

## イ. 有用水産生物に対する有害性の解明

### 【担当機関, 所属, 担当者名】

水産機構水産資源研究所：長谷川夏樹、鶴沼辰哉、渡辺剛、中川亨、黒川忠英、谷内由貴子

水産機構水産技術研究所：北辻さほ、湯浅光貴、中山奈津子、紫加田知幸、内田肇、松嶋良次、渡邊龍一、小澤真由

水産機構水産大学校：山崎康裕

道総研釧路水産試験場：石田良太郎、園木詩織、安東祐太郎、深井佑多佳

道総研栽培水産試験場：栞原康裕、安宅淳樹、坂上嶺、高橋昂大

道総研函館水産試験場：秋野秀樹、夏池真史

道総研さけます・内水面水産試験場道東センター：春日井潔、越野陽介

道総研中央水産試験場：吉村圭三、高谷義幸

北海道水産林務部水産振興課：佐々木 剛、中川工

### 【目的（全体計画）】

北海道東部太平洋海域で発生した *Karenia selliformis*（以下、*K. selliformis*）を中心とした赤潮の有用水産生物に対する有害性を解明するため、赤潮海水や培養株を活用した曝露試験を行い、毒性やへい死機構を解明するほか、漁場等で生じた生物被害の情報を収集、整理する。

### 【方法】

#### ① 赤潮海水および培養株を用いた曝露試験等による有害性評価

道東太平洋の赤潮による漁業被害や生態系への影響評価に向けて、赤潮の主体となった *K. selliformis* の培養株を用いて、被害が生じたと想定される複数の水産有用生物やモデル生物を対象とした曝露試験を実施する。また、去年の被害発生時に赤潮海水で実施した曝露試験のデータ解析も実施し、本種を主体とする赤潮による対象生物の衰弱やへい死を評価する。さらに、分画成分別や添加剤を用いた曝露試験や血球を用いた溶血活性も実施する。曝露試験にあわせて、対象生物標本を採取、薬剤や凍結による固定標本の作製を行い、組織学的な観察によって呼吸器系を中心とした組織異常等を評価や（再委託）を行う。これらにより、*K. selliformis* によるへい死等の被害発生生物の特定およびへい死機序の解明を目指す。さらに、本種による産生が疑われている海洋生物毒（ギムノジミン群、ブレベトキシン群）を対象に機器分析や神経芽細胞を用いた濃縮抽出物の毒性試験を実施し、赤潮被害における毒成分の影響評価を実施する。これらの試験・分析結果に加えて警報基準が設定されている *Karenia mikimotoi*（以下、*K. mikimotoi*）等の既知の赤潮有害プランクトンの知見との比較検証を行うことで、その有害性を総合的に評価する。

#### ② 漁場および飼育生物被害情報の収集整理および解析

道東太平洋の赤潮では、被害想定海域が広大なためその実態は十分には明らかとなっていない

ない。また、赤潮に際してへい死等が漁業現場（漁具内や飼育施設等）で確認された水産有用種以外に、直接的に観察確認が困難な深場漁場の生物やへい死によって漁獲が困難になった水産有用種等が存在するものと考えられているが、その被害実態の全容は明らかとなっていない。そこで、水中カメラを用いた漁場等の調査および取得した画像の解析によって被害実態の収集整理を行う。また、赤潮発生海域では陸上の種苗生産施設や研究飼育施設、海面養殖試験施設においても複数の魚種でへい死などの被害が報じられており、これらの被害実態についても収集整理を行う。さらに、（１）において整理収集された海域モニタリング調査および衛星クロロフィルデータ等から、各漁場海域や飼育施設において生じた赤潮について、原因プランクトンの細胞密度や発生期間の推定を行う。これら漁場および施設における被害実態と赤潮の発生情報を統合解析することで、①の曝露試験を補完し、2021 年秋の赤潮被害発生機構の解明を進めるとともに赤潮影響評価を高精度化することで、今後の赤潮発生時のリスク評価に資する。

