

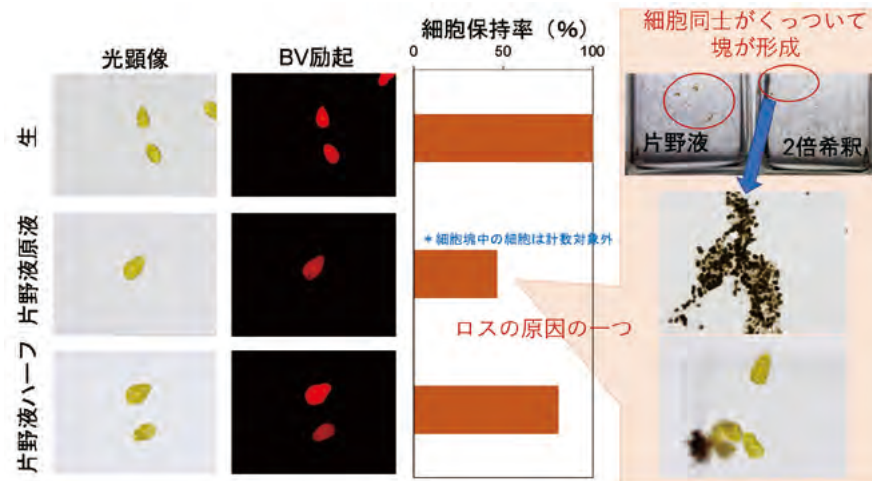


図 27. 片野液で固定直後の *Chattonella* の状態.

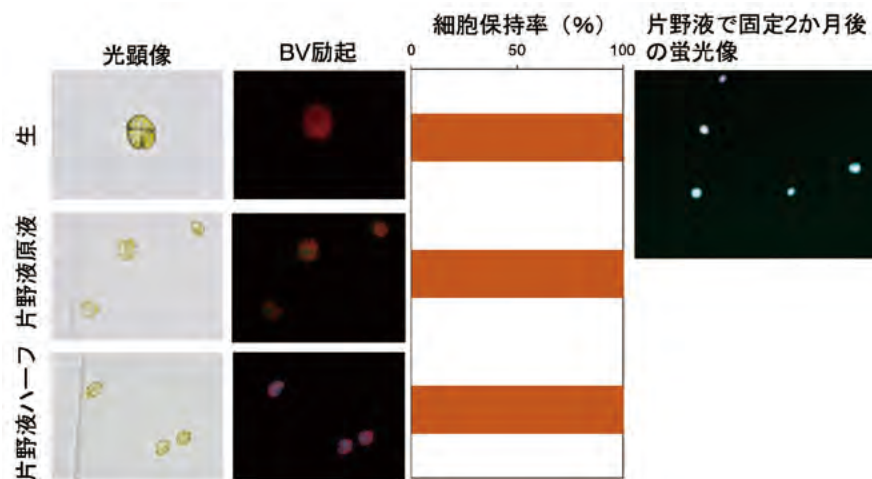


図 28. 片野液で固定直後の *K. mikimotoi* の状態と 2 か月後の蛍光像.

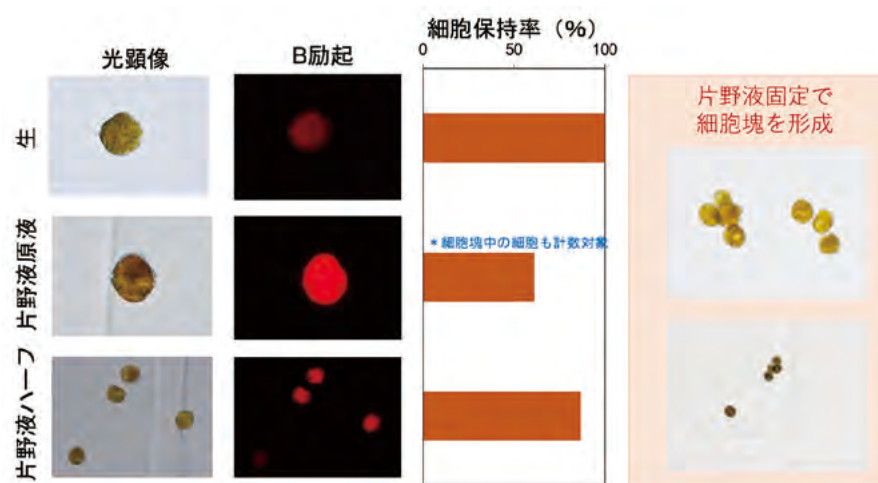


図 29. 片野液で固定直後の *A. leeii* の状態.

