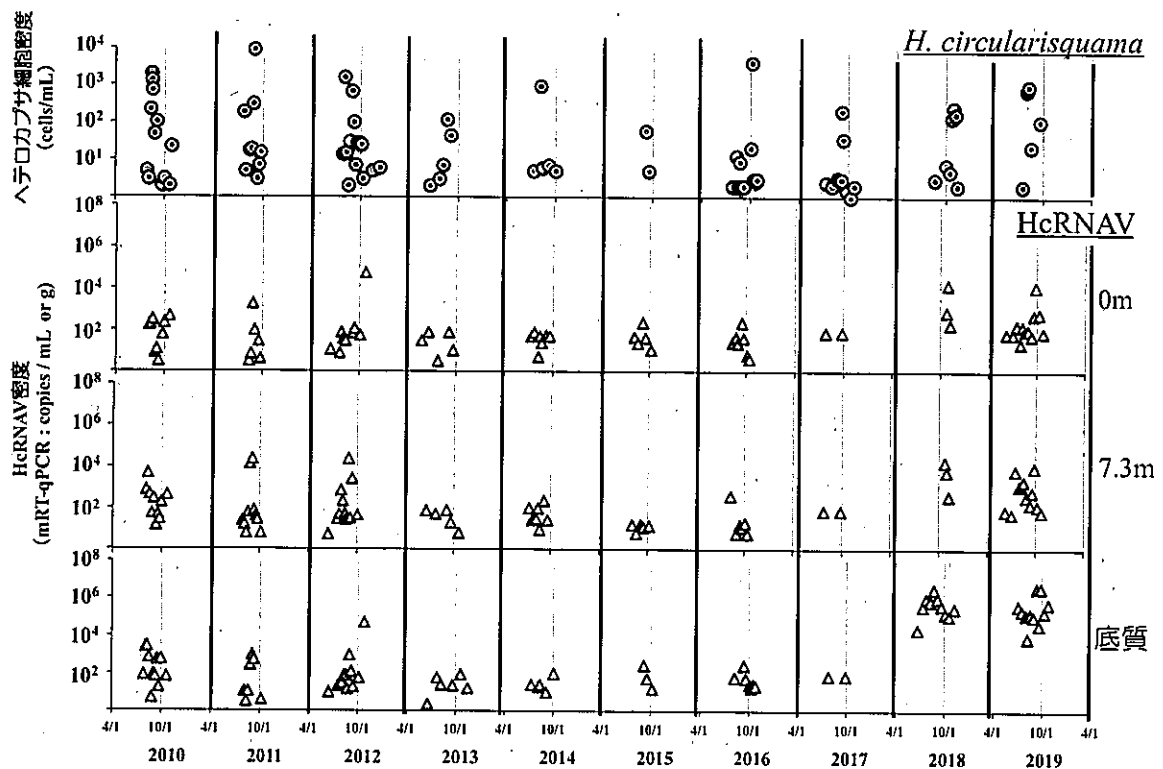


図 6. 2010~2019 年の加茂湖におけるヘテロカプサおよび HcRNAV 密度の推移.
上段から, ヘテロカプサ細胞密度 (cells/mL), 湖水 0m, 7.3m, 底質における HcRNAV 密度.
(2010~2017; unit/mL, 2018-2019 copies/mL あるいは copies/g)

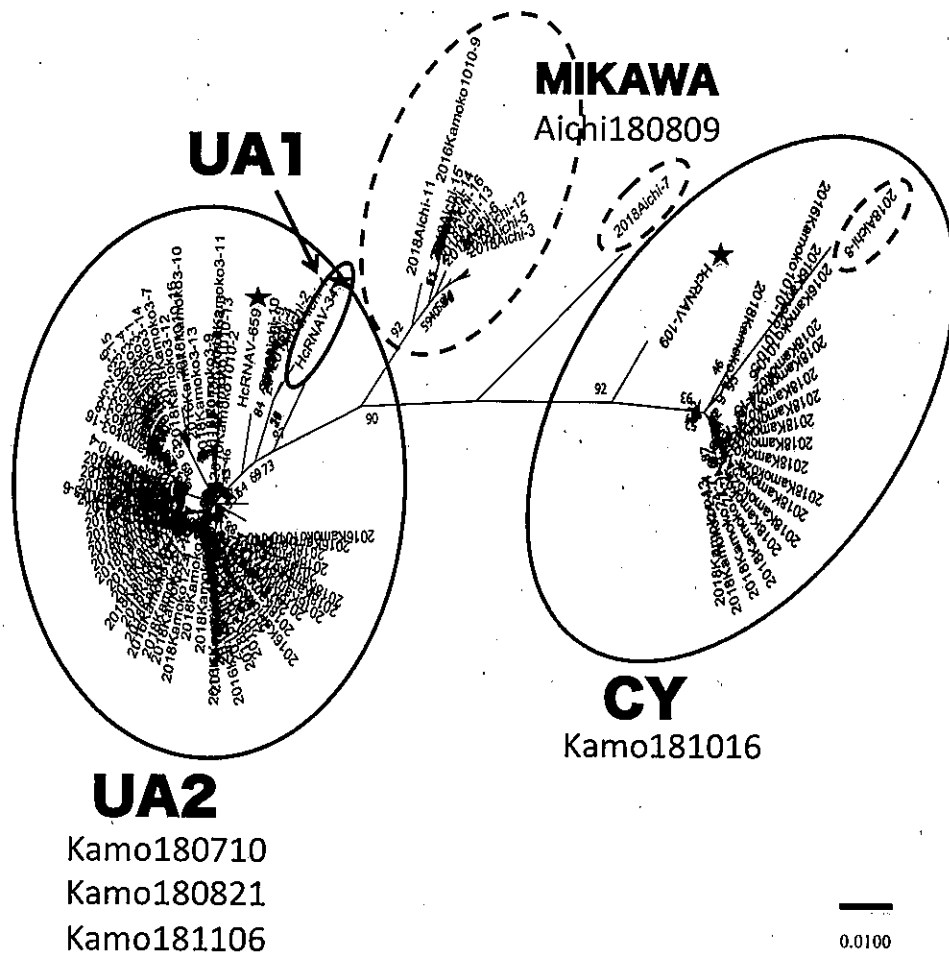


図 7. 2018 年加茂湖および愛知県の底泥より得られた HcRNAV クローンのアミノ酸配列による系統樹。UA1, UA2, CY は Nakayama et al. (2013) で見出されたグループで, MIKAWA は愛知県三河湾により得られた配列より新規に作られたグループ。Kamo は加茂湖より, Aichi は三河湾より得られた配列を示し, 数字は試料採取日。系統樹上の数字は Bootstrap 値。

表 2. 次世代シーケンサーによる HcRNAV の感染多様性の網羅的解析

Aichi; 愛知県三河湾 BT 地点 (2018 年 8 月 9 日採取)

Kamoko; 佐渡市加茂湖 (2018 年 10 月 16 日採取)