### 【結果および考察】

#### ① 赤潮海水および培養株を用いた曝露試験等による有害性評価

##### 1. 曝露試験による有害性評価

魚類（*Oncorhynchus keta* シロサケ、*Seriola quinqueradiata* ブリ、*Oryzias latipes* var. ヒメダカ）、頭足類（*Paroctopus conispadiceus* ヤナギダコ）、腹足類（*Haliotis discus hannai* エゾアワビ、*Neptunea arthritica* ヒメエゾボラ）、二枚貝類（*Crassostrea gigas* マガキ）、ウニ類（*Strongylocentrotus intermedius* エゾバフンウニ）、十脚類（*Pandalus latirostris* ホッカイエビ、*Paralithodes brevipes* ハナサキガニ）、鰓脚類の *Artemia salina* アルテミア、*Saccharina longissima* ナガコンブの幼体（フリー配偶体から培養）、ナガコンブの一年目藻体と *Ulva australis* アナアオサの縁辺ディスクを対象とした *K. selliformis* 培養株（Ks-6、Ks-13）の曝露試験を実施した。培養株と天然赤潮海水（2021 年秋に先行研究として実施、先述の対象生物の一部に加えて *Patinopecten* (*Mizuhopecten*) *yessoensis* ホタテガイと *Apostichopus japonicus* マナマコでも実施）を用いた曝露試験の結果、魚類、頭足類、腹足類や二枚貝類では衰弱およびへい死が確認された。また、ナガコンブの幼体では部分的な白化・細胞死と残存した成長帯からの再成長、ナガコンブとアナアオサの縁辺ディスクでは白化後に完全枯死が確認され、海藻類への有害性も確認された。一方で、十脚類のホッカイエビとハナサキガニ、鰓脚類のアルテミアでは顕著なへい死の発生は確認されなかった。

影響が生じた対象生物では、衰弱率やへい死率は *K. selliformis* の細胞密度依存的に高まったが、対象生物種によって影響が生じる細胞密度水準は異なっていた。また、*K. selliformis* の培養方法や培養株と天然赤潮海水の違いに起因すると思われる有害性の相違も確認された。そこで、各生物への *K. selliformis* のリスク評価の観点から、細胞密度別にへい死率が最も高かった曝露試験結果を抽出し、プロビット曲線（累積正規分布曲線）に近似し、対象生物別に 10%、50%および 90%へい死率に相当する *K. selliformis* 細胞密度を推定し（図 1）、*K. selliformis* に対する感受性は分類群別に以下のように整理された。

- 魚類や腹足類：100 cells / mL 以上でへい死が生じはじめ、1,000 cells / mL 程度で >90%の重篤なへい死率に至る。
- 頭足類（ヤナギダコ）：2,000 cells / mL 程度でへい死が生じるとともに、へい死率が急激に高まる。
- 二枚貝類やウニ・ナマコ類：1,000 cells / mL 程度でへい死が生じはじめ、数千 cells / mL で >90%の重篤なへい死率に至る。

以上のように、分類群間で *K. selliformis* へ感受性が異なり、感受性は魚類や腹足類で高く二枚貝類やウニ・ナマコ類では低いことが明らかとなった。*K. mikimotoi*でも有害性が高い強毒株などが報告されているが（Zou *et al.*, 2010）、*K. selliformis*の有害性が確認される細胞密度水準は一般的な *K. mikimotoi*にくらべて低密度であり、*K. selliformis*は *K. mikimotoi*にくらべても総じて高い有害性を有すると判断された。また、ウニ類（図2）や腹足類では、へい死に至らなくても衰弱による一時的な付着力の喪失が確認された。このうちウニ類の生息場は、厳しい波浪条件の浅場岩礁域であり、岩礁等への付着力の喪失は打ち上げや不適な生息場への流失、体の損傷を生じさせる恐れが高い。したがって、赤潮発生時には、直接的なへい死に加え間接的な影響によるへい死が生じた可能性も推察された。このように、リスク設定においては、各生物の生息場や生態的特性にもとづく判断が不可欠である。また、曝露試験の多くは、試験上の制約から小型の稚魚や稚貝を対象としたものに限られるが、シロサケでは稚魚の成長に併せて行った試験によって、魚体サイズの増加に伴ってへい死率の上昇やへい死までの時間の短縮が確認された（図3）。このため、大型の成魚や成体では、より感受性が高い可能性や生活史段階別の感受性の変化を考慮したリスク評価が必要である。一方で、エゾアワビでは1+齢の稚貝にくらべ0+齢の稚貝のへい死率が顕著に高く（図4）、シロサケとは関係が異なっており、生物種でサイズと感受性の関係性には違いがあることも明らかとなった。

