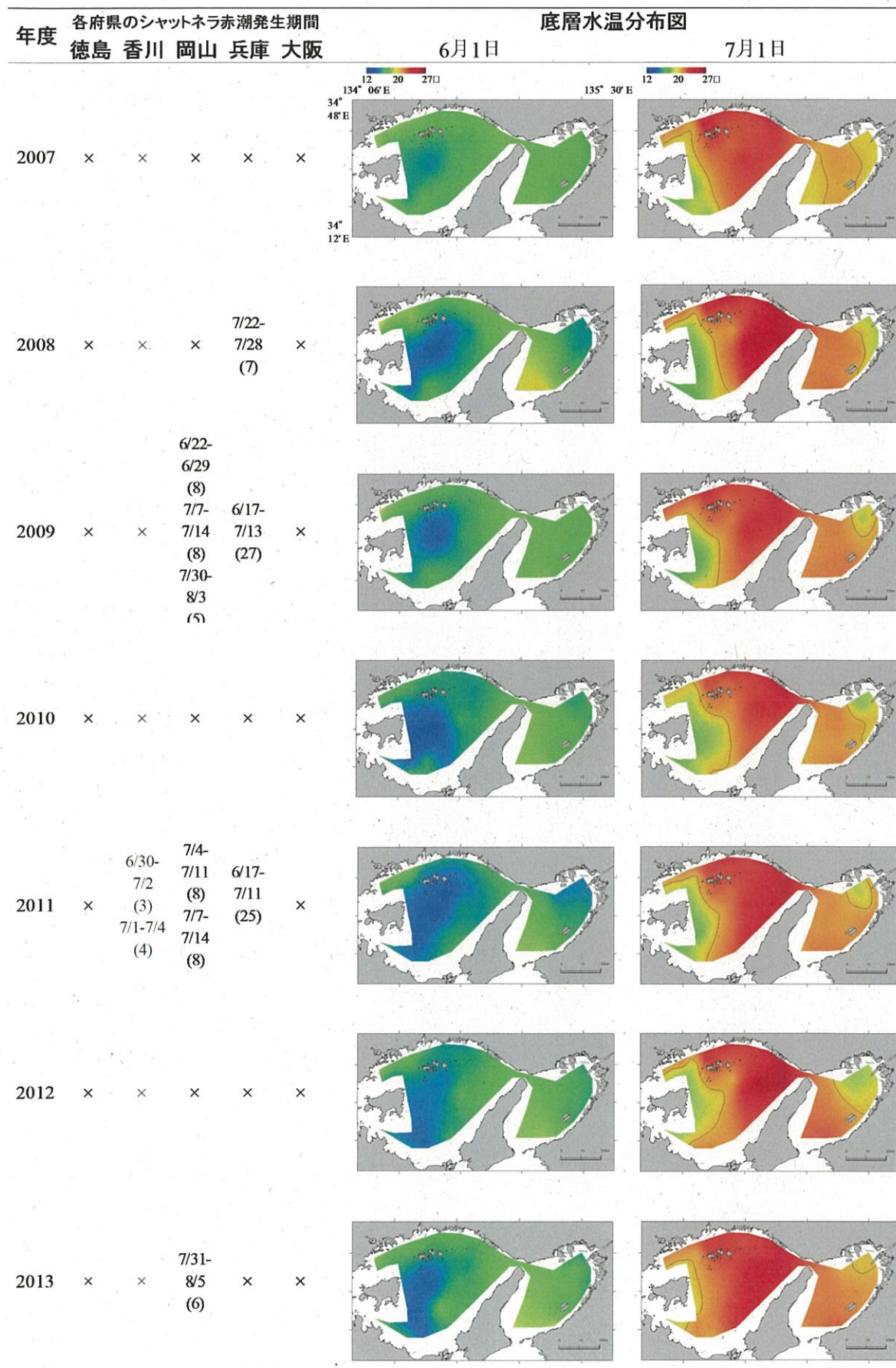
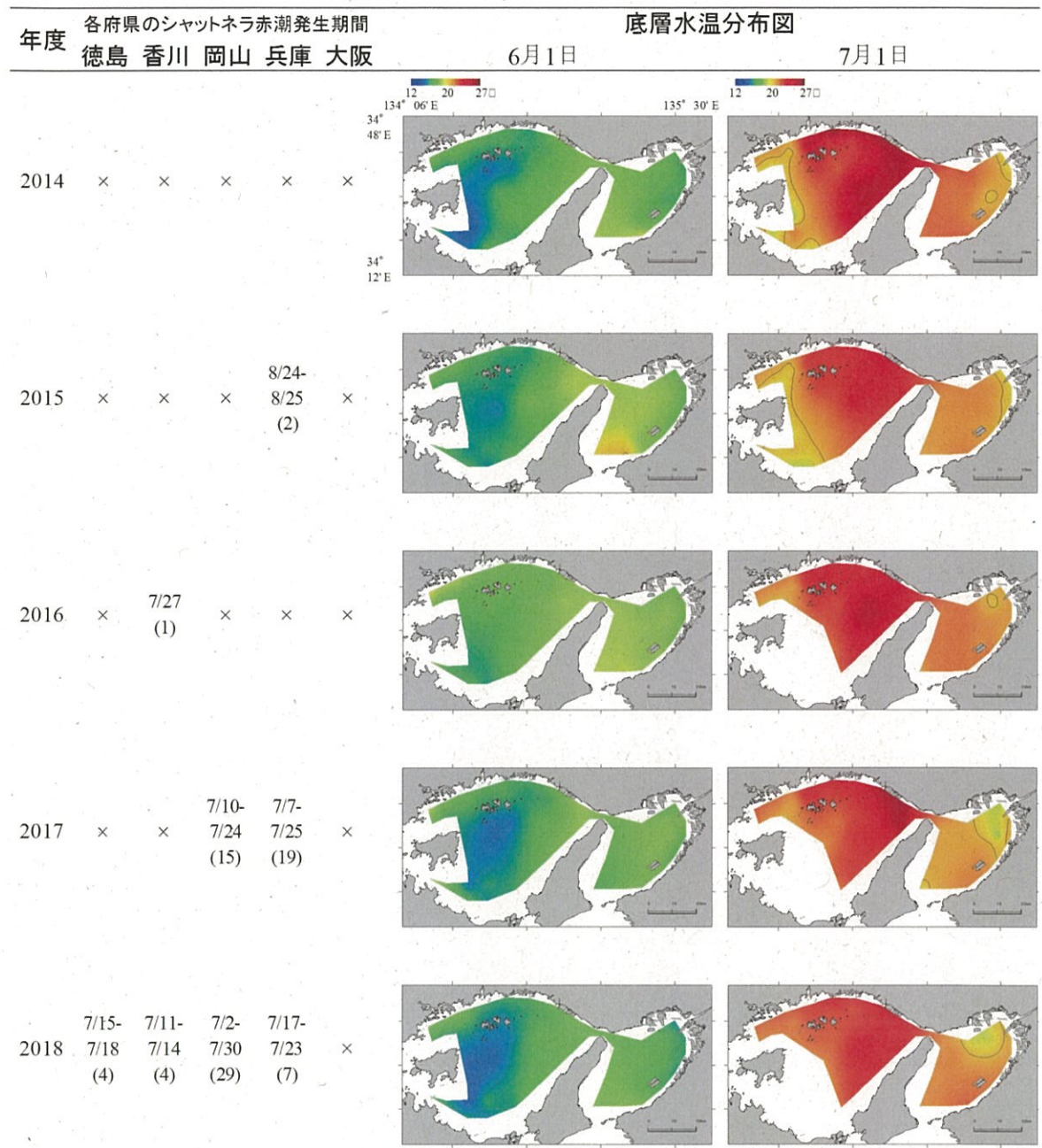






1) 有害赤潮プランクトンの出現動態監視および予察技術開発
イ. 瀬戸内海西部・豊後水道・土佐湾海域

広島県水産海洋技術センター
加川真行, 黒田麻美, 村田憲一, 工藤孝也
山口県水産研究センター内海研究部
本田宇聖, 吉村栄一, 馬場俊典, 國森拓也
福岡県水産海洋技術センター豊前海研究所
後川龍男, 恵崎 摂
大分県農林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
大分県農林水産研究指導センター水産研究部北部水産グループ
岩野英樹, 畔地和久
愛媛県農林水産研究所水産研究センター
竹中彰一, 平井真紀子, 鈴川健二
高知県水産試験場
谷口越則
愛媛大学沿岸環境科学研究センター
吉江直樹, 郭 新宇
愛媛大学南予水産研究センター
清水園子, 松原孝博, 武岡英隆
高知大学教育研究部自然科学系農学部門
山口晴生
水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所
外丸裕司, 坂本節子, 鬼塚 剛, 山口聖

1 全体計画

(1) 目的

瀬戸内海西部海域では有害赤潮プランクトンによる漁業被害が頻繁に発生しており、平成24年夏季には、当該海域で広範囲に *Karenia mikimotoi* 赤潮が発生し、県によっては、十数億円の過去最大の漁業被害が発生した。赤潮による漁業被害を未然防止および軽減するためには、赤潮発生海域を網羅した広域連携調査を実施する必要がある。本課題では、瀬戸内海西部・豊後水道海域・土佐湾海域において各機関が連携して広範な調査を実施し、有害赤潮プランクトンの発生状況および海洋環境を監視するとともに、既存のモニタリングデータの解析、数値モデルを用いた解析等によって当該海域における有害赤潮の発生シナリオを構築し、赤潮発生予察や漁業被害軽減に資することを目的とする。

