K.mikimotoi が水深 5m で 1200cells/mL 確認され，熊本県が八代海に *K. mikimotoi* の赤潮警報を発令した。このように，有害プランクトンセンサーの設置により，*K. mikimotoi* の早期発見に繋がった。

続いて，*K. mikimotoi* の赤潮発達期である 7 月 8 日から 7 月 10 日までの 48 時間の結果を図 21 に示す。*K. mikimotoi* の発達期には， FSI およびクロロフィル蛍光の増減に周期性がみられ，これは増殖期に日周鉛直移動を行う *K. mikimotoi* （Honjou, 1990）を捉えていると考えられた。

最後に，*K. mikimotoi* の衰退期である 7 月 30 日から 8 月 5 日の結果を図 22 に示す。衰退期になると，*K. mikimotoi* は運動能力を消失させ，表層に集積して消滅していくが（Honjou,1990），楠浦湾では水深 10m は 8 月 2 日，水深 5m は 8 月 3 日，水深 1.5m は 8 月 5 日を最後に FSI が 1.95 を下回るようになり，終息した。この結果により，水深 10m から 5m にかけて，FSI が 1.95 を下回るようになることが終息の判断指標になると考えられた。しかし，今年は 7 月中旬に一度，*K. mikimotoi* の細胞数が低下したものの，1 週間後には再度，赤潮化したことから（図 19），さらなるデータの蓄積により，*K. mikimotoi* の赤潮が終息するか継続するかの判断精度を高めていく必要がある。

なお，*Chattonella* 属については，赤潮発生時に FSI に反応がみられたものの（図 19），反応時に確認された *Chattonella* 属の細胞密度等に一貫性がなかった。これは，有害プランクトンセンサーが *Chattonella* 属を捉えることができる条件として，他の珪藻類などのプランクトンとの *Chattonella* 属の優占割合が 80% 以上占めていることであるため，他プランクトンとの優占割合が関係していると考えられた。

b. 有害プランクトンセンサーおよび多項目水質計による鉛直観測

K. mikimotoi の赤潮時（7 月 25 日）および *Chattonella* 属の赤潮時（8 月 22 日）の結果を図 23 に示す。テレメータ観測と同様に，*K. mikimotoi* および *Chattonella* 属の赤潮発生時，投げ込み式の有害プランクトンセンサーに有害プランクトンの細胞密度に応じて反応がみられた。特に，8 月 22 日は *Chattonella* 属が 19cells/mL と低い密度で FSI に反応がみられたが，検鏡結果から *Chattonella* 属の優占割合が 80% 以上だったため，FSI に反応がみられたと考えられた。

以上のことから，有害プランクトンセンサーが *K. mikimotoi* の発生動向（特に，初期発生時）を捉えており，定点観測ではセンサーを異なる 3 層に設置することでいち早く *K. mikimotoi* の発生を捉えることができると考えられた。一方，有害プランクトンセンサーの *Chattonella* 属への有効性については，*Chattonella* 属が 10cells/mL で熊本県の赤潮警報レベルとなること，他プランクトンとの優占割合により有害プランクトンセンサーへの反応状況が変わることから，有害プランクトンセンサーによる *Chattonella* 属赤潮の早期感知は難しいと考えられた。

今後は現場に行かずとも，赤潮の出現動向および細胞密度が推定できるよう，有害プランクトンの細胞密度と FSI およびクロロフィル蛍光の関係について，さらなるデータの蓄積および検証を進める必要がある。

②モニタリングの高度化

〈1〉 ドローンによる赤潮範囲の推定

本課題では，空撮写真から高精度で赤潮発生範囲を推定できたことから，ドローンを

用いて効果的な粘土散布を実施できる可能性を見出した。

まず，空撮ドローンで撮影した赤潮を図 24 に示す。この空撮写真から，赤潮のパッチや筋状の切れ目が視認できた。次に，空撮写真の赤潮を PC で判別した（図 24）。その結果，赤潮の存在箇所を寒色系から暖色系の濃淡で表現できた。最後に，PC による判別の精度確認結果を示す（表 3）。この混同行列の要素から計算した正解率は 80%，適合率と再現率は 100% と 71% で，F 値は 83% であった。誤判別は 5 回で，その全てが偽陰性であった。誤判別された写真（図 25）を確認すると，濃い赤潮パッチの中の比較的薄い箇所を非赤潮と判定したケースが 1 件，判定箇所が太陽の反射に入ってしまい非赤潮と判定したケースが 4 件であった。

