

表 1. *K. mikimotoi* の毒性パラメータ間の相関係数 (p 値). **は有意な相関関係を示す.

	溶血活性	メガイアワビへい死率	クロアワビへい死率
ワムシへい死率	0.50 (0.67)	0.87 (0.33)	0.50 (0.67)
溶血活性		0.87 (0.33)	1.00 (0.00)**

表 2. *K. mikimotoi* 各培養株を曝露した時のマダイ横臥尾数.

培養株名	マダイ横臥尾数 (平均値)
IMR4	4.0
Km69-9	1.0
KMUW9	0.7
KM02KSS	0.7
KU9	0.3
KmNo.3	0.3
IMR3	0.0
KJK1	0.0
KU8	0.0
KmNo.7	0.0

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の開発・実証

① ウイルス等微生物による赤潮防除法の確立と現場実証

水産研究・教育機構水産技術研究所

中山奈津子, 浜口昌己

三重県水産研究所

奥村宏征, 久野正博, 栗山功, 矢野央樹, 西川次寿

三重県水産研究所鈴鹿水産研究室

勝田孝司

愛知県水産試験場

二ノ方圭介, 松村貴晴, 青山裕晃, 大澤 博, 天野禎也

1 全体計画

(1) 目的

有害赤潮原因藻 *Heterocapsa circularisquama* (以下, ヘテロカプサ) は, 1988 年に高知県浦ノ内湾で初めて確認されてから急速に分布を拡大し, 西日本ならびに中部や, 近年では, 新潟県においても同種による赤潮被害が確認されている。そのため, その防除・軽減対策の開発・実現は喫緊の課題である。近年, ヘテロカプサ発生海域にはそれらを特異的に死滅させるウイルス (HcRNAV) が存在し, 赤潮終息時期の海底泥表層に高密度に存在することが確認された。2011 年に, 予備試験的に行ったヘテロカプサ赤潮海水への底泥接種試験 (閉鎖系) では, 底泥接種によるヘテロカプサ細胞密度の減少とウイルス力価の上昇が見られた。そのため, 前事業課題では, 本技術の実用化を目指し, 様々な検討実験及び半開放系での現場実証試験を行い, ウイルスを含む海底泥投入の効果を実証するに至った。本課題では, 赤潮が発生した海域からウイルスを含む底泥を採取し, それを同じ海域で翌年以降の赤潮発生時に散布するという, 土着の生物を利用した赤潮防除法について, 効果的かつ効率的な手法に改善するとともに, 本手法の現場適用を目指す。

2 令和 2 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) ヘテロカプサ赤潮発生状況と HcRNAV 密度の推移及び海況

三重県英虞湾立神定点 (34°17'38"N-136°50'6"E), 愛知県三河湾 A6 点 (34°48'12"N-137°13'34"E) および新潟県佐渡市加茂湖の原黒定点 (St.2; 38°04'3"N-138°26'2"E), 潟上 (St.6; 38°04'7"N-138.44°0"E), カキ殻工場前 (St.7; 38.°05'9"N-138°44'5"2E) について, 三重県水産研究所, 愛知県水産試験場および新潟県水産海洋研究所佐渡水産技術センターの協力をいただき, 6~11 月の間に月 1~2 回の頻度で海水及び海底泥を採取した (図 1)。ヘテロカプサは直接検鏡にて, HcRNAV の密度はリアルタイム PCR 法 (Nakayama and Hamaguchi 2016) にて定量した。リアルタイム PCR 法は, 海水試料 10 mL から HcRNAV を PEG 沈殿法によ

り濃縮し、RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて全 RNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA remover (Toyobo Co. Ltd., Life Science Department, Osaka, Japan) により cDNA を作製したのち、HcRNAV 特異的プライマー (Nakayama and Hamaguchi 2016) を用いて定量した。

2) ヘテロカプサ赤潮防除法の現場試験

天然のヘテロカプサ個体群を対象に、これまで3回に渡って現場実証試験を行い、昨年度は、加茂湖にて現場で底泥散布試験を行った。それらの結果から、底泥の散布がヘテロカプサの増殖を抑制することが認められたため、今年度は、現場関係者(新潟県、佐渡市、加茂湖漁協等)のみで、加茂湖に底泥散布を実施することとした。作業手順は以下のとおりである。散布の効果を高めるため、底泥散布前日(2020年10月12日)に、2019年11月に採取し冷凍保存した底泥約10kg(湿重量)を室温で自然解凍し、ヘテロカプサが含まれている海水100L中に懸濁した。懸濁に用いた海水は12日にSt.7で採取したものである(ヘテロカプサ細胞数は6.5 cells/mL)。散布当日、底泥を含む海水を3等分してポリタンクに移し、St.6, St.2, St.7にて調査船かもこ丸を微速で前進させながら、舷から湖面に直接散布した(図2)。今年度は2回底泥散布を実施し、2回目の散布は1回目と同様の方法で底泥約5kgをSt.6およびSt.7にて実施した。

3) ヘテロカプサウイルス HcRNAV の多様性に関する研究

HcRNAV は少なくとも3つ以上の感染タイプがあるが、それぞれの出現パターンや出現パターンの有無さえも不明であった。昨年度までの遺伝子解析の結果より HcRNAV の出現タイプが季節ごとに異なる可能性が見出されたため、今年度採取した加茂湖の海水及び底泥中の HcRNAV の感染タイプの季節変動を調べた。表層水・底層水の濾液(0.45 µm 以下の画分) および底泥より攪拌振騰後に得た遠心上清の濾液(0.45 µm 以下の画分) を、ウイルス感受性タイプの異なるヘテロカプサ株4株(HU9433-P;以下, Hu, HCLG-1, 05HC06, Kamo06) に接種して感染の有無により評価した。具体的には48穴マイクロプレートに藻類培養株を4穴ずつ培養し、1穴は対照区、3穴はウイルス接種区とし、対照区と比較して溶藻したウェルを陽性とした。培養試験時の条件は、温度は20°C、光強度は100 µmol/m²/s、培養期間は1週間とし、溶藻は光学顕微鏡観察により判定した。

