

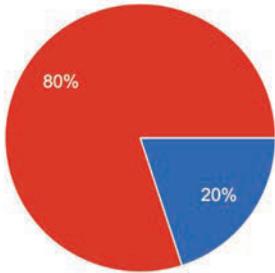
<p>4. 参考資料: 本試験で毒性検出可能な赤潮原因種と細胞密度</p> <p>ワムシ(奄美株 L型)に様々な赤潮プランクトンを曝露して、毒性の有無を調べた</p> <p>山崎ほか (2023)</p> <p><i>H. circularisquama</i>や<i>K. mikimotoi</i>は、低密度でも本法による毒性リスク評価が可能です。少なくとも今回使用した<i>Chattonella antiqua</i>属等のラフィド藻、珪藻類3種および<i>Prorocentrum</i>属の培養株は、ワムシに対して毒性を示しませんでした。</p> <p>14</p>	<p>4. 参考資料: 現場採水試料を用いたワムシ毒性試験</p> <p>八代海宇城地先で採水した<i>Heterocapsa</i> sp.を含む海水および<i>H. circularisquama</i>培養株(陽性対照区)をワムシ毒性試験に供した</p> <p>山崎ほか (2023)</p> <p>現場で採集された<i>Heterocapsa</i> sp.を本法に供試した結果、ワムシのへい死は認められませんでした。後日、今回採集された細胞が<i>H. circularisquama</i>ではなかったことがLAMP法により示されました。種同定に時間を要する場合でも、毒性リスクの有無が評価可能です。</p> <p>15</p>
<p>4. 参考資料: 現場採水試料を用いたワムシ毒性試験</p> <p>八代海楠浦湾で採水した<i>Heterocapsa</i> sp.を含む海水および<i>H. circularisquama</i>培養株(陽性対照区)をワムシ毒性試験に供した</p> <p>山崎ほか (2023)</p> <p>現場で採集された<i>Heterocapsa</i> sp.を本法に供試した結果、曝露密度が低い状況でもワムシに対する毒性が検出されました。後日、今回採集された細胞は<i>H. circularisquama</i>であったことがLAMP法により示されました。種同定に時間を要する場合でも、毒性リスクの有無が評価可能です。</p> <p>16</p>	<p>4. 参考資料: 現場採水試料を用いたワムシ毒性試験</p> <p>八代海楠浦湾で採水した<i>Chattonella antiqua</i>を含む海水をワムシ毒性試験に供した</p> <p>山崎ほか (2023)</p> <p>現場で採集された<i>Chattonella antiqua</i>を本法に供試した結果、室内実験の結果と同様にワムシに対する毒性は曝露密度に関わらず検出されませんでした。</p> <p>17</p>
<p>5. 引用文献</p> <p>安部哲文, 平山和次 (1979) <i>Gymnodinium</i> sp.のシオミズボロムシ<i>Brachionus plicatilis</i>に対する致死作用. 長崎大学水産学部研究報告 46: 1-6.</p> <p>Kashiwada S, Mochida K, Ozoe Y, Nakamura T (1995) Contribution of zooplankton to disappearance of organophosphorus insecticides in environment water. J. Pesticide Sci. 20: 503-512.</p> <p>Kim D, Sato Y, Oda T, Muramatsu T, Matsuyama Y, Honjo T (2000) Specific toxic effect of dinoflagellate <i>Heterocapsa circularisquama</i> on the rotifer <i>Brachionus plicatilis</i>. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 2719-2722.</p> <p>Oda T, Sato Y, Kim D, Muramatsu T, Matsuyama Y, Honjo T (2001) Hemolytic activity of <i>Heterocapsa circularisquama</i> (Dinophyceae) and its possible involvement in shellfish toxicity. J. Phycol. 37: 509-516.</p> <p>Zou Y, Yamasaki Y, Matsuyama Y, Yamaguchi K, Honjo T, Oda T (2010) Possible involvement of haemolytic activity in the contact-dependent lethal effects of the dinoflagellate <i>Karenia mikimotoi</i> on the rotifer <i>Brachionus plicatilis</i>. Harmful Algae 9: 367-373.</p> <p>Nishiguchi T, Cho K, Yasutomi M, Ueno M, Yamaguchi K, Basti L, Yamasaki Y, Takeshita S, Kim D, Oda T (2016) Intracellular haemolytic agents of <i>Heterocapsa circularisquama</i> exhibit toxic effects on <i>H. circularisquama</i> cells themselves and suppress both cell-mediated haemolytic activity and toxicity to rotifers (<i>Brachionus plicatilis</i>). Aquat. Toxicol. 179: 95-102.</p> <p>Cho K, Kasaka T, Ueno M, Basti L, Yamasaki Y, Kim D, Oda T (2017) Haemolytic activity and reactive oxygen species production of four harmful algal bloom species. Eur. J. Phycol. 52: 311-319.</p> <p>Kim D, Li W, Matsuyama Y, Cho K, Yamasaki Y, Takeshita S, Yamaguchi K, Oda T (2019) Extremely high level of reactive oxygen species (ROS) production in a newly isolated strain of the dinoflagellate <i>Karenia mikimotoi</i>. Eur. J. Phycol. 54: 632-640.</p> <p>Shikata T, Taniguchi E, Sakamoto S, Kitatsuji S, Yamasaki Y, Yoshida M, Okawa H (2020) Phylogeny, growth and toxicity of the noxious red-tide dinoflagellate <i>Alexandrium leei</i> in Japan. Reg. Stud. Mar. Sci. 36: 101265.</p> <p>柴田知幸, 湯浅光貴, 北辻さほ, 長谷川夏樹, 鶴沼辰哉, 山崎康裕, 西穂俊之 (2023) <i>Karenia selliformis</i>の毒性と鉛直移動特性. 水産海洋研究 山崎康裕, 龜尾研夢, 和田佳大, 北辻さほ, 湯浅光貴, 柴田知幸 (2023) シオミズボロムシに対する毒性を指標とした有害・有毒藻類の毒性リスク評価. 日本プランクトン学会報 印刷中.</p> <p>18</p>	

図 17. 赤潮の毒性リスク評価のためのワムシ毒性試験マニュアル (続き) .



