

図5 高濃度酸素発生に関する室内試験の状況

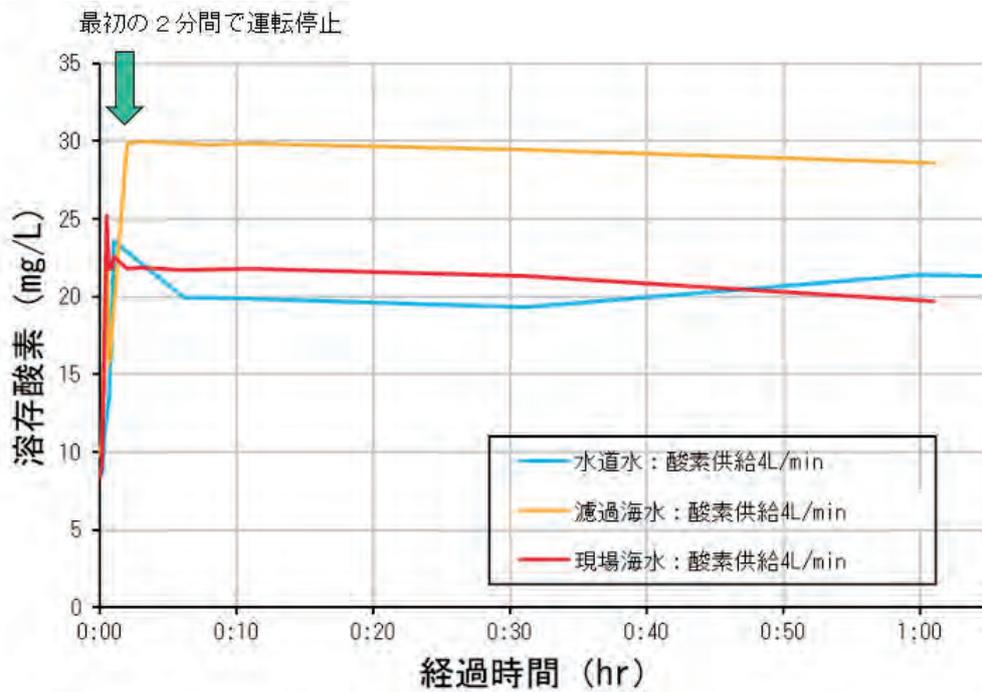


図6 異なる試水間での溶存酸素濃度の上昇効果の差異

表 1 高濃度試験に使用した現地海水（佐賀県伊万里湾大浦地先）

種名	細胞密度 cells/mL	
<i>Thalassiosira</i> spp.	160	小型種中心
<i>Skeletonema</i> spp.	100	
<i>Chaetoceros</i> spp.	10	中型種中心

## 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

#### 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 水産技術研究所

松山幸彦, 長副 聡

林兼産業株式会社

藤田幸辰, 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, 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, 同様な効果を示す餌止めよりは養殖魚の品質低下などを回避できる可能性が高い。このため, 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事業に切り替えて, 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, この改変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 令和2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改変餌料のうち、延命効果が認められた餌料 B について、*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。また餌料 B の複数成分の濃度を変更して作成した 4 種類の餌料(餌料 B1, 餌料 B2, 餌料 B3 および餌料 B4) について試験を行って有効成分の絞り込みを行った。

### 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、水研機構水産技術研究所五島庁舎で 2020 年に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、人工餌料(おとひめ C1: 日清丸紅社製)を総尾数の体重の 3~5% となるように給餌飼育した。試験に用いた個体の尾叉長は 85~94 mm, 体重は 7.9~12.0 g の範囲であった。

今年度試験に用いた赤潮プランクトンは *K. mikimotoi* 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(NGU04 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、*Chattonella* 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 *K. mikimotoi* 強毒株を 20~30 mL 接種し、温度 22 度、光強度 120  $\mu$  mol photons/m<sup>2</sup>/s, 14hL:10hD の明暗条件下で 8~9 日間培養して試験に用いた。