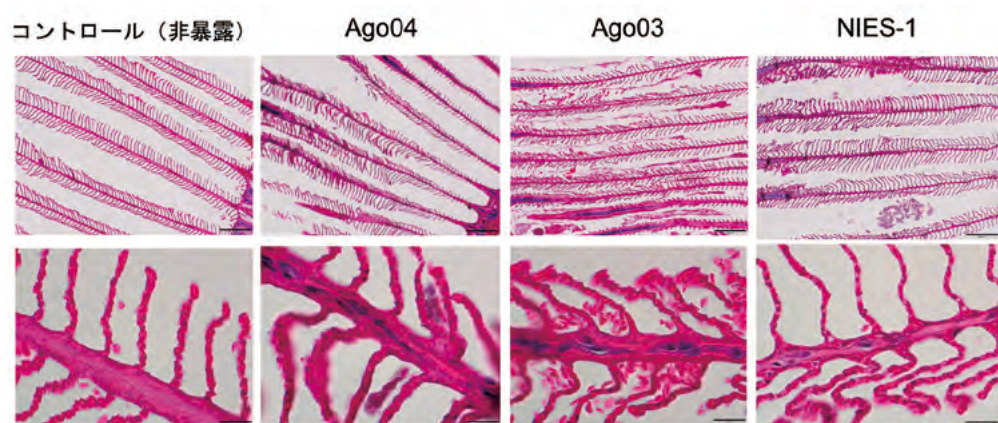


図 30. 片野液で固定した *Chattonella* の弱毒株（Ago04）および強毒株（Ago03, NIES-1）を暴露したマダいの鰓組織. 下段は拡大図.

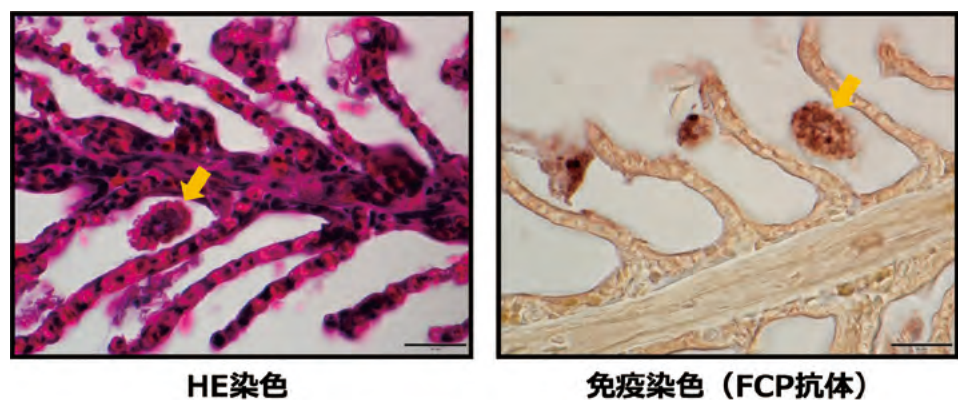


図 31. *Chattonella* を暴露後, 片野液で固定したマダいの鰓組織. 矢印は *Chattonella* と考えられる像.

表 1. 強毒・弱毒株間で変異が特定された NOX 遺伝子とその遺伝子配列中の変異箇所. A, T, C, G は塩基を示し, ○はその株に変異が存在したことを示す.

NOX gene	Position	Reference	Alteration	Ago03 (強毒)	Ago04 (弱毒)	NEIS-1 (強毒)	4KGY (弱毒)
TRINITY_DN21661_c0_g1	2366	T	A	○	—	○	—
TRINITY_DN21661_c0_g1	2595	C	T	○	—	○	—
TRINITY_DN25216_c0_g1	1561	G	A	—	○	—	○

2) 赤潮の防除・被害軽減手法の開発

イ. 生け簀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

田中真二, 奥村宏征, 栗山 功, 出口竣悟, 西川次寿

三重県水産研究所鈴鹿水産研究室

舘 洋

愛知県水産試験場

二ノ方圭介, 松村貴晴, 青山裕晃, 加藤毅士, 大澤 博

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 3 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 地点 (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"E) 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, 6~10 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 による海水お