次に、HcRNAV は RNA ウィルスであるため、遺伝子の多様化が起こっている可能性に注目し、昨年度までに得た HcRNAV のカプシドをコードする ORF2 の塩基配列を用いて、ハプロタイプネットワーク解析を行った。解析には、加茂湖より、2018年7月4日、8月21日、10月16日(赤潮時期)、11月6日から各16クローン、2016年10月10日および13日から得られた24クローン、および、三河湾から2018年8月9日(赤潮時期)に得られた64クローン、およびスタンダード株3株を含む計155クローンを用いた。HcRNAV のグループを代表するスタンダード株には HcRNAV34, HcRNAV109, HcRNAV659 を用いた。解析用の配列の作成には、MEGA7 および DnaSP ver.5 (Librado and Rozas 2009) を用い、ハプロタイプネットワークの作成には median - joining method (Bandelt et al. 1999) Network ver. 4.510 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) を用いた。

(3) 結果及び考察

1) ヘテロカプサ赤潮発生状況と HcRNAV 密度の推移及び海況

2020年6~11月の観測時期において、ヘテロカプサは、三重県英虞湾立神定点および愛知県三河湾 A6 地点では検出されなかった。新潟県加茂湖では、ヘテロカプサの初認は7月14日と例年より遅く、細胞密度は約 0.5 cells/mL であった(図3)。その後、湖奥と湖央で細胞密度が徐々に増加し、9月中旬に 200 cells/mL を超えた。9月下旬に一旦減少したが、10月に入ると再び増加した。最高細胞密度は10月6日湖奥の St.1 で 872 cells/mL、湖奥の定点以外では 4,685 cells/mL であった。その後徐々に減少し、11月5日の観測では最高細胞密度 4.5 cells/mL まで減少し終息した。

リアルタイム PCR 法による HcRNAV 定量結果について、2020年の英虞湾立神定点および愛知県三河湾 A6 地点の海水からは HcRNAV は検出されなかった。加茂湖では、ヘテロカプサの細胞密度の推移に同調して海水中に HcRNAV の増殖が認められ、底泥においても高密度で検出された(図4)。

加茂湖原黒定点の6~10月では、水温は 22.4~29.7°C、塩分は7月上旬に 9.4 と表層では降雨の影響によって低下した時期はあったものの全体的には 30 前後で安定していた。溶存酸素は、6~10月上旬まで、6 m 以深において 4 mg/L を下回る低い値が恒常的に見られ、例年より長期間低酸素状態が続いたため、ヘテロカプサの優占には好条件であったと考えられる(図5)。

2) ヘテロカプサ赤潮防除法の現場試験

2011年及び2016年の天然ヘテロカプサ個体群への底泥接種試験では、ヘテロカプサが高密度化した際にウイルスを含む底泥を接種することにより、同種の衰退を促進することを実証した。2018年には、ヘテロカプサ発生初期の天然赤潮海水を用いた水槽同試験において、底泥の初期投入が同種赤潮の拡大抑制に繋がることを実証した。これらの結果を受けて、2019年にはヘテロカプサ赤潮の増殖抑制を目指し、7~9月、すなわち、ヘテロカプサ赤潮発生初期から3回にわたって加茂湖に底泥を散布した。その結果、ヘテロカプサは高密度化することなく終息した。今年度は、コロナ禍で身動きが取れなかったため、新潟県、佐渡市、加茂湖漁協等現場関係者と協議の末、現場関係者のみで底泥散布を実施することとした。実施決定に時間を要したため、ヘテロカプサ発生初期からの投入はできなかったものの、10月初旬から高密度化した周辺を中心に10月13日、27日に底泥散布が行われた(図2)。その結果、ヘテロカプサは増殖することなく終息した。10月13日に散布後、翌週、翌々週と HcRNAV の値が増加していたことから、湖内のヘテロカプサに感染増殖したことが認められた(図4)。

今年度、ようやく、本法が現場導入されることとなった。このような手法の厳密な効果を評価することは対照区を設定することができないため困難であるが、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泥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。散布された底泥の量は、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、底泥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へ撒き、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。現在、本法のマニュアルを作成中であり、来年度と再来年度も引き続き実施しながら、現場で簡易に効率よく実施できるよう改善案を出し合い、マニュアルを完成させる予定である。

3) ヘテロカプサウイルス HcRNAV の多様性に関する研究

昨年までの遺伝子解析の結果より HcRNAV の出現タイプが季節ごとに異なる可能性が見出されたため、今年度採取した加茂湖の海水及び底泥中の HcRNAV の感染タイプの季節変動を調べた。2020 年に採取した底泥 10 点と湖水 8 点からのウイルス抽出画分を HcRNAV 代表株 3 株 (HcRNAV34;UA1, HcRNAV109;CY, HcRNAV659;UA2) および加茂湖から分離した HcRNAV (Kamo06; UA2) に接種したところ、HcRNAV34 はヘテロカプサ発生初期に見られ、HcRNAV109 は高密度化する時期にのみ認められた。殺藻力も強く、この傾向は昨年にも認められた。一方、HcRNAV659 は 7~11 月まで全体的に存在していたが、赤潮後期に優占的に見られる傾向があった。Kamo06 も期間を通して見られることが多かったが、殺藻力はやや弱かった。これらの結果は、今年のクローンライブラリーの結果と類似しており、HcRNAV のタイプに季節変動があることが推察された。