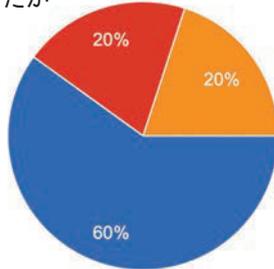
図 18. スーパーオキシド検出法の研修会の様子.

1. スーパーオキシド検出の原理を理解できたか



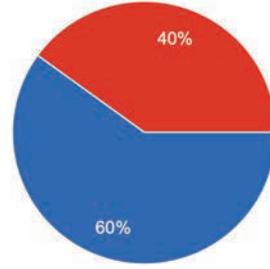
- よく理解できた
- まあまあ理解できた
- 一部理解できなかった
- 理解できなかった

2. 必要な試薬、機器、道具、試薬の調整部分は分かりやすかったか



- 分かりやすかった
- やや分かりやすかった
- 一部分かりにくかった
- 分かりにくかった

3. 事前設定、測定手順、計測部分は分かりやすかったか



- 分かりやすかった
- やや分かりやすかった
- 一部分かりにくかった
- 分かりにくかった

図 19. スーパーオキシドを指標にした魚毒性診断技術のマニュアルの原案に関するアンケート集計結果.

表 1. *Chattonella* の強毒株及び弱毒株で変異が特定された非同義置換及び同義置換の遺伝子の数.

変異の存在する培養株	非同義置換	同義置換	非同義置換/ 同義置換	全変異数
Ago03 & NIES1	2,511	6,659	0.38	9,170
Ago03 & Ago04	50,479	111,109	0.45	161,588
Ago03 & 4KGY	2,517	6,916	0.36	9,433
Ago03 のみ	37,125	94,752	0.39	131,877
Ago04 のみ	37,613	96,160	0.39	133,773
4KGY のみ	19,851	42,260	0.47	62,111
NIES-1 のみ	20,709	43,473	0.48	64,182

表 2. 八代海における魚類に対する赤潮海水の暴露試験に使用した現場赤潮海水の情報

採水日	試験区	採水地点	<i>K. mikimotoi</i> 細胞密度 (cells mL <sup>-1</sup> )	供試魚
令和4年8月10日	対照区	水俣沖	34	ブリ
令和4年8月10日	カレニア暴露区	伊唐湾	8,000	ブリ
令和4年8月10日	カレニア暴露区	御所浦島東	22,000	ブリ
令和4年8月12日	対照区	大築島西	400	マサバ
令和4年8月12日	カレニア暴露区	樋島東	2,950	マサバ
令和4年8月12日	カレニア暴露区	幣串長鼻沖	11,000	マサバ
令和4年8月12日	対照区	大築島西	420	マダイ, シマアジ
令和4年8月12日	カレニア暴露区	幣串長鼻沖	11,000	マダイ, シマアジ

表 3. スーパーオキシドを指標にした魚毒性診断技術のマニュアルの原案に関するアンケート集計結果

<b>1. スーパーオキシド検出の原理を理解できたか</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>測定原理か試薬説明時に、PBS と SOD の測定値の差でスーパーオキシド値を算出することについてのイメージ図があるとさらに理解が深まるかと思えます。</li> </ul>
<b>2. 必要な試薬、機器、道具、試薬の調整部分は分かりやすかったか</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>原理等はある程度分かったが、試薬の調整はされていたので実際に試薬を調整する時に理解できると思う。</li> </ul>
<b>3. 事前設定、測定手順、計測部分は分かりやすかったか</b>

- 数秒でも測定が遅れると、結果に大きく影響するという点はもっと強調してマニュアルに記載したほうが良いかと思いました。

**4. 参考資料に関して、欲しい情報や改善すべき点等がございましたら、記述をお願いします。**

- 使い方については取扱説明書等もある為大丈夫だと思うが、実際に測定する際に必ず行うべきことや注意していることを明記すると思う。
- 今の内容でかなり分かりやすかったですが、気付いた点などを随時加えてバージョンアップできれば、使わせて頂く側としてはありがたいです。