● ; リード数 100 以上

#OTUId	Aichi	Kamoko	Target	Identity
OTU_001	● 12492	● 36430	LC120626.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_gene_for_capsid_protein,_complete_cds_isolate:_HcRNAV659	UA2 99.659
OTU_002	● 8816	● 1320	LC120626.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_gene_for_capsid_protein,_complete_cds_isolate:_HcRNAV659	UA2 96.246
OTU_003	● 3494	● 5485	AB218609.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_DNA,_complete_genome,_isolate:_HcRNAV109	CY 98.635
OTU_004	● 3687		LC120626.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_gene_for_capsid_protein,_complete_cds_isolate:_HcRNAV659	UA2 92.491
OTU_005	57		0 Nohit	
OTU_006	58		0 Nohit	
OTU_007	46		0 Nohit	
OTU_008	78		0 Nohit	
OTU_009	28		LC120626.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_gene_for_capsid_protein,_complete_cds_isolate:_HcRNAV659	95.222
OTU_010	0	32	Nohit	
OTU_011	0	21	Nohit	
OTU_012	32		0 Nohit	
OTU_013	11		0 Nohit	
OTU_014	13		0 Nohit	
OTU_015	16		0 Nohit	
OTU_016	0	7	LC120626.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_gene_for_capsid_protein,_complete_cds_isolate:_HcRNAV659	89.761
OTU_017	8		0 Nohit	
OTU_018	24		QCP033917.1_Chryseobacterium_sp._G0201_chromosome,_complete_genome	93.75
OTU_019	16		0 Nohit	
OTU_020	0	11	LC120626.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_gene_for_capsid_protein,_complete_cds_isolate:_HcRNAV659	91.809
OTU_021	14		0 Nohit	
OTU_022	0	8	LC120626.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_gene_for_capsid_protein,_complete_cds_isolate:_HcRNAV659	93.857
OTU_023	● 483		AB218609.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_DNA,_complete_genome,_isolate:_HcRNAV109	CY 95.862
OTU_024	5		0 Nohit	
OTU_025	5		0 Nohit	
OTU_026	0	2	NR_076710.1_Pirellula_staleyii_strain_DSM_6068_23S_ribosomal_RNA_gene,_complete_sequence	76.419
OTU_027	0	7	Nohit	
OTU_028	8		0 Nohit	
OTU_029	3		0 Nohit	
OTU_030	2		0 Nohit	
OTU_031	16		0 Nohit	
OTU_032	4		0 Nohit	
Total	29416	43323		

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

② 既存の赤潮防除技術の高度化とマニュアル作成

水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所

紫加田知幸, 北辻さほ, 鬼塚 剛

大分県水産研究指導センター水産研究部

井口大輝, 中里礼大, 内海訓弘

東町漁業協同組合

浦 啓介, 古川新平, 立元伸幸

1 全体計画

(1) 目的

近年、豊後水道など西日本の沿岸域において *Karenia mikimotoi* 等鞭毛藻による有害赤潮が頻発しており、その対策が強く求められている。一方で、各現場では長年の経験に基づいて構築された被害軽減技術（餌止め、生簀避難など）が実用されている。本課題では、既存の技術を対象として科学的な検証と基礎情報の収集を行い、高度化を図ること、そして技術普及を円滑に推進するためにマニュアルを作成することを目的とする。まずは、足し網および生簀浮沈法について検討する。具体的には、赤潮プランクトンの鉛直移動および養殖魚介類の生簀内行動、環境条件の影響を把握し、網を足すあるいは生簀を沈下することで赤潮鞭毛藻類と養殖魚介類との接触頻度が最小限になる条件を見出す。その後、実際に足し網および生簀沈下を行って効果を検証する。

2 平成 31 年度計画及び結果

(1) 目的

「全体計画と同じ」

(2) 方法

1) 有害赤潮プランクトンの日周鉛直移動の観測

K. mikimotoi は環境条件や発達段階によって鉛直移動パターンが変わることが知られている（紫加田ほか 2018）。そのため、現場データを蓄積して鉛直移動パターンを環境条件等と関連づけて体系化する必要がある。2019 年 6 月 28～29 日の昼と夜間、八代海の楠浦湾（32°23'04''N, 130°13'E）および宮野河内湾（32°18'06''N, 130°09'71''E）の 2 定点において *K. mikimotoi* 細胞の鉛直分布および環境条件を東町漁協調査船・鯨王丸にて観測した。多項目水質計（AAQ-RINKO, JFE アドバンテック社製）にて表層～海底までの水温、塩分、クロロフィル蛍光値、光量子量を計測後、表層から海底までの 5 m 間隔の層およびクロロフィル極大層にて採水を行なった。採水試料は *K. mikimotoi* の計数および栄養塩分析に供した。細胞の計数は光学顕微鏡（ECLIPSE TS100, Nikon）下でおこなった。また、栄養塩分析はオートアナライザー（TRAACS 2000, Bran + Luebbe）を用いて行い、無機三態窒素（DIN）および無機態リン（DIP）の濃度を算出した。

一方で、2019 年 8 月 27 日 10:00～9 月 6 日 23:40 にかけて、入津湾（32°49'53''N, 131°58'71''E

水深：約 9 m) において自動昇降式多項目水質計 (AAQ-RINKO, JFE アドバンテック社製) にて水温、塩分、溶存酸素濃度 (DO)、クロロフィル蛍光値を約 30 分に一回の頻度で連続観測した。8 月 29 日 17:30~8 月 30 日 9:30 にかけては強風のため欠測した。また、2019 年 8 月 28 日 10:34 には、表層およびクロロフィル蛍光値の極大層で採水を行って検鏡を行い (ECLIPSE Ni, Nikon 社製), *K. mikimotoi* の細胞密度を算出した。

2) 生簀中の養殖魚の行動観測

本調査は現場における養殖魚の行動に及ぼす赤潮および環境条件の影響を把握することを目的とした。2019 年夏、準備を進めていた佐伯湾において有害赤潮が発生しなかったため、非発生時の養殖魚の行動を観察した。佐伯湾松浦漁港のポンツーンに養殖魚用生簀 (水深：約 13 m, 寸法：3 m×3 m の正方形, 網の深さ：9.5 m) を設置し、2019 年 9 月 11 日、大分水研で飼育していた当歳魚ブリ 100 尾 (平均尾叉長：234 mm, 平均体重：174 g) を投入した。太陽光パネルと接続した魚群探知機 (本体：HDS-10, 振動子：HST-DFSBL, Lawrance) をポンツーンに、トランスデューサーを生簀中央の海面に設置し、周波数 200 Hz で 24 時間連続観測を行った。また、2019 年 9 月 10~14 日、ポンツーンにおいて自動昇降式多項目水質計で水温、塩分、DO を連続観測した。調査開始時には、表層~海底まで 1 m 間隔で採水して検鏡を行い、*K. mikimotoi* やその他の有害種の細胞を計数した。取得した魚探データは Sonar viewer で可視化し、魚群の鉛直分布を抽出した。

3) 養殖魚の生残に及ぼす赤潮の断続曝露の影響試験

2018 年度の研究成果により、足し網や生簀沈下法が *K. mikimotoi* など一日の鉛直移動距離が長いプランクトンの赤潮に対して効果を発揮するか否かは、養殖魚が赤潮から逃避できるか否かに加え、赤潮の連続的な曝露に比べて、断続的な曝露で生残率が上がるあるいは延命するかが重要であることがわかった (紫加田ほか 2019b)。そこで、本課題では室内において、養殖魚の生残に及ぼす赤潮の断続曝露の影響を明らかにするための試験を実施した。

