

図2 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
 (*Karentia mikimotoi* 曝露時: 2回目実験)

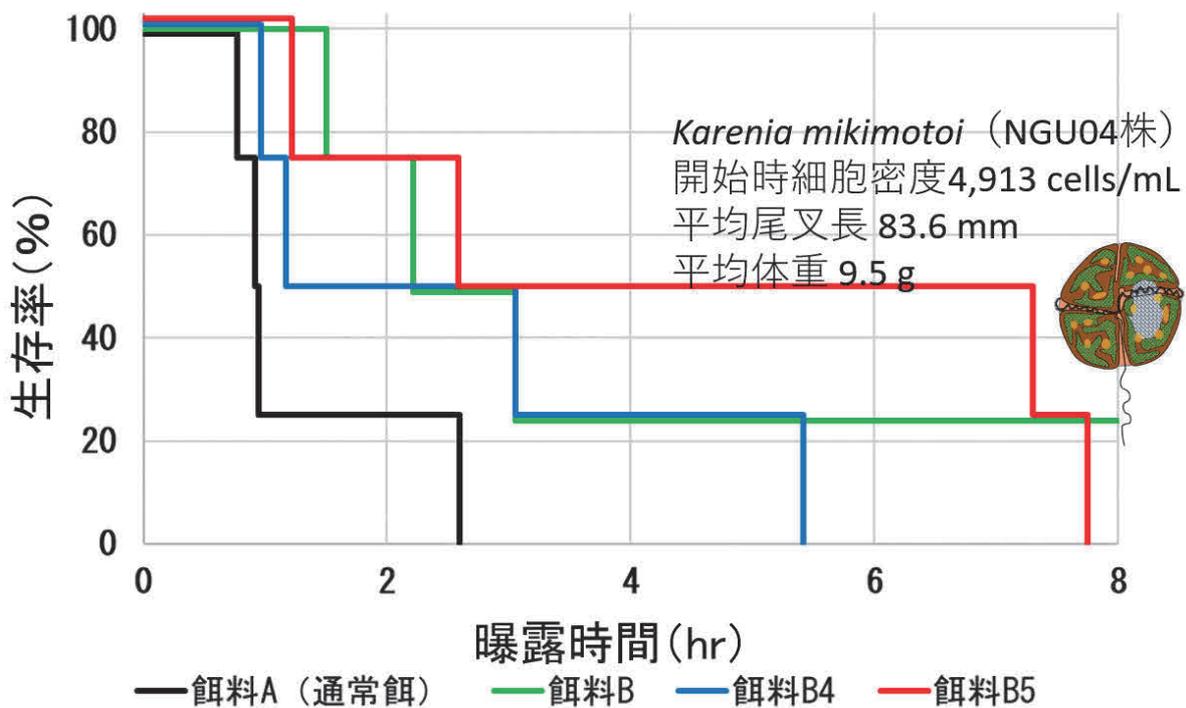


図3 異なる餌料Bの給餌(4日間)がクロホシイシモチの生存率に与える影響
 (*Karentia mikimotoi* 曝露時: 3回目実験)

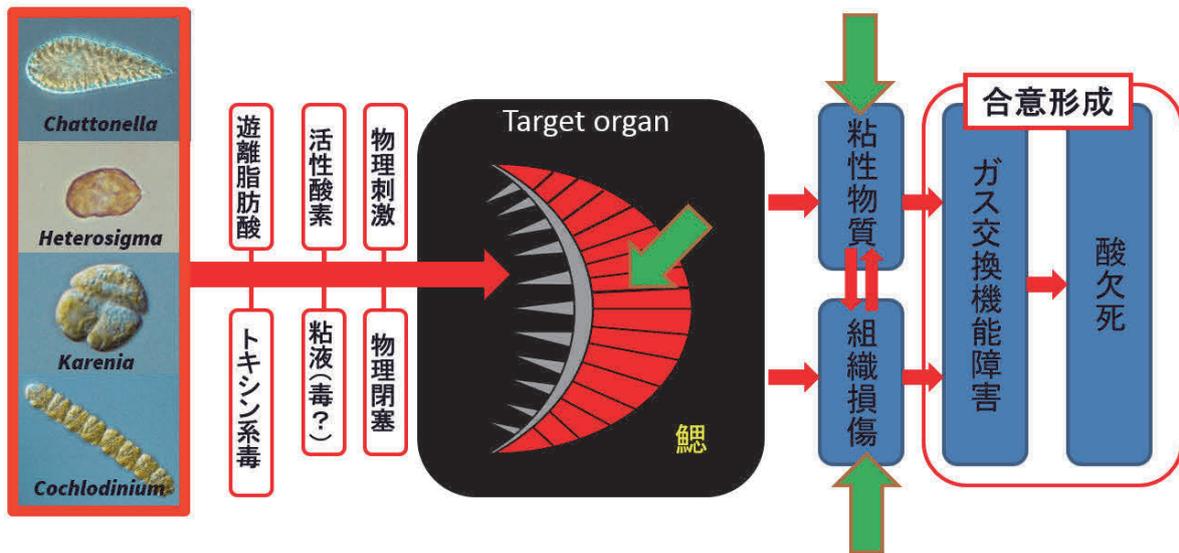


図4 赤潮プランクトンが魚類をへい死させるメカニズムの概要図
 矢印は絶食や改変餌料を投与した場合に生理学的な変化が生じる可能性のあるパスウェイを示した (Matsuyama and Oda 2020 を改変)