以上より，太陽が反射している箇所は目視に頼るしかないが，それ以外の箇所では空撮写真の解析結果をもとに赤潮の濃い所を発見できると考えられる。これによって，より濃い赤潮が発生している箇所で粘土を散布し，その効果を高められることが期待できる。

〈2〉 **seaMS** による細胞密度の推定

本課題では，赤潮発生後の定期調査を seaMS で代行できる可能性を見出した。なぜなら，*K. mikimotoi* が 2150cells/mL 以上で seaMS による細胞密度の検出精度が上がったからである。

まず，誤差（RMSE）は 5596cells/mL であった（図 26）。誤差の値だけを見ると到底許容しきれない数字であるが，今回検証に用いた *K. mikimotoi* 赤潮の多くが 25000cells/mL を超えており，最大で 113750cells/mL であったことを考慮すると，精度の良い推定であったと考えられた。次に，これを定量的に表すために，誤差率を算出した（図 27）。この図から，2150cells/mL 未満の *K. mikimotoi* 赤潮では誤差率が 500% を超えるため，この推定値は信用できないと考えられた。一方， 2150cells/mL 以上の *K. mikimotoi* 赤潮では誤差率が 40% 以下に減少し，推定値として許容できる範囲であると考えられた。

K. mikimotoi で 2150cells/mL となると，すでに発生初期は経過し，警報が発令される密度（≥ 1000cells/mL）である。これらのことから，seaMS を現場に導入する場合，現状では初期発生の検出は難しいが，警報発令後の定期調査であれば代行できるものと考えられた。

2）予察

①発生予察

〈1〉 判別分析による予察

過年度に *Chattonella* 赤潮の中長期動態予測技術として開発された判別分析による赤潮発生予測を行った。その結果，赤潮発生は的中したが発生日は的中しなかった。

今年度の 2～4 月の平均気温は 12.8°C，梅雨入りは 5 月 30 日で 5 月 16 日からの経過日数は 14 日であった。これを図 28 にプロットすると，判別直線より右上，すなわち「今年度は赤潮発生年である」と予測された。現実においても，前述の通り，*Chattonella* 赤潮が発生しており，予測は的中したと認められた。

この判別分析結果から判別得点を算出したところ，今年度は 1.9 であった。これを判別得点と赤潮発生日の回帰式に代入して赤潮発生日を算出したところ，6 月 30 日から約 21 日後，すなわち「7 月 21 日頃に赤潮が発生する」と推定された（図 29）。しかし

実際は，6 月中旬以降 *Chattonella* 赤潮が八代海に発生・拡大したことが確認された。そのため，発生日については的中しなかったと判断した。

〈2〉 予察の高度化

予察精度の維持・向上のために，説明変数とモデルの見直しを行った。その結果，気温・河川水位・降水量・IOBW を用いてランダムフォレストを使用する方法が，赤潮予察に適していると考えられた。

まず，赤潮発生年と非発生の環境の違いを確認するために，母平均の差の検定を行ったところ，4 月の気温，5 月の河川水位と降水量，前年 11 月の河川水位と降水量，前年 9 月の IOBW に有意差が認められた（表 4）。これらの変数がどのようにして赤潮の発生に作用するかは不明であるが，有意差が認められたことから予察に有効な変数であると考えた。

次に，これらの変数を用いて 6 種類の統計的分類手法を試行し，交差検証を行ったところ，ランダムフォレストが高精度であることが明らかとなった。ランダムフォレストは，5 種類のモデル指標値の全てにおいて，他 5 種類のモデルよりも高い値を記録した（表 5）。正解率および k 統計量（偶然の一致を除いた正解率）が高く，適合率と再現率の調和平均である F 値も高いことから，高精度でバランスの良いモデルであると考えられた。