よび底泥中の HcRNAV 定量手順は以下の通りである。海水試料 10 mL 中の HcRNAV を PEG 沈殿法により濃縮回収し、RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて全 RNA を抽出した。底泥については、2 g の泥から RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (Qiagen, CA, USA) を用いて全 RNA を抽出した。RNA 抽出物より ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA remover (Toyobo Co. Ltd., Life Science Department, Osaka, Japan) を用いて 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とマニュアルの作成

これまで、現場実証試験を 3 回行い、2019 年度からは、加茂湖にて現場で底泥散布を開始した。さらに、2020 年度から、現場関係者（新潟県、佐渡市、加茂湖漁協等）のみで、加茂湖への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、底泥散布前日に、前年度に採取し冷凍保存した底泥約 10 kg（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 100 L 中に懸濁する。懸濁に用いる海水はヘテロカプサ赤潮海水を採取して用いる（濃い方がいい）。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する。現場での散布を実施するとともに、現実的かつ効率的な散布法について検証及び意見交換を行い、マニュアル化を進める。

3) 底泥散布法の検討

① 冷凍した底泥をそのまま散布する手法の検討

採取して冷凍保存しておいた底泥を解凍することなく、ヘテロカプサ赤潮発生時に散布する手法の検討を行った。底泥は、本試験用に以下の調製を行った。2021 年 8 月に加茂湖から採取し冷凍保存してある底泥を解凍し、よく混合した後、製氷皿に均等に流し入れ 2 cm 角(10 g) の泥氷を作った。滅菌済みの 500 mL ビーカーに、ヘテロカプサ培養株を 200 mL 入れ、凍ったままの泥氷を接種する区（試験区）、0.1 g/L 濃度になるように解凍した泥を接種する区（通常の方法；対照区）を準備した。ヘテロカプサ培養株は、感染タイプの異なる 3 株、Hu9433-P（浦ノ内湾，高知県）、HCLG-1（五ヶ所湾，三重県）、05HC06（英真湾，三重県）を当量混合し、混合培養液を約 1,000 cells/mL となるように調製した。泥氷を培養液試験区に投入し、5 日間ヘテロカプサ細胞密度を計数するとともに HcRNAV の密度を定量した。試験の培養温度は 20℃、光強度は 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とした。計数及び定量法は(2)-1)と同様である。試験は 3 回繰り返して行なった。

② 底泥の接種量を増やす手法の検討

ヘテロカプサ赤潮時に散布する底泥の量を増やす方法について、接種方法とその効果を検証した。実験に用いるヘテロカプサ混合培養株（以下、ヘテロカプサ培養液、または、培養液）は、方法(2)3)①と同様の要領で調製した。接種する底泥は次の要領で準備した。ヘテロカプサ混合培養液（細胞密度；約 5,000 cells/mL）に、底泥を最終濃度 0.1 g/L で加えたもの（試験区 1）、約 10 g/L で加えたもの（試験区 2）、底泥を加えないもの（対照区）を調製し、一晚室温で静置した。試験区 1 には底泥を含む培養液を、試験区 2 には上澄みを、対照区は底泥を含まない培養液を、それぞれ準備したヘテロカプサ培養液 200 mL（細胞密度；約

1,000 cells/mL)に接種した。接種後から5日間、ヘテロカプサ細胞密度を計数するとともに HcRNAV の密度を定量した。計数及び定量法は(2)1)と同様である。

4) ヘテロカプサウイルス HcRNAV の多様性に関する研究

HcRNAV の多様性を時空間的に把握するため、2021 年度に、加茂湖（新潟県）、英虞湾（三重県）、三河湾（愛知県）、浦ノ内湾（高知県）より底泥（表層約 3 cm）を採取した。底泥は試験まで冷凍保存した。解凍した底泥を均一になるまで混合し、湿重 2 g を RNA 抽出に供試した。底泥からの RNA 抽出及び cDNA 作成手順は、方法(2)-1)と同様である。解析は、HcRNAV の ORF2 全領域を標的とし、次世代シーケンサー（依頼分析）を用いたメタバーコーディング解析を実施し、ハプロタイプネットワーク解析より遺伝子の類似度をもとに遺伝的多様性を評価した。解析用の配列は、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。HcRNAV のグループを代表する標準株には HcRNAV34, HcRNAV109, HcRNAV659 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