さらに、魚類のへい死は曝露開始から数十分～数時間で確認されたが、無脊椎動物では曝露数日後にへい死に至る事例も確認され、漁業被害につながる有害性の顕在化に時間の差があることが確認された。また、二枚貝類のマガキ（図5）やウニ類のエゾバフンウニ、腹足類のヒメエゾボラでは8時間曝露にくらべ24時間曝露の試験において累積の死亡率が高く、これらの生物種では *K. selliformis* に曝露された時間によっても影響が大きく異なることが明らかとなった。

## 2. 組織学的観察による有害性発生機序の解明

培養 *K. selliformis* を用いた曝露試験に供した魚類（シロサケ、ブリ ヒメダカ）の固定標本の組織学的観察を行った結果、曝露によって横臥した魚類の鰓の鰓弁に異常が共通して確認された（図6a-b）。また、横臥個体の採集直後に行った蛍光観察では、鰓表面に *K. selliformis* が確認されたが、その付着は限定的であった。天然赤潮海水を用いた曝露試験に供したエゾバフンウニの組織学的観察でも、曝露により衰弱したウニの体表（鰓同様に呼吸ガス交換を担う）の損傷が確認されたが（図6c-d）、同様に *K. selliformis* の付着は限定的であった。以上の結果から、これらの生物では *K. selliformis* の被覆等による呼吸障害では

なく、*K. selliformis* の繰り返し接触等がこれらの呼吸器系組織に損傷をもたらす衰弱やへい死に至ったことが推察された。

### 3. 曝露試験等による有害性発生機序の解明

*K. selliformis* 培養株を含む「細胞浮遊液」、細胞浮遊液をヌクレポアフィルターでろ過した「ろ液」、細胞浮遊液を一時的に凍結後融解した「凍結融解液」を調製し、ヒメダカとブリ稚魚を対象とした曝露試験を実施した結果、細胞浮遊液以外ではへい死は確認されなかった（図 7）。一方、ウサギの赤血球の溶血活性試験では、ろ液でも溶血活性が確認されたが、細胞浮遊液（100 cells/mL）よりも高い細胞密度レベルのろ液（1,000 cells/mL）での活性であった。また、10,000 cells/mL の凍結融解液で検出された細胞あたりの溶血活性は、細胞浮遊液（350 cells/mL）の活性より大きく減少していた。

ブリを対象とした曝露試験では、通常の明暗周期で培養した *K. selliformis* にくらべ、曝露直前 1 日間を暗条件で維持培養した *K. selliformis* ではへい死率が低下した。また、異なる増殖段階の細胞浮遊液（100 cells/mL に調整）を用いた輪形動物の *Branchionus plicatilis* sp. complex シオミズツボワムシに対する曝露試験では、培養日数の経過とともにワムシの生残率が低下し、対数増殖期にあたる 7 日目の生残率が最も低く、衰退期にあたる 10 日目と 15 日目の生残率は上昇した（図 8a）。

以上の結果から、魚類やワムシのへい死を生じさせる *K. selliformis* の有害因子は *K. selliformis* 細胞表面上等に存在し、*K. selliformis* 細胞が対象生物と接触または近接することで障害が生じるものと推定された。また、*K. selliformis* の増殖活性が高い状況下では有害性が高いが、増殖活性の低下に伴って有害性が低下するとともに、*K. selliformis* 細胞から遊離した状態では有害性が減少または喪失する可能性が考えられた。