ア. *K. mikimotoi* 培養株の選抜

断続曝露試験に際し、*K. mikimotoi* の培養株を確立し、増殖速度、スーパーオキシド (O_2^-) レベル、ワムシを使った簡易アッセイおよび魚類曝露試験によって魚毒性の強い株を選抜した。6 月 3 日に長崎県九十九島で採水した海水から 7 株 (KJK1, KJK 4, KJK 5, KJK 7, KJK 8, KJK 9, KJK 10)、6 月 11 日に八代海楠浦湾で採水した海水から 10 株 (KU1, KU2, KU3, KU4, KU5, KU6, KU7, KU8, KU9, KU10)、6 月 17 日に長崎県伊万里湾で採水した海水から 3 株 (IMR2, IMR3, IMR4) を単離した。培養株は、改変 SWM-3 培地で 20℃、塩分 30, $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12hL:12hD) の条件で培養した。なお、海水はそれぞれ熊本県水産研究センター、長崎県水産総合試験場より提供頂いた。

単離した全ての培養株について、増殖速度および O_2^- レベルを計測した。増殖速度は、上述の条件で 10 日間培養し、期間中の最高増殖速度 (6~8 日目) を算出した。 O_2^- レベルは発光法により測定した (紫加田ほか 2019a)。また、陽性対象として、高い O_2^- レベルを有する *Chattonella antiqua* 培養株 (NIES-1) を使用した。

また、増殖が良好だった一部の培養株についてワムシに対する毒性を計測した。ワムシによる簡易アッセイは、48 ウェルプレート (IWAKI) を用いて 20℃で実施した。シオミズツ

ボウムシ (L 型奄美株) 10 個体を懸濁した改変 SWM-3 培地 200 μL に、培養 4~6 日目の培養液 800 μL ($1.0 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) を添加して 8 時間曝露し、ウムシの半数がへい死した時間を算出した。陽性対象として、ウムシに対して強い毒性を有する *K. mikimotoi* 培養株 (No.7 株) を使用した。

増殖速度、 O_2 レベルおよびウムシへの毒性の測定結果を踏まえて選抜した 2 株および既存の弱毒株 (ax69-9) をマダイへの曝露試験に供した。曝露試験は、前述の条件で培養した 6 L の約 20,000 cells mL^{-1} の *K. mikimotoi* 培養液または改変 SWM-3 培地を 30 cm 水槽に注入した後、マダイ稚魚 (平均体長 15 cm, 体重 72 g) を 3 尾ずつ収容した。最長 6 時間、マダイの状態を観察した。横臥した個体が認められた場合、腐敗防止のため、直ちに引き揚げた。試験期間中、経時的に水温および DO を計測し、エアレーション強度とヒーター温度を調節してそれぞれ 25°C および $>5 \text{ mg L}^{-1}$ を維持した。なお、実験は 2~3 反復した。

イ. 断続曝露試験

3) ア. で選抜した *K. mikimotoi* 強毒株 ($18,600 \text{ cells mL}^{-1}$) の培養液 6 L を 30 cm 水槽に注入し、マダイ稚魚 (平均体長 16 cm, 体重 78 g) を 3 尾ずつ収容した。1 時間培養液に曝露後、新鮮な培地の入った水槽に移し、6 時間経過後、再度培養液に曝露する (6 時間休憩)、あるいは 1 時間培養液に曝露して新鮮な培地の入った水槽に移し、24 時間経過後、再度培養液に曝露する (24 時間休憩) 2 種類の断続曝露区、連続曝露区、コントロール (改変 SWM-3 培地) を設置した。なお、対象区では、マダイを 1, 7, 25 時間後に新鮮な培地の入った水槽に移した。試験期間中、エアレーション強度とヒーター温度を調節してそれぞれ水温を 25°C および DO を $>5 \text{ mg L}^{-1}$ に維持した。

4) 生簀沈下および足し網の被害軽減効果の現場検証 (東町漁協, 水産機構瀬水研)

2019 年 8 月下旬~9 月上旬、八代海において大規模な *Chattonella* による有害赤潮が発生した。そこで、東町漁協管内の漁場における生簀ごとの養殖魚のへい死率を算出し、生簀沈下や足し網の実施の有無との関係性を検証した。

(3) 結果及び考察

1) 有害赤潮プランクトンの日周鉛直移動

ア. 八代海における *K. mikimotoi* の鉛直移動

赤潮ネット (<https://akashiwo.jp/>) によると、調査時期は *K. mikimotoi* 赤潮の衰退直前に相当した (図 1)。宮野河内湾では、楠浦湾よりも約 1 カ月遅れて赤潮が発達したが、衰退時期はほぼ同じであった。昼と夜の調査日時は楠浦湾および宮野河内湾でそれぞれ 2019 年 6 月 28 日 12:40 と 23:15 および 2019 年 6 月 28 日 13:40 と翌日 0:10 であった。楠浦湾では、*K. mikimotoi* は昼間表層から 10 m 層に多く分布しており、表層および 7.1 m 層では $1,000 \text{ cells mL}^{-1}$ を超える細胞密度が認められ、夜間も同様に表層から 10 m 層に集積したままであった (図 2)。一方で、宮野河内湾において、*K. mikimotoi* は昼間表層~5 m 層に多く分布していたが、夜間は 19.2 m に細胞密度の極大層が認められた。

赤潮衰退期に *K. mikimotoi* が鉛直移動を示さなくなることは知られており、過去の楠浦湾での調査においても昼夜表層に集積し続ける現象が観察されている (紫加田ら 2018)。一方で、宮野河内湾では明確な鉛直移動が観察された。細胞密度の長期動態を見る限りでは、調

査時、楠浦湾と宮野河内湾ともに赤潮衰退直前の時期にあったことが推察される。さらに、調査時の各種環境条件は、楠浦湾と宮野河内湾間で大差なかった（図3、4）。

発達期にある *K. mikimotoi* は晴天時、亜表層～中層に集積することが知られている（Shikata et al. 2017）。今回、楠浦湾および宮野河内湾ともに海面には $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を超える光が到達していたにも拘らず、表層に細胞が集積していた（図3）。さらに、表層～20 m 層における栄養塩濃度は低く、DIN/DIP は楠浦湾の一部の中層以外および宮野河内湾の表層以外で13以下であり、PよりもNが不足していたと推察された（図4）。*K. mikimotoi* は窒素不足と強光曝露が同時に起こると光障害が誘導されて生残できなくなる（Yuasa et al. 2018）。さらに、窒素欠乏状態の細胞は強光曝露されても下降遊泳ができなくなることが室内で観察されている（Yuasa et al. 2018）。本研究により、*K. mikimotoi* 赤潮衰退直前には、中層集積や明確な日周鉛直移動リズムが認められなくなることが再確認された。

イ. 入津湾における *K. mikimotoi* の鉛直移動

2019年8月28日の調査において、*K. mikimotoi* が表層およびクロロフィル蛍光値極大層においてそれぞれ75および $160 \text{ cells mL}^{-1}$ の細胞密度で検出された。また、自動昇降式多項目水質計は8月28日～9月2日にかけて、時間帯によってクロロフィル蛍光値の鉛直分布が変化する様子を捉えており、特に夜間下層におけるクロロフィル蛍光値のピークは *K. mikimotoi* によるものと推察された（図5）。各調査日における *K. mikimotoi* 由来と推察されるクロロフィル蛍光値の極大層深度の最小値（最小到達深度）および最大値（最大到達深度）とそれらを記録した時刻を表1にまとめた。8月31日以降は昼夜連続で表層～1 m 層に高いクロロフィル蛍光値を有する水塊が観察されたため最小到達深度は抽出できなかった。現地の情報によると小型の鞭毛藻類が優占していたとの情報もある。8月30日までについては、最小到達深度は1.4～2.5 m の範囲にあった。気象庁のデータによると、8月28～30日の最寄りの観測所である蒲江における日照時間は0.7～6.5時間で曇天であった。最大到達深度は期間中、5.9～7.7 m であり、*K. mikimotoi* は夜間海底付近に集積した。また、図5を見ると、最小到達深度あるいは最大到達深度に達した個体群はその深度層に長時間停滞することなく、直ちに下降あるいは上昇を開始したことが推察された。