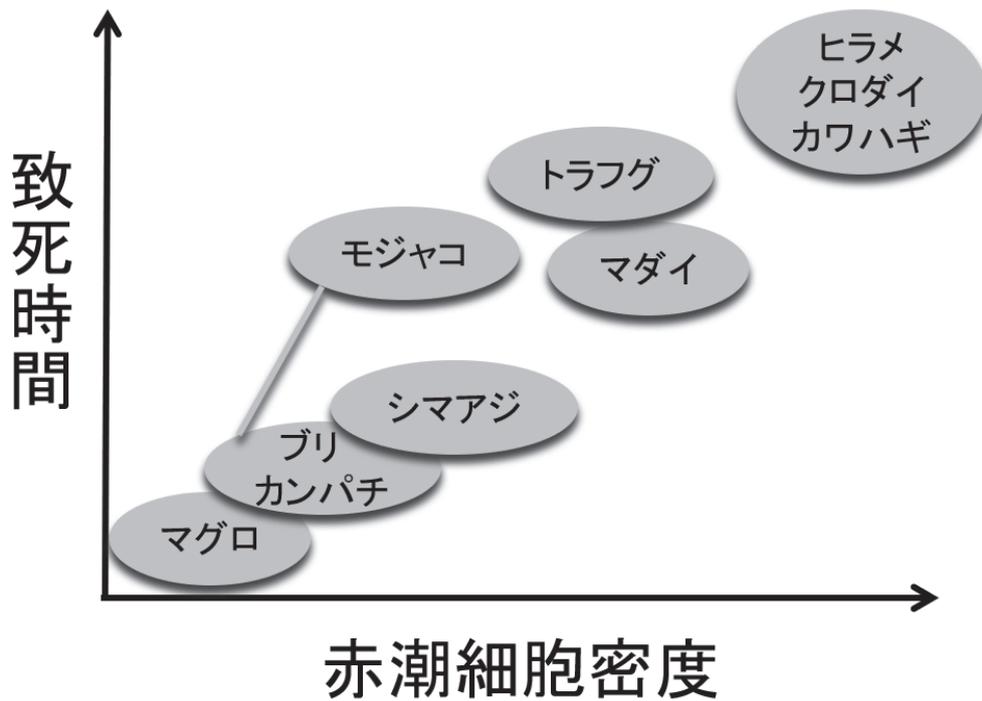


図5 赤潮プランクトンに対する魚種ごとの感受性を示した概念図
 (Matsuyama and Oda 2020 を改変)

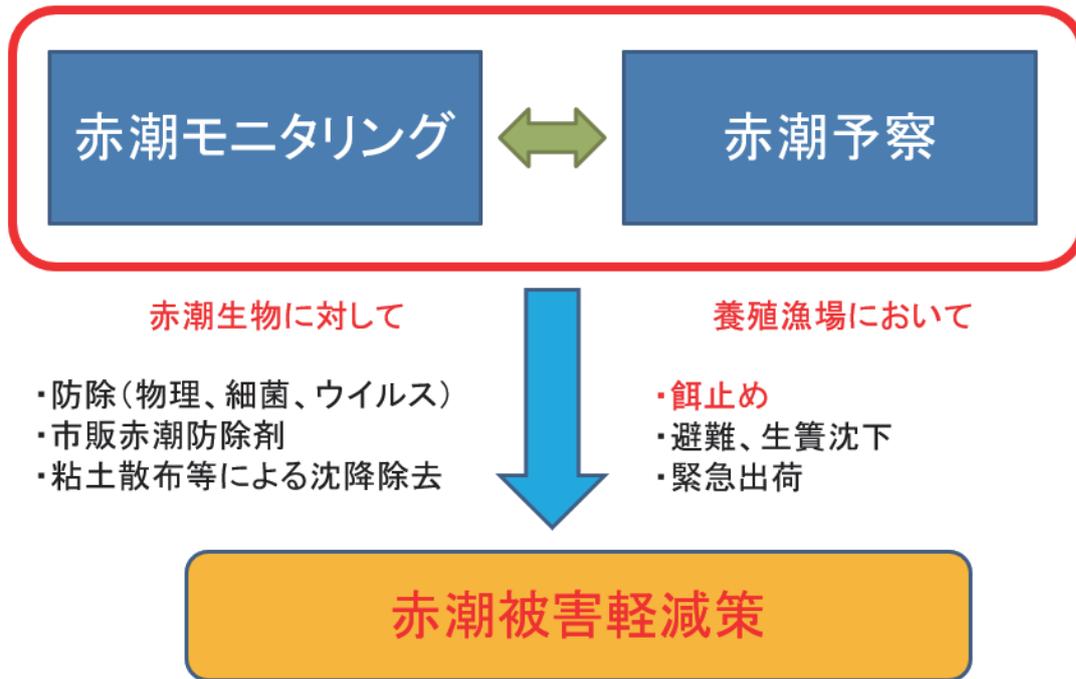


図 6 赤潮による漁業被害軽減のため取り組まれている中短期の対策

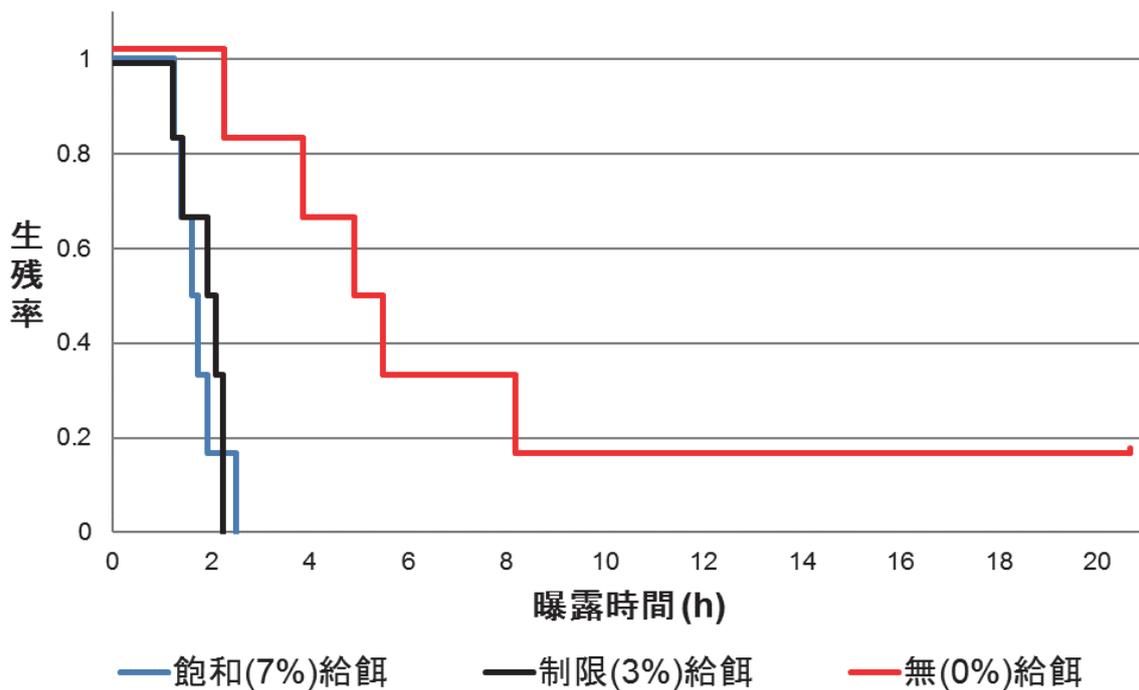


図 7 4日間の制限給餌および絶食処理後に *Chattonella antiqua* (1,900 cells/mL) へ曝露されたブリ稚魚の生存率 (Matsuyama and Oda 2020 を改変)