2 平成31年度計画および結果

(1) 目的

全体計画と同じ

(2) 試験等の方法

1) モニタリング調査

当該海域に計 58 点の調査定点を設置し (図 1), 原則, 有害赤潮が発生する 5 月から 9 月までに計 4 回以上, 海洋環境 (水温, 塩分, 栄養塩等) およびプランクトン細胞密度等のモニタリング調査を実施した (表 1, 表 2)。なお, 調査時に多項目 CTD にクロロフィル極大層の反応が確認された場合は, その層を採水し, プランクトン細胞密度の検鏡計数を行った。調査実施日を表 4 に示す。

周防灘西部の各県海域, 広島湾および浦ノ内湾については, 水塊の成層強度を示す鉛直安定度を以下の式 (1) により求めた。

上層と下層の海水密度差÷水深差×10⁻³ (Sverdrup et al. 1942) (1)

また, 気象データとして気象庁気象統計情報から広島, 豊後高田, 宇和島, 須崎における降水量, 気温, 日照時間および風速の観測値と平年値 (1981 年から 2010 年の 30 年平均値) を解析に用いた。

2) *K. mikimotoi* 高感度監視調査

1) のモニタリング調査定点 58 点のうち, 8 点を調査定点に設置し (図 1), モニタリング調査前の 4~6 月, および冬季の 2~3 月に, PCR 法による高感度調査を実施した (表 3)。調査実施日を表 4 に示す。

各県の共同提案機関は, 各調査点で採水した海水 1 L を孔径 5 μm のメンブレンフィルター (Millipore JMWP04700) で濃縮濾過し, 凍結保存して, 愛媛大学南予水産研究センターに送付した。同センターは, 送付された凍結試料を解凍後, 速やかにビーズ粉砕によりホモジナイズし, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 69106) を用いて DNA を抽出した。DNA の検出・定量は, PCR 法を用いて行った。*K. mikimotoi*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Heterocapsa circularisquama*, *Chattonella* spp. (*antiqua* + *marina* + *ovata*), *Heterosigma akashiwo* の遺伝子をそれぞれ特異的に識別するプライマーと蛍光プローブ (Taqman プローブ) を作製し, マルチプレックス検出可能なリアルタイム PCR 機 (バイオ・ラッド, CFX96) を用いて解析した。得られた数値は, 既知の細胞数を測定して得られた値を基に細胞数へと変換した。

3) 高頻度観測とデータ解析・モデル構築等

図 2 に示す宇和島湾 6 定点にて 5~8 月に週一回の頻度で採水および多項目水質計 (JFE アドバンテック社, AAQ-RINKO) を用いた観測を行った。採水は表層, 5 m, 10 m, 海底上 1 m, クロロフィル極大層で行い, 海水試料は植物プランクトン種組成・細胞密度の分析に供するとともに, オートアナライザー (ビーエルテック社, QuAAtro) で栄養塩濃度 (DIN: NO₂-N+NO₃-N+NH₄-N, DIP: PO₄-P, DSi: SiO₂-Si) を測定した。なお, 表層またはクロロフィル極大層の海水試料は PCR 法による DNA 量の分析にも供した (方法は 2) 参照)。また, U6 および隣接する吉田湾において 2019 年 9 月 18 日に KK 式柱状採泥器を用いた海底泥の層別採取 (1 cm ごと) を行い, 概ね山口ら (2011) の方法に従って処理した後に元素分析計 (ジェイサイエンスラボ社, JM10) (炭素, 窒素) およびオートアナライザー (ビーエルテック社, QuAAtro) (リン) によって海底泥中の有機物含量を測定した。さらに, 宇和海海況情報サー

ビス「You see U-Sea」<http://akashio.jp/>で取得・公表されている U6 の水温データ（5 m 深，25 m 深）を利用するとともに，気象庁の宇和島特別地域気象観測所の日照時間と降水量，宇和島湾奥に流入する須賀川水位（愛媛県南予地方局須賀川ダム管理事務所提供）をそれぞれ用いた。

4) 有害鞭毛藻類の培養試験

① *K. mikimotoi* の培養試験（塩分低下実験のための窒素欠乏培養カレニアの作製）

窒素欠乏状態にあると判断され，かつできる限り高収量になる *K. mikimotoi* Km6Y 株の培養条件を探るため，以下のような実験を行った。窒素源を添加しない -N_SWM-3 培地を作製し，それに対して硝酸塩濃度が SWM-3 完全培地の 3.3%，5%，10%，20%，100% になるように調整した培地を作製した。また硝酸塩を添加しない培地をネガティブコントロールとした。SWM-3 培地で培養して定常期に達した当該株培養を最終濃度 120 cells/mL になるように添加した。添加量は容量比で 1/100 以下になるように調整した。培養は 20°C，12h:12h 明暗周期，600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で実施した。数日間隔で培地から 0.1 mL を採取し，グルタルアルデヒド最終添加濃度 0.01% にて固定後，直ちに自動細胞測定器 Tali（Thermo Fisher Scientific 社）にて細胞密度，細胞サイズ（直径），赤蛍光強度（クロロフィル *a* 蛍光強度）を測定した。実験は概ねの傾向を掴むことを目的としていたため，それぞれ 1 本立てで実施した。

② 塩分低下実験

SWM-3 培地で培養して定常期に達した *K. mikimotoi* Km6Y 株培養を，塩分 30 になるように調整した -N10%_SWM-3 培地ならびに SWM-3 完全培地に対し，それぞれ最終濃度 10 cells/mL ならびに 100 cells/mL になるように接種した。100 cells/mL 接種区は培養開始 28 日目に，10 cells/mL 接種区の培養は 31 日目に塩分低下実験に供した。各実験に用いた培養は，SWM-3 完全培地と窒素制限培地とで当初見込んでいた通りの細胞の性状差が認められた（表 5）。28 日目の培養を用いて以下の実験を行った。塩分 30 の培養液が塩分 26，22，20，18，16，14，12 になるように，SWM-3 と同様な Tris 添加と pH 調整を施した塩分低下希釈用蒸留水を各培養に添加した（塩分低下区）。コントロールとして，蒸留水に NaCl を添加して塩分 30 に調整し Tris 添加と pH 調整を上記と同様に施した添加液を準備した。塩分低下希釈用蒸留水と等量の本添加液を各培地に添加した（対照区：塩分が低下しない希釈処理のみ）。プレートリーダー ARVO-FX（PerkinElmer 社）にて，添加直後から 3 日目までの各実験処理区の蛍光強度を測定した。各希釈区において，対照区の蛍光量に対する塩分低下区の蛍光量の割合を計算し，塩分低下の影響を評価した。実験はそれぞれ 3 連で実施した。

また，28 日目の培養ならびに 31 日目の培養を用いて，塩分低下の影響を細胞数で評価することを目的とした実験を行った。塩分 30 の状態から，塩分 20 ならびに塩分 15 になるように塩分低下希釈用蒸留水を添加し，24 時間後の細胞数を，Tali を用いて計数した。対照区は上記の実験と同様に設置した。本実験はそれぞれ 1 本立てで実施した。

③ 画像解析ソフトを用いた細胞の解析

H30 年度に構築したフリー画像解析ソフトである ImageJ による細胞直径測定プロトコルに基づいて，2018 年 7 月 11 日～12 日にかけて愛媛県宇和海海域で発生した *K. mikimotoi* 赤潮

の顕微鏡写真 53 枚を対象として、当該種の直径を測定した。また、二枚貝のサイズ測定のために開発された画像解析ソフト Touch De Measure を用い、上記と同じ写真の画像解析をして両者の操作性を比較した。

④ 内湾環境を室内再現可能な培養装置の新規構築

この課題の目的は、赤潮発生域にて観察される様々な環境変動を室内にて再現可能な新しい培養システムを開発し、それを用いて有害赤潮原因藻の鉛直挙動を明らかにすることにある。ここでは、ガラス製円筒を培養容器とし、それに培地を投入、恒温培養室内にて昨年度開発の温度・光照射制御を実施することで、様々な環境下で培養した *Karenia mikimotoi* の挙動を調べようとした。

本年度、培養系の無菌化とともに光変動のリアルタイムモニタリングを可能とする技術開発に挑んだ。巨大シリコン栓をガラス製円筒の口径に適合するように加工、さらに当該栓にフィルターもしくはキャップ付きの通気口・試料採取口を設けた。このシリコン栓をガラス製円筒に取り付け、オートクレーブ処理を試みることで、培養装置の無菌化を図ろうとした。続いて、培養系内に海水を満たした状態で白色 LED 光を照射し、各水位に 4 π 型水中光量子センサー (LI-COR 社) を投入した。経時的に各水位の光量子束密度 (光強度) を測定した。その上で、2 π 型光量子センサー (LI-COR 社) を用いて各水位における光強度を系外から測定した。得られた両光強度の相関関係を解析することで、培養系外から系内の光強度を推定可能な関数を得ようとした。