### 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 回給餌することにより予備飼育を行った。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。

大量培養された *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(塩分 33.6~34.1)で希釈して試験に使用した。希釈から曝露開始までは 2 時間程度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、この期間試験水の交換は実施していない。実験個体数は、各試験区 4~5 個体を 1 ターンとして実施した。曝露試験には、容量 10 L の透明バケツを用いた。赤潮プランクトンを含む試水を 5~9 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(24~28°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。

ブリ稚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。

#### (4) 鰓組織像の解析

延命効果が認められた個体については、トリパンブルー染色法によって鰓の損傷度を死亡個体と比較した。

### (3) 結果及び考察

#### 1) 餌料成分を改変された餌の調製

今年度も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、餌料 B の複数成分のうち、特定の 4 種類の餌料（餌料 B1、餌料 B2、餌料 B3 および餌料 B4）を作成した。餌料 B1 と B2 については、通常餌料から複数の有効成分のうち 1 成分のみ濃度を低下させたもの、餌料 B3 と B4 については、有効成分のうち 1 成分のみ濃度を上昇させたものである。餌料 B3 および餌料 B4 の調製については、特定成分を 99.5% のエタノールに溶解させたものを餌料 B へ噴霧して濃度を上昇させたものを用いた。すべての改変餌料について、4 日間ブリの稚魚に食べ残しがないように給餌して曝露実験に用いた。

#### 2) 試験魚の馴致および培養株の調製

今年度試験に用いたブリ稚魚は 6 月中旬に入手し、流水中で人工餌料を体重の 7% となるように給餌して予備飼育を行った。過年度、予備飼育中に原生動物のスクーチカの寄生による死亡などが発生する事例がみられたが、今年度は飼育中の死亡魚はほとんど認められなかった。また、*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。

過年度まで、曝露試験には研究所内の取水海水を直前にガラス繊維ろ紙（GF/C, Watman 社製）でろ過したもので希釈して使用していた。しかし、予備試験において、この所内海水で培養株を希釈して試験を行うと、希釈後 3~4 時間を経過すると水カビの繁茂によって試験水が白濁し、*K. mikimotoi* の遊泳低下と試験魚の死亡が遅延・停止するトラブルが続出した。このため、希釈用の海水は試験前日に研究所近くの岸壁（32°48'45.1"N, 129°46'21.8"E）から表層採水された天然海水を GF/C でろ過したものを使用した。

#### 3) 赤潮プランクトンの強毒株を用いた曝露試験の実施

（改変餌料 4 日間の給餌による影響評価：*Karenia mikimotoi* 強毒株による 1 回目試験）

本試験の曝露開始時の細胞密度は 3,798 cells/mL、試験に用いたブリの平均尾叉長は 85.7 mm、平均体重は 9.1 g、平均肥満度は 1.44 であった。試験は対照区、餌料 B 区、餌料 B1 区 および餌料 B2 区の全 4 試験区で、各試験区の供試尾数はすべて 4 尾である。試験時の水温は 28.2~28.4°C であった。

曝露試験による生存曲線を図 1 に示した。対照区については、曝露開始 24 分後からへい死がはじまり、34 分後までに 4 尾すべて死亡した。餌料 B 区については、曝露開始 44 分後に 1 尾目、1 時間 38 分後に 2 尾目が死亡したが、残り 2 尾は試験終了時の 6 時間後まで生存するなど、顕著な延命効果が認められた。餌料 B の特定成分のみ濃度低下させた餌料 B1 と餌料 B2 試験区については、それぞれ 30 分後および 25 分後に 1 尾目が死亡し、43 分後および 30 分後に全数死亡した。この結果、餌料 B2 区については、延命効果に寄与していないことが判明した。餌料 B1 が対照区と比較してわずかに死亡時間が遅延していたが、差は僅かであった。このため、曝露密度を少し下げて再試験を実施することとした。

(改変餌料 4 日間の給餌による影響評価 : *Karenia mikimotoi* 強毒株による 2 回目試験)