②拡大予察

〈1〉 有害プランクトンの輸送過程の解明

八代海を対象とする流動モデル構築のため，三角形格子による八代海地形の再現を試みた。図 30 に計算領域の全景を示す。外洋からの影響を考慮するため，甑島沖の東シナ海に開境界を設定した。また，有明海との海水交換を考慮するため，有明海もモデル領域として設定することとした。楠浦湾と有明海をつなぐ本渡瀬戸は，近年の有害赤潮プランクトン発生状況も勘案し，モデル領域として組み込むこととした（図 31）。

〈2〉 赤潮発生から衰退に至る栄養塩動態の解明

図 7 には球磨川の流量と *K. mikimotoi* の日最大細胞数の推移を示す。河川流量はそれぞれの年において最大で 2017 年の約 1250m^3/s から 2016 年の約 2500m^3/s の範囲であった。*K. mikimotoi* は 2015 年 7 月に最大値となる約 150000cells/mL に達し，出水から 1 ヶ月経過した 8 月になっても 50000cells/mL に達する高密度なパッチを形成した。2015 年は，*K. mikimotoi* 赤潮が八代海西部で発生し，風の影響を受けて八代海中央部へと広がったことが報告されている（Aoki et al., 2023）。2014 年には流量が中程度であったものの *K. mikimotoi* の赤潮が発生せず，2017 年には流量が最低であったが最大細胞数は 20000cells/mL を上回るように，単純に規模やタイミングに合わせて *K. mikimotoi* の赤潮が発生しないことが分かる。

K. mikimotoi の細胞数が長期間にわたって高密度を維持していた 2015 年における八代海南部海域の水質の時系列変化を図 32 に示す。6 月の出水後，表層塩分は約 1 ヶ月間に渡って 28 を下回った。これに呼応するように，表層から水深 15m にかけてクロロフィル a 濃度が 10μg/L を超える濃度上昇が確認された。その後，クロロフィル a 濃度が低下する頃に *K. mikimotoi* 細胞数は急上昇し，8 月下旬まで高い細胞数密度を維持した。

実測 DIN 濃度は表層から 10m までは多くの期間において 2μmol/L を下回っていたが，7 月下旬と 8 月下旬には水深 10m でも 4μmol/L を上回っていた。ミキシングモデルによる計算結果によると，八代海南部海域に対する河川由来 DIN の影響はごく表層に限られており，その濃度は最大でも 3μmol/L 程度であり，8 月下旬から 9 月上旬の短期間のみであった。一方，底層由来 DIN については多くの期間において水深 5m でさえ 2μmol/L，水深 10m では多くの期間において 3〜4μmol/L と高濃度であった。*K. mikimotoi* の日周鉛直移動が最大で 20m に達することを踏まえると（Shikata et al., 2017），底層由来 DIN は風によって広がった *K. mikimotoi* の維持に対して重要な役割を担う可能性が高いと言える。また，実測 DIN 濃度と供給 DIN 濃度の差し引きより見積もった N 取り込み量は水深 10〜20m で高く，2〜4μmol/L に達した。ただし，このような底層水由来の高濃度な DIN は 2015 年だけではなく，その他の年においても確認されている（図 33）。このことは，赤潮が発生した時に底層由来 DIN 濃度が高かったことを意味するだけであり，底層由来 DIN が高い時に赤潮が大規模化するわけでは無い点には注意が必要である。今後の課題として，底層由来 DIN が赤潮の維持・拡大に対して与える影響を定量的に評価する必要がある。

