

## 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

#### 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

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3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 1 mm 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 2 種類の餌料（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 2021 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、シオミズツボウムシ（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、シャットネラ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、22 度、120  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、14hL:10hD の明暗条件下で 8～9 日間培養を行って試験に用いた。

### 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 回給餌して飼育を行った。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蟬集するのを確認後、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、尾叉長 50 mm までは容量 10 L の透明バケツを、尾叉長 50 mm 以上では 30 L パンライト水槽を用いた。赤潮プランクトンを含む試水を 5.0～15 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℃）を掛け流して水温を一定に保った（24～28℃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的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。

ブリ幼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、今年度は餌料 B の複数成分のうち、昨年度関与が低いと判断された 2 種類を除いた特定の 2 種類の餌料（餌料 B3 および餌料 B4）を作成した。餌料 B3 と B4 については、すべての成分の濃度を低下させた餌料 B に対して、餌料 B3 と餌料 B3 の成分を 99.5%のエタノールに溶解させたものを餌料 B へ噴霧・乾燥させて濃度を上昇させたものを用いた。さらに、通常餌料から餌料 B3 および餌料 B4 の 1 成分のみ濃度を低下させたものについても検討を行い、有効成分の特定および相乗作用について検討した。いずれも原則として、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。対照区は室内飼育に用いている市販の餌料（ラブラヴァ、林兼産業株式会社）を同量 4 日間給餌した。

##### 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、*K. 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, Whatman 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 3,300 cells/mL、試験に用いたブリの平均尾叉長は 72.1 mm、平均体重は 5.6 g、平均肥満度は 1.50 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 試験区である。ここで用いた餌料 B3 と餌料 B4 については、基本となる餌は餌料 B と同じで、これに対して、餌料 B3 と餌料 B4 の成分を 99.5%エタノールに溶解させ、餌料 B に対して噴霧したのち、50 ° C で 1 時間乾燥させたものを用いた。すなわち、餌料 B のうち、特性の 1 成分のみ濃度が上昇した餌料となる。各試験区の供試尾数は餌

料 B3 区のみ 5 尾で、他はすべて 4 尾である。試験時の水温は 26.2～27.6 °C であった。

1 回目の試験結果を図 1 に示した。対照区については、曝露開始 28 分後からへい死がはじまり、3 時間 18 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 55 分後に 1 尾目、2 時間 9 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上昇させた餌料 B3 と餌料 B4 試験区については、それぞれ 27 分後および 26 分後に 1 尾目が死亡し、2 時間 3 分後および 1 時間 32 分後に 5 尾目と 4 尾目が死亡して全滅した。ここで、基本的に餌料 B は延命効果を示す餌で、これに対して特性成分をスパイクすることで、生存時間が短縮して対照区の方に近づくと、スパイク成分の作用によって延命効果が失われたと判断される。第 1 回目の試験では、餌料 B3 と餌料 B4 のいずれも生存時間が短縮し、特に餌料 B4 についてはほぼ対照区と同じ生存時間であったことから、この試験結果に基づくと、餌料 B3 区と餌料 B4 区のいずれも、弱いながら延命効果に寄与していると判断された。ただし、その差異は僅かであった。このため、餌料 B4 については、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 B4 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 3,450 cells/mL、試験に用いたブリの平均尾叉長は 77.4 mm、平均体重は 7.2 g、平均肥満度は 1.56 であった。試験は対照区、餌料 B 区および餌料 B4 区の全 3 試験区である。第 1 回目の試験では、4 日間特定成分を含む餌を給餌したが、過剰投与の可能性もあるため、給餌方法を変更した。すなわち、餌料 B4 区は 3 日目まで餌料 B を給餌して、試験前日の 4 日目の給餌のみ、第 1 回目の試験と同じ餌料 B4 の成分をスパイクした餌を給餌した。各試験区の供試尾数はすべて 4 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 33 分後からへい死がはじまり、1 時間 45 分後までに 4 尾目が死亡して全滅した。餌料 B 区については、曝露開始 1 時間 15 分後からへい死がはじまり、2 時間 11 分後までに 3 尾目が死亡した。試験終了時の 6 時間後まで 1 尾生残した。餌料 B4 区については、曝露開始 31 分後からへい死がはじまり、2 時間 35 分後までに 4 尾目が死亡して全滅した。従って、1 回目の試験でみられた僅かな延命効果は、2 回目の試験でも弱いながら確認された。

(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 B3 と B4 が延命効果に寄与している可能性は高くなったため、今度は通常餌料から餌料 B3 と餌料 B4 の成分のみ調整した餌を新たに調製した。本試験の曝露開始時の細胞密度は 3,120 cells/mL、試験に用いたブリの平均尾叉長は 83.6 mm、平均体重は 9.5 g、平均肥満度は 1.63 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 29 分後からへい死がはじまり、1 時間 32 分後までに 4 尾目が死亡して全滅した。餌料 B 区については、曝露開始 29 分後に 1 尾目が死亡したが、残り 3 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 B3 については、曝露開始 37 分後に 1 尾目が死亡し、曝露開始 2 時間 59 分後に 3 尾目が死亡したが、残り 1 尾は試験終了時の 6 時間後まで生存した。



餌料 B4 試験区については、50 分後に 1 尾目が死亡し、1 時間 41 分後に 4 尾目が死亡して全滅した。この結果から、スパイク試験では餌料 B4 の関与が疑われたが、B4 のみの成分を除いた試験結果では対照区より僅かに生存時間が遅延するだけで、餌料 B3 の方がより生存時間を遅延させる効果があることが判明した。ただし、餌料 B3 の延命効果は餌料 B ほどではないことから、餌料 B3 と餌料 B4 が相乗的に関与している可能性も示唆された。今回 1 成分のみ調整した餌料での試験となったことから、今後は餌料 B3 と餌料 B4 の両方の成分を調整した餌料を再調製して試験を行って餌料 B の延命効果に近づくかどうか、まだ未検討の餌料 B5 の試験についても検討する必要がある。

#### (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 4 にへい死機構に関する概略図を再掲した。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なものが提示されており、学術的な論争は決着していない。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、昨年度および今年度の課題番号 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・成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い。これとは異なり、*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、給餌する餌の成分を改変することで、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繰り返し確認されているが、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、*Chattonella 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。今回延命効果に関与していると推定された B3 の成分については、体内でのイオンの輸送あるいは細胞内濃度を一定に保つのに関与しているという知見もある。