餌料 B1 の延命効果を再確認するための再試験を実施した。本試験の曝露開始時の細胞密度は 3,580 cells/mL、試験に用いたブリの平均尾叉長は 90.7 mm、平均体重は 11.7 g、平均肥満度は 1.58 であった。試験は対照区、餌料 B 区、餌料 B1 区および絶食区の全 4 試験区で、各試験区の供試尾数はすべて 5 尾である。

2 回目の試験結果を図 2 に示した。対照区については、曝露開始 27 分後からへい死がはじまり、49 分後までに 4 尾目が死亡した。1 尾は試験終了時の 6 時間後まで生残した。餌料 B 区については、試験終了時の 6 時間後まで全数生残した。絶食区については、1 時間 29 分後に 1 尾死亡したが、残り 4 尾は試験終了時の 6 時間後まで生残した。餌料 B1 については、1 尾目が 30 分後に死亡し、5 尾目が 2 時間 47 分後に死亡して全滅した。従って、1 回目の試験でみられた僅かな延命効果は、2 回目の試験では確認できず、餌料 B1 についても、延命効果には寄与していないことが判明した。

(改変餌料 4 日間の給餌による影響評価 : *Karenia mikimotoi* 強毒株による 3 回目試験)

餌料 B1 と B2 が延命効果に寄与していないことが判明した。残り 3 成分については、今後の検討課題であるものの、2 成分のみ予備的な検討を行った。餌料 B3 および餌料 B4 について、特定成分の濃度のみ上昇させたものを給餌した後、曝露実験を実施した。本試験の曝露開始時の細胞密度は 3,770 cells/mL、試験に用いたブリの平均尾叉長は 88.3 mm、平均体重は 10.1 g、平均肥満度は 1.46 であった。試験は対照区、餌料 B 区、餌料 B3 区および餌料 B4 区の全 4 試験区で、各試験区の供試尾数はすべて 5 尾である。

3 回目の試験結果を図 3 に示した。対照区については、曝露開始 21 分後に 1 尾目が死亡し、2 時間 28 分後までに 4 尾目が死亡した。1 尾は試験終了時の 6 時間後まで生残した。餌料 B 区については、曝露開始 42 分後に 1 尾目が死亡し、3 尾目が 2 時間 2 分後に死亡した。残り 2 尾は試験終了時の 6 時間後まで生残した。餌料 B3 区については、曝露開始 29 分後に 1 尾目が死亡し、3 尾目が 45 分後に死亡した。残り 2 尾は試験終了時の 6 時間後まで生残した。餌料 B4 区については、曝露開始 1 時間 2 分後に 1 尾目が死亡し、3 尾目が 1 時間 15 分後に死亡した。残り 2 尾は試験終了時の 6 時間後まで生残した。試験開始 1 時間後までは、対照区と餌料 B3 がよく似た生存パターンを示しており、B3 の可能性も示唆された。ただし、3 回目の試験では 1, 2 回目の試験と異なり、各試験区で試験終了時の 6 時間後まで 2 尾生残したことから、延命効果が不明瞭となった。この原因については不明であるが、この試験が水温低下時に実施したため、給餌飼育を写真 4 のように小さい水槽に入れて温水を掛け流し

て実施した。調製した餌料 B3 と B4 は特定成分の濃度も高かったと推定されるため、4 日飼育中に排泄された糞の再懸濁によって、試験区間でコンタミが発生した可能性がある。従って、次年度は残り B3～B5 成分まで、餌の調製時から成分調整されたものを作製して再試験して特定する必要があるだろう。