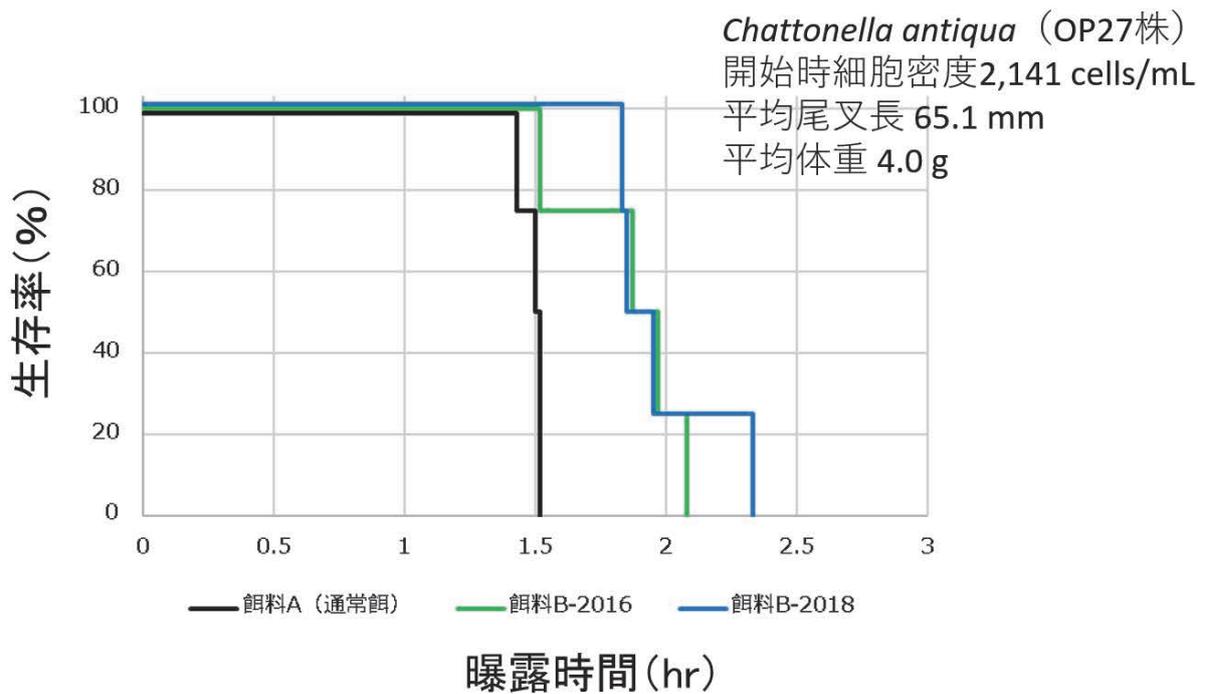


図 8 ロットが異なる餌料Bの給餌(7日間)がブリ稚魚の生存率に与える影響
 (*Chattonella antiqua* 曝露時)

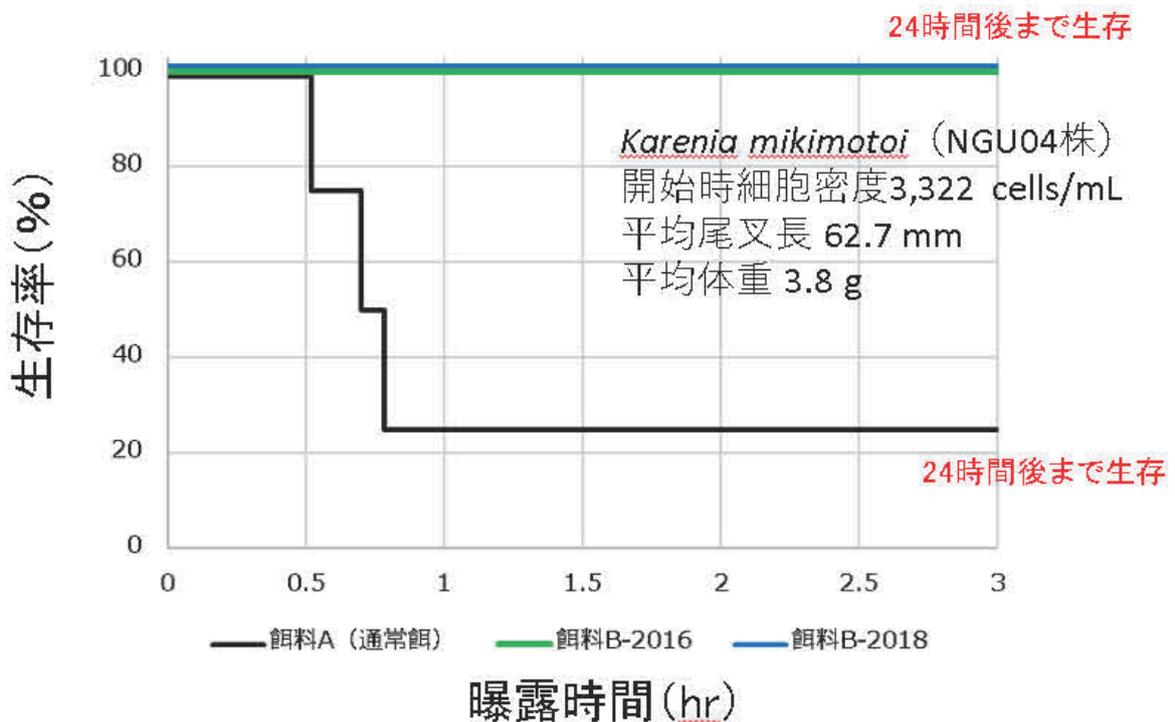


図 9 ロット異なる餌料Bの給餌(7日間)がブリ稚魚の生存率に与える影響
 (*Karenia mikimotoi* 曝露時)