一方で、増殖段階別の *K. selliformis* を用いたウサギの赤血球の溶血活性試験（350 cells/mL に調整）では、対数増殖期の 4・7 日目に加え衰退期の 15 日目でも高い溶血活性が確認された（図 8b）。衰退期の細胞浮遊液には、死滅した細胞の破片等が多量に含まれていることから、溶血活性を有する有害因子には、*K. selliformis* の増殖活性が高い状態で存在する因子に加え、衰退期の溶液中に多量に含まれる別の因子が存在している可能性がある。

以上のように、*K. selliformis* には複数の有害性発生因子が存在する可能性が推察されたが、増殖活性と連動し接触や近接によって障害をもたらす細胞上等の有害因子は、その特性から沿岸域の浅場で確認されたサケやウニなどの漁業被害を生じさせた因子である可能性がある。一方で、日高管内えりも町沖の水深数十 m 以上の深場海底では、赤潮以後にエゾボラ等のツブ類の漁業資源の減少が懸念されるとともに、2021 年秋には十勝沖水深 130 m で試験トロール網によって、埋在性の環形動物ホシムシ類やツブ類のへい死個体の大量入網が報告されている（美坂&安東, 2021）。*K. selliformis* では日周鉛直能も報告されているが（紫加田ら, 印刷中）、このような移動による数十 m を超える深場への到達は想定しにくく、衰退に伴う沈降などによる海底到達が有力な仮説の一つと考えられる。衰退期の溶液ではワムシへの有害性は低下している一方で、赤血球の溶血活性は高く他の有害因子の存在と深場生物のへい死との関連が疑われる。ただし、衰退期の *K. selliformis* による顕著な有害

性は赤血球以外では確認されておらず、被害想定生物を用いた曝露試験によるさらなる確認が必要不可欠である。

#### 4. 海洋生物毒の検討

*K. selliformis* 培養株 (Ks-6、Ks-13) および *K. mikimotoi* 培養株 (強毒株 IMR-4) を対象に (表 1)、既知の海洋生物毒のブレベトキシン群やギムノジミン群等の機器分析を行うとともに、ブレベトキシン群に特徴的なナトリウムチャネルの活性化作用を利用したマウス神経芽細胞 (Neuro-2a) の 24 時間生存率を比較する毒性試験を行った。LC/MS/MS 分析と細胞毒性試験にあたっては、脂溶性化合物のブレベトキシン群およびギムノジミン群抽出のため、培養液の凍結融解液を ODS 固相抽出カラムで脂溶性化合物を吸着、水で脱塩したのちにメタノールで溶出した。さらに、メタノール溶出液をエバポレートした残渣を 1 mL のメタノールに溶解した濃縮試料を、LC/MS/MS 分析および細胞毒性試験に供した。ブレベトキシン (Brevetoxin: Pbtx) 群およびギムノジミン (Gymnodimine: GYM) 群を含む環状イミンの定量分析は選択反応モニタリング (Selected reaction monitoring: SRM) で行った。

ニュージーランドの *K. selliformis* は環状イミンのギムノジミン群を産生することが報告されているが (Tetsuya *et al*, 1995)、2021 年秋の天然赤潮海水ならびに Ks 培養株からギムノジミン群は検出されなかった。*K. selliformis* と同属の *Karenia brevis* の産生するブレベトキシン群は魚毒性を有することが報告されているが (Kathleen *et al.*, 1994)、環状イミンと同様にすべての試料で検出限界以下であった。

Neuro-2a 細胞毒性試験では、0-50 ng/mL の Pbtx-2 の標準物質曝露では細胞毒性は認められなかったが、Ks-6 および Ks-13 の濃縮試料では著しく細胞の生存率が低下した (図 9)。一方で IMR-4 では細胞毒性は認められなかった。以上の試験により、*K. selliformis* は *K. mikimotoi* の強毒株よりも非常に強い細胞毒性を示すことが明らかになった。