試験には、浦ノ内湾より分離した *K. mikimotoi* KmURN1Y 無菌株 (Yamaguchi et al. 2016) を用いた。先に構築した 2 つの大量培養装置 (2014 年度事業成果) に IMK 培地 6 L (塩分 30) をそれぞれ調製し、それらをオートクレーブ処理した。そのうちの一つに供試株の保存培地を接種、20°C に設定した恒温培養室内にて、白色 LED 光照射下 (明暗周期 12hr:12hr) で 20 日間培養した。これにより得られた培養液をガラス製円筒に投入し、その後、非接種の培地も投入した。乾熱滅菌処理した特大シリコン栓を円筒上部に取り付けた。これらの操作はクリーンルーム内にて実施した。培養 0 日目に光強度の鉛直変動をモニタリングし、培養 4 日目以降、明期において光強度および細胞密度の鉛直的かつ経時的なモニタリングを実施した。その過程で、培養 7 日目の光照射開始 1 時間前 (暗黒下) での細胞密度モニタリングも実施した。

5) 赤潮発生シナリオと予察技術の検証と改良

① 既存データの解析 (初認日と冬季水温の関係について)

平成 30 年度に実施した統計解析により、当該海域における *K. mikimotoi* の初認日が冬季水温や発生規模と関連があるか検討した。その結果、初認日と発生規模については相関が確認できたが、冬季水温と初認日との関連は認められなかった。この解析は、年代が統一されていない瀬戸内海西部・豊後水道・土佐湾海域の複数の湾のデータをすべて統合して行ったため、年代や海域ごとの特徴を抽出できなかった可能性がある。そこで本年度は、解析期間や海域別に関係性がないか再度検討した。

② 既存データの解析 (赤潮予察技術の検証および発生規模に関与する環境因子の抽出)

平成 29 年度までに実施した統計解析により、*K. mikimotoi* の赤潮の発生、非発生を反映する環境因子（海象・気象）を見出し、発生シナリオの構築および判別分析による予察技術を開発した。本年度は、これまでに作成した赤潮予察技術の結果検証および赤潮発生・非発生の判別だけではなく、発生規模を分ける環境条件を検討した。

（3）結果および考察

1) モニタリング調査

① 気象

【概況】

今年度の梅雨入りは、中国地方（山口県を除く）、九州北部地方（山口県を含む）、および四国地方ともに 6 月 26 日頃（平年 6 月 5～7 日頃）、梅雨明けは 7 月 25 日頃（平年 7 月 18～21 日頃）であった。梅雨入りは、平年より 20 日程度遅く、梅雨明けは、平年より 4～7 日遅かった。梅雨入りが遅く、6 月の降水量は少なめとなったが、7 月中旬には、梅雨前線や台風 5 号の影響によりまとまった降雨があった。

また、今年度は 7～10 月にかけて、5 個の台風が日本に上陸し、西日本にも接近した。このうち、8 月 6 日に宮崎市に強い勢力で上陸した台風第 8 号は宮崎県や大分県に、8 月 15 日に広島県呉市に上陸した台風 10 号は、西日本に影響を与えた。

【広島、豊後高田、宇和島、須崎の観測結果】

各観測所における 4～9 月の降水量、日照時間、平均気温および平均風速の旬別気象データと平年値の推移を図 3 に示した。

降水量（図 3a）：梅雨入り前までは平年並みもしくは平年より低い旬が続いた。梅雨入り後は、広島市、豊後高田市で 7 月中旬に、宇和島市で 6 月下旬～7 月中旬に 100 mm を超える降雨があった。また、須崎市では 7 月上旬中旬に 300 mm 程度の降雨があった。梅雨明け後の 8 月にもまとまった降雨があり、広島市では 8 月中下旬に、豊後高田市では 8 月下旬に、宇和島市では 8 月中旬に、須崎市では 8 月中旬、9 月上旬に平年より多めの降水量となった。

平均気温（図 3b）：4 月、5 月は平年より高めであったが、7 月上旬と 8 月下旬は平年より低めであった。

日照時間（図 3c）：梅雨入りが遅く、6 月は平年より長めであった。しかし、梅雨入り後の 7 月は平年より短めになった。また、梅雨明け後の 8 月上旬は長めとなったが、下旬は短めとなった。

平均風速（図 3d）：広島市と豊後高田市は平年より低め、宇和島市と須崎市は平年より高めで推移した。

② 海象

各県海域の海象データの推移を図 4～7、平年偏差を表 6、平年偏差の算出に用いたデータ

期間、対象調査点、対象水深を表 7 に示す。

水温 (図 4) : 広島湾 (5 m, 5 月～9 月) は, 15.6～25.3℃, 山口県徳山湾 (5 m, 6 月～9 月) は, 19.1～26.6℃, 福岡県周防灘 (5 m, 5 月～8 月) は, 17.1～27.4℃, 大分県周防灘 (5 m, 5 月～9 月) は, 17.5～27.4℃, 大分県別府湾・豊後水道海域 (10 m, 5 月～8 月) は, 14.8～23.8℃, 愛媛県豊後水道海域 (10 m, 5 月～8 月) は, 17.3～24.4℃, 高知県宿毛湾 (5 m, 5 月～9 月) は, 22.9～27.8℃, 高知県浦ノ内湾 (5 m, 5 月～9 月) は, 20.5～28.7℃で推移した。広島湾や周防灘では, 6 月の水温が高めであった。

塩分 (図 5) : 広島湾 (5 m, 5 月～9 月) は, 30.28～32.19, 山口県徳山湾 (5 m, 6 月～9 月) は, 31.58～33.06, 福岡県周防灘 (5 m, 5 月～8 月) は, 31.87～33.13, 大分県周防灘 (5 m, 5 月～9 月) は, 29.87～32.88, 大分県別府湾・豊後水道海域 (10 m, 5 月～8 月) は, 32.82～33.84, 愛媛県豊後水道海域 (10 m, 5 月～8 月) は, 33.52～34.17, 高知県宿毛湾 (5 m, 5 月～9 月) は, 32.91～34.35, 高知県浦ノ内湾 (5 m, 5 月～9 月) は, 25.68～33.34 で推移した。梅雨入りが遅く 6 月の降水量が少なめの影響を受けて, 広島湾, 周防灘, 別府湾で 7 月の塩分は高めとなった。

透明度 (図 6) : 広島湾 (5 月～9 月) は, 2.1～6.0 m, 山口県徳山湾 (6 月～9 月) は, 4.2～6.7 m, 福岡県周防灘 (5 月～8 月) は, 3.2～7.7 m, 大分県周防灘 (5 月～9 月) は, 4.0～7.8 m, 大分県別府湾・豊後水道海域 (5 月～8 月) は, 5.2～12.7 m, 愛媛県豊後水道海域 (5 月～8 月) は, 12.6～16.5 m, 高知県宿毛湾 (5 月～9 月) は, 5.9～9.4 m, 高知県浦ノ内湾 (5 月～9 月) は, 1.1～5.1 m で推移した。

鉛直安定度 (図 7) : 広島湾 (5 月～9 月) は, 8.8×10^{-5} ～ 102.7×10^{-5} , 山口県徳山湾 (6 月～9 月) は, 10.1×10^{-5} ～ 23.9×10^{-5} , 福岡県周防灘 (5 月～8 月) は, 1.6×10^{-5} ～ 19.0×10^{-5} , 大分県周防灘 (5 月～9 月) は, 1.8×10^{-5} ～ 26.2×10^{-5} , 高知県浦ノ内湾 (5 月～9 月) は, 12.1×10^{-5} ～ 170.4×10^{-5} で推移した。広島湾, 大分県周防灘, 浦ノ内湾では, 7 月のまとまった降雨の影響を受けて, 鉛直安定度の増大がみられた。

③ 水質

各県海域の水質データの推移を図 8～11, 平年偏差を表 6, 平年差の算出に用いたデータ期間, 対象調査点, 対象水深を表 7 に示す。

クロロフィル *a* (図 8) : 広島湾 (5 m, 5 月～9 月) は, 2.99～7.00 $\mu\text{g/L}$, 山口県徳山湾 (5 m, 6 月～9 月) は, 2.17～4.48 $\mu\text{g/L}$, 福岡県周防灘 (5 m, 5 月～8 月) は, 0.10～0.44 $\mu\text{g/L}$, 大分県周防灘 (5 m, 5 月～9 月) は, 1.12～4.16 $\mu\text{g/L}$, 大分県別府湾・豊後水道海域 (10 m, 5 月～8 月) は, 1.11～2.30 $\mu\text{g/L}$, 愛媛県豊後水道海域 (10 m, 5 月～8 月) は, 1.32～2.542 $\mu\text{g/L}$, 高知県宿毛湾 (5 m, 5 月～9 月) は, 0.38～1.96 $\mu\text{g/L}$, 高知県浦ノ内湾 (5 m, 5 月～9 月) は, 1.22～17.85 $\mu\text{g/L}$ で推移した。