水温、塩分およびDOはそれぞれ22.5～26.6℃、28.1～32.1および $1.08 \sim 10.32 \text{ mg L}^{-1}$ の範囲で推移した。9月2日の夜間に *K. mikimotoi* 由来と考えられる中～下層のクロロフィル蛍光値が急激に減少していき、消滅した（図5）。この時期、中～下層で水温の急激な低下が認められ、さらに、*K. mikimotoi* 赤潮は局所的に発生していたとの現地情報もある。*K. mikimotoi* が死滅した可能性もあるが、海水交換等の物理的なプロセスが働いた可能性が高い。今回得られた情報は今後の鉛直移動シミュレーションなどに活用していく予定である。

2) 生簀中の養殖魚の行動パターン

生簀中のブリ魚群の鉛直分布を15分おきに抽出してグラフ化したものを図6に示す。また、自動昇降式多項目水質計による観測結果を図7に示す。ブリ魚群は、9月11日10:00～19:00までは表層～下層に、19:00～翌日5:00までは表層に、以降は表層～下層に分布した。調査期間中の日没および日出時刻はそれぞれ18:30および5:45であった。すなわち、日中は上下層に分散し、夜間は表層に集積する行動パターンが観察された。2014年9月8～12日に実施した白杵湾における2歳魚の観測によると、ブリは給餌日には昼間生簀下層に集積

し、日出および日没前後に離底して表層に分布するのに対し、無給餌日にはその行動パターンが不明瞭となって昼間も離底する(紫加田ら 2015)。今回は1日間餌止めをした状態で試験を実施したが、この2歳魚の行動パターンとは随分異なっていた。今回の調査期間中、水温、塩分およびDOはそれぞれ22.8~27.5°C、29.1~34.45 および6.0~9.8 mg L⁻¹の範囲で推移し、臼杵湾での試験時の環境と大差なかった。給餌や環境条件に加え、魚齢や飼育密度はブリの行動パターンに多大な影響を及ぼすと考えられる。今後、体系的な研究が必要である。

3) 養殖魚の生残に及ぼす赤潮の断続曝露の影響

ア. *K. mikimotoi* 培養株の選抜

K. mikimotoi 培養株の増殖速度は0.06~0.50 div. day⁻¹の範囲にあり、0.4 div. day⁻¹以上の増殖速度を示した培養株は、4株(KU6, KU8, KU9, IMR4)であった(図8)。また、いずれの*K. mikimotoi* 培養株においても、O₂レベルは*C. antiqua*よりも極めて低かった(図9)。ワムシの半数致死時間は3.3~6.0時間の範囲にあり(図10)、株間で大差なく、新たに分離した株の毒性は全てこれまで強毒と考えられてきたNo.7株(4時間)と同程度であった。以上の結果を表2にまとめた。O₂レベルやワムシ毒性では株を選抜することが困難であったため、増殖速度の高いKU9株およびIMR4株をマダイ稚魚への曝露試験に供した。その結果、マダイ稚魚は、IMR4株に曝露されると全滅したのに対して、KU9株およびax69-9株では67%の個体が生残した(図11)。また、*K. mikimotoi* (IMR4株, KU9株, ax69-9株)のマダイ稚魚への曝露前後のO₂レベルを図12に示すが、曝露直後にO₂レベルが変化することはなく、魚毒性との関係も認められなかった。

イ. 断続曝露試験

3)ア. の試験結果を受けて、IMR4株を本実験に供した。連続曝露区および6時間休憩区では試験開始1時間15分以内に1尾がへい死してその後へい死は認められなかった(図13)。24時間休憩区では休憩後の赤潮曝露で全滅した。コントロールにおいてへい死は認められなかった。この結果から、休憩を挟むことで、マダイが赤潮抵抗性を備えるということはないと考えられる。ただし、今回、反復ができなかったので今後再現性を検討する予定である。

4) 生簀沈下および足し網の被害軽減効果の現場検証(東町漁協, 水産機構瀬水研)

東町漁協管内のブリ漁場では、2019年9月2~3日に*Chattonella*の細胞密度が最高となり、9月3~5日にへい死が確認された(表3)。2019年9月1~4日の漁場A~Fにおける*Chattonella*の細胞密度を示す(図14)。全ての漁場で9月2日あるいは3日に表層あるいは2m層で最高細胞密度を記録し、漁場E以外で1,000 cells mL⁻¹を超えた。*Chattonella*赤潮の発生に際して、8月20日から全ての生簀で餌止めを実施し、漁場AおよびBの一部の生簀では2年魚を対象に8月22日から順次足し網および沈下を行った(表3)。漁場Dの2年魚については、別漁場に生簀を避難させた(図15)。

ブリのへい死率は生簀間で大きな差があった(図16)。餌止め以外の事前対策を実施しなかった生簀間で比較すると、2年魚については*Chattonella*の細胞密度が高かった漁場でへい死率が高い傾向にあったが、1年魚についてはその傾向は明確でなく、また2年魚と比べるとへい死率は全体的に低かった(図17)。漁場Bにおいて、足し網および生簀沈下を実施した生簀のへい死率はそれぞれ実施しなかった生け簀の13%および0.17%で、大きな被害軽減

効果が認められた。一方、漁場 A では、2 年魚の生簀全てで沈下を実施したが、大きな被害が発生した。その原因として、漁場 A の水深は 20 m 程度と浅く、理論的に効果があるとされる深度（紫加田ら 2019b）まで沈下できなかったことが考えられる。なお、漁場 B の水深は 40 m 程度である。

以上のことは的確なやり方で足し網および生簀沈下を行えば大きな被害軽減効果を得られる可能性を示唆している。今回、一部の生簀でのみこれらの事前策が実施されたが、今後もっと普及されるべきである。そのためには、科学的な根拠をさらに積み重ねていくことだけでなく、簡便な足し網手法や浮沈生簀の低コスト化を推進しなければならない。また、2019 年夏の *Chattonella* 赤潮は昼間高い表層集積度を示したが、そうでない場合、すなわち表層から深い層まである程度高密度の赤潮が分布する場合、必ずしも同様の被害軽減効果が期待できないことは念頭に置かねばならない。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、海水を提供いただいた熊本県水産研究センター・向井宏比古研究参事、長崎県水産総合試験場・平江想主任研究員、山本佳奈主任研究員に厚く御礼申し上げます。また、現場データの解析にあたりご助言を頂いた中央水産研究所の青木一弘主任研究員に御礼申し上げます。

引用文献

紫加田知幸, 鬼塚剛, 山口峰生, 高山剛, 伏屋玲子, 宮村和良, 梶川和武. 有害赤潮鞭毛藻類の遊泳特性を利用した新規赤潮防除技術の開発. 平成26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 瀬戸内海等での有害赤潮発生機構解明と予察・被害防止等技術開発報告書, 瀬戸内海赤潮共同研究機関, 水産庁, 東京. 2015 ; 168-183.

紫加田知幸, 鬼塚剛, 北辻さほ, 中山奈津子, 坂本節子, 阿部和雄, 松原賢, 大竹周作, 井口大輝, 西山佳孝. 現場ミクロコズムを用いたカレンニア等有害赤潮鞭毛藻の動態と環境条件との関係の解明. 平成29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 瀬戸内海等での有害赤潮発生機構解明と予察・被害防止等技術開発報告書, 瀬戸内海赤潮共同研究機関, 水産庁, 東京. 2018 ; 211-224.