3）行動計画

①赤潮発生状況と対策の現状把握

東町漁協にヒアリングを行ったところ，次のような回答が得られた。東町漁協では，御所浦島を境に北側と南側の海域において 1〜5cells/mL，5〜10cells/mL の細胞密度，すなわち，2 海域 × 2 区分= 4 段階で対応を分けている（表 6）。具体的には，御所浦島北側において *Chattonella* 属が 1〜5cells/mL 確認された場合，漁協による自主調査を毎日実施している。これが 5〜10cells/mL に増加した場合は，生簀沈下・足し網の準備を呼びかけている。また，御所浦島南側において *Chattonella* 属が 1〜5cells/mL 確認された場合，漁業者による検鏡を実施している。これが 5〜10cells/mL に増加した場合は，生簀沈下・足し網を実施する。*K. mikimotoi* の場合は 100〜500cells/mL，500〜1000cells/mL を基準に，同様の対応を行っている。次に，海水養殖漁協にヒアリングを行ったところ，次のような回答が得られた。海水養殖漁協では，龍ヶ岳，樋島の漁場では姫戸周辺の，楠浦湾の漁場では楠浦湾内の赤潮警報を基準に対応している（表 7）。具体的には，龍ヶ岳の漁場では姫戸周辺で *Chattonella* 属が 10cells/mL 以上で餌止めを実施する。樋島の漁場では常時 16m まで網を深くしているので，足し網はせず餌止めを実施する。楠浦湾では，楠浦湾内で *Chattonella* 属が 10cells/mL 以上で餌止めおよび足し網を実施する。

②赤潮発生状況と対策の改善・更新

東町漁協では，事前打ち合わせで決定したとおりの調査および対策を実施した。

今年度の対応をとおして次の 2 点を今後の改善点として見出した。

- 赤潮前に深い生簀に移す
- 最初から深い生簀で養殖する

今年度は 6 月中旬にブリ 2 歳魚が 2500 尾斃死した。このとき，足し網と生簀沈下は

実施しておらず，生簀の深い層まで *C. polykrikoides* と *Chattonella* 属が分布していた。また，7 月下旬にマダイ・サバ・シマアジが 8 万尾斃死した。このとき，隣り合わせの生簀でも深い生簀で被害が少なかった。足し網と生簀沈下は，主にブリの生簀で使用されているものであり，今回の生簀では使用していなかった。これらのことから，次年度は深い生簀を使用するよう漁業者へ薦めていく。

海水養殖漁協および熊本水研・天草市水研センターでは，事前打ち合わせで決定したとおりの調査を実施した。しかし今年度は，*Chattonella* 属と *K. mikimotoi* の初認が楠浦であったり，*K. mikimotoi* が優占したり，*Chattonella* 属が 20m 層まで分布したりと，例年とは異なる発生状況となった。そのため，対応も例年と異なった。今年度の経験から，次年度は以下を試行することとなった。

- マグハイパーを 5m に垂下する
- 赤潮の移流シミュレーションに取り掛かる
- 意見交換会を設ける

まず，マグハイパーなどの赤潮防除剤を生簀周辺に垂下し，常に赤潮が寄りにくい状態になることを期待する。

次に，赤潮が翌日どこに移動するのかをシミュレーションするモデルの作成に取り掛かる。なぜなら，今年度は生簀や魚の移動先で被害に合うことが多かったからである。そのため，このようなモデルがあれば，安全な移動先を選定できるようになる。また，いま魚を入れている生簀に明日赤潮が来ないことが分かれば，餌やりのタイミングも判断できる。さらに，八代海における赤潮の主な移動ルートが分かるだけでも助かるとのことであった。例えば，漁業者の私信ではあるが，御所浦と牧島をつなぐ橋のところは何故か *C. polykrikoides* が通らない。そのような知見が複数箇所であると生簀の移動先としての候補を挙げやすくなるとのことであった。

最後に，漁業者を集めた意見交換会を開催する。特に，マグハイパーやクニボンドなどの防除剤の効果や，赤潮時において魚を取り扱う際の失敗例などを共有することとなった。

参考文献

Aoki, K., Sugimatsu, K., Yoshimura, N., Kuroki, Y., Nakashima, H., Hoshina, K., Ura, K. Dynamics of a fish-killing dinoflagellate Karenia mikimotoi red-tide captured by composite data sources. *Marine Pollution Bulletin* 2023; **195**: 115472.

Holm-Hansen, O., Lorenzen, C. J., Holmes, R. W., Strickland, J. D. Fluorometric determination of chlorophyll. *ICES Journal of Marine Science* 1965; **30**: 3–15.

Honjou, T. Annual cycle of motile cell of *Gymnodinium nagasakiense* and ecological features duringtheperiodofredtidedevelopment. *InToxicMarinePhytoplankton.*1990: 165–170.