**5. 全体を通して、改善すべき点やご意見等ございましたら、記述をお願いします。**

- 実際に計測することで測定の仕方等理解しやすくとってもいい研修になりました。
- 研修で用いた Atto 社製のルミノメーターが一番必要としている漁業者が使用するのには、非常に高価なことと、操作がややとっつきにくいので、難しいかなと思いました。そこで、本来は食品衛生管理用の ATP 専用の測定装置ですが、キッチンマンのルミテスター（ルミノメーター、ハンディー式）は Atto 社と比べると、機能が制限されますが、比較的安価で（10万円前後）で購入できるので、本機により測定できないか検討頂け、思っていた以上に簡易に測れるので驚きました。一方で、数秒でも測定が遅れると値が大きく減少してしまったので、船上等で測定するには練習が必要だと感じました。
- マニュアル P.13「3.（4）ルミノメーターによる発光量計測」のなかで、「※⑤～⑧の工程を滞りなく実行すべき」という内容の注意書き的な記述を入れた方が親切だと思いました。（スタートを押すタイミングがずれることで発光量の積算値に違いが生じることなどを付記して）測定原理を一度理解すれば、スタートを押すタイミングを変えることはないと思いますが…。

## 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

奥村宏征, 渥美貴史, 今井絵美, 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, 加藤毅士, 石田俊朗, 柘植朝太郎, 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 4 年度計画および結果

### (1) 目的

「全体計画と同じ」

### (2) 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

今年度は、現場関係者（新潟県、佐渡市、加茂湖漁協等）の方々に、底泥散布や底泥採取作業を体験していただくなど、広く普及活動を行った。作業工程は底泥散布前日に、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 中に懸濁した。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た。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 の順番に、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。2022 年 11 月には、採泥作業においても、現場関係者の方々に普及した。現場で実施するにあたり、現実的かつ効率的な散布法や採泥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た。

## 3) 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、Next Generation Sequence (NGS)（依頼分析）を用いたメタバーコーディング解析を実施し、遺伝的多様性を評価した。用いた試料の一覧は表 1 に示した。

### (3) 結果および考察

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

2022 年 6~10 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 11 日と例年より遅く、細胞密度は約 1 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し、7 月 27 日の調査では、それぞれの地点の 6m 以深で、約  $2 \times 10^2$  cells/mL 確認された。翌日、St.6, St.2, St.7 の順で底泥散布を行った。その後、同種は減少し、以降も 10 cells/mL 以上増えることはなく、10 月末には終息した (図 2)。

リアルタイム PCR 法による HcRNAV 定量結果によると、2022 年の英虞湾および三河湾の海水からは、ほぼ検出されなかった。同点における底泥中の HcRNAV 密度は、昨年度より全体的に高めで、英虞湾では、 $2.1 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^3$  copies/g、三河湾では、 $4.8 \times 10^4 \sim 5.9 \times 10^5$  copies/g で推移した (図 3)。さらに、6~10 月までの間に、HcRNAV は 10~100 倍の増減を繰り返した。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、本底泥が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、また、密度変化が比較的大きいことから、湾内に宿主であるヘテロカプサが存在していた可能性も考えられた。底泥への蓄積は、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。次に、加茂湖の湖水では、ヘテロカプサが表層低層とも 7 月上旬から下旬にかけて最も増殖し、8 月上旬まで高い密度を維持したが、その後は減少した (図 4)。7 月 27 日の調査において、湖奥や湖央 (St.2, 6, 7) の 6 m 以深で、ヘテロカプサの増殖が認められたため、翌日 7 月 28 日に HcRNAV を含む底泥を散布した。調査日の湖水、特に 6 m 以深の湖水には、既に HcRNAV が含まれており、これと底泥散布による HcRNAV の投入がヘテロカプサの減少に繋がったと考えられる。図 4 の表層水の HcRNAV に注目すると、泥散布後の HcRNAV 密度が、3 地点とも増加しているため、底泥中の

HcRNAV がヘテロカプサ減少に寄与したことを支持した。ウイルスは感染過程で宿主の細胞内に入ると、その間検出されないため、HcRNAV 密度の把握は極めて困難である。底泥中の HcRNAV の値は、7 月上旬から 8 月上旬まで減少しており、7 月下旬に 6m 以深でのヘテロカプサの増殖が寄与したと推測される(図 5)。その後、10 月上旬までの上昇は、湖水で増えた HcRNAV の蓄積によるものと考えられる。

2022 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。2022 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 19.0 ~ 30.4 °C、塩分は 7 月中旬、8 月中・下旬の降雨の影響によって表層で低下した時期が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、10 月初旬を除き 6 mg/L 以上の溶存酸素濃度を維持した。2022 年度のヘテロカプサの密度との関係性においては、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

2022 年 7 月 27 日に実施された加茂湖の調査で、加茂湖の湖奥と湖央の低層において、ヘテロカプサの増殖が認められたため、HcRNAV を含む底泥を散布した。ヘテロカプサは、7 月 11 日に初認があつてから下旬にかけて増殖し、散布前日の細胞密度は約 200 cells/mL であったため、増殖初期に散布することができた。本年度は、特に、現場への普及活動に重点を置くことを目的とした。新潟県、佐渡市、加茂湖漁業協同組合役員など 10 名程度に集まっただき、泥の準備から散布まで体験していただいた。具体的には、凍結泥の解凍、ヘテロカプサ赤潮海水との混合、静置による HcRNAV 増殖誘導、加茂湖への散布である。2019 年にこの泥散布がスタートし、現場で簡単に散布できるよう簡略化してきた。最も簡略化した部分は、赤潮海水と底泥を混合する容器をコンテナからポリタンクにした部分である。これによって、容器を入れ替えることなく、容易に移動でき、散布も簡単になった。これらのことから、今年度は、最も簡単な方法で行うことで、現場の方々が比較的容易に実施できたと考えられる。さらに、来年度以降の底泥散布に向けて、赤潮終息後の 11 月に海底泥の採取法を現場の方々へ普及した。これに関しては、表層泥を約 3cm 採ることから、かなりの重労働であるため、簡略化することが今後の課題であると考えている。一連の工程（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) 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た。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、2021 年に、加茂湖、三河湾、英虞湾、浦ノ内湾の 4 つの海域から採取した底泥について、サブクローニングによらない手法 NGS を用いた HcRNAV の ORF2 メタバーコーディング 解析を行い、泥中の HcRNAV の多様性を評価した。三河湾、英虞湾、浦ノ内湾、加茂湖の採取時期の異なる海