2021 年 6~10 月の観測時期において、ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマは、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 8 月 8 日と例年より遅く、細胞密度は約 2.5 cells/mL であった。その後、湖奥(St.6)と湖央(St.2)において、細胞密度は増加することなく低密度で検出されたが、10 月 20 日以降は検出されなくなった (図 2)。

リアルタイム PCR 法による HcRNAV 定量結果によると、2021 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 はほとんど検出されなかった。底泥中の HcRNAV は、両地点とも、7, 8 月は非常に低密度であったが、9, 10 月には増加が認められた(図 3)。これまでに蓄積された HcRNAV が偏って底泥に存在しており、偶然密度の高い泥を採取したことも考えられるが、本底泥は表層から採取されているため比較的新しい堆積物であることを考えると、9, 10 月における HcRNAV 密度の増加は、2021 年夏にヘテロカプサが存在していたことを示すと考えられる。すなわち、観測日以外、あるいは、定点以外の場所で、海水中にヘテロカプサが存在し、HcRNAV が感染し増殖した後に沈降し、底泥に蓄積したと推察できる。一方、加茂湖の湖水では、ヘテロカプサの細胞密度の推移とは同調せず、HcRNAV の変動が見られた (図 4)。湖水中の HcRNAV は 7 月から 9 月にかけて増加傾向で、10 月も高い密度を維持していた。また、底泥中の HcRNAV 密度も高い値を維持し、 $10^6 \sim 10^7$ copies/mL 間で増減が認められたことから (図 5)、観測日以外、あるいは、定点以外の場所で、湖水中にヘテロカプサが存在していたことが推察された。

2021 年度の英虞湾や三河湾の海況については、課題 1)ウに述べた通りである。2021 年度の加茂湖の環境については、図 6 に示す。加茂湖原黒定点の 6~10 月では、水温は 20.2~30.2℃、塩分は 7 月中旬に降雨の影響によって表層 (11.7) で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。溶存酸素濃度は、6~9 月中旬まで、6 m 以深において 4 mg/L を下回る貧酸素状態が恒常的に見られたが、9 月下旬以降は回復傾向であった。3 m 以浅では、

8月を除き6 mg/L以上の溶存酸素濃度を維持し、例年に比べると、貧酸素期間は短かった。2021年度のヘテロカプサの低密度との関係性を見るには、栄養塩の変動や珪藻類など他の競合生物の挙動も視野に入れた考察が必要である。

2) ヘテロカプサ赤潮防除法の現場試験とマニュアルの作成

2019年度より加茂湖において、ヘテロカプサ赤潮発生時に、底泥散布が行われるようになった。今年度もヘテロカプサ赤潮発生時に散布予定であったが、ヘテロカプサの細胞密度が増加しなかったため、実施しなかった。2009年以来、初めてヘテロカプサが赤潮状態にならなかった。これまでの研究で、毎年ヘテロカプサの増殖が見られる場所ではHcRNAVが底泥に蓄積していることが明らかになっているため、来年度以降の底泥散布に向けて、2021年11月に新潟県及び加茂湖漁協と協力して、採泥を行った。採取した底泥は冷凍保存した。さらに、散布法や採泥法、底泥の保存法などについて検討会を開くなど、マニュアル作成を進めるとともに、協力体制を強化した。

3) 底泥散布法の検討

① 冷凍の底泥を散布する手法の検討

本法は、ヘテロカプサ赤潮の終息後に、HcRNAVが底泥に蓄積する事象を活用する方法である。同種赤潮の衰退後にHcRNAVを含む底泥を採取し、冷凍保存する。次回、赤潮発生時に底泥を解凍し、その赤潮海水に数時間底泥を入れることで、底泥中のHcRNAVはヘテロカプサへの感染を始めるため、その海水を赤潮現場に散布することで、大量のHcRNAVを投入するという工程である。本法が現場で用いられる様になってきた今、いかに現場関係者のみで、容易に実施するかを検討する必要がある。そこで、まず、冷凍保存してある底泥を赤潮発生時に散布する際、解凍しないで凍ったまま散布する方法を検討した。500 mL ビーカーに200 mLの培養液を入れて、2 cm 角の泥氷を加えて泥の拡散を観察したところ、泥氷はすぐに底に落ちて、15分程度で崩れた。スケールを大きくし、バケツに10 Lの海水を入れ、2 cm 角の泥氷を投入したところ、やはりすぐに底に落ちた。泥氷を湖水に浮かべて、溶けながら泥が拡散するよう調整するには、泥氷の密度を低くする必要があるが、「より簡易な手法を検討する」趣旨に合わないため、今後底泥は解凍して用いることとした。