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、今年度試験を行った 2 成分が、赤潮曝露下で相乗的に延命効果に貢献している可能性が示唆された。今後相乗効果、未検討の残り 1 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, 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.
- Kim D, Okamoto T, Oda T, Tachibana Ka, Lee KS, Ishimatsu A, Muramatsu T. Possible involvement of the glycocalyx in the ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae): immunological approach using antiserum against cell surface. *Mar. Biol.* 2001; **139**: 625-632.
- Kim D, Wencheng L, 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*. *Eur. J. Phycol.* 2019; **54**(4): 632-640.
- 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; 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; 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, Fruse M, Shimasaki Y, Oshima Y. Effects of *Chattonella antiqua* on the swimming behavior and brain monoamine metabolism of juvenile yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Mar. Pollut. Bull.* 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

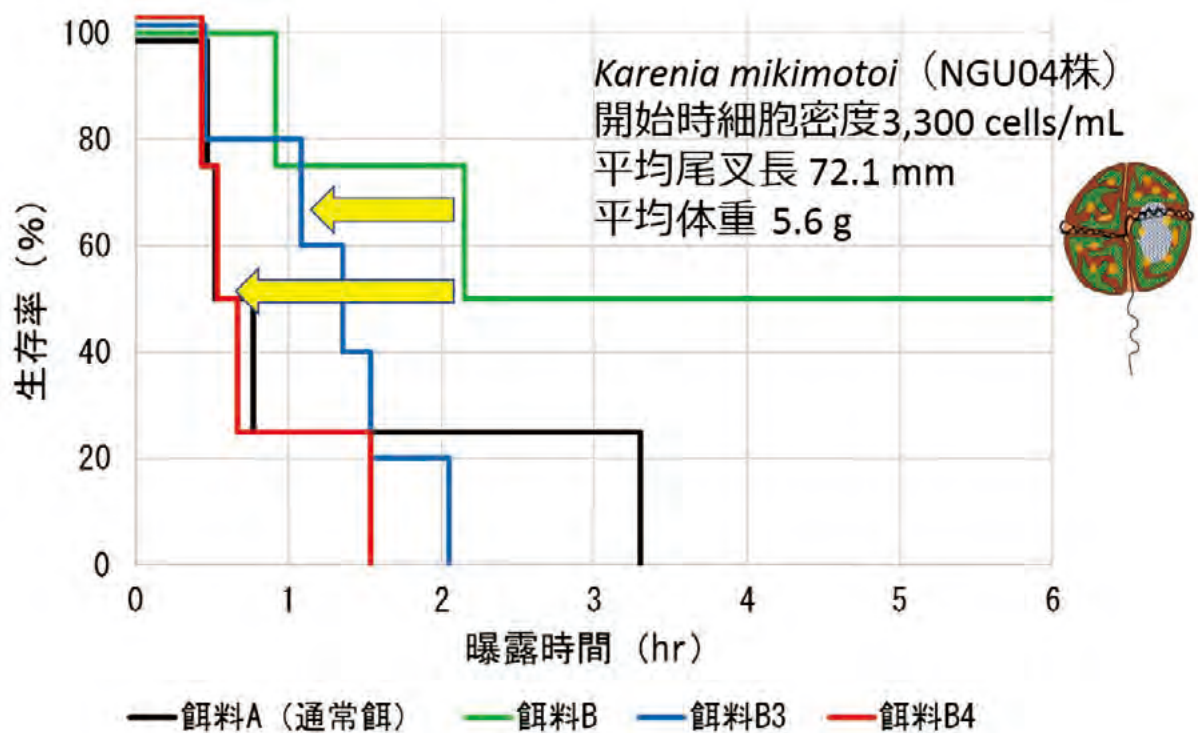


図 1 異なる餌料 B の給餌（4 日間）がブリ稚魚の生存率に与える影響  
 (*Karenia mikimotoi* 曝露時)

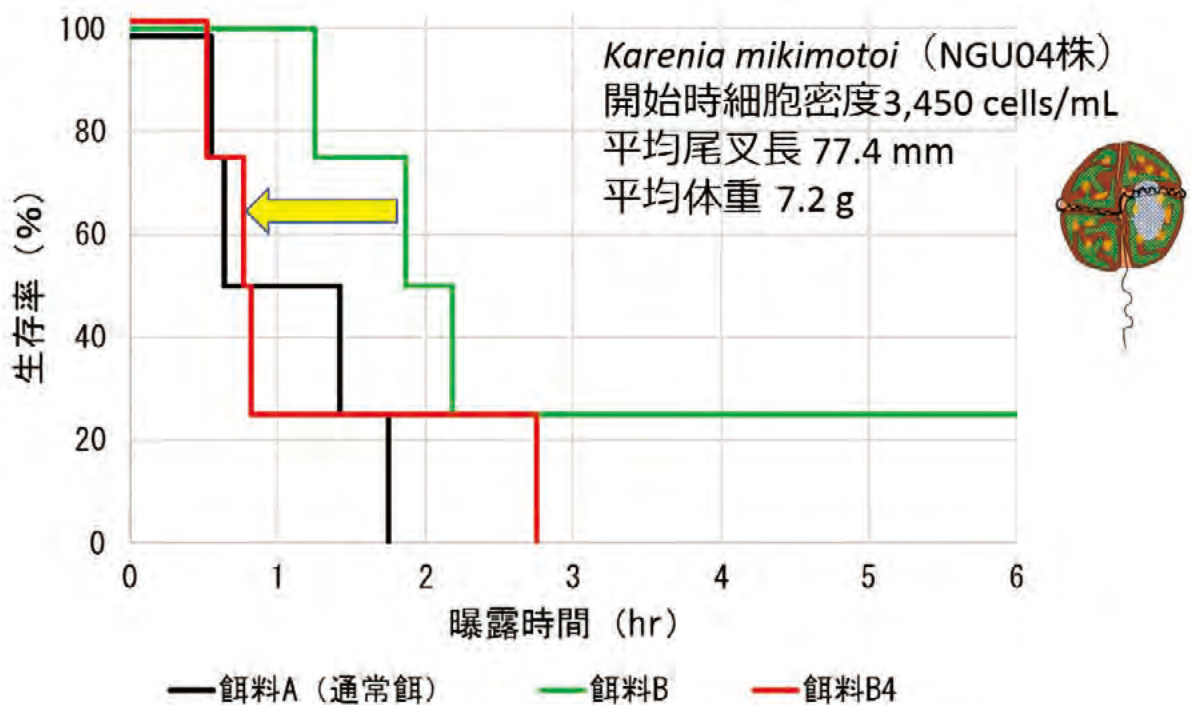


図 2 異なる餌料 B の給餌（4 日間）および絶食がブリ稚魚の生存率に与える影響  
 (*Karenia mikimotoi* 曝露時)