底泥を解析した結果、Ura-1, Kamo-1, Kamo-2, Mikawa-2 からデータが得られた。英虞湾から得られた2サンプル、三河湾と浦ノ内湾から得られたそれぞれ1サンプルについては、PCR増幅が認められなかった(表1)。三河湾、英虞湾については、2021年にヘテロカプサは認められなかったために、また、浦ノ内湾も中学校前ではヘテロカプサが高密度にならなかったために、HcRNAVが検出されなかったと考えられる。三河湾の10月末に採取された泥からはHcRNAVは検出されたが、リード数が非常に少なかった。一方で、ヘテロカプサが高密度になった浦ノ内湾の鳴無、加茂湖からは十分量のリード数が得られた。これらのことから、底泥からHcRNAVをメタバーコーディング解析する場合、RNA抽出に用いる泥の量を増やすなど、改善が必要と考えられる。

本解析で、Ura-1, Kamo-1, Kamo-2, Mikawa-2 から得られたリード数は、それぞれ、約44,000, 47,000, 48,000, 3,800リードであり、塩基配列の類似性でクラスタリングして得られるOperational Taxonomic Unit (OTU)数は、26, 40, 16, 10であった。OTU数が低いほど類似の塩基配列が多い、すなわち、多様度が低いと考えられる。4つの試料を比較すると、加茂湖の7月の海底泥から得られた塩基配列は多様度が高く、浦ノ内湾、加茂湖の9月、三河湾の順番に低くなった。興味深いのは、加茂湖でも、7月と9月に得られた泥中の結果が異なり、ヘテロカプサ発生初期では多様度が高く、後半になると多様度が低くなる、すなわち、出現しているヘテロカプサの感染タイプによって、卓越するHcRNAVのタイプが異なることを示唆した。

表2は、それぞれのOTUの相同性の最も高いものを示した表であるが、浦ノ内湾、加茂湖、三河湾ではHcRNAVのタイプが異なることが示された。加茂湖においては、時期によって異なることが明らかとなった。三河湾から得られた配列は、相同性候補が得られなかったが、加茂湖や浦ノ内湾のものとは異なり、このことは過去のデータと一致した(Nakayama and Hamaguchi 2020)。

以上から、HcRNAVは地域や季節、年によっても異なるタイプで構成されていることが明らかとなった。そのため、海底泥散布に利用する海底泥は、土着のものが最も効果があり、効率的であると考えられる。一方で、泥からのRNA抽出を改善し、季節や海域ごとのさらなる知見の収集が必要であるだろう。

### 3 5か年のまとめ

#### 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、愛知県三河湾及び新潟県加茂湖のヘテロカプサおよびHcRNAV、環境因子の推移を5年間に渡って調査した。過去5年間において、英虞湾でほとんどヘテロカプサが出現することはなく、三河湾も2020年以降ほぼ検出されていない。しかしながら、2021年及び2022年の6~10月の両湾の海底泥におけるHcRNAV密度を見ると、10~100倍の増減が認められ、観測日や観測地点以外にヘテロカプサが存在する可能性が認められた。一方で、加茂湖では、ほぼ毎年ヘテロカプサが発生した。ヘテロカプサ発生時には、同種に感染するウイルスHcRNAVが同調的に増殖し、ヘテロカプサ終息に寄与したと考えられる。本事業課題では、前課題で構築したHcRNAVの定量PCRを、野外のサンプルに適応可能な状態に改善し、HcRNAVのモニタリングに利用した。これにより、多くの野外試料を迅速に解析することが可能になっただけでなく、室内試験においても正確な定量値を出すことで、様々な検討試験を正確に行うことができるようになった。

加茂湖におけるヘテロカプサは、2009年秋の最初のブルームで養殖牡蠣に大被害を与えた後、毎年夏に発生している。カキや貝の種苗に付着したプランクトンが、たまたま移入されるといふ報告があるが(Rosa et al. 2013)、仮にヘテロカプサが加茂湖に偶然移入されたとしても、同種による赤潮が毎年起こる要因は別にあると考える。今年度、これまでの加茂湖の環境について整理し、考察した結果を以下に示す。