② 底泥の接種量を増やす手法の検討

(3)3)①で述べたように、本法を簡略化するために、②では底泥の投入量を増やす方法を検討した。本目的は、HcRNAVを高密度に含む底泥表層(2~3 cm)の採取には多大な労力を要するため、効率を低下させずに底泥をある程度雑多に採取したい、また、投入する底泥の量を増やしたくない、などの現場の要望に応えるものである。後者に対しては、散布前に底泥を赤潮海水に接触させるという事前処理において、雑多に底泥を加えて、数時間から一晩置くことで、底泥中のHcRNAVのヘテロカプサへの感染を促し、散布時に上澄みのみを湖水に流すという方法を検討した。

結果を図7に示す。本試験では、まず、ヘテロカプサ混合培養液(細胞密度;約5,000 cells/mL)を赤潮海水に見立て底泥を接種した(事前処理)。従来通り底泥を最終濃度0.1 g/Lで泥も含めて培養液に加えたもの(試験区1)、約10 g/Lの底泥を投入し上澄みのみ加えたもの(試

験区 2), および底泥を加えないもの (対照区) で, ヘテロカプサの増殖と HcRNAV の密度を比較した。試験期間 5 日間で, 対照区は, ヘテロカプサが 1 mL あたり約 1,000 細胞から 85,000 細胞まで増加したのに対し, 試験区 1 は約 44,000 細胞, 試験区 2 は約 30,000 細胞と対照区の半数以下に留まった。一方, 5 日後の HcRNAV 密度は, 試験区 1 では, 3 copies/mL から約 180 copies/mL, 試験区 2 では, おおよそ 300 から 50,000 copies/mL まで上昇した。試験 1 日目の HcRNAV 密度は, 試験区 1 は 3 copies/mL, 試験 2 では約 180 copies/mL であったことから, 散布前の底泥の赤潮海水への接種処理で, HcRNAV の感染を促進できることが明らかとなった。さらに, 散布時に上澄みのみを接種する今回の方法で, より大きな効果をも期待できる可能性が示された。しかしながら, 今回は, 培養に用いた培地の栄養塩濃度が高く, ヘテロカプサの増殖速度が速すぎたこと, HcRNAV の細胞への潜伏期間を考えると, 5 日以上試験が必要であることなど, 実験設定に問題点が残された。今後, これら問題点を改善し, さらに精緻なデータを獲得することにより, より簡易な手法への改善を目指したい。

4) ヘテロカプサウイルス HcRNAV の多様性に関する研究

新潟県加茂湖では, 2009 年にヘテロカプサ赤潮が発生して以来, 同種の出現が毎年確認されている。これまでの結果から, ヘテロカプサとそれらに感染するウイルスには, 感染の組み合わせが少なくとも 3 タイプ存在することが明らかになっており (Nakayama et al. 2013), 毎年のモニタリング結果から, 感染タイプは変化していることが示唆されている。そのため, 2018 年には, 新潟県加茂湖および愛知県三河湾の底泥中の HcRNAV の ORF2 全領域を標的としたサブクローニングによる系統解析及びハプロタイプネットワーク解析を行い, HcRNAV の多様性や遺伝的類似度を評価した (Nakayama and Hamaguchi 2022)。それによると, HcRNAV の遺伝子タイプが季節ごと, 地域ごとに異なることが明らかになった。特に, ネットワーク解析では, HcRNAV は, UA2, CY, MIKAWA がそれぞれ異なるクレードに分かれ, 年々そこから派生していることが認められた。そこで, 今回は, 加茂湖, 三河湾, 英虞湾, 浦ノ内湾の 4 つの海域から底泥を採取し, クローニングによらない方法, すなわち, NGS を用いた HcRNAV の ORF2 メタバーコーディング解析を行うことにより, 底泥中の大量データを対象に比較解析を実施することとした。それぞれの海域からの底泥は, 予めリアルタイム PCR 解析により, HcRNAV 密度の高かったものを用いている。