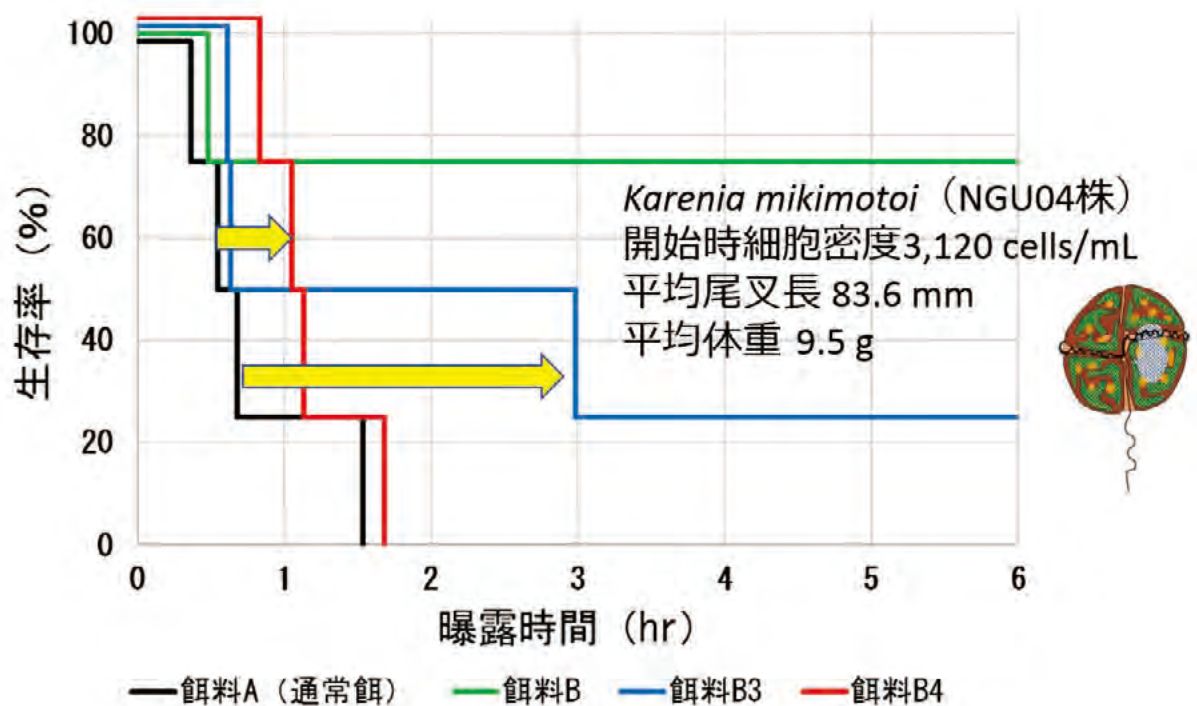


図 3 異なる餌料 B の給餌（4 日間）がブリ稚魚の生存率に与える影響  
 (*Karenia mikimotoi* NGU04 株曝露時)

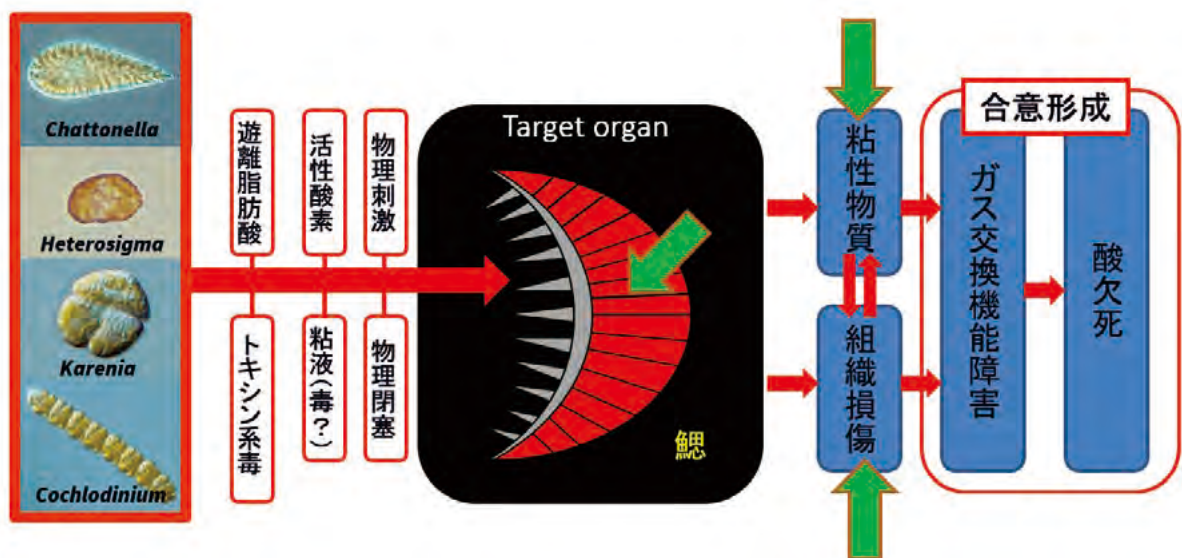


図 4 赤潮プランクトンが魚類をへい死させるメカニズムの概要図

矢印は絶食や改変餌料を投与した場合に生理学的な変化が生じる可能性のあるパスウェイを示した



### 3) 有害赤潮プランクトンのモニタリング技術の開発・実証及び普及並びにデータ利活用の促進

#### ア. モニタリング技術の開発・実証

水産研究・教育機構水産技術研究所

坂本節子, 外丸裕司

広島大学

小原静夏, 小池一彦

## 1 全体計画

### (1) 目的

日本沿岸では、これまで赤潮の形成や漁業被害が報告されていなかった新奇有害プランクトンによる漁業被害が発生しており、このようなプランクトンの中には渦鞭毛藻 *Karenia digitata* のように、不定期に発生して漁業被害の原因となってきた種も存在する。しかし、その分布や生態、発生環境、増殖生理特性、毒性などの発生予察の基盤となる情報はほとんど蓄積されていない。その要因として、1) 細胞形態による種同定が難しくモニタリングが困難、2) 発生が不定期であり継続性がないため十分な調査研究がなされていない、3) 原因種の培養株確立や維持が困難で安定した培養条件が把握できていない、など複数の要因が挙げられる。本課題では、*K. digitata* を含む新奇有害プランクトンの分布や生態を把握し、発生リスクを評価する。また、難培養の有害プランクトンについて培養株を確立し、安定して維持培養するための培養条件を明らかにするとともに、安定した培養株が確立できれば基本的な増殖生理特性を室内培養実験で把握し、発生予察に必要な基盤的情報を蓄積する。種同定が困難な種については DNA を標的とした分子検出・同定手法を確立・導入する。