DO (図9) : 広島湾 (B-1 m, 5月～9月) は, 15.3～83.8 %, 山口県徳山湾 (B-1 m, 6月～9月) は, 7.6～78.0 %, 福岡県周防灘 (B-1 m, 5月～8月) は, 70.8～94.5 %, 大分県周防灘 (B-1 m, 5月～9月) は, 31.9～103.5 %, 大分県別府湾・豊後水道海域 (10 m, 5月～8月) は, 88.3～102.0 %, 愛媛県豊後水道海域 (10 m, 5月～8月) は, 91.7～98.0 %, 高知県宿毛湾 (20 m, 5月～9月) は, 78.9～99.2 %, 高知県浦ノ内湾 (B-1 m, 5月～9月) は, 10.1～45.7 %で推移した。広島湾, 山口県徳山湾, 大分県周防灘では, 9月に35 %以下まで低下した。

DIN (図10) : 広島湾 (5 m, 5月～9月) は, 0.30～6.80 μM , 山口県徳山湾 (5 m, 6月～9月) は, 0.09～0.74 μM , 福岡県周防灘 (5 m, 5月～8月) は, 1.36～2.84 μM , 大分県周防灘 (5 m, 5月～9月) は, 0.05～1.27 μM , 大分県別府湾・豊後水道海域 (10 m, 5月～8月) は, 0.28～2.01 μM , 愛媛県豊後水道海域 (10 m, 5月～8月) は, 0.58～0.97 μM , 高知県宿毛湾 (10 m, 5月～9月) は, 0.31～7.43 μM , 高知県浦ノ内湾 (5 m, 5月～9月) は, 0.25～15.80 μM で推移した。広島湾, 大分県周防灘では, 7月中旬のまとまった降雨の影響を受けて, DINの増加がみられている。

DIP (図11) : 広島湾 (5 m, 5月～9月) は, 0.13～0.83 μM , 山口県徳山湾 (5 m, 6月～9月) は, 0.02～0.09 μM , 福岡県周防灘 (5 m, 5月～8月) は, 0.02～0.17 μM , 大分県周防灘 (5 m, 5月～9月) は, 0.01～0.09 μM , 大分県別府湾・豊後水道海域 (10 m, 5月～8月) は, 0.15～0.26 μM , 愛媛県豊後水道海域 (10 m, 5月～8月) は, 0.06～0.10 μM , 高知県宿毛湾 (10 m, 5月～9月) は, 0.05～0.23 μM , 高知県浦ノ内湾 (5 m, 5月～9月) は, 0.07～0.92 μM で推移した。

④ プランクトン

各海域におけるプランクトンの観測値 (有害種は最高細胞密度, 珪藻は表層平均密度) を図12, 広島湾, 周防灘海域, 別府湾, 豊後水道海域, 宿毛湾における *K. mikimotoi* 及び *Chattonella* spp. の観測値 (最高細胞密度) の水平分布を図13, 図14に, 浦ノ内湾における *K. mikimotoi* 及び *Chattonella* spp. の水平分布を図15, 図16に示す。

K. mikimotoi (図12, 13, 15) : 広島湾 (最高密度0 cells/mL), 大分県別府湾・豊後水道海域 (最高密度17 cells/mL), 愛媛県豊後水道海域 (最高密度0.09 cells/mL), 高知県宿毛湾 (最高密度3 cells/mL) では, 最高密度が20 cells/mL以下で推移し, *K. mikimotoi* 赤潮の発生はみられなかった。赤潮がみられた海域は, 周防灘と浦ノ内湾であった。周防灘のうち山口県徳山湾では, 6月5日に初認され, 8月9日に最高密度の440 cells/mLに達し, 8月9日～27日の間に山口県の注意報基準 (100 cells/mL) を超えて出現した。福岡県周防灘では, 5月7日に初認され, 調査点での最高密度は2 cells/mLであったが, 7月上旬にF8に近い沿岸の狭い範囲で2,700 cells/mLの高密度水域が確認され, 7月17日～24日の間に赤潮を形成した。また, 8月中旬には沖合域のF9で153 cells/mLが確認され, 8月21日～27日の間に赤潮を形成した。大分県周防灘では, 6月中旬に他事業調査の定点で初認され, 7月22日に170 cells/mLまで増殖し, 8月20日に795 cells/mLの最高密度に達した。大分県周防灘では, 7月22日～9

月2日の間に赤潮を形成した。

浦ノ内湾では、*K. mikimotoi* は、冬季から確認され他事業調査の結果と合わせると、初認は1月と早い傾向にあった。4月中旬には100 cells/mLを越え、5月15日には18,000 cells/mLに達し、赤潮を形成した。6月19日(15,000 cells/mL)、25日(28,000 cells/mL)に10,000 cells/mLを超える高密度となり、28日に47,000 cells/mLの最高密度に達した。7月上旬からは*Chattonella* spp. と混合赤潮を形成し、8月上旬まで増減を繰り返し、中旬に減少傾向となり、下旬に終息した。

C. polykrikoides (図12)：広島湾(8 cells/mL)、大分県別府湾・豊後水道海域(0.32 cells/mL)、高知県宿毛湾(0.01~0.54 cells/mL)で観察された。

H. circularisquama (図12)：高知県宿毛湾(29 cells/mL)で観察された。

Chattonella spp. (*antiqua* + *marina* + *ovata*) (図12, 14, 16)：広島湾、山口県徳山湾、愛媛県豊後水道海域、高知県宿毛湾では、3 cells/mL以下で観察された。福岡県周防灘では、1~70 cells/mL、大分県周防灘では、1~60 cells/mL、大分県別府湾・豊後水道海域では、1~30 cells/mL、高知県浦ノ内湾では、1~17,000 cells/mLの範囲で観察され、周防灘と別府湾では6月~7月に、浦ノ内湾では7月~9月に赤潮となった。

H. akashiwo (図12)：広島湾(3~120 cells/mL)、山口県徳山湾(1~2 cells/mL)、福岡県周防灘(2~4 cells/mL)、大分県周防灘(5~10 cells/mL)、大分県別府湾・豊後水道海域(18 cells/mL)、高知県浦ノ内湾(250~400 cells/mL)で観察された。

珪藻類(図12)：表層の平均密度は、広島湾(5月~9月)が、1,101~27,836 cells/mL、山口県徳山湾(6月~9月)が、243~8,603 cells/mL、福岡県周防灘(5月~8月)が、144~881 cells/mL、大分県周防灘(5月~9月)が、32~1,017 cells/mL、大分県別府湾・豊後水道海域(5月~8月)が、78~2,835 cells/mL、愛媛県豊後水道海域(5月~8月)が、1~69 cells/mL、高知県宿毛湾(5月~9月)が、150~500 cells/mL、高知県浦ノ内湾(5月~9月)が、10~4,400 cells/mLの範囲で推移した。

⑤ まとめ

4~11月の赤潮発生状況を表8に示す。本年度は、広島県(燧灘)、周防灘(徳山湾、福岡県海域、大分県海域)、豊後水道(大分県入津湾)、土佐湾(浦ノ内湾)で計7件の*K. mikimotoi* 赤潮が発生したが、前年の15件に比べ少ない結果となった。特に豊後水道域での*K. mikimotoi* 赤潮の発生件数は少なく、前年の9件から1件に減少した。また、*Gonyaulax polygramma* 赤潮が愛媛県海域と大分県海域で共通して発生した。調査対象海域では、本年度は周防灘と浦ノ内湾で*K. mikimotoi* 赤潮が発生したが、それ以外の海域では非発生となったことから、本調査結果もふまえ、*K. mikimotoi* 赤潮の発生過程や発生に至らなかった要因等について海域毎に検討した。

広島湾においては、*K. mikimotoi* 赤潮は非発生の年となった。*K. mikimotoi* は、冬季~春

季の濃縮検鏡において12月上旬に0.01 cells/mLで検出されたが、その後は検出されなかった。さらに、3月から6月のPCR法によっても全く検出されず、冬季～春季の*K. mikimotoi*の細胞密度は極めて低レベルであった。7月中旬になって100 mmを超える降雨にともなう塩分低下の影響で鉛直安定度の増大やDIN濃度の増加、日照時間の低下など、*K. mikimotoi*の増殖に有利な環境条件となったものの、競合する珪藻が増殖したこともあり、*K. mikimotoi*は増殖することなく、調査期間中は全く検出されなかった。

徳山湾において*K. mikimotoi*は、注意報基準を超えて出現した。冬季～春季の*K. mikimotoi*の細胞密度は、PCR法では6月に、顕微鏡計数では4月に確認されたが、全般に低レベルであり、7月中旬までの最高密度は1 cells/mLで推移した。本年度は、梅雨入りが遅く、降水量は7月上旬まで平年に比べて少なめであったが、中旬になって200 mm近い降雨があり、その後の珪藻密度の減少もあり、*K. mikimotoi*は、8月上旬に440 cells/mLまで増加した。