機器分析および毒性試験の結果から、2021 年秋に赤潮を形成した *K. selliformis* からは既知毒は確認されなかったが、高い細胞毒性物質を産生することが示唆された。また、細胞毒性試験では、メタノール抽出物において細胞毒性が確認されたことから、溶血活性試験で確認された有害因子とは異なる物質であると推察される。

## ② 漁場および飼育生物被害情報の収集整理および解析

### 1. 沿岸域の浅場における漁業被害等の実態解明

沿岸域の浅場における 2021 年秋の赤潮動態を把握するため、本事業課題 (1) アにおいて Sentinel-3 衛星観測に基づいて推定された *Karenia* 属プランクトン細胞密度データ (2021/8/20~12/31、北方四島~むかわ沿岸岸一沖 20 km の各ライン上の平均値) および北海道が取りまとめた定点および臨時調査点における採水・検鏡調査の *Karenia* 属プランクトン細胞密度データ (2021/9/19~12/22) をもとに、市町村・月旬別の最高細胞密度を、低位 (< 10 cells / mL)、中位 (10~100 cells / mL) および高位 (> 100 cells / mL) の 3 段階に分類整理した (図 10)。衛星観測に基づく推定は、岸から 20 km の沖域までの平均値であり、各海域の沿岸部が各時期にさらされた潜在的な赤潮リスクの指標であり、一方の採

水・検鏡調査は、着色を確認した海水の細胞密度なども含まれており、海域の最大リスクを表しているものと判断した。

2021 年秋の道東海域を中心とした漁業被害情報を精査した結果、被害情報件数の多いサケ・マス類の定置網および試験養殖におけるへい死報告、漂着・潜水確認によるウニ類のへい死報告が、沿岸域の浅場漁場における被害情報として活用可能であると判断し、市町村・月旬別の報告件数の整理を行った。

衛星観測からの推定細胞数は、9 月第 2 週 (9/11～) に釧路管内厚岸町～十勝管内大樹町で 10～100 cells / mL の中位となり、9 月第 3 週 (9/18～) 以降、根室管内根室市～日高管内えりも町に拡大するとともに、採水・検鏡調査では >100 cells / mL の高位も確認された (図 11)。10 月第 3 週 (10/18～) 以降の中・高位の市町村は、十勝管内豊頃町～日高管内浦河町と南西部の海域に変化した。11 月以降も採水・検鏡調査では中・高位となる海域が散見されたが、12 月第 2 週 (12/11～) の釧路管内浜中町を最後にすべて低位となった。

サケ・マス類のへい死報告は、推定細胞密度が中位となった 9 月第 2 週の翌週の第 3 週 (9/18～) に釧路管内釧路町～十勝管内大樹町で最初に確認され、中位の海域が拡大した 9 月第 3 週の翌週の第 4 週 (9/25～) 以降に根室市～日高管内浦河町に拡大・急増した (図 11)。一方、ウニ類のへい死報告は、9 月第 3 週に釧路管内厚岸町～釧路市でサケ・マス類と同時に報告されたが、日高管内えりも町は 9 月第 3 週、新ひだか町では 9 月第 4 週にサケ・マス類よりも先にウニ類の報告が確認されてた。えりも町でのウニ類の報告は細胞密度が中位となった同一週であり、新ひだか町では低位の密度にもかかわらず、ウニ類とサケ・マス類のへい死報告があった。