## 2 令和3年度計画及び結果

### (1) 目的

全体計画と同じ

### (2) 方法

#### 1) 新奇有害プランクトンに関する情報収集（水産技術研，広島大）

過去に日本や中国で繰り返し漁業被害の原因となっているものの、生態や増殖生理特性が分かっていない渦鞭毛藻類 *K. digitata* の生態を解明することを目的とした。

##### 1-1 定量 PCR 法による *K. digitata* の出現動態の把握

2015 年以降、*K. digitata* が繰り返し発生している広島県東部海域を中心として下記の調査を実施した。

##### 1-1- ① 広島県東部海域（備後灘）（2021 年 1～12 月，月 1 回）

過去に *K. digitata* による赤潮発生と漁業被害の報告がある広島県福山市沿岸に位置する田島港および田尻港の 2 定点（図 1b）において月 1 回の海洋調査を実施し、周年の出現動態を調べた。各定点において、多項目水質計（DS5, Hydrolab）を用いた水温、塩分の鉛直的な測定に加え、バンドーン採水器を用いて水深 1 m から bottom-1 m（B-1 m）までを 2 m おきに採

水した。採水した試水は、オートアナライザー（SWAAT, BLTEC）による溶存態無機栄養塩濃度（DIN:  $\text{NO}_3+\text{NO}_2+\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ）の測定、検鏡および定量 PCR 法による *K. digitata* の検出に用いた。定量 PCR 法を用いた *K. digitata* の検出は以下の手順で実施した。試水 500 mL を目合い 3  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過してプランクトンを回収した。フィルター試料は分析するまでの間、マイクロチューブに入れて -20  $^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。フィルター試料は以下の方法で DNA 抽出に供した。まず、フィルター試料に 200  $\mu\text{L}$  の 5% Chelex PBS を添加し、ペッスルホモジナイザーでホモジナイズした。これを 15 分間加熱抽出し、抽出液を遠心分離（10,000 rpm, 1 min）して得られた上清を DNA 粗抽出液とした。定量 PCR には StepOne または StepOnePlus（Thermo Fisher Science）と TaqMan Gene Expression Master Mix（Thermo Fisher Science）を用い、通常のプロトコルに従い反応液を調製した。反応液中のプライマーおよびプローブの終濃度はそれぞれ 0.9  $\mu\text{M}$  および 0.25  $\mu\text{M}$  とした。プライマーおよびプローブは下記の配列で作製した：プライマー Kdi-LSU-MGBF: 5'-TCTGGTCGCAGTGCTCTCA-3', Kdi-LSU-MGBR: 5'-ACCATTTTGTTCATCGTACTTATGTC A-3', プローブ Kdi-LSU-MGBP: 5'-CCTCGGCTCYTCCT-3'。プローブは 5'末端に FAM を標識した TaqMan MGB プローブとした。PCR 反応はプレヒート 95  $^{\circ}\text{C}$ -10 min の後、95  $^{\circ}\text{C}$ -15 sec と 60  $^{\circ}\text{C}$ -1 min の PCR 反応を 40 サイクルとし、60  $^{\circ}\text{C}$  反応の間に蛍光値を測定した。検量線には *K. digitata* の rDNA LSU D1-D2 領域を増幅し、精製した PCR 産物から調製した既知 DNA 濃度標品（ $2\times 10^1\sim 2\times 10^7$  copies  $\mu\text{L}^{-1}$  の間の 4 段階）を用いた。DNA 濃度から細胞数への換算は、2019 年度に本事業で得られた *K. digitata* 1 細胞当たりの推定コピー数 5,500 copies cell<sup>-1</sup>（坂本ら 2019）を用いて算出した。なお、地図およびグラフの作成には Ocean Data View を使用した（Schlitzer 2018）。

#### 1-1- ② 瀬戸内海西部海域（広島湾）（2019 年 1 月，2020 年 2 月）※分析は 2021 年度実施

これまでの調査において広島湾でも秋季に *K. digitata* が出現することを確認している（坂本ら 2020, 2021）。そこで広島湾の沖合において冬季に海洋調査を実施し、本種栄養細胞の越冬について検討した。調査は水産研究・教育機構の漁業調査船こたか丸にて、2019 年 1 月 11 日と 2020 年 2 月 4 日に広島湾 7 定点（図 1c）において実施した。各定点において、多項目水質計（AAQ-RINKO, JFE アドバンテック）を用いた水温、塩分の鉛直的な測定に加え、バケツによる表層（0 m）採水およびニスキン採水器により 5 m, および B-1 m で採水を行った。採水した試水は、オートアナライザー（QuAAtro, BLTEC）による溶存態無機栄養塩濃度（DIN:  $\text{NO}_3+\text{NO}_2+\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ）の測定、*K. digitata* の細胞数計数、および定量 PCR 法を用いた *K. digitata* の検出を前述の方法に従い実施した。調査は 2019 年度および 2020 年度に実施したが、定量 PCR 法による *K. digitata* の検出は本年度実施した。

#### 1-1- ③ 瀬戸内海中央部～東部（2021 年 4 月）

過去に一部の海域（山口県油谷湾）でのみ *K. digitata* の出現が確認されている 4 月に（坂本ら 2020），瀬戸内海中央部から東部にかけて広域調査を行い、春季における *K. digitata* の水平分布を調べた。調査は広島大学生物生産学部練習船豊潮丸にて 2021 年 4 月 12～16 日に備後灘，燧灘，備讃瀬戸，播磨灘，大阪湾に属する図 1d に示した 16 定点にて実施した。各定点において、多項目水質計（DS5, Hydrolab または SBE 911plus, Sea bird）を用いた水温、塩分