北辻さほ, 紫加田知幸, 鬼塚剛, 青木一弘．八代海における赤潮発生メカニズムの解析．平成 29 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と予察・被害防止等技術開発」報告書，九州海域赤潮・貧酸素共同研究機関, 東京 2018.

Kohavi, R. A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. *Proceedings of the 14th international joint conference on Artificial intelligenceVolume 2* 1995: 1137–1143.

Lantz, B. *Machine Learning with R*: Packt Publishing. (訳者長尾高弘. (2017). R による機械学習. 翔泳社) 2013.

小川健太, 秋山諭, 妹背秀和, 高木秀蔵, 嵐俊右．瀬戸内海東部海域．養殖ビジネス
2022；**59**：10–14.

Ohba, M., Kadokura, S., Yoshida, Y., Nohara, D., Toyoda, Y. Anomalous Weather Patterns in Relation to Heavy Precipitation Events in Japan during the Baiu Season. *Journal of Hydrometeorology* 2015; **16**: 688–701.

Onitsuka, G., Aoki, K., Shimizu, M. Meteorological conditions preceding *Chattonella* bloom events in the Yatsushiro Sea, Japan, and possible links with the East Asian monsoon. *Fisheries Science* 2015; **81**: 123–130.

Shikata, T., Onitsuka, G., Abe, K., Kitatsuji, S., Yufu, K., Yoshikawa, Y., Honjo, T., Miyamura, K. Relationships between light environment and subsurface accumulation during the daytime in the red-tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Marine biology* 2017; **164**: 1–12.

紫加田知幸, 北辻さほ, 鬼塚剛, 中野善, 岡村和麿, 向井宏比古, 松谷久雄, 山下博和, 高杉朋孝, 宮田翔也, 森島義明, 西広海, 石田幸生, 古川新平, 浦啓介, 上野翼, 西山佳孝．有害赤潮プランクトンの出現動態監視および予察技術開発 6 イ．八代海・鹿児島湾海域．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, 東京 2019.

Tanaka, M. Interannual and interdecadal variations of the western North Pacific monsoon and Baiu rainfall and their relationship to the ENSO cycles. *Journal of the Meteorological Society of Japan. Ser. II* 1997; **75**: 1109–1123.

植松光夫, 南川雅男, 有田英之, 角皆静男．海水中の懸濁粒子量の測定法．北海道大學水産學部研究彙報 1978；**29**：164–172.

表 1. 機器設置一覧

定点名	管理機関名	観測項目				
		水温	塩分	DO	クロロフィル・濁度	FSI
田浦	熊本県	0.5m	-	-	-	-
楠浦	熊本県, 海水養殖漁協（天草市）	1.5m, 5m	1.5m, 5m	1.5m, 5m	1.5m, 5m	1.5m, 5m
嵐口	海水養殖漁協（天草市）	1.5m	1.5m	1.5m	1.5m	1.5m
宮野河内	海水養殖漁協	1.5m	1.5m	1.5m	1.5m	-
深海湾		1.5m	1.5m	1.5m	1.5m	-
久玉湾		1.5m	1.5m	1.5m	1.5m	-
葛輪黒崎	東町漁協	1m, 3m, 10m	-	-	-	-
薄井竹島		1m, 3m, 5m, 10m	1m	1m, 5m, 10m	5m	-
宮ノ浦		1m, 3m, 5m, 10m	1m	1m, 5m, 10m	5m	-
脇崎		1m, 3m, 10m	-	-	-	-
多々羅		1m, 3m, 10m	-	-	-	-
柏栗		1m, 3m, 10m	-	-	-	-
福ノ浦		1m, 3m, 10m	-	-	-	-
御所浦		1m, 3m, 10m	-	-	-	-

表 2. 赤潮カメラからの予測と検鏡結果の混同行列

		観測	
		赤潮	非赤潮
推定	赤潮	6	82
	非赤潮	0	32

表 3. 空撮画像における赤潮判別の混同行列.