紫加田知幸, 北辻さほ, 坂本節子, 内田肇, 及川寛, 鈴木敏之, 山崎康裕, 内山郁夫, 成瀬清, 亀井保博, 西出浩世, 安斎賢, 西山佳孝, 西槇俊之. 魚毒性診断技術の開発. 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. 2019a ; 225-252.

紫加田知幸, 北辻さほ, 鬼塚剛, 高山剛, 井口大輝, 中里礼大, 都留久美子, 木藪仁和, 石田幸生, 浦啓介, 古川新平, 上野翼. 既存の赤潮防除技術の高度化とマニュアル作成. 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. 2019b ; 263-243.

Shikata T, Onitsuka G, Abe K, Kitatsuji S, Yufu K, Yoshikawa Y, Honjo T, Miyamura, K.

Relationships between light environment and subsurface accumulation during the daytime in the red-tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Mar. Biol.* 2017; **164**: 18.

Yuasa K, Shikata T, Kuwahara Y, Nishiyama Y. Adverse effects of strong light and nitrogen deficiency on cell viability, photosynthesis, and motility of the red-tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Phycologia* 2018; 57: 525-533.

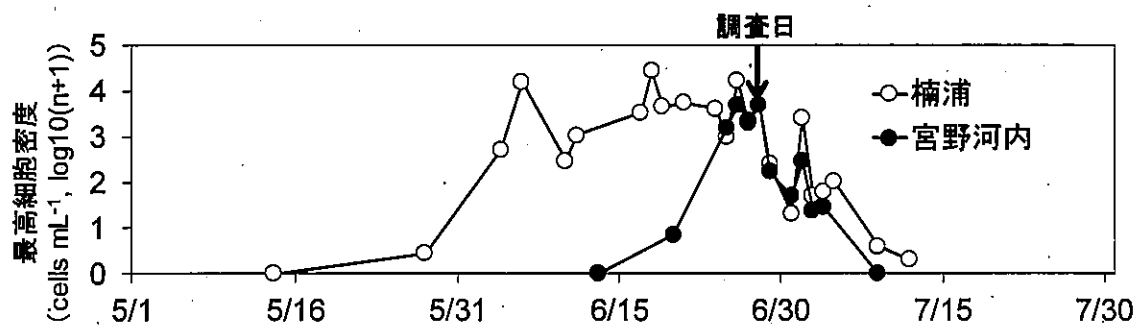


図 1. 楠浦湾および宮野河内湾における *K. mikimotoi* 細胞密度の動態と調査実施時期.
赤潮ネット (<https://akashiwo.jp/>) より抽出したデータから作成.

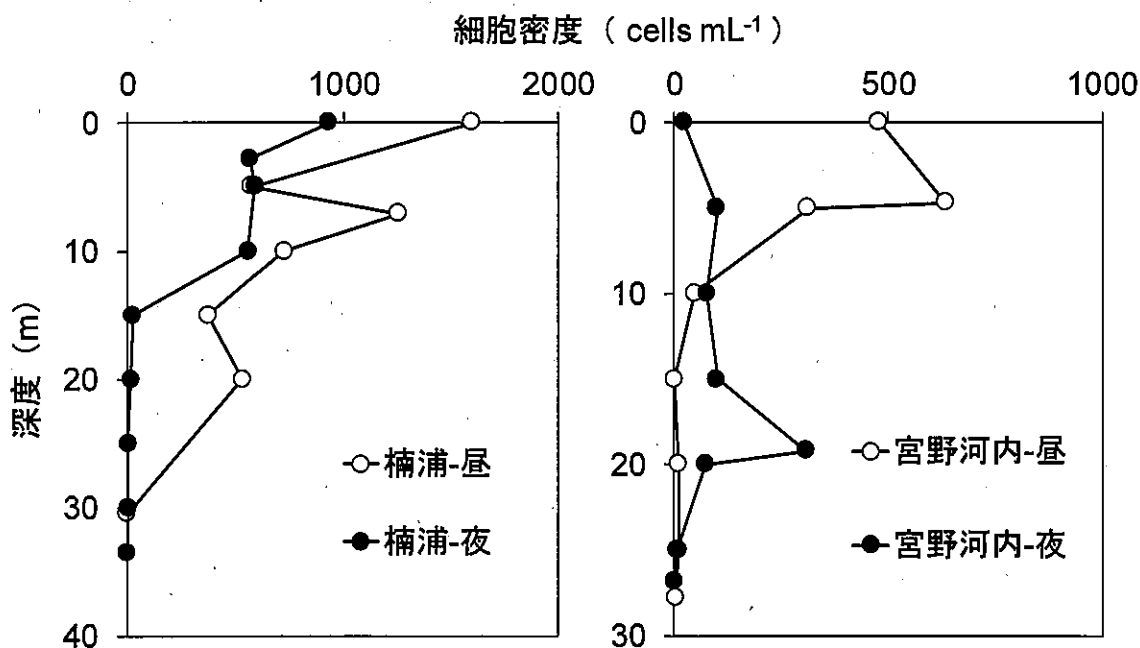


図 2. 楠浦湾および宮野河内湾における *K. mikimotoi* 細胞の昼および夜の鉛直分布.

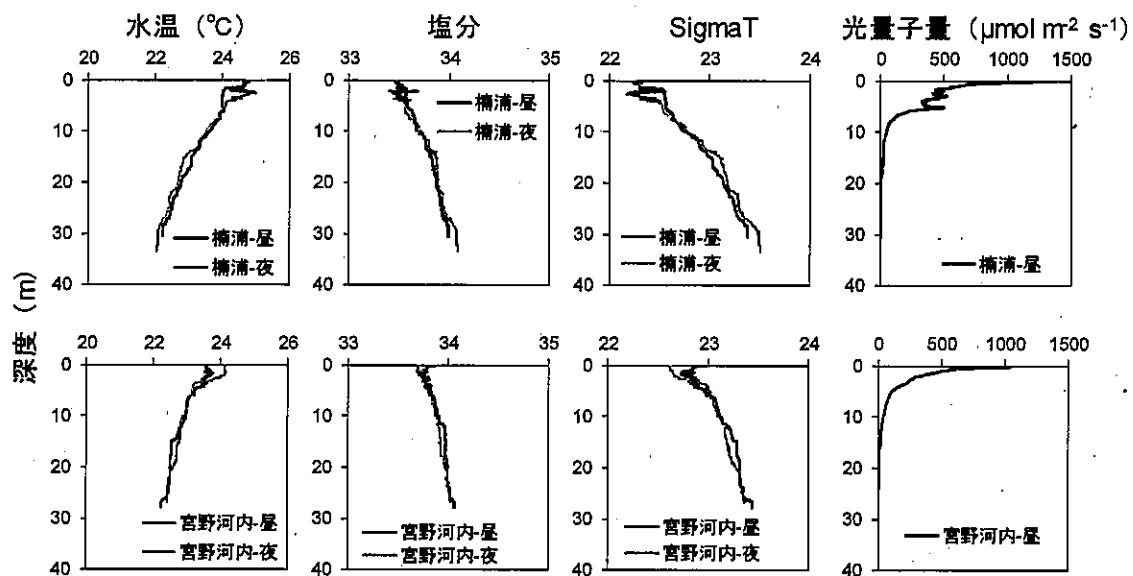


図 3. 楠浦湾および宮野河内湾における環境条件.