周防灘の福岡県海域においては、7月中旬にF8に近い沿岸域、8月下旬に沖合域のF9で*K. mikimotoi*赤潮が発生した。本年度の中部～南部海域では珪藻類が少ない状態がしばしば観察されており、渦鞭毛藻類が増殖する余地があったものと考えられる。一方冬季～春季の*K. mikimotoi*の細胞密度は、PCR法で5月に確認されただけで、全般に低レベルであり、7月上旬まで最高密度2 cells/mLで推移した。しかし梅雨入りの遅れにより7月になってから日照時間が低下し、7月中旬のまとまった降雨による陸水の流入に伴い、本種の増殖に好適な条件となったことから、*K. mikimotoi*が局所的に増殖し赤潮を形成したものと考えられた。なお発生域が狭く、短期間で終息したため*K. mikimotoi*による漁業被害は確認されなかった。また8月下旬の*K. mikimotoi*赤潮は、沖合域のみで確認されており、その後の増殖も見られなかったことから、隣接海域からの移送による一時的なものと考えられた。

周防灘の大分県海域においては、7月中旬から9月上旬まで*K. mikimotoi*赤潮が発生した。

本年度は、全般的に降水量が少ないために栄養塩濃度が低く、珪藻類の密度が低いのが特徴的であり、鞭毛藻類が優占しやすい環境にあった。鞭毛藻類のうち、6月上旬には*Vicicitus globosus*が、7月上旬には*Chattonella* spp.が優占した。*K. mikimotoi*については、冬季～春季の細胞密度は、PCR法で6月に確認されただけで、全般に低レベルであり、7月上旬まで最高密度4 cells/mLで推移した。しかし、7月の日照時間が平年に比べ短くなり、本種の増殖に好適となったこと、7月中旬のまとまった降雨にともなう陸水の流入により、一時的に栄養塩濃度が上昇したことや成層強度の発達により本種が増殖しやすい物理的環境条件になったこと等が影響して、7月下旬に赤潮を形成したものと考えられた。

豊後水道のうち、大分県海域における*K. mikimotoi*赤潮は、入津湾で発生がみられただけで他の海域では発生がなかった。大分県入津湾では、暖冬の影響等により初期遊泳細胞とされる越冬細胞が周年確認され、豊後水道大分県海域沿岸の高感度調査では、冬季に遺伝子が検出される等、赤潮が発生する可能性が考えられたが、本種赤潮が発生しやすい梅雨時期に珪藻が優占し、その後も断続的に珪藻が発生したことによって、*K. mikimotoi*の増殖が抑制されたため、赤潮発生には至らなかったものと考えられた。

愛媛県海域においても*K. mikimotoi*赤潮は、発生しなかった。愛媛県海域の*K. mikimotoi*はPCR法で2月から4月に確認されたが、それ以降7月までほぼ検出されなかった。6月下旬から7月中旬にかけて降水量の増加と日照時間の低下がみられ、*K. mikimotoi*の増殖に有利な条件となったが、遊泳細胞が低レベルであったため赤潮化に至らなかった。*K. mikimotoi*が

低密度であった要因として、5 月底層の低栄養塩と 5 月下旬の急潮による海水交換の影響が考えられた（詳細は 3) 参照）。今年度は、*K. mikimotoi* の代わりに *Gonyaulax polygramma* が増殖し赤潮を形成した。*K. mikimotoi* の最高密度は、8 月の 0.09 cells/mL であり、調査海域以外では、10 cells/mL が最高であった。

宿毛湾においては、湾内の *K. mikimotoi* が冬季には確認されず、初認は PCR 法で 4 月下旬、顕微鏡観察で 8 月上旬と遅く低密度で推移した。また、愛媛県海域の *K. mikimotoi* 赤潮が非発生であったため、湾内への流入がみられなかったことから、赤潮発生には至らなかったものと考えられた。

浦ノ内湾においては、5 月上旬から 8 月下旬まで *K. mikimotoi* 赤潮が発生した。

本種は冬季から確認され、他事業調査の結果と合わせると初認は PCR 法、顕微鏡観察ともに 1 月であり、早い傾向にあった。7 月上旬からは、*Chattonella* spp. と混合赤潮を形成し、7 月に漁業被害が生じた。

本年度は、冬季から *K. mikimotoi* の遊泳細胞が存在する状態で、珪藻類が低密度であり、4 月から 5 月にかけて降水量が多く、日照時間が短くなるなど、本種の増殖に有利な条件が整い赤潮を形成したと考えられた。また、*K. mikimotoi* 赤潮が長期化した要因として、梅雨前線の影響で低日照が続いたこと、前線や台風 5 号のまとまった降雨による陸水の流入に伴い、表層の塩分が著しく低くなり、競合する珪藻類の増殖が低調となったことなどが影響したものと考えられた。

2) *K. mikimotoi* 高感度監視調査

図 17 と表 9 に、遺伝子検査の結果を示した。顕微鏡観察で把握できる前の動向を把握するため、今年度は 4～6 月に 3 回調査を実施し、2～3 月に 1 回実施する予定である。また、前年度の 2～3 月の結果についても併せて図 17 と表 9 に示した。なお、本年度の 2～3 月の結果については、次年度に報告することとする。

冬季～初春（2 月～3 月）に *K. mikimotoi* 遺伝子が検出された海域は、大分県別府湾海域（O3：0.002 cells/mL）、愛媛県（E4：0.002～0.005 cells/mL）、浦ノ内湾（KU1：0.001 cells/mL）であった。今期の冬季越冬細胞は、広島湾や周防灘では検出されず、豊後水道や土佐湾海域で確認された。

春季～初夏（4 月～6 月）に遺伝子が検出された海域は、山口県（Y4：0.002～0.017 cells/mL）、福岡県（F11：0.004～0.057 cells/mL）、大分県周防灘海域（O13：0.005～0.013 cells/mL）、大分県別府湾海域（O3：0.002～0.005 cells/mL）、高知県宿毛湾（KS1：0.001～0.009 cells/mL）、高知県浦ノ内湾（KU1：0.006～1.750 cells/mL）であった。赤潮が発生した周防灘では、5 月または 6 月にかけて遺伝子が検出されたが、赤潮が非発生であった広島湾では、調査期間中に全く *K. mikimotoi* 遺伝子が検出されなかった。豊後水道海域では、4 月から遺伝子が検出された大分県側も、4 月以降全く検出されなくなった愛媛県側も赤潮は非発生となった。5 月に赤潮となった浦ノ内湾では、4 月～6 月まで継続して遺伝子が高密度で検出された。本種の初期の挙動と赤潮発生状況は概ね一致し、周防灘海域では赤潮発生に先行して検出される傾向がみられた。

3) 高頻度観測とデータ解析・モデル構築等

図 18 に 5 月から 8 月にかけての気象条件と宇和島湾への河川水流入の指標と考えられる須賀川水位を示す。2019 年は平年に比べて梅雨入りが大幅に遅れたため（四国地方の梅雨入り日、平年：6 月 5 日，2019 年：6 月 26 日），6 月中旬まで好天が続いたが 6 月下旬から 7 月中旬にかけて降水量が増加し，日照時間も平年より短くなった。須賀川水位は降水量と対応し 6 月下旬から 7 月中旬に増加していた。宇和島湾では近年の大規模発生年（2012 年，2014 年，2015 年，2018 年）において，日照時間が平年値を下回る梅雨時期に *K. mikimotoi* 細胞密度の増加が確認されていたが，2019 年は梅雨入り後も *K. mikimotoi* が低密度で推移し，細胞密度は最高で 4 cells/mL だった。

図 19 に宇和島湾奥の重点調査点 U6 における水質環境と植物プランクトン種組成・細胞密度の鉛直分布時間変化を示す。5 月下旬に全層で水温・塩分の上昇が確認され，外洋系水の進入が示唆された。6 月下旬までまとまった降水がなかったため，10 m 以浅の栄養塩濃度は 6 月中旬まで低い傾向が続いていた。珪藻（*Chaetoceros* 属と *Pseudonitzschia* 属が主体）は 5 月中旬から 7 月中旬まで 1,000 cells/mL 未満と比較的低密度で推移していた。梅雨時期の 6 月下旬から 7 月下旬には，珪藻の密度が低下し，鞭毛藻（*Prorocentrum dentatum* 等）が数十～数百 cells/mL に増加した。2018 年には *P. dentatum* の減少後に *K. mikimotoi* が優占したが，2019 年には *K. mikimotoi* の増加は認められず，7 月下旬以降 *Gonyaulax polygramma* が増加し，8 月下旬に 600 cells/mL が観測された。周辺漁協も含めた宇和島湾全域の調査結果によると，*G. polygramma* は 8 月下旬に広範囲で赤潮化し，最高細胞密度は 100,000 cells/mL に達した（愛媛県赤潮情報 <http://ehime-suiken.jp/wordpress/akasio/>）。

宇和海の中央部に位置する宇和島湾では大規模な *K. mikimotoi* 赤潮が発生した 2012 年以降，監視・調査体制を強化しており，発生年の特徴については調査データを基にいくつかの報告がなされている（宮川ら 2018，黒田ら 2019）。一方，2019 年は宇和海全域で *K. mikimotoi* 赤潮が発生せず，非発生は 2011 年以来 8 年ぶりとなった。そこで，今年度は宇和島湾における観測結果をもとに，1）初期個体群，2）増殖環境，3）物理環境（外洋系水の影響），という 3 つの要素から 2019 年夏季に *K. mikimotoi* 赤潮が発生しなかった理由を考察した。