地球温暖化による水温上昇のため、西日本で頻発していた赤潮プランクトンは、ここ 10 年の間に確実に拡大している。加茂湖の 10 年間の水温等環境データの間には大きな違いは認められなかったが (Nakayama et al. in press), 気象庁の報告によると、佐渡島のある日本海側では、100 年間で平均水温が 1.80°C 上昇した。この値は、全世界の平均値 (100 年間で 0.56°C 上昇) の約 2 倍にあたる。加茂湖は 4 つの河川が流入し、水路を介して外洋とつながっている。しかし、加茂湖は、湖口が狭く浅いことと、最大水深が湖口の水深よりもマイナス 6m と大きいことから、海水交換の悪い閉鎖性塩水湖となっている。さらに、水温の上昇に伴って日本海側で水位が上昇していると考えられ、加茂湖のお椀型の形状と考え合わせると、加茂湖からの外洋への水の流出が妨げられ、水交換を悪くしていると考えられる。また、加茂湖のある北緯 38 度付近は冬になると水温は 10°C 以下に低下するため、夏に赤潮を形成するプランクトンは冬には生残できないと考えられてきた。しかし、過去 100 年間の加茂湖の水温は、1~3 月が +2.45°C、4~6 月が +1.87°C、7~9 月が +0.99°C、10~12 月が +2.03°C 上昇し、10~3 月の冬季に特に水温が高くなったことを示している。このことから、加茂湖のヘテロカプサはテンポラリーリストや栄養細胞で越冬し、夏場に増殖して加茂湖に定着したと推察できる。現在では、加茂湖は年間を通じてヘテロカプサにとって生育可能な水温であり、潮流が少ない安定した水系であるため、ヘテロカプサが繁殖しやすい環境であると考えられる。

## 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

前事業課題で、ヘテロカプサ赤潮に対して、ウイルス HcRNAV を含む海底泥を散布する赤潮防除法を構築し、室内及び野外試験を経て、2016 年には現場実証試験を実施した。その結果、底泥散布によりヘテロカプサの密度が減少することを確かめた。続いて、本事業課題では、2018 年に愛知県水産試験場にて、三河湾の赤潮海水を用いて、ヘテロカプサが低密度の段階で HcRNAV を含む泥を投与すると、より効果的であることを明らかにした。これにより、2019 年度から、加茂湖に直接底泥を散布する許可がおりた。さらに、2020 年度から、現場関係者への普及を目的に、加茂湖への底泥散布を実施することとした。今年度は、新潟県や佐渡市の職員に加えて、加茂湖漁協の役員や漁業者なども参加し、底泥散布や底泥採取作業を体験していただいた (図 7)。現場の方々が利用しやすいよう、実際に体験しながら話し合い、手法の改善に努めた。翌年用いる底泥を採取する作業も、現場関係者らと行い、採取法から保存法までを普及した (図 8)。今後も加茂湖だけでなく、他の海域でも利用できるようマニュアル化を進めている。

## 3) ヘテロカプサウイルス HcRNAV の多様性に関する研究

ヘテロカプサウイルス HcRNAV の感染タイプは、大きく UA1, UA2, CY の 3 つに分けられるとされていた (Nakayama 2013)。しかし、2014 年以降、加茂湖では、感染タイプの偏りが認められた。そのため、2016 年の赤潮発生時に採取した試料を用いて、遺伝子に基づいた感染多様性解析を行ったところ、感染タイプの組成に変化が認められた。

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。その結果より、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。そこで、2021 年に、加茂湖、三河湾、英虞湾、浦ノ内湾の 4 つの海域から採取した底泥について、HcRNAV のメタバーコーディング解析を行い、泥中の HcRNAV の多様性を評価した。得られた結果を前回の解析結果と統合すると、HcRNAV タイプは、地域や、採取地点、年によって異なることが明らかになった。このことから、海底泥散布に利用する底泥は、土着のものが最も効果的かつ効率的であると考えられた。

## 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

- 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
- Nakayama N, Kitatsuji S and Hamaguchi M 2023 Current environmental status of the oyster farms on Lake Kamo in Japan; viral control of the harmful bloom of *Heterocapsa circularisquama*. *PeerJ* (in press)
- Rosa M, Holohan BA, Shumway SE, Bullard SG, Wikfors GH, Morton S, Getchis T. 2013. Biofouling ascidians on aquaculture gear as potential vectors of harmful algal Introductions. *Harmful Algae* **23**: 1-7.

表 1. HcRNAV メタバーコーディング解析に用いた試料

	採泥日	採泥場所	採泥地点	リード数	OUT数
Ago-1	2021/9/21	英虞湾	立神	—	—
Ago-2	2021/10/18	英虞湾	立神	—	—
Ura-1	2022/1/12	浦の内	鳴無	43,888	26
Ura-2	2022/1/12	浦の内	中学校前	—	—
Kamo-1	2021/7/27	加茂湖	St.2	47,232	40
Kamo-2	2021/9/7	加茂湖	St.2	48,210	16
Mikawa-1	2021/9/27	三河湾	A6	—	—
Mikawa-2	2021/10/25	三河湾	A6	3,786	10

表 2. HcRNAV メタバーコーディング解析-相同生検索結果

#OTU ID	Ura-1	Kamo-1	Kamo-2	Mikawa-2	Target	Identity	Alignment length
ASV_001	0	27983	9996	0	LC571661.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Kamoko	100	292
ASV_002	0	2732	16218	0	LC571737.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Mikawa	99.658	292
ASV_003	0	4303	8445	0	LC571681.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Mikawa	100	292
ASV_004	7579	0	0	0	LC571737.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Mikawa	100	292
ASV_005	7395	0	0	0	LC571643.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Kamoko	96.233	292
ASV_006	6377	0	0	0	LC571661.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Kamoko	99.315	292
ASV_007	4501	0	0	0	LC571737.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Mikawa	99.658	292
ASV_008	3981	0	0	0	LC571737.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Mikawa	93.493	292
ASV_009	0	0	3559	0	LC571661.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Kamoko	99.658	292
ASV_010	2922	0	0	0	LC571737.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Mikawa	99.658	292
ASV_011	2912	0	0	0	LC571737.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Mikawa	93.493	292
ASV_012	0	0	2171	0	LC571681.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Mikawa	97.945	292
ASV_013	0	1340	800	0	LC571661.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Kamoko	99.658	292
ASV_014	0	0	1979	0	LC571661.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Kamoko	99.658	292
ASV_015	0	0	0	1964	Nohit		
ASV_016	0	0	1930	0	LC571661.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Kamoko	99.658	292
ASV_017	0	0	1541	0	LC571737.1_Heterocapsa_circularisquama_RNA_virus_01_enHcRNAV_2018Mikawa	99.315	292