謝辞

本研究の実施にあたり, 現場調査および現場指導並びに現場試料の提供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, 高知県水産試験場の山下樹徹様, 上村海斗様, 赤潮に関する情報提供及び現場試料提供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. DnaSP; 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.
- Nakayama N, Hamaguchi M. The importance of the genetic diversity of the HcRNAV ssRNA virus in the viral-based bloom control of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Aquaculture* 2022; **546**: 737318. DOI [10.1016/j.aquaculture.2021.737318](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737318)

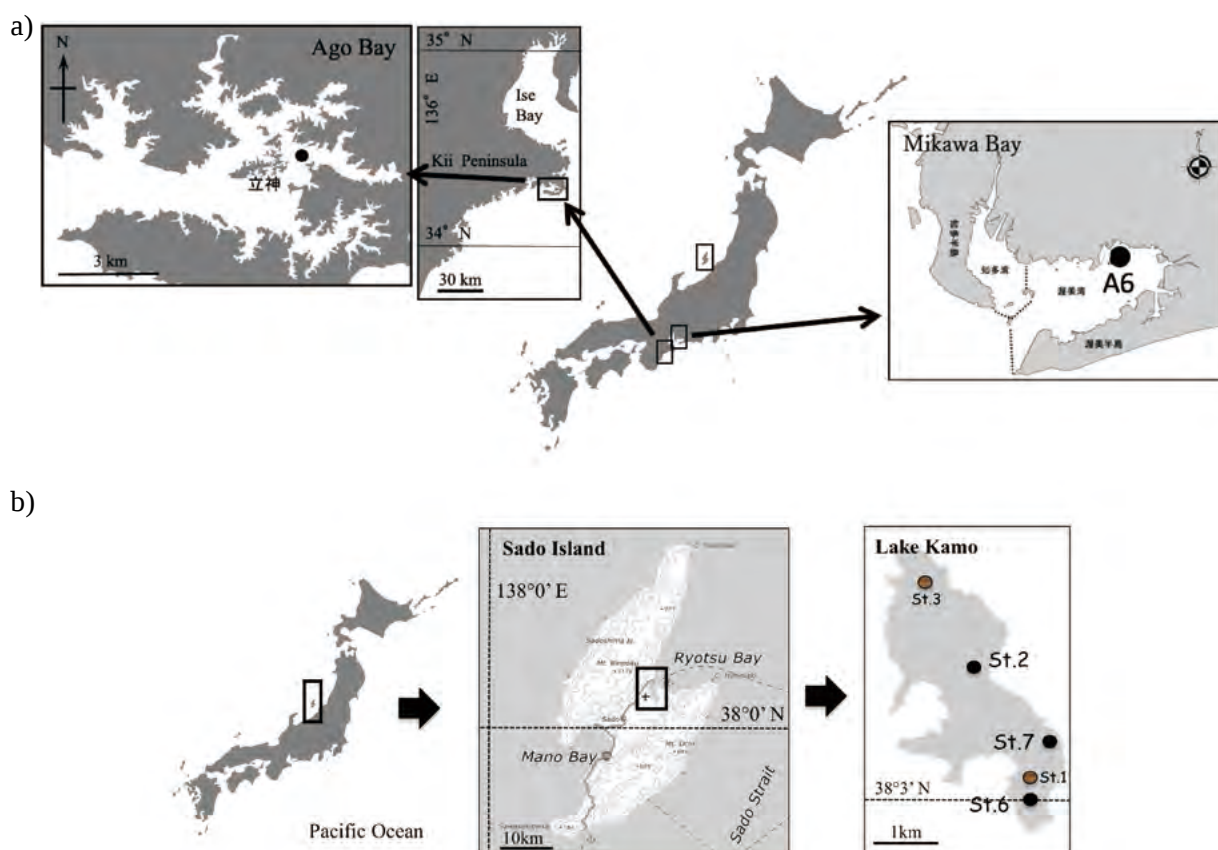


図 1. 試料採取および試験実施地点

- 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, St1, St.2, St.3 ; 定期観測点.