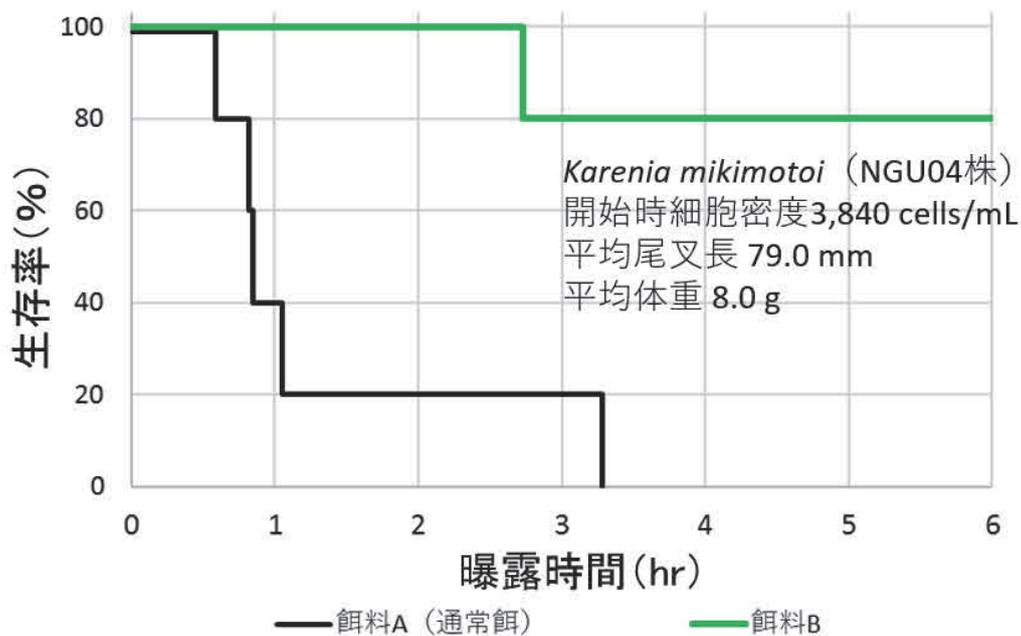
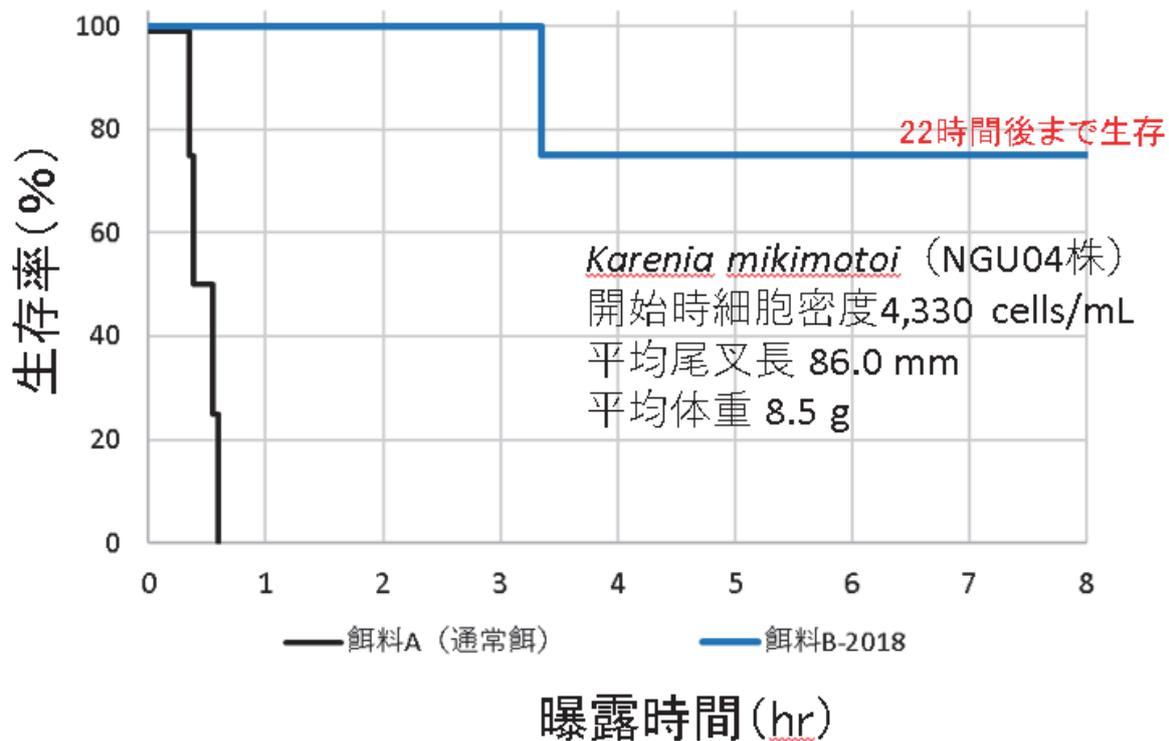


図 10 餌料Bの給餌(3日間)がブリ稚魚の生存率に与える影響
 (*Karenia mikimotoi* 曝露時)

上段：松山ら (2020) 図 4 の再掲、下段：松山ら (2019) 図 4 の再掲

表1 餌料Bの各成分を調製・給餌されたブリ稚魚の半数致死時間 (*Karenia mikimotoi* 曝露時)

餌料名	半数致死時間 (相対値)
Control (通常餌料)	100
B	>213
B1	104~303
B2	125
B3	69~115
B4	193~210
B5	145

表2 餌料Bの各成分を調製・給餌されたクロホシイシモチの半数致死時間 (*Karenia mikimotoi* 曝露時)

餌料名	半数致死時間 (相対値)
Control (通常餌料)	100
B	242
B1	—
B2	—
B3	—
B4	127
B5	282

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の情報を蓄積する。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4年度計画および結果

(1) 目的

全体計画と同じ。

(2) 方法

1) 新奇有害プランクトンの生態に関する情報収集

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 *Karenia 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 *Karenia digitata* の出現動態の把握

以下のとおり *K. digitata* を対象として瀬戸内海の複数の海域で生態に関する情報を収集した。調査は広島県東部海域 (2 定点) および広島湾 (1 定点) において月 1 回の月例調査を、4~5 月に瀬戸内海での分布を明らかにするための広域調査を実施した。以下に各調査の詳細を述べる。

1)-1-1. 広島県東部海域における月例調査 (2022 年 1~12 月)

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箱崎港および田尻港の 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: NO₃+NO₂+NH₄-N, PO₄-P, SiO₂-Si) の測定 (※8~12 月は未分析)、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 μm 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°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 μ L の 5% Chelex PBS を添加し、ベ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 Scientific) と TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 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 μ M および 0.25 μ 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' -TCTGGTCGCAGTGTCTCTCA-3', Kdi-LSU-MGBR: 5' -ACCATTTTGTTCATCGTACTTATGTCA-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 (Thermo Fisher Scientific) とした。PCR 反応はプレヒート 95°C-10 min の後、95°C -15 sec と 60°C-1 min の PCR 反応を 40 サイクルとし、60°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 PCR 増幅し、得られた PCR 産物から精製、調製した既知 DNA 濃度標品 ($2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^7$ copies μ 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⁻¹ (坂本ら 2019) を用いて算出した。なお、地図の作成には Ocean Data View を使用した (Schlitzer 2018)。

1)-1-2. 広島県西部海域における月例調査 (2022 年 1~12 月)

福山沿岸との比較対象海域として広島湾に位置する水産機構廿日市庁舎棧橋 (図 1a) において 2022 年 1~12 月まで月 1 回の海洋観測を実施した。バケツによる表層 (0 m)、およびニスキン採水器による 2 m, B-1 m からの採水をおこない、*K. digitata* の細胞数計数および定量 PCR 法を用いた高感度検出を前述の方法に従い実施した。