これまでの HcRNAV の ORF2 配列による系統解析では、HcRNAV が季節ごとにクレードを作ることで、クレードは UA1, UA2, CY に大別され、その構成比が年々変わってきていることが推察されてきた。HcRNAV は RNA ウイルスであるため頻繁に突然変異を起こす。一方で、それらの変化があっても関わらず、感染力は全体として維持されていた。そこで、今回はこれまでの配列データを集めて、1つの集団内の個体のハプロタイプに注目し、ネットワーク法で調べることにより個体間の繋がりを明らかにした。ここでいう「ネットワーク」とは、配列の類似性に基づきハプロタイプを連結したものである。図 6 で示されるように、「花火型」は、祖先型の配列が中央に位置し、その子孫型のハプロタイプが連結することを示す。本結果では、大きく分けて、祖先型が 3 つあり、そこから子孫型が派生している。グループの代表株の位置より、本データは UA2, CY, MIKAWA に分かれ年々そこから派生していることが認められる。また、近年、2013 年には大きなクレードの一つであった UA1 に属するものは認められなくなっている。ドットを繋ぐ線にあるステップは変異の頻度を示すが、多いものについてはカッコ内に数字で記した。これによると、それぞれのクレードがかけ離れていることがわかる。また、一つのクレード内でのステップ数はかなり多く、RNA ウイルスの変異の多さを示している。さらに、UA2 クレードを見ると季節や年ごとの派生が認められる。以上のことから、赤潮防除に使用する底泥は、やはりその地域のものを必要とし、さらに、比較的新しいもの、季節に数回採るなど、選択的に底泥を取ることが必要であることを示している。しかしながら、こういった派生とウイルスの感染性にどのような関連性があるのかはわかっていない。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、今年度は底泥散布や来年度散布のための底泥採取等一連の作業を現場関係者のみで実施することができ、本法の現場導入へのスタートとなった。今後は、HcRNAV の多様化の情報を元に、使う底泥の選択やより簡易で効率的な方法への改善を目指し、マニュアル化する。

最後に、本年度は、コロナの影響により、底泥中の HcRNAV の解析に用いる RNA 抽出キットが手に入らなかったため、来年度に解析することにした。

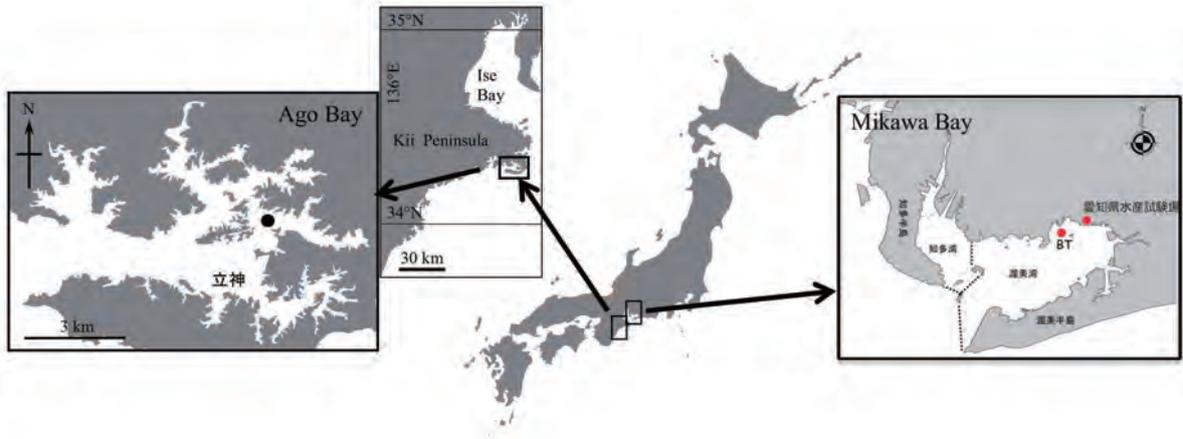
謝辞

本研究の実施にあたり、現場調査および現場指導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

- Bandelt HJ, Foster P, Röhl A. Median-joining networks inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 1999; **16**: 37–48.
- Librado P, Rozas J. Dna SP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009; **25**: 1451–1452.
- 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. *Nature* 2006; **439**: 344–348.
- Volk M, Lang AS, Suttle CA. Marine RNA virus quasispecies are distributed throughout the oceans 2006. *Appl. Environ. Sci.* 2019; **4**: 1–18.

a)



b)

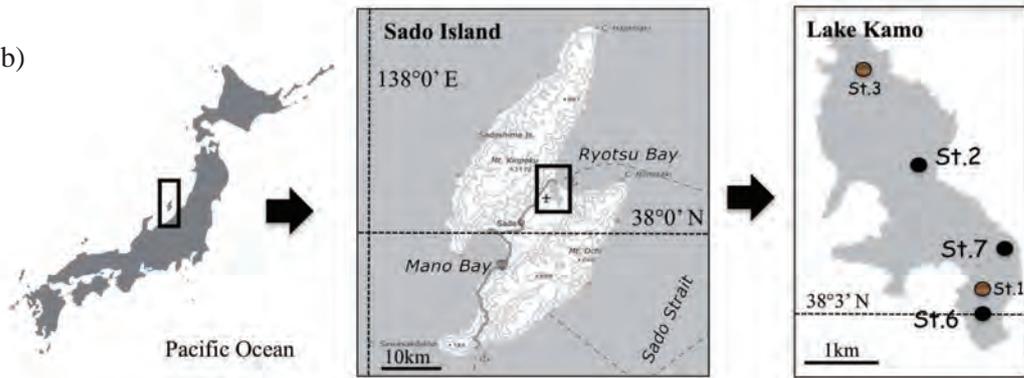


図 1. 試料採取および試験実施地点

a) 三重県英虞湾立神定点 (左), 愛知県三河湾 A6 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, St.1, St.2, St.3 ; 定期観測点.

a)



b)



c)



図 2 2020 年 10 月 12~13 日に加茂湖で行われた底泥散布。 a) 底泥を解凍後, 赤潮海水に懸濁, b) 散布当日ポリタンクに移す, c) 加茂湖丸船上から散布.