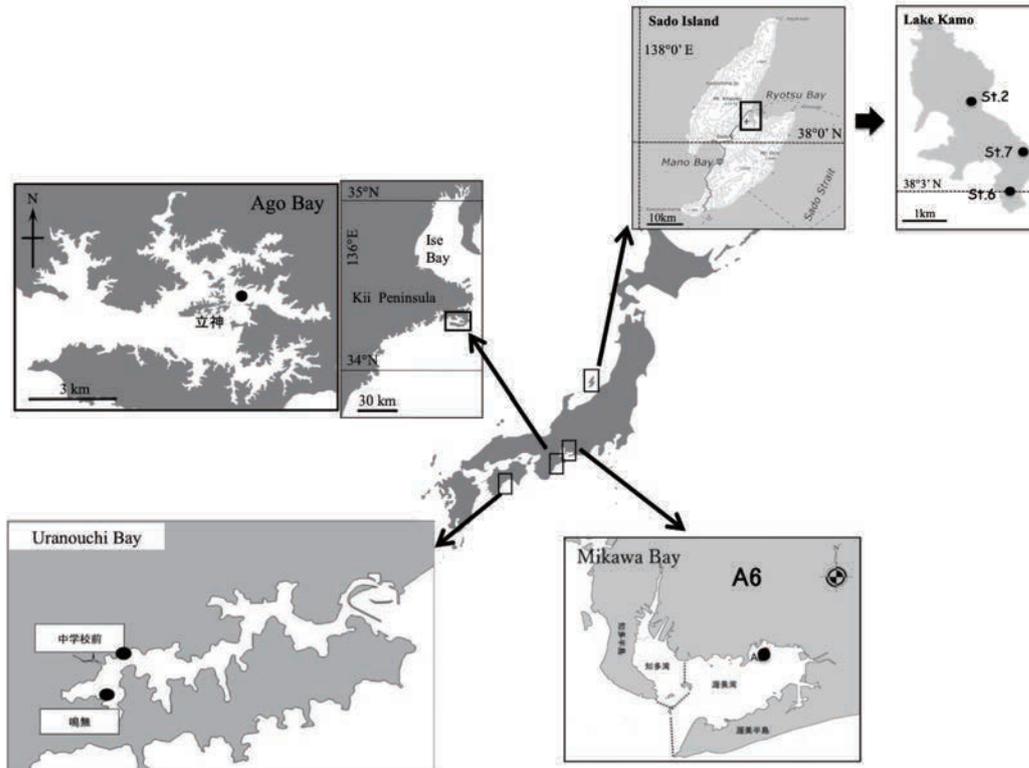


図 1. 試料採取および試験実施地点  
 三重県英虞湾立神定点 (左上)  
 新潟県佐渡市加茂湖 St.2 ; 湖央, St.6 ; 湖奥, St.7 ; 工場前 (右上)  
 愛知県三河湾 ● ; A6 地点 (右下)  
 高知県浦ノ内湾 (左下)