の鉛直的な測定に加え、バケツによる表層（0 m）採水およびニスキン採水器による 5 m, B-1 m 採水を行った。採水した試水は、オートアナライザー（SWAAT, BLTEC）による溶存態無機栄養塩濃度（DIN:  $\text{NO}_3 + \text{NO}_2 + \text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ）の測定、*K. digitata* の細胞数計数および定量 PCR 法を用いた *K. digitata* の検出を前述の方法に従い実施した。本報告書内では分析が終わっている表層（水深 0 m）のデータのみを示す。

#### 1-1- ④ 瀬戸内海西部～中央部（2021 年 10 月）

本事業にて 2020 年に安芸灘から播磨灘にかけての表層で *K. digitata* の出現が確認されている 10 月に、瀬戸内海西部から中央部にかけて広域調査を行い、秋季における *K. digitata* の水平分布を調べた。調査は水産研究・教育機構の漁業調査船こたか丸にて 2021 年 10 月 27～30 日に広島湾、安芸灘、備後灘、燧灘に属する図 1e に示した 21 定点にて実施した。各定点において、多項目水質計（AAQ-RINKO, JFE アドバンテック）を用いた水温、塩分の鉛直的な測定に加え、バケツによる表層（0 m）採水およびニスキン採水器による 5 m および B-1 m 採水を行った。採水した試水は、オートアナライザー（SWAAT, BLTEC）による溶存態無機栄養塩濃度（DIN:  $\text{NO}_3 + \text{NO}_2 + \text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ）の測定、*K. digitata* の細胞数計数および定量 PCR 法を用いた *K. digitata* の検出を前述の方法に従い実施した。本報告書内では分析が終わっている表層（水深 0 m）のデータのみを示す。

#### 1-2 消失時期の生残戦略の把握（シスト形成の有無の検討）

2021 年 1～12 月に月 1 回、1-1- ①で観測している広島県東部海域の 2 定点（図 1b）で、エクマンバージ採泥器を用いて底泥を採取し、表面 1-3 cm の泥を持ち帰った。泥は DNA 抽出まで  $-20^\circ\text{C}$  で冷凍保管した。採取した泥の内、1-1- ①で水柱から *K. digitata* が検出されている 9, 10, 11, 12 月の 2 定点の泥について、以下の手法によって DNA 抽出および検出を行った。泥からの DNA 抽出には市販のキット（DNeasy PowerSoil Pro Kit, QIAGEN）を使用した。本キットでは泥 0.25 g から DNA 抽出液を 50  $\mu\text{L}$  得ることができる。得られた DNA 抽出液を本事業で確立した *K. digitata* の LAMP 法および定量 PCR 法に供した。

#### 2) 有害渦鞭毛藻 *Alexandrium leei* の簡易分子同定手法の検討（水産技術研）

2017 年 4 月に高知県野見湾で *A. leei* の赤潮が発生し、漁業被害が発生した。*A. leei* は魚毒性を持つことが知られており、日本における赤潮の発生はまれであるものの、東南アジアで広く分布して、漁業被害の報告も複数ある。日本では天草や沖縄で *A. leei* の出現は確認されているが、その分布域はほとんどわかっていない。*A. leei* の種同定は細胞の鎧版の配列とその形態により行われるが、正確な種同定には知識や経験が必要であり、発生時に、より簡便な方法で *A. leei* の同定・確認ができることが望まれる。また、分布域を明らかにできれば *A. leei* の潜在的な発生リスクを把握できる。今年度は昨年度手法を確立した LAMP 法の現場実証および定量 PCR 法の確立を実施した。

#### 2-1 分子同定手法 LAMP 法による *Alexandrium leei* 検出法の現場実証

本課題にて別の有害渦鞭毛藻類 *K. digitata* のモニタリング海域である広島県東部海域を中心として以下の海洋観測および LAMP 法の現場実証試験を行った。

## 2-1- ① 広島県東部海域（備後灘）（2021 年 1～12 月，月 1 回）

*Alexandrium leei* の出現報告が過去にないものの *Alexandrium* 属が毎年出現する広島県福山市沿岸に位置する田島港および田尻港の 2 定点(図 1b)において月 1 回の海洋調査を実施し、本海域に *A. leei* が出現するのか、また出現する場合の周年の出現動態を調べた。海洋観測の方法は 1- ①に同じ。採水した試水は検鏡（試水 1 mL）および LAMP 法（試水 500 mL）を *A. leei* の検出に用いた。また、LAMP 法を用いた *A. leei* の検出を以下の手順で実施した。各点、各層の試水 500 mL を目合い 3  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター上にろ過した。このフィルターを 5% Chelex 入りリン酸緩衝液中で加熱抽出し、得られた DNA 粗抽出液を *A. leei* の rDNA LSU を標的配列として検出する LAMP 法（坂本ら 2020）で分析した。

## 2-1- ② 瀬戸内海中央部～東部（2021 年 4 月）

過去に高知県野見湾で赤潮発生により漁業被害報告がある 4 月に瀬戸内海中央部から東部（図 1d）にかけて広域調査を行い、春季における *A. leei* の水平分布を調べた。海洋観測の方法は 1- ③に同じ。LAMP 法による *A. leei* の検出は前述の方法に従って実施した。本報告書内では分析が終わっている表層（水深 0 m）のデータのみを示す。

## 2-1- ③ 瀬戸内海西部～中央部（2021 年 10 月）

秋季の *A. leei* の水平分布を調べるため、瀬戸内海西部から中央部（図 1e）にかけて広域調査を行った。海洋観測の方法は 1- ④に同じ。LAMP 法による *A. leei* の検出は前述の方法に従って実施した。本報告書内では分析が終わっている表層（水深 0 m）のデータのみを示す。