まず一つ目の要素である初期個体群の動態を探るために，PCR 法で検出された U6 における *K. mikimotoi* の DNA 量の時間変化を示す（図 20）。2019 年は 4 月上旬まで検出されており，初期個体群として 1 L に数細胞レベルの低密度で栄養細胞が存在していたと考えられた。しかしながら，4 月中旬以降，6 月下旬までほぼ未検出だった。対照的に 2018 年は 5 月以降急激に増加していたことから，両年の違いは 5 月から 6 月の環境の違いによって生じたと推察された。

そこで，2 つ目の要素である *K. mikimotoi* の増殖環境として，水温・塩分・光・栄養塩について 2018 年と 2019 年を比較した。2018 年 5 月から 6 月の水温は 17.4～24.0℃，塩分は 27.8～34.4 の範囲だったのに対し，2019 年 5 月から 6 月は 16.2～23.8℃，29.8～34.5 の範囲で，山口（1994）の培養株を用いた増殖試験による水温・塩分と増殖速度の関係に照らすと，両年の水温・塩分環境による増殖速度の違いはほとんどなかったと推察された。同様に光環境として両年の 5 月と 6 月の日照時間を比較すると，梅雨入りの遅れた 2019 年の方が 5～6 月の日照時間が 1 割程度長かったが，同じく培養株を用いた山口（1994）の光－増殖曲線によると 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 以上の光強度において 1 割程度の変化で増殖速度はほぼ変わらず，両年の光環境による増殖速度の違いは小さかったと推察された。一方，図 21 に示す底層の栄養塩環

境の両年の違いは特に5月で大きく、2018年5月はDIN・DIPが*K. mikimotoi*の増殖に対する半飽和定数を大幅に上回る濃度であったのに対して、2019年5月は相対的に低く、半飽和定数を下回る日もあった。したがって、2019年は特に5月の底層で栄養塩濃度が低かったことが*K. mikimotoi*が増殖しなかった一因と考えられる。

ここで、底層の栄養塩環境の両年の違いに影響する要因を探るため、海底泥中の有機物含量を確認した。図22に示す層別の有機態の炭素・窒素・リン濃度によると、海底表層3cm程度まで養殖場近くのU6で有機態の炭素・窒素濃度が高く、養殖場からの有機物供給が原因と考えられた。宇和島湾には2018年7月上旬に発生した西日本豪雨（平成30年7月豪雨）によって多量の河川水が流入したため（黒田ら2019）、河川水とともに多量の土砂も流入したことが想定された。仮に多量の土砂が堆積物として底層に堆積していれば宇和島湾の底層の栄養塩環境を変化させた可能性があるが、今回測定した海底泥中の有機物含量のプロファイルからは西日本豪雨の影響は確認されず、2018年と比べて2019年に底層栄養塩が低かった理由が底質環境の違いとは考えにくい結果となった。

最後に、3つ目の要素の物理環境として、外洋系水の進入の有無を確認した。図23にU6における水温の時間変化を示す。5月下旬に表層から海底まで2℃以上の急激な水温上昇が観測された。同時期の表層水温分布図によると、豊後水道南部から北東に向けて暖水が波及していく様子が確認でき（愛媛県水温情報 <http://ehime-suiken.jp/wordpress/>）、宇和海全域で比較的規模の大きな急潮が発生していたと推察された。宇和海では急潮や底入り潮などの外洋水の進入が植物プランクトン動態に影響していることが知られている（小泉・河野1994、速水ら2005、兼田ら2010）。2019年5月下旬に観測された急潮による海水交換によって、低密度で存在していた*K. mikimotoi*が希釈されたことで結果的に赤潮化に至らなかった可能性がある。

以上をまとめると、2019年夏季に宇和島湾で*K. mikimotoi*赤潮が発生しなかった要因として、5～6月の底層での低栄養塩と5月下旬の急潮による海水交換が考えられた。本事業によって、宇和島湾では2018年と2019年の2年連続で高頻度調査が行われ、*K. mikimotoi*を含む植物プランクトン動態と環境データが蓄積されてきている。これらのデータや数値モデルを用いて、今後はより解像度を上げた数日スケールの*K. mikimotoi*動態の解明に取り組んでいく予定である。

4) 有害鞭毛藻類の培養試験

① *K. mikimotoi*の培養試験（塩分低下実験のための窒素欠乏培養カレニアの作製）

実験結果を図24に示す。いずれの培地においても実験開始以降、細胞は徐々に増加し始めた。窒素源を添加しないネガティブコントロールでは培養開始9日目に 2.5×10^3 cells/mLの定常期に達し、17日目以降、徐々に減少していった。それ以外の培養区では、窒素添加量が多いほど定常期に達するのが遅くなる傾向にあった。完全培地の*K. mikimotoi*は培養15日目に 3.6×10^4 cells/mLに達し、それ以降も細胞密度は徐々に増加して実験開始37日目には 8.5×10^4 cells/mLに到達した。その間、細胞当たりの平均自家蛍光強度ならびに細胞サイズは大きく変動したが、18日目以降はそれぞれ、9,500-10,000程度ならびに20-21μm程度で実験終了時まで推移した。塩分低下実験に使用するための窒素欠乏培養の条件として、完全培地の細胞と比較して細胞の性状が明らかに異なること、ならびに細胞密度ができる限り高いことが必要

とされる。それらの観点から、-N10%_SWM-3 培地で 28 日間培養した *K. mikimotoi* 培養が妥当と判断した。その理由として、当該培地で 28 日間培養した *K. mikimotoi* の細胞密度はおよそ 2×10^4 cells/mL が見込まれること、細胞当たりの平均蛍光強度は 8,000 程度であり、平均細胞サイズは約 23 μm 程度であることから、完全培地で培養した細胞とは区別することが可能であることが挙げられる。これら細胞状態の傾向は、これまでに本事業で蓄積してきたデータと合致している。参考までとなるが、本実験で観察された細胞当たりの平均蛍光強度 8,000 程度、平均細胞サイズ約 23 μm の培養（実際には -N1/5_SWM-3 培地で 37 日間培養した *K. mikimotoi* 培養、図 25 参照）で観察される細胞の写真を示す。

② 塩分低下実験

プレートリーダーを用いて測定した塩分低下による *K. mikimotoi* の生残に対する影響実験の結果を図 26 に示す。塩分が低下しない希釈処理のみの対照区に対しての塩分低下処理区の蛍光値は、3 日目の完全培地の *K. mikimotoi* において、塩分 22 を下回ると徐々に低下していく傾向にあり、塩分 14 では約 50% に低下し、さらに塩分 12 では蛍光は確認されなかった。窒素制限培養の *K. mikimotoi* でも、ほぼ同様の傾向が観察された。

また、塩分低下の影響を細胞数で評価することを目的とした実験では、実験開始時と 24 時間後の細胞数を比較した。完全培地で培養していた *K. mikimotoi* は塩分低下により細胞数は概ね減少する傾向にあったが、その減少は最大 3 割程度であった。一方、塩分低下があった場合でも窒素制限培養の *K. mikimotoi* は、概して生残率は高い傾向にあった。

以上の塩分低下の影響評価実験を総合すると、窒素制限状態で増殖している *K. mikimotoi* は完全培地で増殖している細胞と比較して、塩分低下によって著しく死滅率が高くなるとは言えないと推察された。

③ 画像解析ソフトを用いた細胞の解析

2018 年 7 月 11 日、愛媛県宇和海海域（宇和島市、下灘）で発生した *K. mikimotoi* 細胞について、ImageJ を用い画像解析した。53 枚の顕微鏡写真から合計 276 細胞を既存のプロトコルで測定することができ、 $17 \pm 1 \mu\text{m}$ （平均±標準偏差）となった。本数値は昨年度、宇和島市第二出棺場前に出現した *K. mikimotoi* 細胞（ $14 \pm 1 \mu\text{m}$ ）よりも大きかった。ImageJ を用いた解析では、写真 53 枚中、27 枚は画像のコントラストがとりにくく、細胞の面積測定をすることができなかった。原因としては、画像の白黒化を施す処理において、細胞と背景のコントラストの差がとりにくいためと推察された。

一方、Touch De Measure で測定した場合、53 枚全ての写真について細胞の画像解析を実施することができ、合計 454 細胞を測定することに成功した。標準粒子を用いた予備的なサイズキャリブレーションの結果、細胞の測定値は $15 \pm 2 \mu\text{m}$ となった。本ソフトウェアの操作性については、細胞を操作者が選ぶことができる点が優れていた。さらに操作が簡単であることから、作業時間も半分以下に短縮できる利点がある。ただし本ソフトウェアは現在、スケールが大型ベントス用に開発されているため、今後調整の余地はあると思われた。