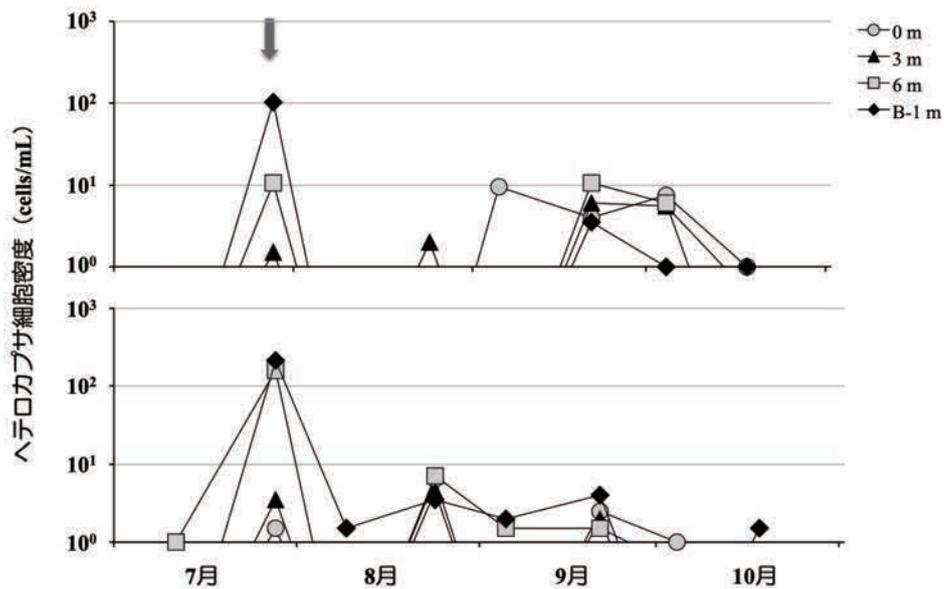


図 2. 2022 年 新潟県佐渡市加茂湖の 2 定点 (上段から, St.2 原黒, St.1 湖奥) におけるヘテロカプサの発生状況. 矢印は泥散布日

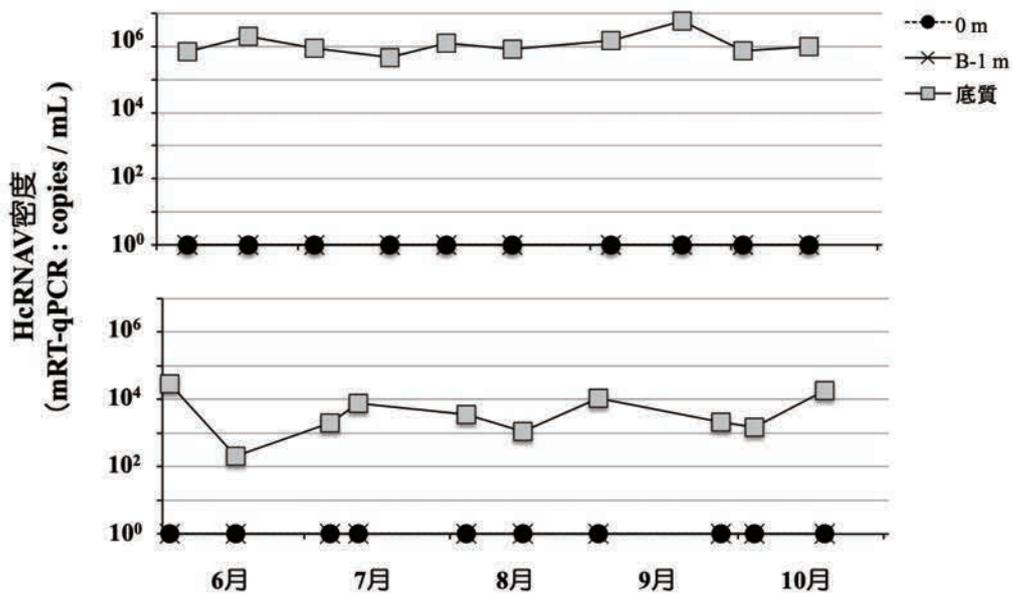


図 3. 2022 年 底質中のヘテロカプサウイルス HcRNAV の発生状況  
上段；愛知県三河湾，下段；三重県英虞湾

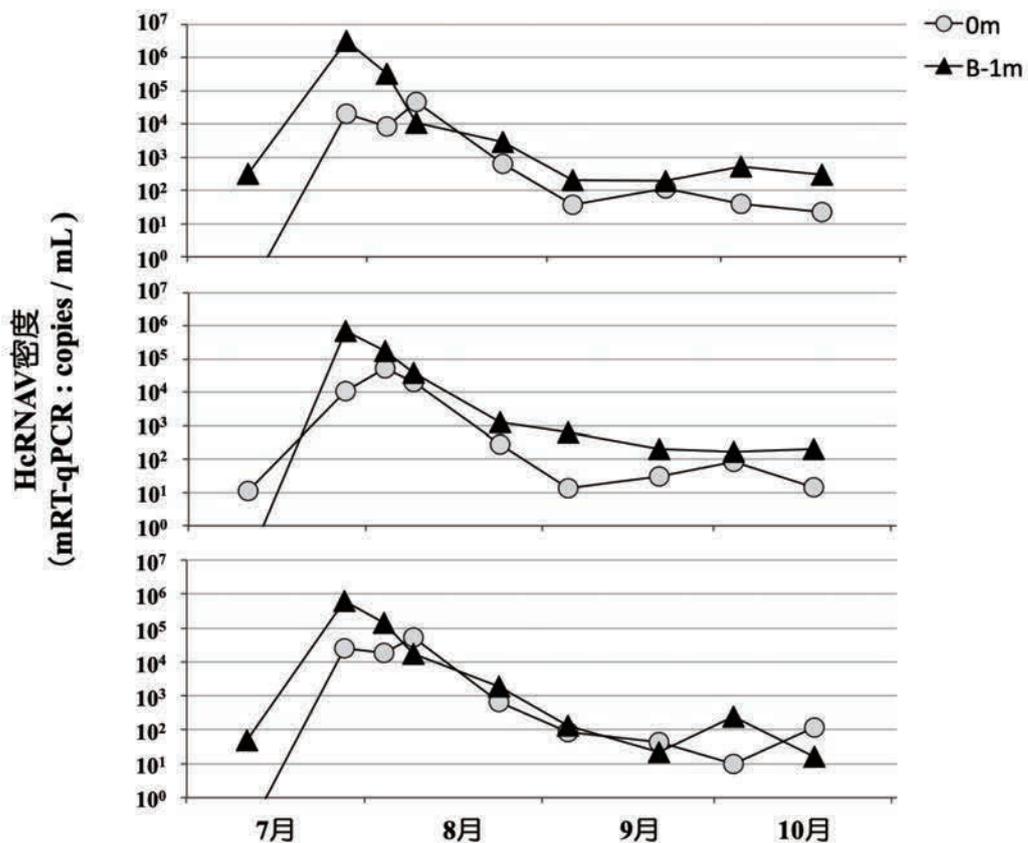


図 4. 2022 年 新潟県佐渡市加茂湖の 3 定点（上段から，St.2 原黒，St.6 湖奥，St.7 工場前）  
における湖水中のヘテロカプサウイルス HcRNAV の発生状況