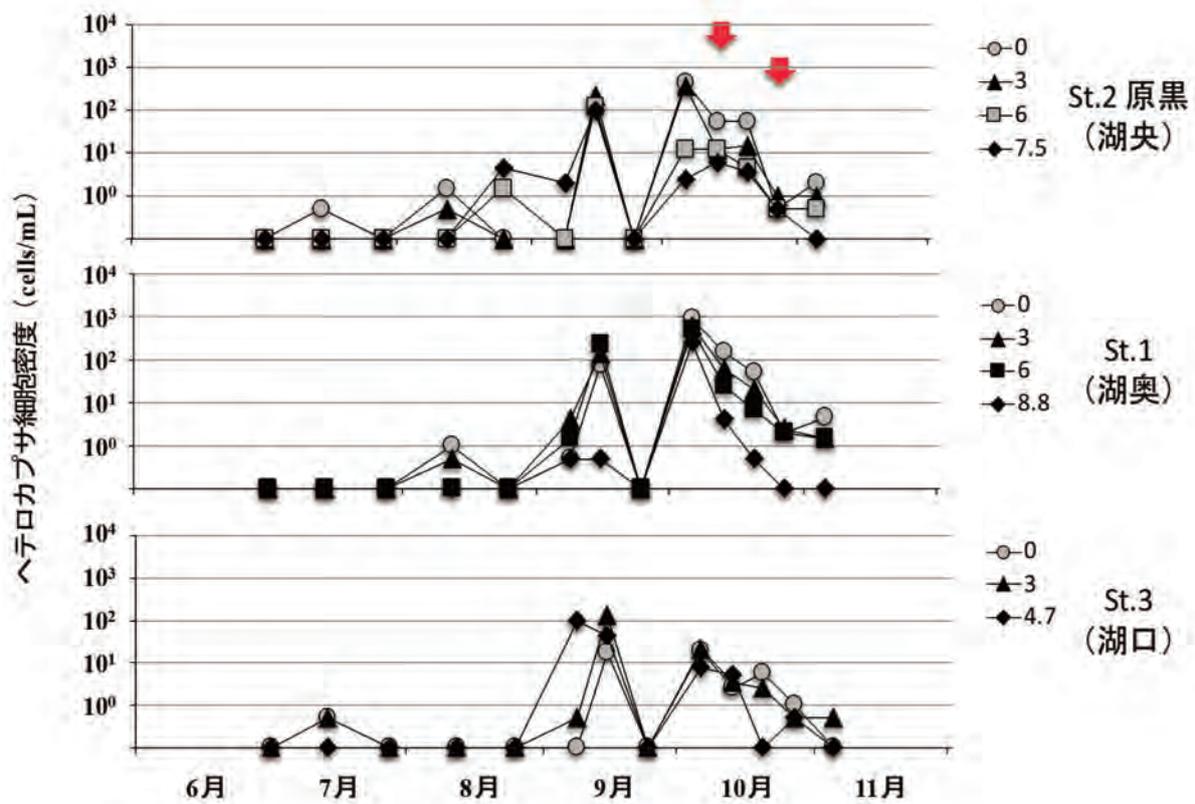


図3. 2020年 新潟県佐渡市加茂湖の3定点（上段から，St.2 原黒，St.1 湖奥，St.3 湖口）における，ヘテロカプサの発生状況. 矢印は底泥散布日.

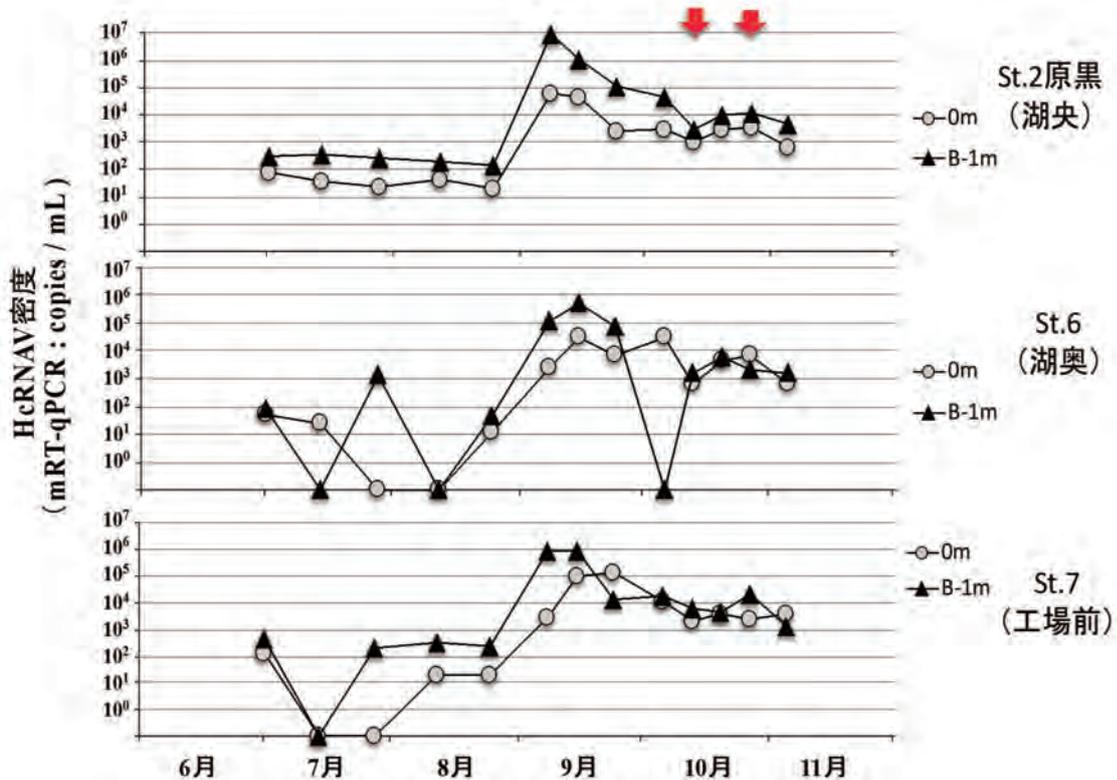


図4. 2020年 新潟県佐渡市加茂湖の3定点（上段から，St.2 原黒，St.6 湖奥，St.7 湖口）における，ヘテロカプサウイルス HcRNAV の発生状況. 矢印は底泥散布日.