## 2-2 定量 PCR 法による *Alexandrium leei* 定量法の確立

*Alexandrium leei* の定量的な動態を把握するため、本種の種特異的 DNA 配列を標的とした定量 PCR による検出系を検討した。プライマーおよび TaqMan-MGB プローブ（Thermo Fisher Science）の設計は高知県野見湾より得られた培養株（AL\_KOCHI 株）の rDNA LUS D1-D2 配列を基に、プライマー設計ソフト Primer Express ver. 3.0 を用いて設計した。また、AL\_KOCHI 株の DNA 抽出液を元に真核藻類ユニバーサルプライマー D1R および D2C (Scholin et al. 1994) を用いて rDNA LSU D1-D2 領域の部分配列を増幅し、得られた PCR 産物を精製、DNA 濃度を測定して、既知濃度の定量 PCR 用標品を調製した。これを  $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^8 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$  の 8 段階の濃度に希釈して、検量線用標品とした。定量 PCR には StepOnePlus (Thermo Fisher Science) と TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Science) を用い、通常のプロトコルに従い反応液を調製した。PCR 反応は先に 1-1-①で記載した方法に従い分析した。2, 10, 100, 1000 cells の *A. leei* 細胞（AL\_KOCHI 株）を 200  $\mu\text{L}$  の 5% Chelex を添加した 0.1M リン酸緩衝液（5% Chelex PBS）で加熱抽出した DNA 粗抽出液（n=3）を定量し、得られた標的 DNA コピー濃度から 1 細胞あたりの標的 DNA コピー濃度を算出した。また、2 cells  $200 \mu\text{L}^{-1}$  の DNA 粗抽出液を段階希釈した試料を定量分析し、検出限界を推定した。さらに、*A. leei* (20AL Koc A1 株：高知県野見湾より分離)，および他種 *Alexandrium* 属培養株 5 種 (*A. tamiyavanichii*, *A. catenella*, *A. ostenferdii*, *A. fraterculus*, *A. pacificum*) の各 1000 cells を 200  $\mu\text{L}$  の 5% Chelex PBS で抽出した DNA 粗抽出液を定量分析し、作製した定量 PCR の反応の種特異性を確認した。



### (3) 結果及び考察

#### 1) 新奇有害プランクトンに関する情報収集（水産技術研，広島大）

##### 1-1 定量 PCR 法による *K. digitata* の出現動態の把握

##### 1-1- ① 広島県東部海域（備後灘）（2021 年 1～12 月，月 1 回）

2021 年 1～12 月の調査期間中，光学顕微鏡下での試水 1 mL 検鏡によって *K. digitata* 細胞が最大 1 cells mL<sup>-1</sup> 見つかった（9 月，田島港）。定量 PCR 法によって得られた試水 500 mL 中の本種細胞密度を 1 L 中に換算した結果を図 2 に示した。2021 年 1～8 月までは両定点で本種は検出されなかった。9 月は田島港のみ，10～12 月は両点ともに *K. digitata* が検出された。9～12 月の *K. digitata* の細胞密度は田島港で 0.1～434.0 cells L<sup>-1</sup>，田尻港で 0.2～29.1 cells L<sup>-1</sup> と昨年度最大細胞密度 12.5 cells L<sup>-1</sup> と比べると多いものの，検鏡で捉えられる 1,000 cells L<sup>-1</sup> を下回るほどに低密度であった。例年の傾向どおり，田島港の方が田尻港よりも細胞密度が高く，また田島港では 9 月から検出され 10 月に最大値を迎えた一方で，田尻港では 10 月から検出され，11 月に最大値を記録した。特定の水深への局在は確認できなかった。2018，2019 年には LAMP 法によって *K. digitata* が検出された初夏（6～7 月）には本年は検出されなかった。

定量 PCR 法による *K. digitata* が検出された期間の水温は 12.0～27.2℃，塩分は 23.0～31.4 であった（図 3）。溶存無機態栄養塩濃度はそれぞれ DIN が 0.4～18.2 μM，PO<sub>4</sub>-P が検出限界（<0.06）以下～1.4 μM，SiO<sub>2</sub>-Si が検出限界以下～106.0 μM であった。本事業で実施した 2018～2020 年のモニタリング結果と合わせると，*K. digitata* の出現水温は 11.4～27.2℃，塩分は 23.0～32.0 であった。本海域においてこれまで赤潮の形成と漁業被害が報告されているのは 10～11 月であり（Yang et al. 2000，岩野 2017），2018～2020 年もこの時期に本種が検出されていることから，1 年の中でも栄養塩が豊富な時期に増殖しやすい可能性が示唆された。

##### 1-1- ② 瀬戸内海西部海域（広島湾）（2019 年 1 月，2020 年 2 月）※分析は 2021 年度実施

光学顕微鏡下での試水 1 mL 検鏡では全試料で *K. digitata* を確認できなかった。定量 PCR 法では各調査日で 2 定点ずつ，2019 年 1 月調査時には HB2 の水深 0 m で 1.2 cell L<sup>-1</sup>，HB4-2 の水深 5 m で 8.9 cells L<sup>-1</sup>，2020 年 2 月調査時には HB2 の水深 5 m で 0.5 cell L<sup>-1</sup>，HB7 の水深 0 m で 7.6 cells L<sup>-1</sup> と低密度ながら *K. digitata* が検出された（図 4）。水温は 2019 年 1 月で 13.0～13.9℃，2020 年 2 月は 12.8～13.0℃と，広島湾においては低水温下でも *K. digitata* が栄養細胞の状態で生残し，表層～水深 5 m 層に極低密度で出現することが明らかになった。塩分は 2019 年 1 月で 31.5～32.6，2020 年 2 月で 32.2～32.6 であった。過去に赤潮発生記録がある広島県東部海域や山口県油谷湾は河川からの距離が近く，また両年ともに *K. digitata* が検出された HB2 は湾奥に位置し最も河川（太田川）から近いことから *K. digitata* が河川の影響を受けている可能性もあるが，一方で最大値を示した HB7 は最も沖合に位置したことから，河川との距離と *K. digitata* の分布には明確な特徴が得られなかった。

##### 1-1- ③，④ 瀬戸内海広域調査（2021 年 4，10 月）

両航海において光学顕微鏡下での試水 1 mL 検鏡では全点で *K. digitata* を確認できなかった。定量 PCR 法による *K. digitata* の検出では，2021 年 4 月の調査では全定点で非検出であった一方で 10 月は全定点で検出された。2021 年 10 月の調査における試水 500 mL 中の本種細

胞密度を 1 L 中に換算した結果を図 5 に示した。2021 年 10 月調査では *K. digitata* の水深 0 m の細胞密度は 0.1~192.7 cells L<sup>-1</sup> であった。細胞密度が 50 cells L<sup>-1</sup> を超えたのは、安芸灘中央部から東部、備後灘、燧灘および備讃瀬戸西部で、広島湾および安芸灘西部では低密度であった。10 月に採水した表層水の水温は 20.9~23.1 °C、塩分は 29.6~31.9 であった。10 月の調査海域の東西で環境の違いに明確な傾向はなく、*K. digitata* 細胞密度の勾配を引き起こした環境要因は明らかにはならなかった。ただし昨年度 10 月に調査した瀬戸内海中央部から東部にかけた調査結果と合わせると、*K. digitata* は広島県東部海域で高頻度に出現する秋季において、瀬戸内海の他海域（広島湾、安芸灘、備後・燧灘、備讃瀬戸、播磨灘、大阪湾）においても同様に出現していることが明らかになった。