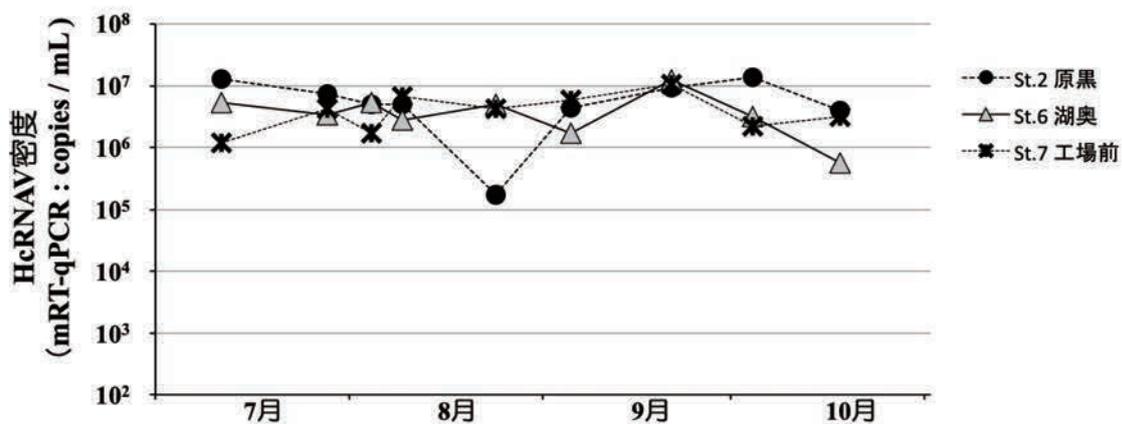


図 5. 2022 年 新潟県佐渡市加茂湖の 3 定点（上段から，St.2 原黒，St.6 湖奥，St.7 工場前）における底質中のヘテロカプサウイルス HcRNAV の発生状況

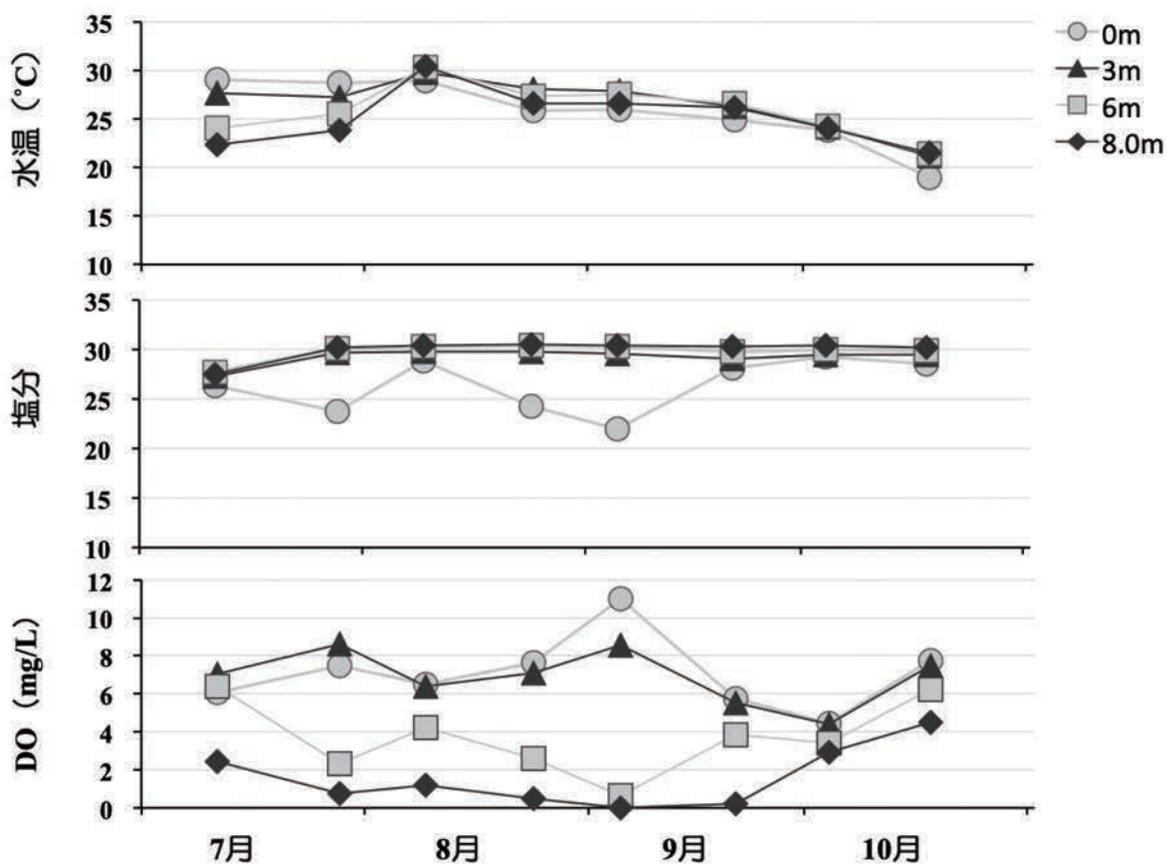


図 6. 2021 年の加茂湖原黒定点（St.2）における水温，塩分，溶存酸素量の変動