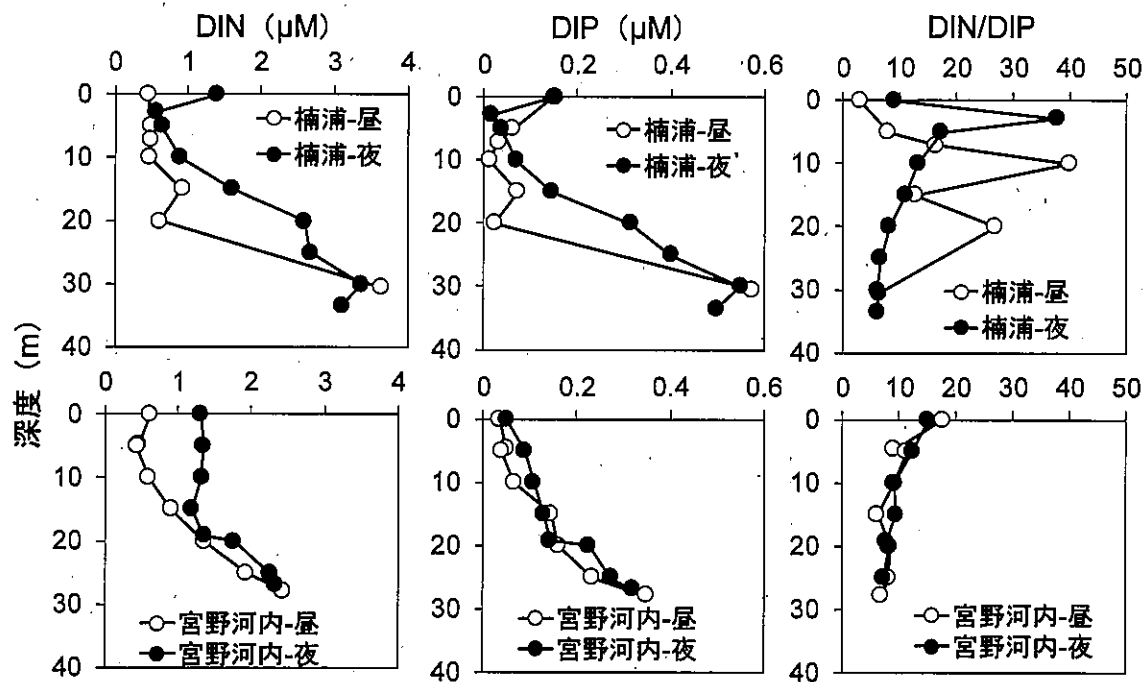


図 4. 楠浦湾および宮野河内湾における栄養塩の鉛直分布.

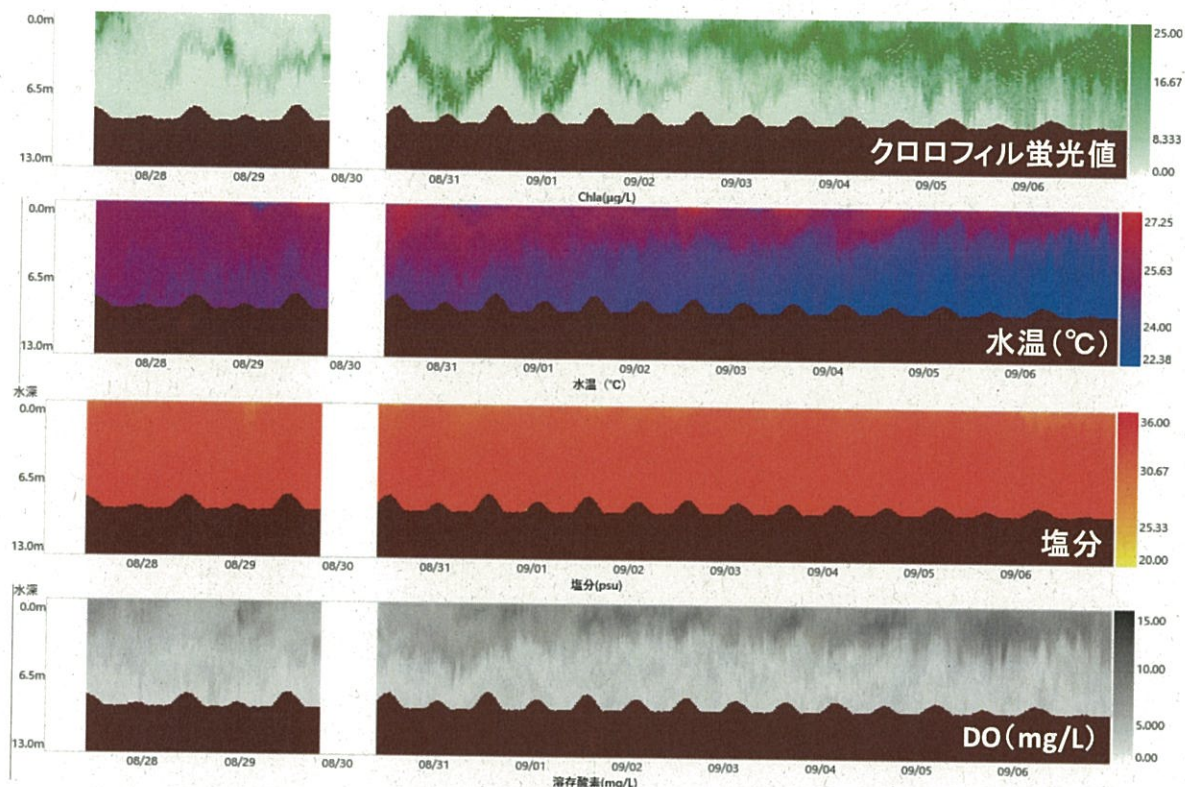


図 5. 入津湾における自動昇降式多項目水質計による観測結果.

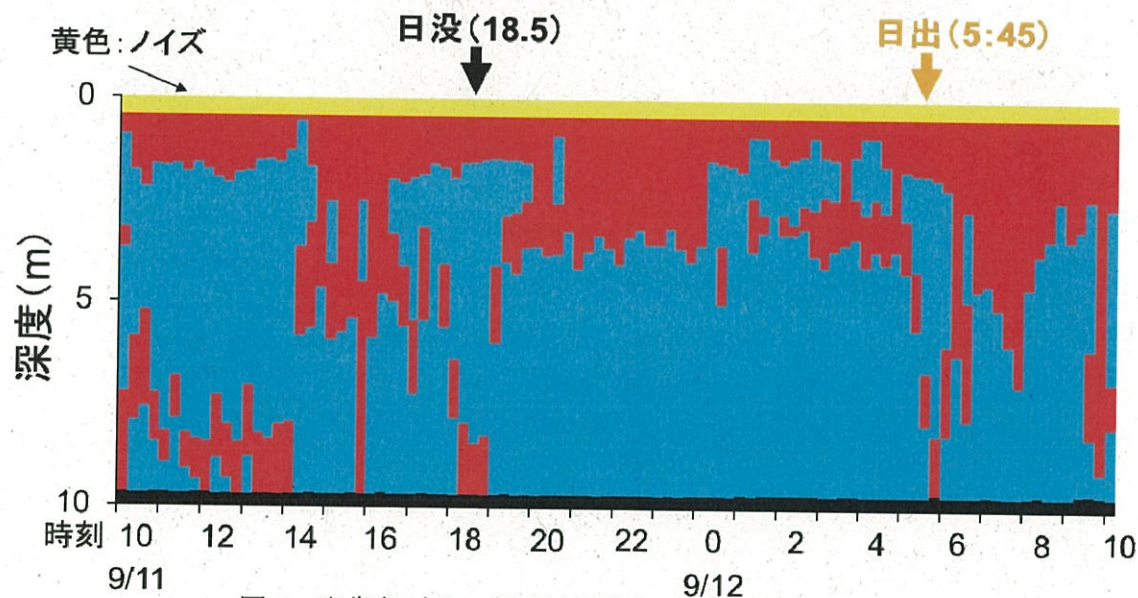


図 6. 当歳魚ブリの魚群鉛直分布の経時変化.