1)-1-3. 瀬戸内海中央部から東部にかけての広域調査 (2022 年 4 月)

Karenia digitata の出現は秋から初冬に発生が多く認められているが、日本海に面した山口県油谷湾ではまれに 4 月に確認された事例もある (坂本ら 2021)。本種の瀬戸内海広域における春季の水中での分布を明らかにするため、瀬戸内海中央部から東部にかけて調査を行い、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 2022 年 4 月 11~15 日に備後灘、燧灘、備讃瀬戸、播磨灘、大阪湾に属する図 1c に示した 16 定点にて実施した。各定点において、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-2 m 採水を行った。採水した試水は、船内で *K. digitata* の細胞数計数、および前述の方法でフィルターろ過して定量 PCR 分析試料として -20°C に保存して持ち帰った。定量 PCR 法を用いた *K. digitata* の高感度検出は前述の方法に従い実施した。

1)-1-4. 瀬戸内海西部から中央部にかけての広域調査 (2022 年 5 月)

同様に、春季の水中における *K. digitata* の水平分布を調べるため、安芸灘以西の瀬戸内海西部海域において広域調査を行った。調査は水産研究・教育機構の漁業調査船こたか丸にて 2022 年 5 月 12 日~16 日に図 1d に示した 14 定点にて調査を実施した。各定点においてバケツによる表層 (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、船内でメンブレンフィルターろ過し、フィルターを -20°C に保存して持ち帰り、定量 PCR 法を用いた *K. digitata* の高感度検出を前述の方法に従い実施した。

1)-2. 水中から消失する時期の生残戦略 (休眠孢子 (シスト) 形成の有無) の検討

本種は同じ海域で同じ季節に出現が繰り返し確認される傾向があることから、出現が認められない時期には底泥中にシストとして存在していることが推測された。しかしながら昨年度実施した調査によると、毎月 *K. digitata* が検出されている広島県福山市沿岸の田島漁港および田尻漁港の底泥試料からは *K. digitata* の DNA の検出はできなかった。そこで今年度は *K. digitata* が海水から検出さ

れない4月に福山市沖合の備後灘および瀬灘の2点で底泥を採取し、*K. digitata*のDNAが検出されるかどうかを再検討した。調査は1)-1-3の豊潮丸を用いた航海の内2点(HN25, HN7)で実施した。アシュラ柱状採泥器を用いて表面を崩さないように底泥表面0~1cmを採取し、目合10 μ mと目合125 μ mのふるいを用いて底質を分画し、粒径10~125 μ mの底質を回収し、分析まで-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。この分画した底質10gをDNA抽出精製キット(DNeasy PowerMax Soil Kit, QIAGEN)でDNA抽出と精製を行い、2定点の底泥からのDNA抽出液を得た。これを海水試料と同様に定量PCR法に供したが、このときキットによって*K. digitata*のDNAが抽出されること、さらにこの精製したDNA抽出物にPCR阻害物質が含まれていないことを確かめるため、シスト形成が知られ本海域にもシストが存在することが知られている*Chattonella marina*のDNAを簡便に検出できるキット(赤潮原因プランクトン検出キット2-シャットネラ属-, ニッポンジーン)にて、2定点から得たDNA抽出物中の*C. marina*のDNAが含まれるかを確認した。また単離培養している*K. digitata*細胞約100 cells(培養株名: Kdi Mix09-14)を2定点の底泥に加え、同様の方法でDNAを抽出・精製し、定量PCR法に供した。

1)-3. *Karenia digitata*の増殖至適環境の解析

本事業でこれまで得られた定量PCR法による*K. digitata*の出現動態と水温、塩分、栄養塩濃度などの環境データを用いて、本種が増殖に適した環境条件を解析した。

2) 野外試料を用いた*Alexandrium leei*の簡易分子同定手法の検討

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*の種同定は細胞の鏡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、分布域を明らかにすることができれば*A. leei*の潜在的な発生リスクを把握できる。本課題では、昨年度*A. leei*の定量PCR法を確立した。これにより本種の量的な把握が可能となったことから、本年度は、*A. leei*の定量PCR法を野外試料に適用して検出の検証をするとともに、本種の出現動態や瀬戸内海における分布域を調べた。

2)-1. 広島県東部海域における*A. leei*の周年出現動態(2022年1~12月)

1)-1-1の月例調査で得たDNA粗抽出液を*A. leei*の定量PCR法に供した。定量PCRにはStepOneまたはStepOnePlus(Thermo Fisher Science)とTaqMan Gene Expression Master Mix(Thermo Fisher Scientific)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 μ Mおよび0.25 μ 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: Aleei-MGB-F: 5' - CAGGTGCAAGCCTATTGAAAGA -3', Aleei-MGB-R: 5' - TGGAAGATTACAGTTGGCAAAG -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Tm値が得られるMGBクエンチャーを付加した。検量線には*A. leei*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 10¹~2 \times 10⁷ copies μ 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、昨年度に本事業で得られた*A. leei*1細胞当たりの推定コピー数52,000 copies cell⁻¹(坂本ら2022)を用いて算出した。

2)-2. 広島県西部海域における月例調査(2022年1~12月)

広島湾における*A. leei*の周年の出現動態を調べるため、1)-1-2.の調査で得られたDNA粗抽出液を*A. leei*の定量PCR法に供した。

2)-3. 瀬戸内海中央部から東部にかけての水平分布の把握 (2022年4月)

瀬戸内海における春季の *A. leei* の広域分布を調査するため、1)-1-3 において実施した豊潮丸による広域調査で得られた DNA 粗抽出液を *A. leei* の定量 PCR 法に供した。

2)-4. 瀬戸内海西部における広域調査 (2022年5月)

同様に、瀬戸内海における春季の *A. leei* の広域分布を調査するため、1)-1-4 において実施したこたか丸による広域調査で得られた DNA 粗抽出液を *A. leei* の定量 PCR 法に供した。

3) LAMP 法の普及に向けたポジティブコントロールの調製方法のマニュアル化

LAMP 法の反応に用いるポジティブコントロールの入手は、LAMP 法の普及における障害の一つとなっている。近年、長鎖の DNA 合成技術や DNA 鎖結合技術の高度化により、DNA の人工合成が可能となってきた。人工合成では、鋳型となる DNA を持ち合わせていない場合でもポジティブコントロールを合成することが可能である。そこで、鋳型となる DNA から PCR 増幅してポジティブコントロールを作製する方法も含め、*A. leei* を事例として LAMP 法に用いるポジティブコントロール調製方法について簡易マニュアルを作成した。

(3) 結果および考察

1) 新奇有害プランクトンの生態に関する情報収集

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

1)-1-1. 広島県東部海域における月例調査 (2022年1~12月)