#### (4) 鰓組織像の解析

延命効果が認められた一部の個体の鰓をトリパンブルー染色法で簡易観察したところ、死亡個体よりは鰓組織の染色性が弱いことを確認した。

赤潮プランクトンによる魚類のへい死機構については 1970 年代から報告がみられる。図 5 にへい死機構に関する概略図を示した。これまでの既往知見を整理すると、原因プランクトンが産生する毒素や活性酸素種などによって鰓の傷害が引き起こされ、その後、鰓のガス交換機能が低下して魚が死亡するというメカニズムが想定されている (Matsuyama and Oda 2020)。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)、鰓組織の傷害を引き起こすトリガーは多種多様であることが想定される。鰓組織切片の観察結果から推定すると、*K. mikimotoi* が最も強く魚類の鰓へ組織傷害を与えているとされる (Matsuyama and Oda 2020)。一方で、昨年度の課題番号 2) -イ-④で示された高濃度酸素による救命試験において、*C. antiqua* に致死濃度で曝露され、高濃度酸素によって救命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、原因プランクトンが存在しないにも拘わらず、十分な酸素の取り込みができずにすぐに窒息死することが分かった (松山ら 2020)。この結果に加えて、組織切片観察、および過年度の曝露試験結果を比較すると、*C. antiqua* については鰓を直接攻撃しているというより本種が細胞外に分泌するグリコカリックス (Yokote and Honjo 1985, Kim et al. 2001) と魚体から分泌される粘質物との複合体による物理的閉塞を中心としてガス交換機能の低下が誘導されている可能性が高く、*K. mikimotoi* では何らかの毒素による鰓の直接破壊が引き起こされていることが推察される。今年度の結果から、この *K. mikimotoi* による直接的な攻撃と鰓組織の傷害についても、魚体側の生理状態でその進行度が大きく変化することが明白となった。

過年度までの結果から、餌料 B が延命効果を示す再現性について確認されているが、その科学的な詳細メカニズムはまだ明らかとなっていない。Qiu et al. (2020) は経口投与したアミノ酸が、*C. antiqua* 曝露時に脳内神経伝達物質の濃度変化に影響することを示しており、魚体側の摂餌状態がストレス反応に影響する事例となっている。いずれにしても、*K. mikimotoi* の曝露によって鰓が損傷する過程で、魚体側の生理特性の変化に伴い、炎症や組織崩壊の進行が緩やかになっていることが示唆されている。従来より、魚体の体サイズによって赤潮プランクトンに対する感受性が変動すること、さらには絶食が赤潮プランクトンの曝露下で著しい延命効果を示す事例から、魚体側の赤潮プランクトンに対するレスポンスの重要性が指摘されていた (Matsuyama and Oda 2020)。本事業の成果により、特に絶食の効果と同様な現象が、餌由来の特定成分の体内濃度が変化することで左右されている結果を示すなど、新知見を提供した。さらに、餌料 B の成分は概ね 5 成分からなり、今年度の試験より、2 成分について

は赤潮曝露下で延命効果に貢献していないことが明らかになった。今後残り3成分について調製した餌料を作成し、成分の絞り込みに取り組むとともに、鰓の炎症や傷害を軽減させる生化学的なメカニズムの推定を行って行きたい。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に匹敵するもしくは凌ぐものであり、今後改良餌料への切り替えによって、赤潮被害軽減策の普及促進が進展するものと期待される。

## 引用文献

- Kim D, Okamoto T, Oda T, Tachibana K, Lee K-S, Ishimatsu A, Muramatsu T. Possible involvement of the glycocalyx in the ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae): immunological approach using antiserum against cell surface. *Marine Biology*, 2001; **139**: 625-632.
- Kim D, Li W, Matsuyama Y, Cho K, Yamasaki Y, Takeshita S, Yamaguchi K, Oda T. Extremely high level of reactive oxygen species (ROS) production in a newly isolated strain of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *European Journal of Phycology*, 2019; **54(4)**: 632 - 640.
- Kim D, Li W, Matsuyama Y, Matsuo A, Yagi M, Cho K, Yamasaki Y, Takeshita S, Yamaguchi K, Oda T. Strain-dependent lethal effects on abalone and haemolytic activities of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Aquaculture*, 2020; 520.
- 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.
- 松山幸彦, 長副 聡, 伊藤信夫, 吉永 潔. ④) 物理化学的防除策および過飽和救命策併用によるブリ類の救命. 平成 31 年度漁場環境改善推進事業のうち赤潮・貧酸素水塊に対する被害軽減技術等の開発 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と実証 赤潮被害防止対策技術の開発報告書, 2020; 令和 2 年 3 月, 337-347.
- Matsuyama Y, Oda T. Toxic effects of harmful algal blooms on finfish and shellfish. In: Konur O. (Ed), Handbook of Algal Science, Technology and Medicine. *Academic Press, London*, 2020; 543-560.
- Qiu X, Matsuyama Y, Furuse M, Shimasaki Y, Oshima Y. Effects of *Chattonella antiqua* on the swimming behavior and brain monoamine metabolism of juvenile yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Marine Pollution Bulletin*, 2020; 152.
- Yokote M, Honjo T. Morphological and histochemical demonstration of a glycocalyx on the cell surface of *Chattonella antiqua*, a 'naked' flagellate. *Experientia*, 1985; **41(9)**: 1143-1145.