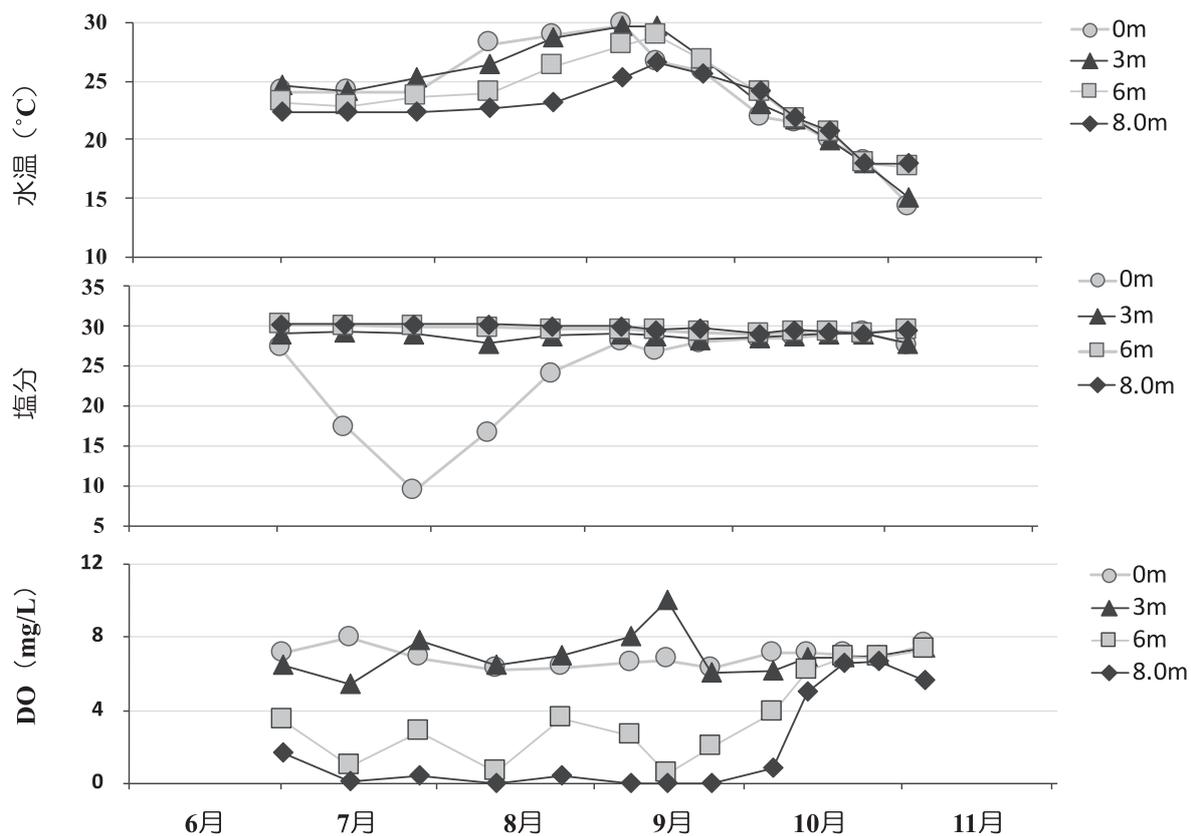


図 5. 2020 年の加茂湖原黒定点 (St.2) における水温，塩分，溶存酸素量の変動.

表 1. 2020 年加茂湖の底泥（上段）と湖水中（下段）の HcRNAV 感染タイプの季節変動.

<sediment>

	グループ	7/28	8/12	9/8	9/15	9/24	10/6	10/13	10/20	10/27	11/5
Hu	UA1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
HCLG-1	CY		-	+++	+	-	-	-	-	-	-
05HC06	UA2	+	+	+++	+	+	++	+++	++	++	+++
Kamo06	UA2	+	++	-	+	+	-	-	-	-	-

<water>

	グループ	7/28	8/12	9/8	9/15	9/24	10/6	10/13	10/20	10/27	11/5
Hu	UA-1	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	-
HCLG-1	CY	ND	ND	+++	+++	-	-	-	-	-	-
05HC06	UA2	ND	ND	+++	++	++	++	++	++	++	++
Kamo06	UA2	ND	ND	+	++	+	+	+	+	+	++