赤色：魚群が観察された深度帯，水色：魚群が観察されなかった深度帯.

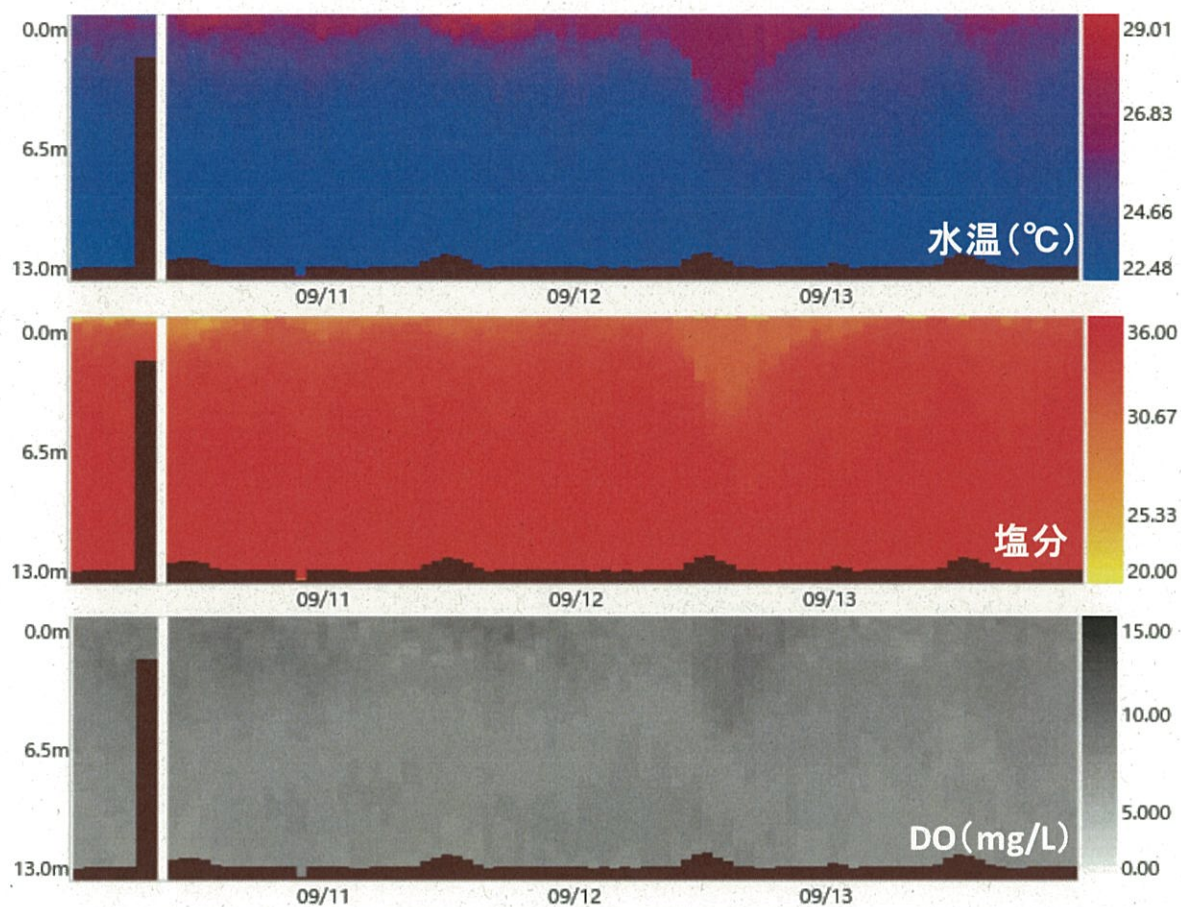


図 7. プリ行動観測前後の環境.

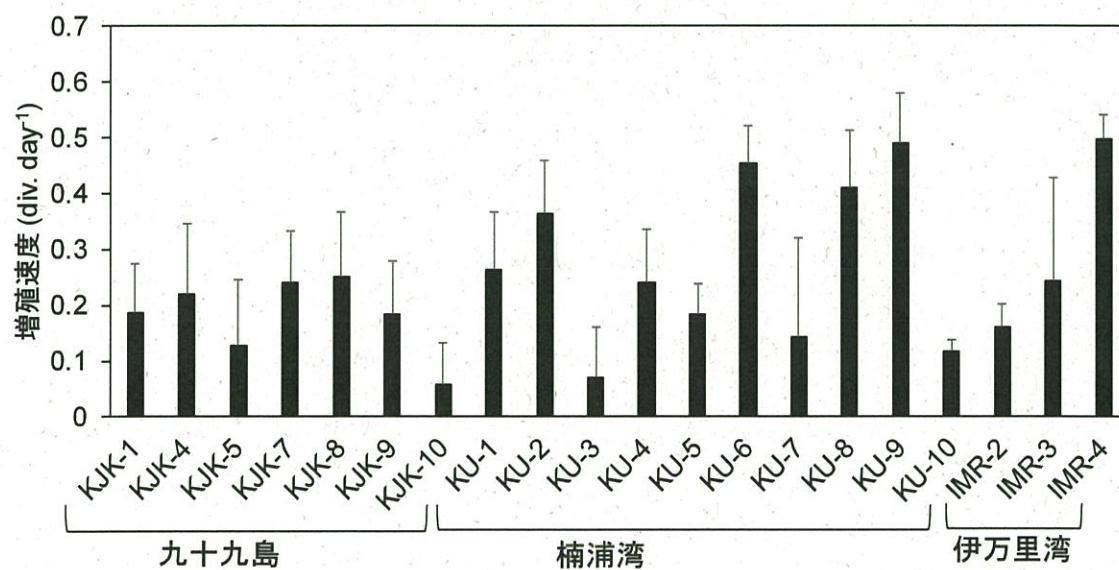


図 8. *K. mikimotoi* 各培養株の増殖速度.

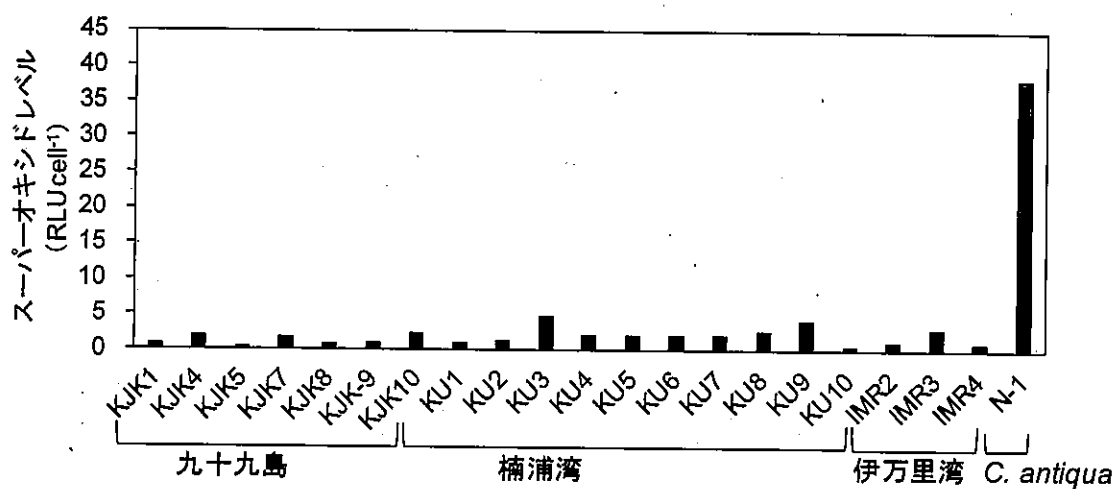


図 9. *K. mikimotoi* 各培養株の O₂⁻レベル.