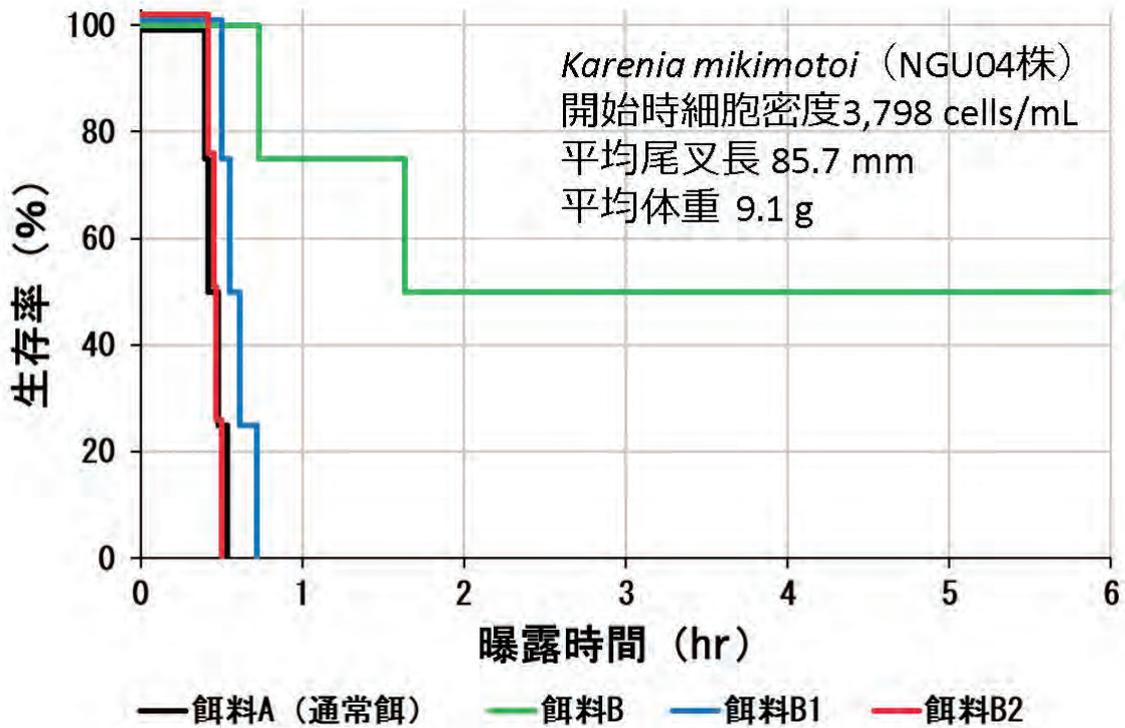


図 1 異なる餌料 B の給餌 (4 日間) がブリ稚魚の生存率に与える影響  
(*Karenia mikimotoi* 曝露時)