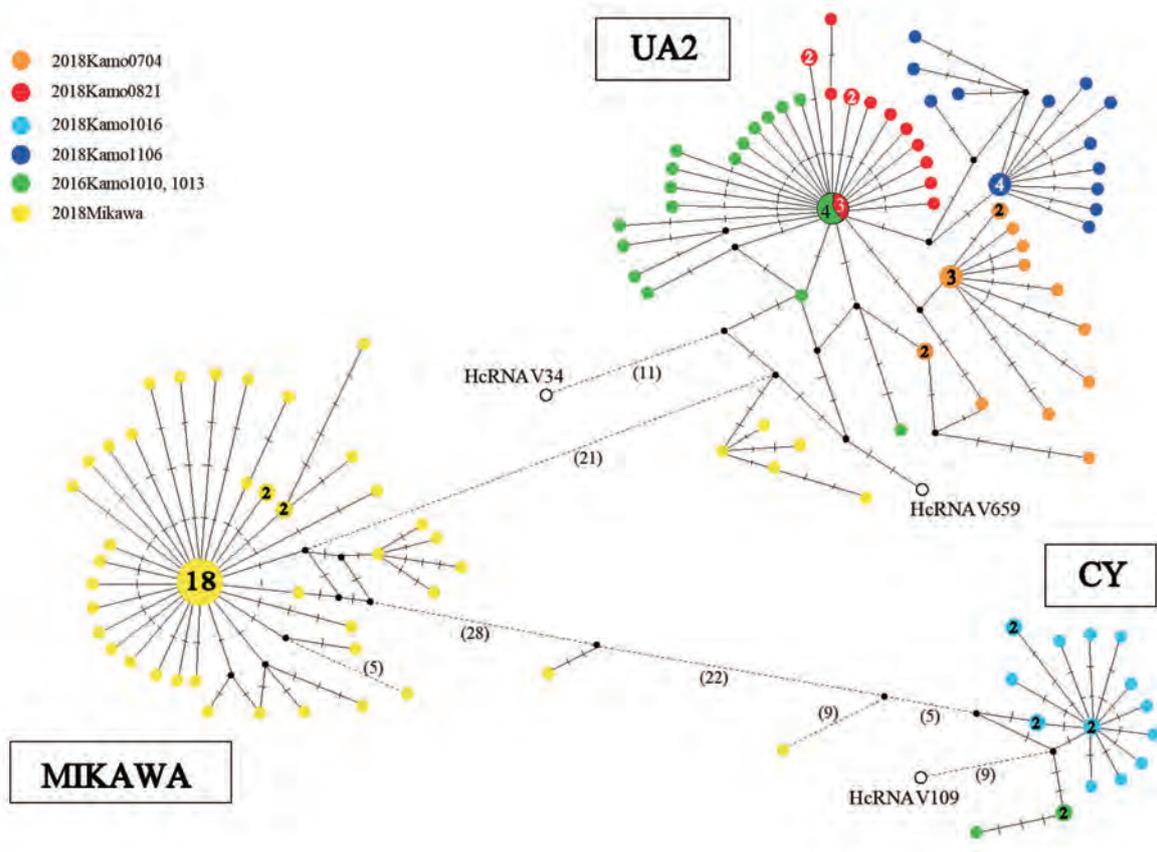


図 6. 2016~2018 年加茂湖および 2018 年愛知県三河湾の海水および底泥より得られた HcRNAV クローンのアミノ酸配列によるハプロタイプネットワーク図. UA2, CY は過去のデータをもとにしたグループ分け (Nakayama et al. 2013 等), MIKAWA は愛知県三河湾を示す. 凡例名については Kamo は加茂湖より, Mikawa は三河湾より得られた配列を示し, 数字は試料採取日. ネットワーク図中のサークル内の数字はハプロタイプの頻度, ステップ (梯子) は変異の頻度を示し, 括弧内の数字はステップの数を示す. 黒いサークルは, おそらくその位置にあるであろう仮想の配列が置かれる. 白いサークルはスタンダード株の HcRNAV34, HcRNAV109, HcRNAV659.

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の開発・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 水産技術研究所
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, 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。特に, 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 令和2年度計画及び結果

(1) 目的

「全体計画と同じ」。ただし, 2020年度, 有害赤潮が非発生であり, 且つコロナウイルス感染拡大の状況下にあったため, 発生時にしかできない現場調査は中止し, 別の内容に変更した。

(2) 方法

1) 赤潮鞭毛藻類の日周鉛直移動の観測

① 赤潮鞭毛藻類の日周鉛直移動の現場観測 (水技研, 大分水研, 東町漁協)

K. mikimotoi などの有害赤潮鞭毛藻類において, 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 (Shikata et al. 2017, Shikata et al. 2020)。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。2020年6月1日~8月31日, 佐伯湾の鶴見ポンツーン (32°57'3''N, 131°57'28''E, 水深: 約12m) で, 自動昇降式多項目水質計 (AWQP13_30, 環境システム社製) を用いて, 水温, 塩分, 溶存酸素濃度 (DO), クロロフィル蛍光値を約30分~1時間に一回の頻度で連続観測した。また, 観測期間中, 週1回, 多項目水質計による水温, 塩分, DO, クロロフィル蛍光値および光量子量の観測を行うとともに, 表層, 6m層, 海底 (B) -1.5m層およびクロロフィル蛍光値の極大層より採水を行った。海水試料については, 当日中に検鏡を行い

(ECLIPSE Ni, Nikon 社製), *K. mikimotoi* を含む有害赤潮鞭毛藻類, 珪藻類およびその他の優占種の細胞密度を算出した。また, 鶴見ポンツーンのすぐ近隣の沖松浦 (32°56'54''N, 131°57'47''E, 水深: 約 10 m) にて, 週 1 回, 表層, 2 m 層, 5 m 層, B-1 m 層, B より採取した海水の栄養塩分析を行った。さらに, 過去の同様の観測により得られたデータを解析し, *K. mikimotoi* の鉛直移動パターンと環境条件の関連性についても検討した。本種が発生した 2018 年 6 月 12 日~6 月 23 日にかけて, 同条件下で取得した自動昇降式多項目水質計および週 1 回の現場調査データを用いた。

② *Chattonella* の鉛直移動に及ぼす栄養塩の影響把握 (水技研)

従前の研究により, 窒素およびリン欠乏環境下で *K. mikimotoi* の鉛直移動が不明瞭となることが知られている (Yuasa et al. 2018)。本課題では, *Chattonella antiqua* について, 日周鉛直移動に及ぼす栄養条件の影響を室内で調べた。実験には, 25°C, 12hL:12hD (明期 6:00~18:00, 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 白色蛍光灯) で継代培養した *C. antiqua* (4KGY 株, 無菌) を用いた。対数増殖期にある *C. antiqua* の培養液 3 mL を 22 mL の改変 SWM-3 (完全培地), 改変 SWM-3 の成分から硝酸塩を除いた培地 (N 欠培地), リン酸塩を除いた培地 (P 欠培地) の入った透明アクリル製角形容器へ植え継ぎ, 5 日間継代培養と同じ条件で培養した。その後, 角形容器を調温暗室 (25°C) に移し, 観察光として近赤外光 LED (中心波長 850 nm; HL01 IR850, Pi Photonics Inc., Shizuoka, Japan) で水平方向から照明した上で, 水面で 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように LED で上方から白色光を照射した。レンズの先端に 800 nm 以上の光をカットするロングパスフィルター (cut off wavelength of <800 nm, LX-903, Mitsubishi Layon Co. Ltd., Tokyo, Japan) を装着した CCD カメラ (Pixelfly, PCO AG, Kelheim, Germany) で角形容器を撮影し, 細胞の鉛直分布を 15 分間おきに 66 時間 (0 日目 18:00~2 日目 12:00 まで) 撮影した。得られた画像は Image J によって処理し, 表層 (水面~水深の 15% の深さ) と容器底面 (底面~水深の 10% の深さ) の Gray value を抽出し, 表層と容器底面の Gray value の比 (表層集積度) を算出した。