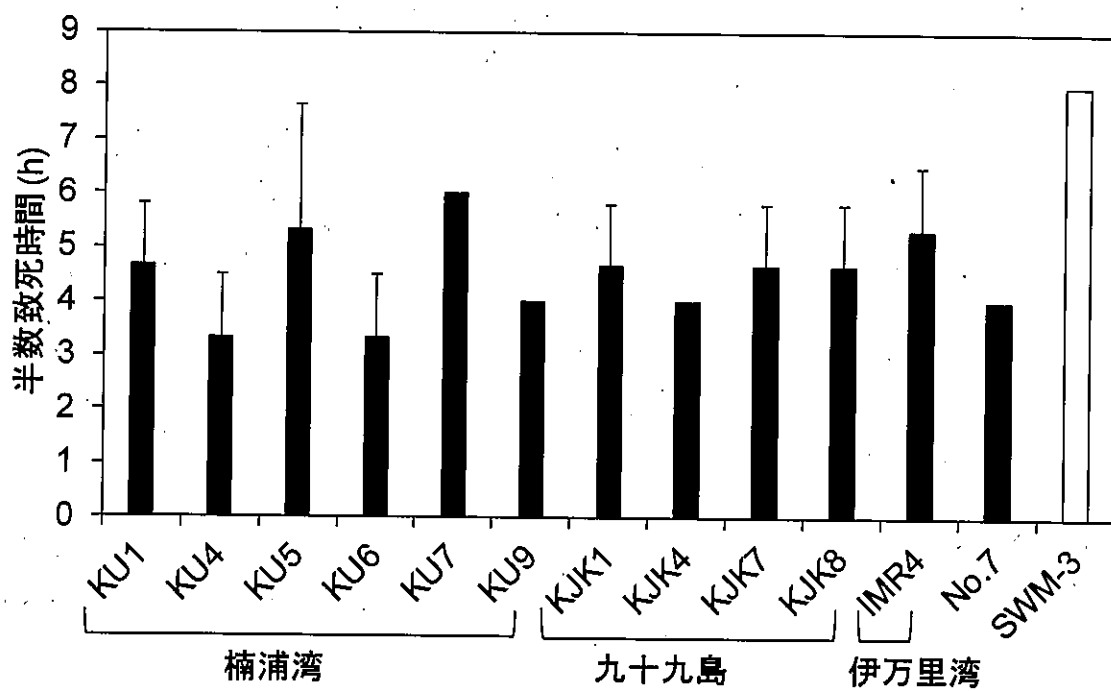


図 10. *K. mikimotoi* 各培養株に曝露されたワムシの半数致死時間.

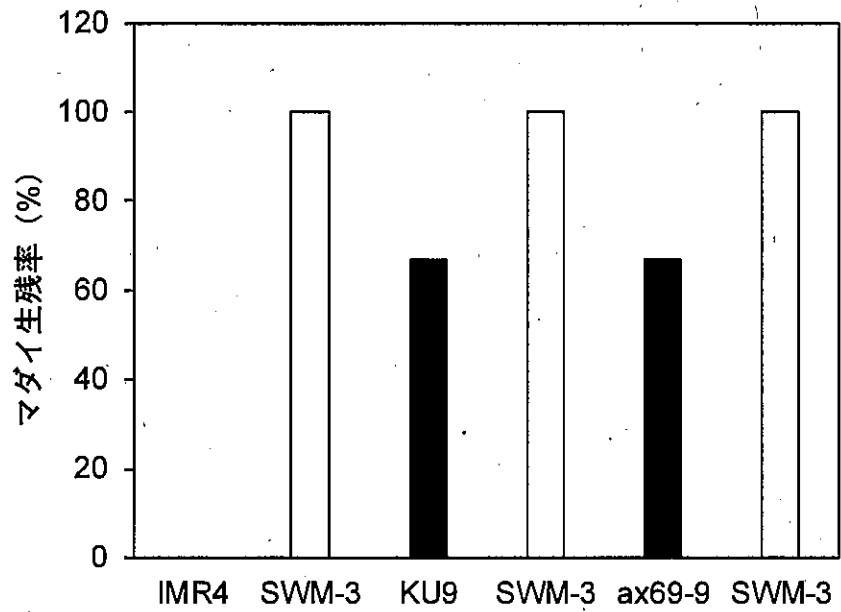


図 11. *K. mikimotoi* 各培養株を曝露されたマダイ稚魚の生残率.

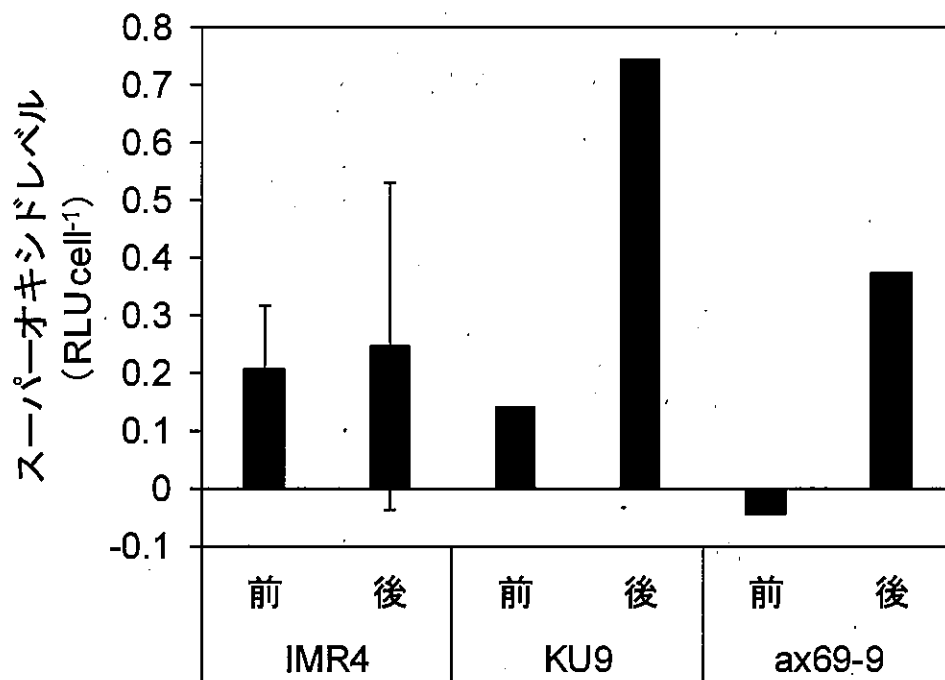


図 12. *K. mikimotoi* 各培養株をマダイ稚魚へ曝露する前後の O_2^- レベル.