2022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 *K. digitata* 細胞は見つからなかった。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 (9 月は未分析)。2022 年 1~8 月までは両定点で本種は検出されなかった。10~12 月は両点ともに 1 cell L^{-1} を下回る極低密度 ($0.0\sim 0.2 \text{ cells L}^{-1}$) で *K. digitata* が検出され、これは定量 PCR 法による分析を開始した 2018 年度以降、最も低密度な年であった。極密度ながら例年の傾向どおり、秋から冬にかけて *K. digitata* が検出され、他の季節には検出されなかった。2018、2019 年には LAMP 法によってのみ *K. digitata* が検出された初夏 (6~7 月) には 2020 年、2021 年と同様に本年も検出されなかった。

定量 PCR 法による *K. digitata* が低密度ながら検出された期間の水温は $11.1\sim 21.9^{\circ}\text{C}$ 、塩分は $31.5\sim 32.6$ であった。溶存無機態栄養塩濃度は 2022 年 8 月以降の調査分は未測定のため、*K. digitata* 出現時期のデータは得られなかった。

1)-1-2. 広島県西部海域における月例調査 (2022年1~12月)

2022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 *K. digitata* 細胞は確認できなかった。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 3 に示した。広島湾では 2022 年 1~10 月まで本種は検出されなかった。しかし、11 月に表層および 2 m 層で極低密度 ($14\sim 26 \text{ cells L}^{-1}$) での出現が確認された後、翌月 12 月には調査した全層で 390 cells L^{-1} を超える密度で検出された (最高細胞密度は 12 月表層の 571 cells L^{-1})。 *K. digitata* が検出された 11~12 月の水温および塩分はそれぞれ $16.9\sim 19.4^{\circ}\text{C}$ および $32.0\sim 32.6$ であった。

1)-1-3. 瀬戸内海中央部から東部にかけての広域調査 (2022年4月)

本広域調査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、昨年度実施した 2021 年 4 月の調査と同様に、全定点で非検出であった (表 1)。2021 年 4 月では表層 (水深 0 m) のみで分析したが、2022 年 4 月は水深 0, 5, B-2 m の 3 層すべてを分析し、いずれも非検出であった。

1)-1-4. 瀬戸内海西部における広域調査 (2022年5月)

瀬戸内海西部海域においても調査したすべての定点、採水層で定量 PCR による *K. digitata* は非検出であった。

以上の調査結果から、海水中の *K. digitata* は、瀬戸内海の広い範囲で春には検出されないほど ($< 1 \text{ cell } 500 \text{ mL}^{-1}$) に低密度になっているかまたは消失していること、秋に出現し春には消失するという明瞭な季節変動を持つこと、が示唆された。また、本課題で確立した定量 PCR 法を用いた *K. digitata* の高感度分析は、検鏡で確認できない細胞密度でも本種の出現状況を推定できることが確認できた。

1)-2. 水中から消失する時期の生残戦略 (休眠孢子 (シスト) 形成の有無) の検討

瀬戸内海中央部 2 定点の底泥から得た DNA 抽出液からは *Chattonella marina* の DNA が検出された (表 2)。また、2 定点で得られた底泥に *K. digitata* 細胞を加えた DNA 抽出液は、定量 PCR 法にて *K. digitata* が検出された (表 2)。これらの結果から、(1) 底泥から得た DNA 抽出液中には PCR を阻害する物質が含まれている可能性は低いこと、(2) 底泥中に *K. digitata* の細胞が含まれていれば定量 PCR 法で *K. digitata* の DNA が検出されるであろうこと、が示唆された。その上で、備後灘および燧灘 2 定点から得た底泥の DNA 抽出物を定量 PCR 法に供したが、いずれも *K. digitata* の DNA は検出されず (表 2)、*K. digitata* がシストを形成するという仮説を支持するデータは得られなかった。

1)-3. *Karenia digitata* の増殖至適環境の解析

本事業で 2018 年 9 月～2022 年 12 月の広島県東部海域における定量 PCR 法によるモニタリング結果 (図 4) をみると、毎年 9～12 月の間に本種が検出され、年によって最高細胞密度は大きく異なるがピークはいずれの年も 10～11 月にあった。低密度で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), 2018～2021 年もこの時期に本種が検出され、本海域では溶存無機態栄養塩濃度は窒素もリンも秋季に最も高いため、1 年の中でも栄養塩が豊富な秋季に増殖しやすい可能性が示唆された。ただしこの時期には植物プランクトン量が春に次いで低いことが報告されており (Ohara et al. 2020), 他の植物プランクトン種が繁栄していない時期に増殖しやすい可能性もある。*K. digitata* が 2 cell L^{-1} 以上 (ろ過量 500 mL 中に 1 cell 以上) 出現したときの水温範囲は $11.2 \sim 26.7^{\circ}\text{C}$ 、塩分範囲は $29.9 \sim 32.3$ であった (図 5)。調査期間中の水温は $6.7 \sim 31.3^{\circ}\text{C}$ であり、 10°C を下回る冬や、 30°C を超える夏には *K. digitata* が 2 cell L^{-1} 以上、検出されなかった。さらに 1)-2 のシスト探索では底泥中から *K. digitata* の DNA が検出されなかった。よって *K. digitata* が水中から消失する時期の生残戦略は課題として残った。

2) 野外試料を用いた *Alexandrium leei* の簡易分子同定手法の検討

2)-1. 広島県東部海域における *A. leei* の周年出現動態 (2022 年 1～12 月)

2022 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* 細胞は見つからなかった。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 6 に示した (9 月は未分析)。*A. leei* が検出されたのは 1, 2, 4～6, 11, 12 月で、3, 7, 8 月は検出限界 ($1 \text{ cell } 500 \text{ mL}^{-1}$) 以下であった。*A. leei* が最も多く出現したのは両港ともに 1 月であり、田島箱崎港で最大 $181.0 \text{ cells L}^{-1}$ (水深 3 m)、田尻港で最大 $27.8 \text{ cells L}^{-1}$ (水深 1 m) であった。昨年度に LAMP 法により *A. leei* の DNA を検出された月は、2, 8, 11, 12 月であり、この結果と 2022 年の結果を合わせると 3, 7 月を除くほとんどの季節で *A. leei* が検出されており、1 mL 検鏡では検出できないほどに低密度で水中にほぼ周年潜んでいること、が示唆された。また 2022 年に本種が 500 mL あたり 1 cell 以上検出された水温は $6.9 \sim 23.4^{\circ}\text{C}$ で、*A. leei* が低水温下でも生残できることが示唆された。

2)-2. 広島県西部海域における月例調査 (2022年1~12月)