2) 養殖魚の生残に及ぼす赤潮の曝露中断の影響把握 (水技研)

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と考えられる (紫加田ら 2019)。そこで, 本課題では 2019 年度に室内で養殖魚の生残に及ぼす赤潮の曝露中断の影響を試験した (紫加田ら 2020)。2020 年度は, 2019 年度実施した試験結果の再現性を確認することを目的とした。

曝露試験に供した *K. mikimotoi* 培養株 (IMR04) は 25°C, 12hL:12hD (6:00~18:00 明, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で維持培養した。3 L の *K. mikimotoi* 培養液 (曝露密度 $2.1 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$) またはコントロールとしてろ過海水を 30 cm 水槽に入れ, マダイ稚魚 (6.7±0.7 cm, 4.5±1.4 g) を 6 個体ずつ収容し, 通気して曝露試験を実施した。試験区は, 断続曝露区として, 1 時間培養液に曝露後, ろ過海水の入った水槽に移して 6 時間経過後, 再度培養液に曝露する区 (6 時間中断), 1 時間培養液に曝露後, ろ過海水の入った水槽に移して 24 時間経過後, 再度培養液に曝露する区 (24 時間中断), 比較対象として, 連続曝露区およびろ過海水を曝露

するコントロールを設けた。連続曝露区とコントロールでは、断続曝露区と移槽ストレスをそろえるために、断続曝露区でマダイ稚魚を移動させるタイミング（試験開始 1, 7, 25 時間経過後）で、新鮮な培養液またはろ過海水にマダイ稚魚を移槽した。曝露試験時の環境条件は 24.5~25.2°C, DO>7.41 mg L⁻¹ で実施した。

3) 生簀沈下および足し網の被害軽減効果の現場検証（水技研，東町漁協）

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。その結果，足し網や生簀沈下により，大幅にへい死率が低下することが明らかとなった。一方で，「2010 年の八代海域でのシャットネラ属赤潮発生と鹿児島県海域での養殖ブリの大量へい死現象：漁業者への聞き取り調査結果の統計的解析法による被害要因解明報告書」（西海区水産研究所ら 2011）によると，2010 年の同海域における *Chattonella* 赤潮発生時，足し網や生簀沈下の明確な被害軽減効果は見出されなかった。しかしながら，本報告書では，赤潮の発生状況，地理的条件や環境条件が異なる全ての漁場におけるデータを一纏めにして解析がなされ，結論が出された点については再検討の余地があると考えた。そこで，今回，関係機関（水産研究・教育機構 有明海・八代海グループ，鹿児島県）の承諾を得て，当該データを再整理した。

(3) 結果及び考察

1) 赤潮鞭毛藻類の日周鉛直移動の観測

① 赤潮鞭毛藻類の日周鉛直移動の現場観測

ア. *Prorocentrum dentatum* および *Gonyaulax polygramma* の日周鉛直移動

2020 年の佐伯湾における自動昇降式多項目水質計による観測結果を図 1 に示した。観測期間中，水温，塩分および DO はそれぞれ 18.2~28.7°C，16.7~35.9 および 3.8~15.7 mg L⁻¹ の範囲で推移した。

2020 年 6 月 29 日~7 月 21 日にかけて *P. dentatum* の赤潮が確認された（最高細胞密度 31,000 cells mL⁻¹）。検鏡において，7 月 1 日に *P. dentatum* が 6 m 層で 325 cells mL⁻¹ の細胞密度で確認され，その後，7 月 16 日には 2 m 層で 31,000 cells mL⁻¹ の最高細胞密度が記録された。また，同時期に自動昇降式多項目水質計では時間帯によってクロロフィル蛍光値のピーク深度が変化する様子を捉えており，そのクロロフィル蛍光値のピークは *P. dentatum* によるものと推察された（図 2）。そこで，クロロフィル蛍光値から *P. dentatum* の鉛直移動パラメータ（上昇・下降開始時刻，最高・最低到達深度およびそれらが記録された時刻）を抽出し，表 1 にまとめた。多くの場合，上昇開始は夜半過ぎ~夜明け前，下降開始は夕方に観察された。本種はほぼ毎日夜間海底まで下降したが，昼間の最高到達深度は日ごとに変化した。いくつかの渦鞭毛藻類で知られているように（Shikata et al. 2017），最高到達深度は日照時間と有意な正の相関が認められ，本種は高日照の日は深い層に，低日照の日は浅い層に集積した（図 3）。しかしながら，その相関は 7 月 16 日まで高かったが，それ以降急激に低下し，本種は高日照の日においても昼間表層付近に達した。採水調査日の水中光量子量から消散係数と海面光量子量を算出し，日照時間と採水調査日の海面光量子量との関係式から各日の海面光量子量を推算した。その後，それらのパラメータを用いて最高到達深度に達した時

の *P. dentatum* の受光量を推定したところ、*P. dentatum* の受光量は7月16日までは概ね200~300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であったが、それ以降は700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上となった。また、7月14日辺りから本種の鉛直分布はスミアになり、日周鉛直移動が不明瞭になった。室内マイクロコズムを用いた回分培養により、本種は、栄養塩濃度が低下すると昼間の上層での集積能力が低下し、沈降しやすくなることが知られている（高見ら 2016）。7月16日以降、*P. dentatum* の細胞密度が極めて高かったのに対して、DIN あるいは DIP 濃度は低かったので（図4）、栄養塩枯渇により鉛直移動能が低下した可能性が考えられた。

一方で、2020年8月6日~8月31日にかけて *G. polygramma* が優占した（最高細胞密度 600 cells mL^{-1} ）。また、8月14日以降、自動昇降式多項目水質計においてもクロロフィル蛍光値のピーク深度が明確に時間変化する様子が捉えられ、*G. polygramma* の日周鉛直移動によるものと推察された（図2）。多くの場合、上昇開始は夜半過ぎ~夜明け前、下降開始は夕方に観察された（表1）。このパターンは、17:00 ごろ~1:00 ごろに下降し、2:00 ごろから上昇を開始したという既往の昼夜連続鉛直移動観測の結果（小泉ら 2004）と一致している。*G. polygramma* は *P. dentatum* とは異なり、毎日規則正しい鉛直移動パターンを示し、天候に関わらず昼間は表層付近まで上昇し、夜間は海底まで達した（表2）。昼間の最高到達深度と日照時間間の相関は弱かった（図3）。