		検鏡	
		赤潮	非赤潮
推定	赤潮	12	0
	非赤潮	5	8

表 4. 赤潮発生年と非発生年で有意差が認められた変数

変数	p 値
4 月の気温	0.00
11 月の降水量	0.01
11 月の河川水位	0.03
9 月の IOBW	0.03
5 月の河川水位	0.04
5 月の降水量	0.04

表 5. 各統計的分類手法における評価指標

統計的分類手法	正解率	適合率	再現率	F 値	k 統計量
判別分析	0.67	0.50	0.44	0.47	0.23
k 近傍法	0.67	0.50	0.33	0.40	0.18
GLM	0.74	0.62	0.56	0.59	0.40
ベイズ推定	0.81	0.83	0.56	0.67	0.55
SVM	0.78	0.80	0.44	0.57	0.44
ランダムフォレスト	0.89	1.00	0.67	0.80	0.73

表 6. 東町漁協における赤潮発生状況と対応

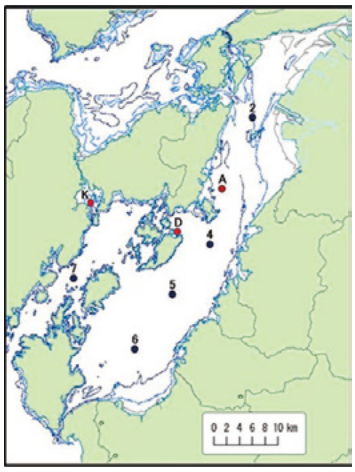
		Chattonella 属の細胞密度	
		1〜5 cells/mL	5〜10 cells/mL
御所浦島	北側	漁協による自主調査	沈下・足し網の準備
	南側	漁業者による検鏡	沈下・足し網の実施

※ *K. mikimotoi* の場合は 100 倍の細胞密度を基準とする

表 7. 海水養殖漁協における赤潮発生状況と対応

漁場	海域	*Chattonella* 属の細胞密度	対策
楠浦湾	楠浦湾内	10 cells/mL 以上	餌止めと足し網を実施
龍ヶ岳・樋島	姫戸沖	着色・警報・10 cells/mL 以上	餌止めを実施

※ *K. mikimotoi* の場合は 100 倍の細胞密度を基準とする



測点番号	測点名	北緯（°）	北緯（′）	東経（°）	東経（′）
2	大築島北	32	30. 40	130	29. 70
4	田浦沖	32	20. 20	130	25. 26
5	津奈木沖	32	16. 20	130	21. 46
6	米ノ津沖	32	11. 80	130	17. 65
7	獅子島西	32	17. 60	130	11. 65
A	姫戸ブイ	32	24. 68	130	26. 57
D	嵐口	32	21. 39	130	21. 72
K	楠浦湾	32	23. 61	130	13. 67