以上のように、サケ・マス類やウニ類の漁業被害は、*Karenia* 細胞密度が 10～100cells / mL の中位以上に達した翌週に顕在化する傾向が確認された。赤潮被害発生海域に所在する水産機構釧路庁舎では、地先からの取水を利用して飼育されていた海産魚類やウニ類において、10  $\mu$ g Chl a / L (240 cells / mL 相当) 以上の赤潮の沿岸への接岸時に繰り返しへい死が発生したことを報告しており (Hasegawa *et al.*, 2022)、赤潮動態とへい死発生との関係性がより明瞭となっている。本課題で実施したシロサケをはじめとする魚類の曝露試験では 100 cells / mL 水準以上でへい死が生じること、エゾバフンウニではへい死は 1,000 cells / mL 水準以上で、付着力の喪失は 100 cells / mL 水準で生じたが、衛星画像から推定された中位 (10～100cells / mL) の細胞密度水準はこれらをやや下回る。ただし、衛星画像からの推定値は沿岸 20 km の平均値であり局所的には高密度なパッチが存在しており、そのようなパッチによって被害が生じた可能性や、*K. selliformis* が日周鉛直移動によって特定の水深や海底に局在・高密度化し、被害を生じさせるメカニズムも推察される。このため、根室～十勝海域の *Karenia* 細胞密度の上昇後の被害発生という解釈に矛盾はないものと判断される。一方で、えりも町や新ひだか町などの日高海域では、細胞密度の推移と被害発生傾向が根室～十勝海域とは異なっており、必ずしも細胞密度の上昇が確認されていない状況下でも被害が報告されている。2021 年の赤潮発生初期には中層域での *K. selliformis* の増

殖の可能性なども報告されており（美坂&安東, 2021、Takagi *et al.*, 2022）、日高海域の被害発生状況は、衛星画像推定や表層採水では確認されない *K. selliformis* の分布による被害発生機構などのさらなる検討が必要なことを示唆しているだろう。

## 2. 深場漁場における被害実態の解明

直接的に観察確認が困難な深場漁場の被害実態の解明に向け、2022 年 2 月に実施された「真ツブ資源量調査」（えりも漁業協同組合）および 2022 年 3 月に実施された「えりも町沖撮影調査」（えりも漁業協同組合）の調査情報の整理を進めた（図 12）。資源量調査では、漁船 8 隻による試験調査操業でのツブ類の入籠は 1 隻に留まった（例年、すべての漁船で確認される）。また、2022 年 9 月にえりも岬沖にて実施された水中ドローンによる撮影調査でも、海底撮影計 67 分中の生貝の確認が 1 個体（*Neptunea polycostata* エゾボラ）のみに限られた。同海域で 2022 年 9・10 月に実施した採泥による海底生物調査では、土壌サンプル中に珪藻類の被殻がわずかに観察されたが赤潮関連プランクトンは未確認であった。また、底生生物相は環形動物、軟体動物、節足動物が確認された。特に軟体動物は 24 種が同定され、腹足綱は 9 種類、二枚貝綱は 15 種であった。さらに堆積物食の二枚貝綱は 9 種（37.5%）に達し、餌料を沈降物に依存すると考えられる貝類が優占的であった。海底土壌サンプル（7 地点）に関しては、土粒子の密度、粒度組成、強熱減量、土壌 pH に関して分析を実施した。ツブ漁場に関する比較可能な過去のデータがないため、一部のホタテガイ漁場と比較した結果、ツブ漁場底質はシルト分と粘度分の比率が高く、最大粒径も小さいため、土壌の粒度が細かい傾向が見られた（表 2）。土壌 pH に関しては海水の pH と比較してやや低い傾向が見られたが、強熱減量は 3.8~6.0%であり赤潮プランクトンの大量沈降など異常な有機物負荷の痕跡等は確認できなかった。

このように、えりも町沖ではエゾボラをはじめとするツブ類がきわめて低調な資源量あるいは分布域の縮小状況にあることが複数の調査により明らかとなったが、採泥調査によって堆積物食の二枚貝など他のベントス種の分布は確認された。ただし、これらの生物の当該海域での本来の分布量や生活史などが不明であり、かつ底質環境に関する知見が乏しいことから、これら調査結果のみを通じた深場での赤潮影響評価は困難であった。また、本事業課題（2）アの予備実験として実施された底質サンプルのメタバーコーディングによる *K. selliformis* 遺伝子の検出においても、検出されたリード数が少ないため深場への赤潮到達の評価には至っていない（私信）。*K. selliformis* の沈降も加味した曝露試験やモデルによる沈降の検証など、さらなる検討が不可欠である。