④ 内湾環境を室内再現可能な培養装置の新規構築

赤潮が多発する高水温期、赤潮原因藻の増殖の場となる沿岸表層においては、栄養塩の濃

度が低下し、赤潮の発生を制限することがよく知られている。Yamaguchi & Sai (2016) の数値計算結果にしたがうと、代表的な赤潮多発海域である浦ノ内湾では、水温の上昇にともなう成層構造の発達によって、底層から表層への栄養塩の供給が滞り、赤潮原因藻の栄養要求量が満たされない。このような栄養環境において、*K. mikimotoi* などの赤潮原因藻は、強い光が降りそそぐ海面に集積、赤潮を形成するに至る。したがって、赤潮の発生を合理的に説明可能なシナリオを構築するには、沿岸域で観察される水塊構造・光強度と共に栄養塩をも厳密に制御可能な室内培養系を構築し、赤潮原因藻の増殖と各環境因子との関係を精密に試験する必要がある。

これまでに、Erga et al. (1999) を先駆けに、様々な光照射型マイクロコズムが用いられており、具体例をあげると、塩分躍層を発達させることが可能なマイクロコズムにて *K. mikimotoi* (Shikata et al. 2014) あるいは有毒渦鞭毛藻 *Protoceratium reticulatum* (Erga et al. 2015) の日周鉛直挙動が実験的に調べられている。しかしいずれも、用いられている培養装置全体の無菌化は想定されていないためか、細菌が介在する栄養塩等の変動を制御することはできないようである。また、光強度は $100 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 前後であり、沿岸域で観察される強い光あるいは光の鉛直変動を再現できない。このような背景の下、今回、水塊構造および光を制御可能な独自培養系に対して、特別に加工した特大シリコン栓を導入した。これにより、培養系全体の無菌化が実現可能となり、赤潮原因藻の鉛直挙動をより精密に調べるための新規培養系を確立できたと判断した。

さらに、培養系の光強度をリアルタイムでモニタリングすることが可能となった。回帰式により得られた系内の推定光強度は、実測したそれと有意かつ高精度な相関関係 ($r=0.987$ ($p<0.01$)) にあった (図 27)。今回の手法であれば、培養系内にセンサーを投入せずとも、系外から光強度を高精度にかつリアルタイムで推定可能であり、その際、コンタミリスクが生じずることは物理的にありえない。また、白色 LED 光を光源に採用することで、従来光源の蛍光灯では困難であった「海洋で観察される青色波長に富んだ光 (山口 2017)」を量的にも質的にも高精度に再現することが可能である。これらより、栄養塩環境も考量しながら、赤潮原因藻 vs 光強度を詳細に調べることが可能となった。

これらの新技術を活用して、沿岸域で観られる光強度の鉛直変動を室内で再現し、その上で *K. mikimotoi* の鉛直挙動を調べたところ、ある一定の光強度を示す水深に本藻が高密度に分布する様子を捉えることができた (図 28)。今回の試験においては、強光が降りそそぐ水面に *K. mikimotoi* 個体群が 10^3 cells/mL 以下の密度で推移しており、 10^4 cells/mL を超える高密度では分布していなかった。モニタリングを開始した培養 4 日目以降、 10^4 cells/mL に達した水深は、光強度およそ $140\text{--}700 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ が得られる 4–8 cm であった。この光強度であれば、*K. mikimotoi* 培養株の増殖に適光強度 $200\text{--}300 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ を含んでおり、十分な増殖速度が得られる。一方、暗期において *K. mikimotoi* の分布は鉛直的にほぼ均等であり、局在分布は認められなかった (図 28D)。これらにより、*K. mikimotoi* は光依存的な挙動をとり、大きく増殖が阻害されない光環境にて、高密度で分布するものと示唆される。確立した培養装置は、浦ノ内湾湾央の水深 16 m 定点の鉛直環境を 20 分の 1 でスケールダウンしたものであり、この縮尺に基づくと、装置の水深 4–8 cm は浦ノ内湾定点の 0.8–1.6 m に相当する。海面にて $10^3 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ の光が降りそそぐ状況では、*K. mikimotoi* 個体群はおそらく表層～亜表層に“居座”ることになり、大増殖を果たすことで水中の濁度が増大した時には、より

光を求めて表層へと分布水深を変えるのではないかと推察される。

これらの成果は、赤潮の発生を鉛直的に予測する上で極めて重要な知見であり、その知見を得るために開発した新規培養装置は、赤潮発生機構の全容を解明する上で強力なツールになりうるものと期待される。

5) 予察技術の検証及び赤潮シナリオ作成

① 既存データの解析（初認日と冬季水温の関係について）

Honjo et al. (1991) では、冬季（12月～3月）の水温が高いほど 1 cell/mL を確認する日が早く、1,000 cells/mL に達する日も早くなることが報告されている。今年度は、冬季水温と初認日について、解析期間・海域別に解析を行い、関連性がないか検討を行った。まず、広島湾・周防灘・豊後水道・土佐湾海域毎における冬季水温（原則 12 月～3 月）と初認日（*K. mikimotoi* 遊泳細胞を 1 cell/mL 確認した日の 3 月 1 日からの経過日数）を図 29 に示した。海域毎に冬季水温は大きく異なり、豊後水道では平均 15.3℃に対し、周防灘では平均 8.9℃であった。冬季水温が高い海域ほど初認日が早くなる傾向は認められなかった。

次に、各海域の解析期間を 2000 年～2018 年に揃えて、*K. mikimotoi* の最高細胞密度が 1,000 cells/mL 以上の年を発生年、1,000 cells/mL 未満を非発生年と定義し、発生年のみもしくは非発生年を含む期間で解析を行った。解析は、冬季水温と初認日について、Spearman の無相関検定により相関の有無を確認した（表 10）。その結果、山口県・福岡県・大分県を含む周防灘海域の非発生年を除いたケースで冬季水温が高ければ初認日が早くなる傾向が確認された（表 10, $p < 0.1$, 図 30）。また、大分県・愛媛県を含む豊後水道海域の非発生年を含む・除いたケースでは、冬季水温が高ければ初認日が遅くなるという周防灘とは逆の傾向が確認された（表 10, $p < 0.1$, 図 30）。*K. mikimotoi* は、培養試験において 10℃以上で増殖することが確認されており（山口・本城 1989）、周防灘や博多湾では 10℃、11℃以上で遊泳細胞が確認されていることから（馬場ら 1994、佐藤ら 1996）、水温約 10℃が個体群密度を維持するために必要な水温だと推測される。周防灘海域における冬季平均水温は 8.8℃であり、10℃という本種の個体群維持の水温閾値付近である。そのため、冬季水温が高い年ほど越冬細胞の生存確率が高くなり、初認日が早くなる可能性が考えられた。また、豊後水道海域において逆の関係が確認された一つの要因として、黒潮等の影響により海水交換が促進されると、シードポピュレーションとなる遊泳細胞の個体群密度の低下に繋がる、つまり黒潮からの暖水波及により冬季水温が高ければ、個体群密度が低下し、初認日も遅くなる可能性が考えられた。一方、各県海域で相関が認められなかった理由の一つとして、初認され始める冬季～初夏の調査頻度および方法が 1 つの原因だと考えられた。Honjo et al. (1991) では、週 1 回濃縮検鏡を行った結果であったが、各県では調査頻度は基本的に月 1、2 回程度であり、濃縮検鏡を行っていない年もあるため、正確な初認日を捉えられていない可能性が考えられた（表 11）。

以上の結果より、周防灘および豊後水道海域で冬季水温と初認日との間に相関が認められたものの、各県海域では相関は認められなかった。しかし今後、*K. mikimotoi* 赤潮がいつ起きるかまたはその年の *K. mikimotoi* 赤潮が大規模化するかどうかを推察するうえでも、初期発生のモニタリングが重要であり、高感度に *K. mikimotoi* を検出できる遺伝子調査とデータの蓄積により、*K. mikimotoi* 赤潮の発生や規模の予察精度向上が期待される。

② 既存データの解析（赤潮予察技術の検証および発生規模に関与する環境因子の抽出）

平成 29 年度までに実施した統計解析により、赤潮発生に関与する環境因子（海象・気象）を抽出し、有害赤潮発生シナリオを構築した。また、抽出された環境因子を用いた判別分析や判別得点のロジスティック回帰による予察技術を開発した。しかし、これまでの解析では各県が定めた一定細胞密度で赤潮発生・非発生を検討するものであり、発生規模については検討していなかった。そこで本年度はさらなる発生シナリオの改良を目指し、これまでの赤潮発生・非発生を分ける環境条件に加え、赤潮発生規模に関与する環境因子を抽出し、発生シナリオの改良を検討した。本年度取得したデータによる各県海域における予察結果と発生規模に関与する環境因子の抽出結果は以下の通りである。なお解析年数は 2002 年～2017 年とした。

山口県海域（徳山湾）

徳山湾における本年の *K. mikimotoi* は、最高細胞密度 440 cells/mL で出現した。その結果、モニタリングにおいては発生年となった。しかしながら、発生予察においては、赤潮発生基準を 1,000 cells/mL 以上の年を発生年、1,000 cells/mL 未満の年を非発生年として判別分析を行ったため、本年は *K. mikimotoi* 赤潮は非発生年となった。