## 1-2 消失時期の生残戦略の把握（シスト形成の有無の検討）

LAMP 法と定量 PCR 法いずれの手法でも全 8 試料（9~12 月、田島港と田尻港（図 1b））すべてで非検出となった。ただし各試料 3 連で供した定量 PCR 法においては 11 月田島港の底泥試料で 3 連の内、1 本のみ極低密度で検出されており（0.1 cell wet-sediment-g<sup>-1</sup>）、今後は 1~8 月の底泥の分析も含めた更なる検討が求められる。また全試料で非検出となったものの、十分な量の DNA 量が抽出されていることや、これらの港で確実に検出されるであろうラフィド藻類 *Chattonella* 属の DNA が検出されるかを確認することで、DNA 抽出手法に問題がなく、遺伝子増幅を阻害する物質が含まれていないことを確かめる必要がある。

以上の調査結果から、*K. digitata* の発生時期が主に秋季から冬季であること、秋季には瀬戸内海のかかなり広域で分布が認められる一方で春季には瀬戸内海中央部から東部にかけた消失すること、広島湾においては冬季にも栄養細胞として生残することが明らかとなった。また消失時期の生残戦略については更なる検討の余地があるものの、水温が低い冬季にも表層~5 m 層で *K. digitata* が検出されたことから、栄養細胞として極低密度で海水中に生残し越冬する可能性が示唆された。*K. digitata* の大規模発生につながる環境要因については依然として今後の課題としてさらなる調査が必要である。

## 2) 渦鞭毛藻類 *Alexandrium leei* の簡易分子同定手法の検討（水産技術研、広島大）

### 2-1 分子同定手法 LAMP 法による *A. leei* 検出法の現場実証

#### 2-1- ① 広島県東部海域（備後灘）（2021 年 1~12 月、月 1 回）

2021 年 1~12 月の調査期間中、光学顕微鏡下での試水 1 mL 検鏡では *A. leei* を確認できなかった。LAMP 法による *A. leei* の検出結果を表 1 にまとめた。*A. leei* が検出されたのは、2 月の田島港水深 3 m、5 m、B-1(8) m、8 月の田尻港 1 m、11 月の田島港 5、B-1(8) m と田尻港の 1 m、12 月の田島港全層であった。8 月の結果の除くと、本海域において *A. leei* は晩秋から冬季にかけて田島港を中心に出現することが明らかになった。本海域における *A. leei* の検出はこれが初報告である。ただし検鏡で *A. leei* の細胞は見つからなかったものの、1、11、12 月では同じ属の *A. pacificum* と思われる細胞が最大 3 cells mL<sup>-1</sup> で見つかった。*A. pacificum* と *A. leei* の増殖に好適な環境が類似しているかどうかは明らかではないが、これまでも *A. pacificum* 等ほかの *Alexandrium* 属細胞に紛れて本種が出現していた可能性はある。*A. leei* が出現した時期の水温は 9.6~26.1°C、塩分は 26.6~32.7、DIN は 0.42~37.2 μM、PO<sub>4</sub>-P は検出限界（<0.06）

以下～2.7  $\mu\text{M}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Si}$  は検出限界以下～104.7  $\mu\text{M}$  であった。

## 2-1- ②, ③ 瀬戸内海広域調査 (2021 年 4, 10 月)

両航海において光学顕微鏡下での試水 1 mL 検鏡では全点で *A. leei* を確認できなかった。LAMP 法による *A. leei* の検出では (水深 0 m のみ分析済み), 2021 年 4 月には 1 定点でのみ検出, 10 月の調査では全定点で非検出であった。4 月に *A. leei* が検出された OY1 (岡山県児島湾口) の表層の水温は 13.9°C, 塩分は 31.7, DIN は 1.9  $\mu\text{M}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$  は 0.1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Si}$  は 7.3  $\mu\text{M}$  であった。過去に赤潮化が報告されている 4 月には岡山県沿岸でも *A. leei* が出現することが明らかになった。

以上の調査結果から, *A. leei* の発生時期が広島県東部海域では主に晩秋から冬季であること, 春季 (4 月) には岡山県沿岸で *A. leei* が出現することが明らかとなった。水温 9.6～26.1°C は, 塩分 26.6～32.7 において *A. leei* は出現した。新しく確立した *A. leei* の LAMP 法によって *A. leei* の出現動態の一部が明らかになった。広島県東部海域で *A. leei* が高頻度で出現した冬季の広域分布や, 大規模発生につながる環境要因については今後の課題とし, 定量的なモニタリングによって今後明らかにしたい。

## 2-2 定量 PCR 法による *Alexandrium leei* 定量法の確立

*Alexandrium leei* の種特異的配列が含まれる rDNA LSU D1 配列上に, 以下配列のプライマーおよびプローブを設計した: プライマー Aleei-MGB-F: 5'-CAGGTGCAAGCCTATTGAAAGA-3', Aleei-MGB-R: 5'-TGGAAGATTACAGTTGGCAAAAG-3', プローブ Aleei-LSU-MGBP: 5'-TGCCATTGTGGGTGAC-3'。プローブは配列の 3'側に FAM 蛍光色素, 5'側に短い配列で高い  $T_m$  値が得られる MGB クエンチャーを付加した。なお, *A. leei* には発生海域により rDNA 配列の一部が異なる 2 つの系群が存在することが報告されている (Shikata et al. 2020) が, 今回設計したプライマーとプローブは両系群に共通した配列上に設計されており, 2 つの系群を分けて検出することはできない。両系群を分けて検出する必要がある場合にはそれぞれの系群特異的な配列上にプライマーを設計する必要がある。

作製したプライマーとプローブを用いて検量線作成用標品の希釈系列サンプルを分析した結果, 図 6 に示す検量線を得た。次に, 既知細胞数 *A. leei* の DNA 抽出液を分析した結果, 1 細胞あたりの標的 DNA コピー数は 44,502～60,323 copies cell<sup>-1</sup> となった。得られた値の平均値から細胞当たりの推定コピー数は約 52,000 copies cell<sup>-1</sup> と算出された。また, 段階希釈した DNA 抽出液 0.2～0.0002 cells 200  $\mu\text{L}^{-1}$  相当の試料の分析結果から, 検出限界は 0.02 cells 200  $\mu\text{L}^{-1}$  相当 (1 細胞を 10 mL の溶媒で抽出した場合に相当) までは確実に定量検出できることを確認した (表 2)。以上の結果から, 定量 PCR により *A. leei* を好感度に検出が可能な定量分析方法が確立した。