広島湾においても2022年1~12月の調査期間中、光学顕微鏡下での試水1 mLの検鏡では*A. leei*は確認できなかった。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7に示す。広島湾では6月、8月および12月に1 cell L⁻¹を超える細胞密度で本種が出現した。最高細胞密度は74 cells L⁻¹ (6月の2 m層)であった。広島県東部海域と同様、夏季にも冬季にも本種の出現が認められ、季節的、周期的な海水中への出現が認められた*K. digitata*とは対照的に、*A. leei*は周年出現している可能性があることが示唆された。

2)-3. 瀬戸内海中央部から東部にかけての水平分布の把握 (2022年4月)

本広域調査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。定量PCR法では分析した16定点×3層の48試料の内、燧灘1点(HN25)の水深B-2 m、播磨灘3点(K6, OY4, NH4)のいずれも水深5 mの計4試料でのみ*A. leei*が検出された(表3)。この4点は燧灘中央部、播磨灘の香川県沿岸、岡山県沿岸、兵庫県沿岸と水平的に広い範囲で出現し、最も高密度であったのは兵庫県沿岸(NH4)の34.8 cells L⁻¹であった。周年調査と同様に、*A. leei*の細胞密度は1 mL検鏡では検出できないほどに低密度であった。

2)-4. 瀬戸内海西部における広域調査 (2022年5月)

定量PCR法による定点別・水深別の*A. leei*の細胞密度(試水1 Lあたりに換算)を表4に示す。調査したすべての定点から本種の遺伝子は検出され、1 cell L⁻¹以上の細胞密度は伊予灘(IY1)および周防灘(Y4, Y6)を除く定点で検出された。底層で高い細胞密度が検出される傾向があった。最高細胞密度は伊予灘IY2の底層における59.0 cells L⁻¹であった。以上の調査結果から、*A. leei*は瀬戸内海西部海域に低密度ながら広く分布していることがわかった。

以上の調査結果から、*A. leei*は低密度ながら瀬戸内海の広い範囲に分布しており、少なくとも4~5月には低密度で水中に出現していること、月例調査の結果から本種の低密度の出現には季節性や周期性はないことが示唆された。今回、検鏡では確認できない低密度での発生状況ではあるものの、瀬戸内海に広く本種が分布していることや、周年の出現動態を把握できたことは、本種の発生リスクを評価するうえで重要な知見になると考える。

3) LAMP法の普及に向けたポジティブコントロールの調製方法のマニュアル化

*Alexandrium leei*を事例に、手元に対象とする生物のDNA、あるいは培養株がある場合と、これらが無い場合に分けてLAMP法に用いるポジティブコントロール調製方法の簡易マニュアルを作成した。前者についてはDNA抽出物を使用するが、DNAの抽出から希釈、保存等注意点を整理した。後者については、LAMP法の標的とする遺伝子配列情報を用いて外注合成を行う方法を事例としてまとめた。

3 5か年のまとめ

本事業では、従来のような検鏡によるモニタリングが困難な新奇有害渦鞭毛藻2種、*Karenia digitata*と*Alexandrium leei*について、遺伝的手法により簡便に検出できるLAMP法および定量PCR法を確立した。これらの手法を用いてこれら2種の周年出現動態および水平分布について新たな知見を得た。

1) 新奇有害渦鞭毛藻*Karenia digitata*および*Alexandrium leei*の遺伝的簡易検出手法の確立

本事業の5か年で*K. digitata*の遺伝的簡易検出手法として定量的な検出手法である定量PCR法を、*A. leei*の遺伝的簡易検出手法として、高価な機器が不要で目視検出が可能なLAMP(Loop-mediated

Isothermal Amplification) 法と定量 PCR 法をそれぞれ確立し、現場実用ができることを検証した。これら 2 種の有害藻類のように普段はごく低密度で水中に存在する種は、従来の顕微鏡によるモニタリングが困難であり、大量の海水試料を濃縮して遺伝子を用いて高感度に検出するこれらの手法は、分布や生態を把握するためのツールとして有用である。実際に以下のように、これらの 2 種の周年モニタリングや水平分布調査に活用できた。

2) 遺伝的簡易検出手法を用いた *Karenia digitata* の生態および分布域の把握

平成 9 年に *K. digitata* による甚大な漁業被害が起こった広島県東部海域で、2018 年および 2019 年に LAMP 法と検鏡による *K. digitata* のモニタリングを実施し、初夏 (6, 7 月) と秋から冬 (10 月～翌年 1 月) に本種が検出された。*K. digitata* の周年動態を捉えた研究は初報告であり、この広島県東部海域では初夏に初めて本種が確認された。2018 年 9 月以降には、同海域で LAMP 法と平行して定量 PCR 法によるモニタリングも実施した。定量 PCR 法は 2022 年 12 月までの 5 年弱、データを蓄積した。定量 PCR 法では秋から冬 (9 月～翌年 1 月) に *K. digitata* が検出され、他の季節には検出限界以下 ($< 2 \text{ cells L}^{-1}$) であった。

このような季節変動が他の海域でも起きているのかを調べるために、同様の周年調査をこれまで *K. digitata* の出現報告がない広島県西部海域と、日本海側に位置し *K. digitata* の出現報告がある山口県油谷湾の 2 カ所でも実施した。広島県西部海域では 2018 年 10 月～2022 年 12 月までの月例調査で 10, 11, 12 月に、油谷湾では 2019 年 4 月～2020 年 12 月までの月例調査で 4, 5, 11, 12 月に *K. digitata* が 2 cells L^{-1} 以上出現し、いずれの海域でも毎年 1-2 回出現すること、秋から初冬 (11, 12 月) に細胞数のピークがあること、といった広島県東部海域と似た季節変動を示すことを明らかにした。

2020 年 10 月、2021 年 4, 10 月、2022 年 4 月に実施した瀬戸内海広域調査でも同様の季節変動がみられた。秋 (10 月) の調査ではほぼすべての調査点から *K. digitata* が検出された一方で、春 (4 月) にはすべての調査点で *K. digitata* は 2 cells L^{-1} 以下であった。また秋の調査において瀬戸内海最大のノリ養殖海域である播磨灘からも *K. digitata* が検出されており、これまで播磨灘での被害報告はないものの、ノリの芽付きや生長に影響を与えることが報告されている *K. digitata* の出現動向には今後も注意する必要がある。

また、調査から *K. digitata* には水中から検出されない消失時期があることがわかった。そこで広島県東部海域における定量 PCR 法によるモニタリング時の環境データに着目すると、*K. digitata* の出現水温は $11.2 \sim 26.7^{\circ}\text{C}$ であった (図 5)。広島県東部海域における LAMP 法では冬季 1 月にも *K. digitata* が検出され、2019 年 1 月と 2020 年 2 月には広島湾沖合の調査点にて 2 cells L^{-1} を超える *K. digitata* が検出された。これらのデータから *K. digitata* は低水温耐性が高いことが伺えるが、 10°C を下回る低水温では検出されていない。