図 1. 調査定点

図 2. 自動水質監視テレメータ，自動観測ブイ等の設置場所及び観測・管理担当機関

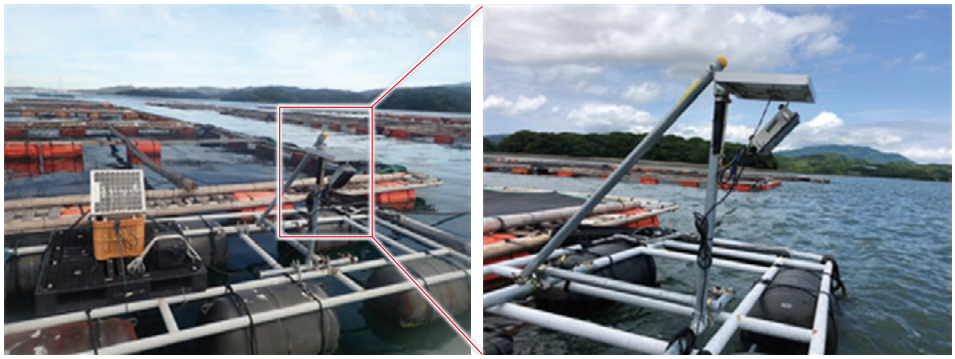


図 3. 楠浦湾に設置した赤潮カメラ

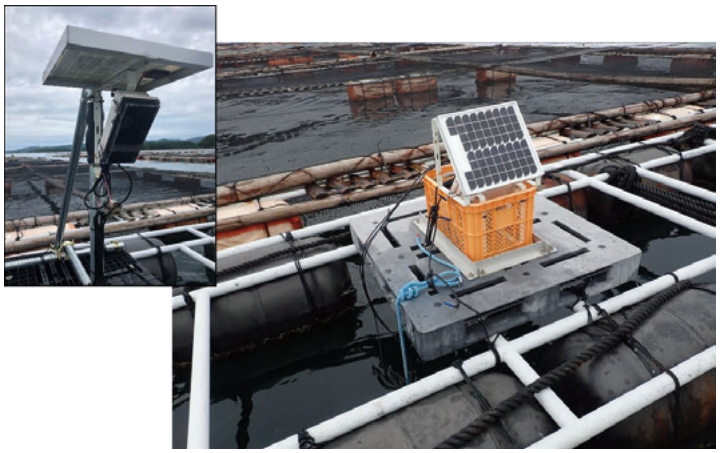


図 4. 楠浦湾のテレメータ

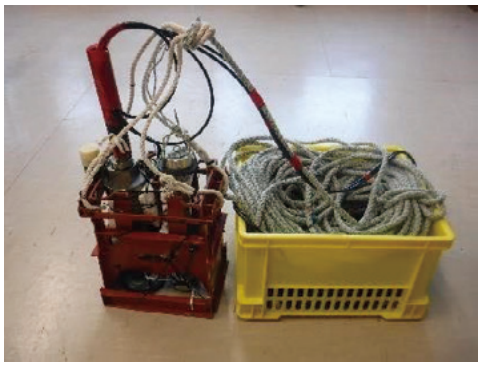


図 5. 有害プランクトンセンサー．多項目水質計および採水器

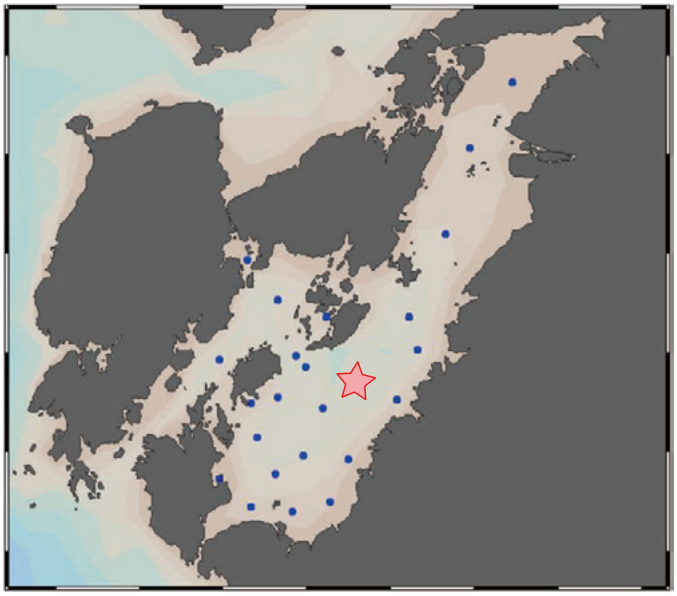


図 6. 調査地点図. 図中の星印は八代海の南部海域の代表点を示す.