2002～2017 年の気象・海象データのうち、昨年度に抽出した環境要因を用いて発生予察を行った結果を表 12 に示した。その結果、本年度は解析に用いた組み合わせの約半数が非発生年となり、精度が良いとは判断できない結果だった。また、非発生年だった 2018 年においても、解析に用いた組み合わせの約半数が的中となったが、本年と同様に精度が高いとは判断できない結果だった。しかし、こうした中で両年とも予察が的中した 5 月中旬表層溶存酸素量と 6 月中旬低層溶存酸素量は、赤潮発生年は 5 月中旬表層溶存酸素量が低く、6 月中旬低層溶存酸素量が高い傾向があった。このような年には徳山湾において、*K. mikimotoi* 赤潮が発生する傾向があった。

2017 年に報告した山口県海域（徳山湾）の赤潮発生シナリオによると、本海域において冬季に初期遊泳細胞群が確認され、1,2 月の水温が高く、4 月の気温が高いことは、初期遊泳細胞群が春季まで維持され、その後梅雨入りによる日照時間の低下と、降水量の増加で *K. mikimotoi* 赤潮が発生すると考えられている。本年は 2 月に行った PCR 法による *K. mikimotoi* の高感度調査において、本種の DNA が検出されなかったことから、冬季における越冬細胞群は検出限界未満まで低下していたと考えられる。本年の *K. mikimotoi* 赤潮の非発生要因として、①冬季における越冬細胞群がごく低密度であったこと。②遅い梅雨入りのため珪藻が増殖し、梅雨入り後は、断続的な降雨が続いたため、珪藻が低下せず、その栄養塩を利用し、珪藻が優占した状態が続いた。その結果、*K. mikimotoi* が増殖しにくい環境であったことが挙げられる。

次に、これまでの赤潮発生・非発生に関わる環境条件に加え、大規模発生・小規模発生に関する環境条件の抽出を行った。類型化は、*K. mikimotoi* の最高細胞密度が 5,000 cells/mL 以上の年を大規模発生年、5,000 cells/mL 未満 1,000 cells/mL 以上を小規模発生年とした。その結果、山口県徳山湾における *K. mikimotoi* 赤潮の大規模発生年と小規模発生年に関わる環境条件を表 13 に示した。特に、大規模発生年と小規模発生年において、多くの共通項目が得られたが、大規模発生年は小規模発生年と比較して「5 月日照時間」や「6 月下旬気温」などが抽

出された。大規模発生年は「5月日照時間」が短く、「6月下旬気温」が低い傾向があった。このことは、5月に日照時間が短く、かつ6月下旬の梅雨による低気温により、主に表層に分布する珪藻が増殖できず減少し、本種が増殖しやすい環境条件だったことを示唆している。その後、成層の発達と崩壊が起こると、本種が増殖し、赤潮化するシナリオが考えられる。これを基にすると、別添のような山口県徳山湾における *K. mikimotoi* 赤潮発生シナリオ（図 31）が考えられる。

本海域において、*K. mikimotoi* 赤潮が大規模に発生するには、冬季に初期遊泳細胞群が確認されること。そして、5月に日照時間が短く、6月下旬気温が低い条件が重なると、本種が大規模に発生すると考えられた。

福岡県海域（周防灘西部）

豊前海における2002年～2017年の海象・気象データのうち、昨年度抽出した10項目の環境要因を用いて発生予察を行った結果を表14に示した。本年度は赤潮発生年（最高細胞密度2,700 cells/mL）であったが、解析に用いた組み合わせの多くが発生年と予測しており、おおむね的中したと判断された。また非発生だった2018年に関しては、発生予察の精度が悪かった。しかしこうした中、両年とも予察が的中した7月5m層水温と4月表層DIP・6月5m層DIPの組み合わせと、5月中旬気温と4月上旬日照時間の組み合わせは、*K. mikimotoi* 赤潮発生の予察に有効であると考えられた。

本年度の予察結果からは、4月以降の水温やDIPは発生年の兆候を示しており初期個体群の生残や増殖には好適であったと考えられた。しかし、梅雨入りの遅れにより6月上旬までは栄養塩が少なく日照時間が長かったため、6月中の赤潮発生はなかった。しかし、生き残った個体群が梅雨入りにより低照度環境となった7月以降、河川水の影響を受けて低塩分になりやすい河川に近い沿岸域で増殖し、一時的な赤潮の発生につながったものと考えられる。

次に、これまでの赤潮発生・非発生に関わる環境条件に加え、大規模発生・小規模発生に関する環境条件の抽出を行った。赤潮大規模発生基準の判断は、最高細胞密度10,000 cells/mL以上とした。その結果、福岡県豊前海における *K. mikimotoi* 赤潮の大規模発生年に関わる環境条件として抽出された項目は、非発生～小規模発生年と比較して4月上旬の日照時間が短い、4月上旬の降水量が多い、6月下旬の日照時間が短い、7月上旬の5m層水温が低い、8月中旬の降水量が多いであった（表15）。これらの項目を上述の発生、非発生にかかる10項目の環境要因と比較すると、4月上旬の日照時間と7月上旬の5m層水温が共通していることから、以下のような福岡県豊前海における *K. mikimotoi* 赤潮発生シナリオ（図32）が考えられる。すなわち、4月上旬の日照時間が短く降水量が多いことにより、初期遊泳細胞の個体群が維持される。次に6月下旬の日照時間が短く中～底層のDIPが高いことにより、弱光下で増殖可能であり、鉛直移動により中～底層の栄養塩を利用できる *K. mikimotoi* の増殖に有利となり赤潮の発生につながると考えられる。また7月上旬の5m層水温が低いことも、同様の理由で赤潮の発生や大規模化に関与していると考えられる。さらに8月中旬の降水量に代表されるように、陸水の流入がきっかけとなって *K. mikimotoi* 赤潮が発生、あるいは大規模化するものと考えられる。

大分県周防灘海域

大分県周防灘海域においては、これまでの調査結果から、①冬季遊泳細胞の密度が高い年は、初認日（1 cell/mL 以上）が早く、初認日が早い年は、赤潮が発生する確率が高い。②赤潮の発生直前には、日照時間の低下や降水量の増加がみられ、珪藻密度が低い傾向にある。また、③判別分析の結果からは、赤潮発生年は、5 月の表層水温が低く、7 月分布指標（10 cells/mL 以上）が高い傾向がみられている。

本年度は、冬季（12～2 月）に *K. mikimotoi* の越冬細胞が全く確認されず、1 cell/mL 以上の初認日も 6 月 20 日と遅いことから中長期的な予察としては、非発生と予測されていた。また、判別分析の結果では、5 月の表層水温は低めで、7 月分布指標（10 cells/mL 以上）も低めであり、発生・非発生のどちらも区別出来ない「△」と予測されていた（表 16）。しかし、7 月中旬になって、日照時間の低下や降水量の増加、珪藻の低密度化など本種が増殖しやすい環境条件になったことで 7 月下旬に赤潮を形成したものと考えられた。

次に、これまでの赤潮発生・非発生に関わる環境条件に加え、大規模発生・小規模発生に関する環境条件の抽出を行った。赤潮小規模発生の基準を 1,000 cells/mL 以上、大規模発生の基準を 5,000 cells/mL 以上とし、大規模発生の基準で抽出された環境要因を表 17 に示した。その結果、通常の赤潮発生時には抽出されず、大規模発生でのみ抽出される項目として、6 月 B-1m 層の DIP と 7 月表層の DIN が抽出され、値が高い条件で大規模発生に繋がること示唆された。

これを基にすると、以下のような周防灘大分県海域における *K. mikimotoi* 赤潮発生シナリオ（図 33）が考えられる。

本海域の赤潮観測において *K. mikimotoi* 遊泳細胞が早期に観測される年は、赤潮が発生する確率が高い。また、5 月の表層水温が低いことが初期個体群の生残・増殖に関係している可能性があり、赤潮発生前の 7 月に遊泳細胞が広く分布していることが赤潮を発生しやすくしているものと思われるが、最終的には、赤潮発生直前の気象条件（降水量、日照時間）とプランクトン密度（*K. mikimotoi*, 珪藻類）が大きく影響しているものと思われる。さらに、赤潮が大規模化するには、プランクトンの増殖を支える栄養塩類が高濃度である必要性が考えられる。

大分県豊後水道海域（佐伯湾）

本年は *K. mikimotoi* 赤潮の非発生年となったが、これまでに作成した予察モデルの多くは「発生年」となり、十分に的中したとは言えなかった（表 18）。大分県佐伯湾において、3 月の降水量が少ない条件は、シストを形成しない本種にとって赤潮のシードポピュレーションとなる遊泳細胞が維持されやすい環境と考えられている。本年は 3 月の降水量が少なく、さらに冬季～春季において、高感度調査により本種遺伝子が常に検出されており、シードポピュレーションとなる遊泳細胞は存在していたと考えられた。しかし、①梅雨入りが観測史上最も遅く、本種にとって好適環境になる前に珪藻が増殖した。②梅雨入り後も断続的な雨天となり長期間の雨天が続かなかったことから、常に珪藻が優占し、降雨により栄養塩が供給されても、珪藻により消費された可能性が高く、本種の増殖が抑制されたと考えられた。以上の結果より、これまでの予察モデルにより発生年と判断された年であっても、赤潮発生直前の気象条件によっては、的中しない可能性がある。また、判別式で用いた「3 月降水量」および「2 月表層塩分」の組み合わせは、本年の予察を的中させており、これまでの的中率も高