一方, PCR が 36 サイクルを超えてから *Alexandrium ostenferdii* の 1,000 cells 200  $\mu\text{L}^{-1}$  抽出液の分析の一部で非特異的な反応がみられた (表 3)。PCR では反応サイクル数が多くなると非特異的な反応が発生しやすくなることが知られており, 通常 DNA の増幅反応では反応サイクル数の設定を 30～35 サイクルとすることが一般的であることから, 36 サイクル以内で反応が見られたもののみを陽性とすることでこの問題を回避できると考えられる。あるいはア

ニーリング・伸長反応温度をわずかに高くすることにより非特異的反応が発生しにくくなると推測される。この点については次年度の検討課題としたい。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、広域調査での海洋観測にご協力いただいた水産研究・教育機構漁業調査船「こたか丸」および広島大学生物生産学部練習船「豊潮丸」の乗組員の皆様、広島湾での採水調査にご協力いただいた県立広島大学・内藤佳奈子氏に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 岩野英樹. 2014 年夏季に周防灘大分県海域で確認された有害渦鞭毛藻 *Karenia digitata* の出現時の環境特性と魚貝類への影響. 大分県農林水検セ研報（水産）2017 ; **6**: 67-78.
- 坂本節子, 外丸裕司, 小池一彦. 3) 有害赤潮プランクトンのモニタリング技術の開発・実証および普及とデータ利活用の促進 ① モニタリング技術の開発・実証, 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. 2019 ; 317-325.
- 坂本節子, 外丸裕司, 小池一彦. 3) 有害赤潮プランクトンのモニタリング技術の開発・実証および普及とデータ利活用の促進 ① モニタリング技術の開発・実証, 平成 31 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. 2020 ; 355-365.
- 坂本節子, 外丸裕司, 小原静夏, 小池一彦. 3) 有害赤潮プランクトンのモニタリング技術の開発・実証および普及とデータ利活用の促進 ① モニタリング技術の開発・実証, 令和 2 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. 2021 ; 316-327.
- Schlitzer, R. Ocean Data View. 2018: <https://odv.awi.de>.
- Shikata T, Taniguchi E, Sakamoto S, Kitatsuji S, Yamasaki Y, Yoshida M, Oikawa H. Phylogeny, growth and toxicity of the noxious red-tide dinoflagellate *Alexandrium leei* in Japan. Regional Studies in Marine Science, 2020; **36**: 101265.
- Yang ZB, Takayama H, Matsuoka K, Hodgkiss IJ. *Karenia digitata* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new harmful algal bloom species from coastal waters of west Japan and Hong Kong. *Phycologia*, 2000; **39**: 463-470.



表 1. 2021 年 1～12 月の広島県東部海域（備後灘）における定点別・水深別の LAMP 法による *Alexandrium leei* の検出の有無（検出は＋，非検出は空欄）.

|        | 1月 | 2月 | 3月 | 4月 | 5月 | 6月 | 7月 | 8月 | 9月 | 10月 | 11月 | 12月 |
|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| 田島港 1m |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     | ＋   |
| 3m     |    | ＋  |    |    |    |    |    |    |    |     |     | ＋   |
| 5m     |    | ＋  |    |    |    |    |    |    |    |     | ＋   | ＋   |
| B-1m   |    | ＋  |    |    |    |    |    |    |    |     | ＋   | ＋   |
| 田尻港 1m |    |    |    |    |    |    |    | ＋  |    |     | ＋   |     |
| 3m     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |

表 2. *Alexandrium leei* 抽出液濃度と定量 PCR で検出された標的遺伝子のコピー数

| 種名                      | 株名       | 抽出液濃度<br>cells 200 $\mu$ L <sup>-1</sup> | 平均<br>copies $\mu$ L <sup>-1</sup> | 標準偏差<br>copies $\mu$ L <sup>-1</sup> | 細胞当たりの DNA<br>濃度 copies cells <sup>-1</sup> |
|-------------------------|----------|------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Alexandrium leei</i> | AL_Kochi | 0.0002                                   | -                                  | -                                    | -                                           |
|                         |          | 0.002                                    | 0.8*                               | -                                    | -                                           |
|                         |          | 0.02                                     | 5.6                                | 0.6                                  | -                                           |
|                         |          | 0.2                                      | 42.6                               | 17.8                                 | -                                           |
|                         |          | 2                                        | 504.0                              | 60.9                                 | 50398                                       |
|                         |          | 10                                       | 3016.1                             | 341.9                                | 60323                                       |
|                         |          | 100                                      | 22251.0                            | 1295.8                               | 44502                                       |
|                         |          | 1000                                     | 257737.5                           | 22928.6                              | 51547                                       |

\* 3 分析中 2 分析で検出 (>36 サイクル) -は非検出

表 3. *Alexandrium leei* 定量 PCR の検出の種特異性：近縁他種 *Alexandrium* 属の反応

| 種名                        | 株名            | 抽出液濃度<br>cells 200 $\mu$ L <sup>-1</sup> | 平均<br>copies $\mu$ L <sup>-1</sup> | 標準偏差<br>copies $\mu$ L <sup>-1</sup> |
|---------------------------|---------------|------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>A. leei</i>            | AL_Kochi      | 1000                                     | 257737.5                           | 22928.6                              |
|                           | 20AL Koc A1   | 1000                                     | 130130.8                           | 19781.1                              |
| <i>A. tamiyamvanichii</i> | BAT-AL1       | 1000                                     | -                                  | -                                    |
| <i>A. catenella</i>       | AL09OS        | 1000                                     | -                                  | -                                    |
| <i>A. ostenferdii</i>     | 20AO Koc mix2 | 1000                                     | 1.4*                               | -                                    |
| <i>A. fraterculus</i>     | Afra05UWA     | 1000                                     | -                                  | -                                    |
| <i>A. pacificum</i>       | AC02FU-B6     | 1000                                     | -                                  | -                                    |

\* 3 分析中 2 分析で検出 (>36 サイクル) -は非検出