そこで次に *K. digitata* が検出されない春や夏に休眠孢子 (シスト) を形成している可能性を検討した。2021 年 9, 10, 11, 12 月に広島県東部海域の 2 漁港で採取した底泥試料から DNA を抽出し、LAMP 法と定量 PCR 法に供したが、いずれも検出限界以下 ($< 4 \text{ cells g}^{-1} \text{ wet-sediment}$) であった。2022 年 4 月には瀬戸内海中央部の沖合 2 点で泥を採取し、さらに多量の泥から DNA を抽出して定量 PCR 法に供したが、いずれも検出限界以下 ($< 0.1 \text{ cell g}^{-1} \text{ wet-sediment}$) であった。このように本事業では底泥中から *K. digitata* の DNA を検出することはできなかった。*K. digitata* がシストを形成して環境の好転を耐えるのか、はたまた栄養細胞のまま極低密度で水中に生残しているのか、結論を得ることはできなかった。

3) *Karenia digitata* の増殖生理特性

Karenia digitata は培養株が分離できているものの、安定した培養条件が確立していない。2018 年には *K. digitata* 培養株について、培養培地の検討を行い、改変 f/2 培地が比較的株の維持に良好であること、SWM-III 培地や IMK 培地は海水で希釈した場合に増殖するが、希釈に用いる海水に影響を受けること、土壌抽出液は効果がないことを明らかにした。これらの検討から、比較的増殖が良

いと判断された培地を用いて長期の継代培養を試みたが、残念ながら多くの培養株は維持することができなかった。本種の増殖は同じ培養株、ロットから植え継いだ株間でも爆発的に増殖したり、全く増殖せずに死滅したり、という現象が認められることがある。培養株は無菌ではないことから、共存する微生物の影響や従属栄養という視点からの増殖生理特性の検討が必要かもしれない。

4) 遺伝的簡易検出手法を用いた *Alexandrium leei* の生態および分布域の把握

これまで *A. leei* の周年動態が報告されていない広島県東部海域において 2021 年 1~12 月に LAMP 法、2022 年 1~12 月に定量 PCR 法による *A. leei* の周年出現動態を調査した。両年合わせると 3、7 月以外の月全てで *A. leei* が検出されており、*A. leei* は冬 (12-1 月) をピークとして 1 mL 検鏡では検出できないほどに低密度で水中にほぼ周年潜んでいることが示唆された。一方、広島湾での周年調査では冬季 (12 月) の発生のほか、夏季 (6 月および 8 月) にも発生のピークが認められた。本種の瀬戸内海における春季の分布については、2021 年 4 月、2022 年 4 月および 2022 年 5 月に広い範囲で *A. leei* の出現を LAMP 法または定量 PCR 法で調査し、4 月には燧灘や播磨灘で、5 月に広島湾、伊予灘、別府湾などで *A. leei* が検出され、瀬戸内海の広い範囲に *A. leei* が出現することが明らかとなった。Shikata et al. (2020) は高知県浦ノ内湾で発生した *A. leei* の増殖至適水温が 20°C であり、10~25°C で増殖可能であることを報告している。したがって、瀬戸内海ではほぼ周年、本種の増殖が可能と推定され、環境など条件がそろえば低密度に存在するシードポピュレーションから赤潮になるリスクは否定できない。本種の発生リスクをあらかじめ把握して、備えることは必要であると考えられる。

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・内藤佳奈子准教授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. 大分県農林水産検査研報 (水産) 2017 ; 6: 67-78.
- Ohara S, Yano R, Hagiwara E, Yoneyama H, Koike K. Environmental and seasonal dynamics altering the primary productivity in Bingo-Nada (Bingo Sound) of the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton Benthos Res*, 2020; 15: 78-96.
- 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, 栄養塩, 赤潮・貧酸素水塊共同研究機関, 水産庁, 東京. 2019 ; 317-325.
- 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, 栄養塩, 赤潮・貧酸素水塊共同研究機関, 水産庁, 東京. 2021 ; 316-327.
- 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 3 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, 栄養塩, 赤潮・貧酸素水塊共同研究機関, 水産庁, 東京. 2022 ; 330-341.
- 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.

図表

表 1. 2022 年 4 月の瀬戸内海広域調査における定点別・水深別の定量 PCR 法による *Karenia digitata* の細胞密度 (cells L⁻¹).

	HN27	HN25	HN1	K-11-2	K6	OY1	OY4	NH4	HG3	HG4	OS1	OS18	OS16	OS19	HN26	HN7
1m	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
5m	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
B-1m	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

表 2. 2022 年 4 月の瀬戸内海東部海域広域調査 2 定点 (HN25, HN7) における底泥中の *Karenia digitata* シストの探索：定量 PCR 法による *Karenia digitata* 細胞密度 (cells 10 g-wet sediment⁻¹) および LAMP 法キットによる *Chattonella marina* の DNA の有無.

	定量PCR法 (<i>K. digitata</i>)	LAMP法 (<i>C. marina</i>)
HN25	<1	+
HN25+ <i>K. digitata</i> 細胞	92.4	分析なし
HN7	<1	+
HN7+ <i>K. digitata</i> 細胞	132.4	分析なし

表 3. 定量 PCR 法による瀬戸内海東部海域広域調査 (2022 年 4 月) における定点別・水深別の *Alexandrium leei* の細胞密度 (cells L⁻¹).

	HN27	HN25	HN1	K-11-2	K6	OY1	OY4	NH4	HG3	HG4	OS1	OS18	OS16	OS19	HN26	HN7
1m	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
5m	<1	<1	<1	<1	2.3	<1	5.2	34.8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
B-1m	<1	2.4	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

表 4. 定量 PCR 法による瀬戸内海西部海域広域調査 (2022 年 5 月) における定点別・水深別の *Alexandrium leei* の細胞密度 (cells L⁻¹). ND : 非検出

	広島湾		伊予灘				別府湾			周防灘				
	HB2	Ank0	IY2	IY1	Y2	Y1	SN4	SN3	SN2	SN1	Y6	Y5	Y4	Y3
0m	ND	<1	ND	<1	ND	2.8	ND	<1	<1	1.0	ND	<1	ND	<1
5m	<1	ND	<1	ND	1.7	<1	27.0	6.3	2.1	1.0	ND	<1	<1	<1
B-1m	25.4	1.5	59.0	ND	8.5	10.6	ND	ND	<1	<1	<1	2.0	ND	1.6