イ. *K. mikimotoi* の日周鉛直移動パターン

解析対象とした期間中、*K. mikimotoi* は最高 650 cells mL^{-1} の細胞密度で優占しており、自動昇降式多項目水質計のクロロフィル蛍光値から明確な本種の日周鉛直移動が観察された（図2）。本種の最高到達深度は、*P. dentatum* と同様、日ごとに変化した（表3）。既往知見と同様に（Aoki et al. 2017, Shikata et al. 2017）、最高到達深度は日照時間と有意な正の相関が認められ、本種は高日照の日は深い層に、低日照の日は浅い層に集積した（図3）。

自動昇降式多項目水質計を用いた観測により、鉛直移動パターンについて有害赤潮鞭毛藻種間の共通点および相違点が見出された。今後も、引き続き様々な赤潮鞭毛藻類の鉛直移動パラメータを取得し、各種の日周鉛直移動シミュレーションモデルの開発などに活用していく予定である。

② *Chattonella* の鉛直移動に及ぼす栄養塩の影響把握

いずれの培地で前培養した *C. antiqua* においても、日周鉛直移動が観察された（図5）。しかしながら、完全培地と比べて、N 欠培地および P 欠培地で明期の表層集積度が明確に低かった。画像を観察すると、N 欠培地や P 欠培地では、容器底面に昼夜沈積した細胞群が認められた。また、完全培地と比べて、N 欠培地や P 欠培地では、上昇開始時刻が遅い上、下降開始が早かったため、一日の上昇時間が短かった。以上の結果から、本種細胞は窒素やリンが欠乏すると、沈降しやすくなることが明らかとなった。さらに、N 欠乏や P 欠乏状態の *C. antiqua* は魚毒性が高まることが本事業の別課題（魚毒性診断技術の開発）で明らかとなった。これらのことから、栄養塩が枯渇状態に陥った局面では、本種細胞の表層集積が弱まり、魚毒性の高い細胞群が下層に沈降することが推定されるので、生簀沈下や足し網を実施すると逆に被害率を上昇させてしまう可能性が懸念される。今後本件については更なる検証が必要であるが、足し網や生簀沈下の実施に際して、漁場ごとの本種の鉛直分布や栄養塩濃度は極めて重要な判断材料になると考えられる。

2) 養殖魚の生残に及ぼす赤潮の曝露中断の影響

マダイ稚魚の生残率は、断続曝露区および6時間中断区では試験開始から1時間30分以内に44%まで、24時間中断区では50%まで低下した(図6)。その後25時間目までは生残率の大きな低下は認められなかったが、新鮮な培地へ移槽した直後の27時間目に、連続曝露区および6時間中断区では試験魚が全滅し、24時間中断区では生残率が22%まで低下した。この結果は昨年度の結果(紫加田ら2020)と同様であり、少なくとも24時間という短時間の曝露中断によって、マダイ稚魚の赤潮抵抗性が上昇する可能性は低いと考えられた。

3) 生簀沈下および足し網の被害軽減効果の現場検証

2010年の*Chattonella*赤潮発生時の東町漁協管内における足し網あるいは生簀沈下を実施した生簀およびこれらの対策を実施しなかった生簀の台数を算出した(図7)。2010年は、漁場ごとに大きく異なっていたものの、全体の48%の生簀で足し網もしくは生簀沈下が行われ、2019年(11%)の約4倍であった。次に、足し網や生簀沈下を実施した生簀およびこれらの対策を実施しなかった生簀における漁場ごとのブリ2歳魚のへい死率を抽出した(図8)。漁場5, 7, 11では明確な被害軽減効果が認められたが、ほぼ効果がなかった漁場(漁場1~4, 8)も存在した。各漁場における足し網および沈下の対策を実施しなかった場合のブリのへい死率と最高細胞密度の相関分析を行ったが、有意な相関は認められなかった(スピアマンの順位相関係数: 0.73, $P=0.84$)。これらのことは、上述のように、*Chattonella*の魚毒性や鉛直分布が漁場間で異なっていた可能性を示唆するものである。今後更なる検証を進めていく予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、2010年の八代海における赤潮被害に関するデータおよびそれに関連する情報をご提供いただいた水産研究・教育機構 水産技術研究所 有明海・八代海グループ栗原健夫主幹研究員に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Aoki K, Kameda T, Yamatogi T, Ishida N, Hirae S, Kawaguchi M, Syutou T. Spatio-temporal variations in bloom of the red-tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi* in Imari Bay, Japan, in 2014: factors controlling horizontal and vertical distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 2017; **124**: 130-138.
- 小泉喜嗣, 市川衛, 田村成男, 長友聖代, 内田卓志. 愛媛県下波湾で観察された *Gonyaulax polygramma* Stein の日周鉛直移動. 水産海洋研究, 2004; **65**: 131-134.
- 西海区水産研究所, 鹿児島県水産技術開発センター, 東町漁業協同組合. 2010年の八代海域でのシャットネラ属赤潮発生と鹿児島県海域での養殖ブリの大量へい死現象: 漁業者への聞き取り調査結果の統計的解析法による被害要因解明報告書. 2012.
- Shikata T, Kitatsuji S, Abe K, Onitsuka G, Matsubara T, Nakayama N, Yuasa K, Nishiyama Y, Mizuno K, Masuda K, Nagai K. Vertical distribution of a harmful red-tide dinoflagellate, *Karenia mikimotoi*, at the decline stage of blooms. *J. Sea Res.* 2020; **165**: 101960.
- Shikata T, Onitsuka G, Abe K, Kitatsuji S, Yufu K, Yoshikawa Y, Honjo T, Miyamura, K.