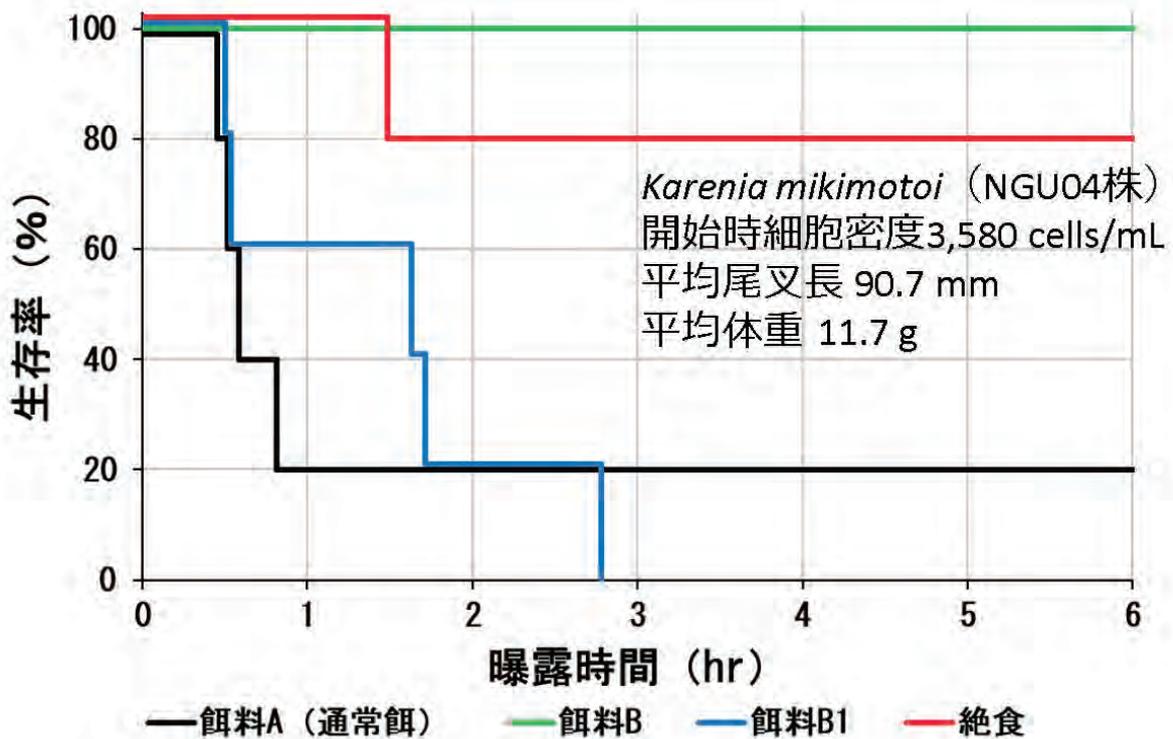


図 2 異なる餌料 B の給餌 (4 日間) および絶食がブリ稚魚の生存率に与える影響  
(*Karenia mikimotoi* 曝露時)

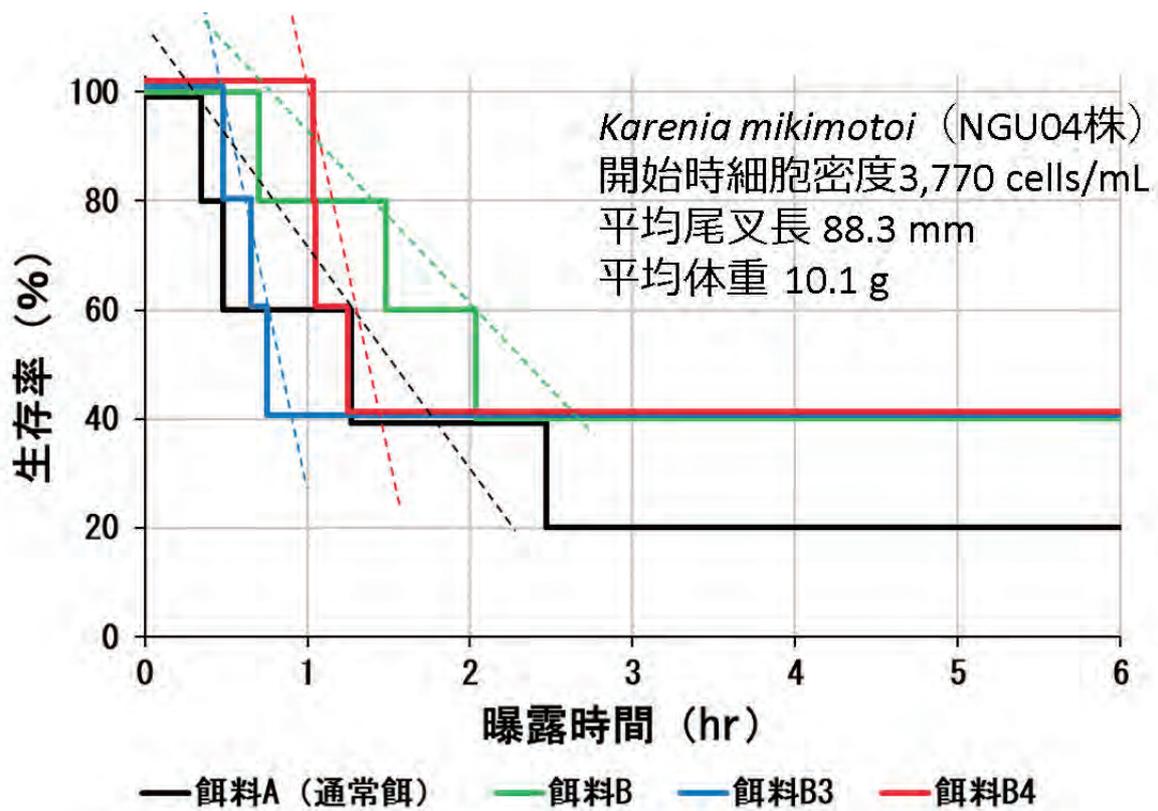


図 3 異なる餌料 B の給餌 (4 日間) がブリ稚魚の生存率に与える影響  
 (*Karenia mikimotoi* 曝露時)



図 4 餌料 B3 および B4 の給餌水槽の写真

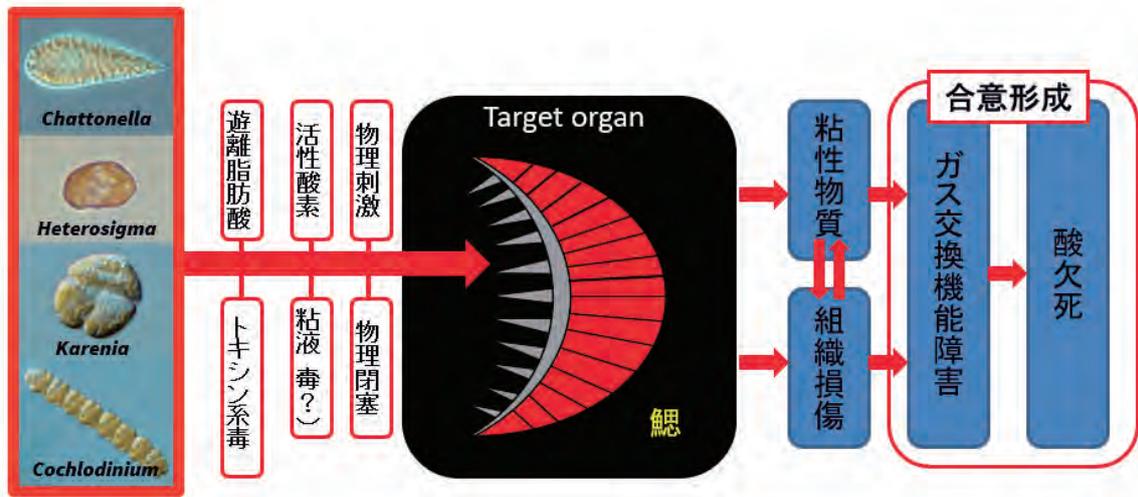


図 5 赤潮プランクトンが魚類をへい死させるメカニズムの概要図