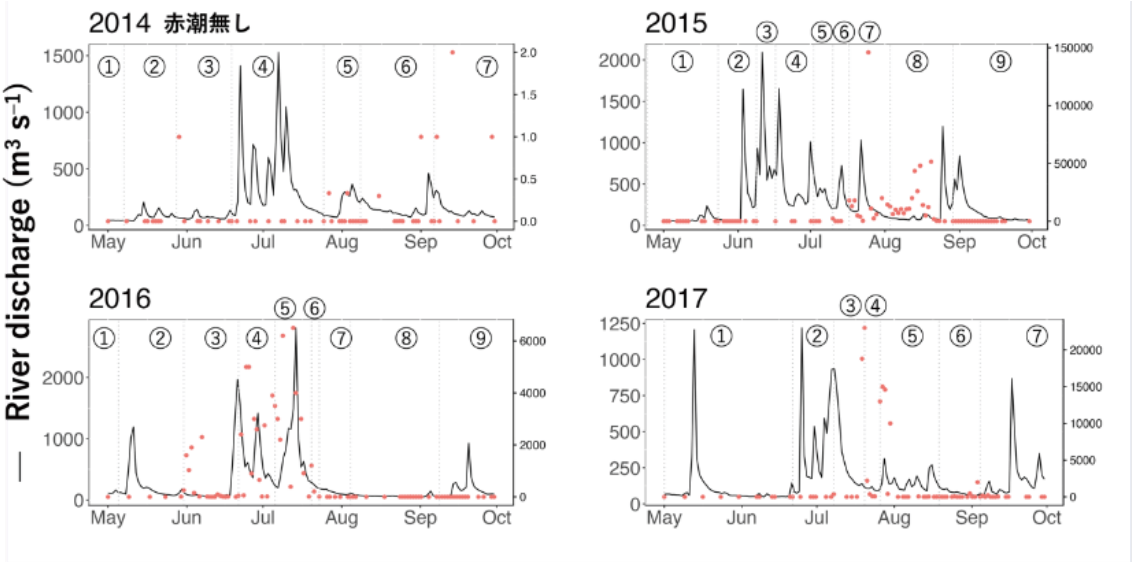


図 7. 球磨川の河川流量と *K. mikimotoi* の日最大細胞数の時系列変化. 図中①から⑨はミキシングモデルにおける計算期間を示す.

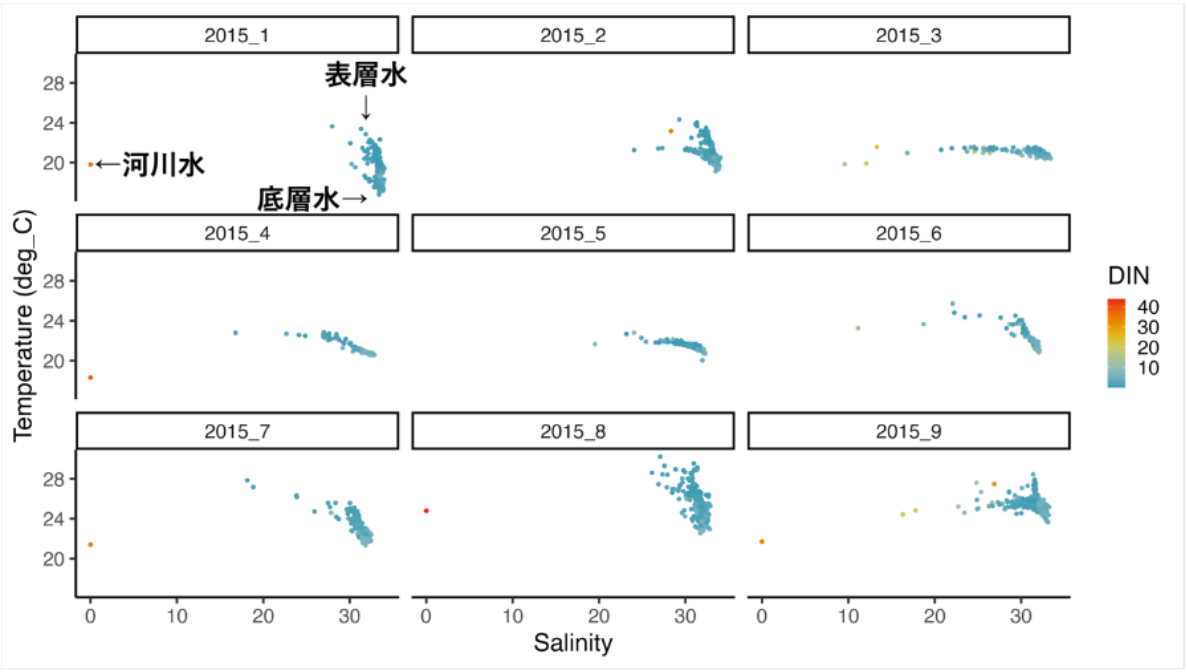


図 8. 2015 年の八代海における TS ダイアグラム.

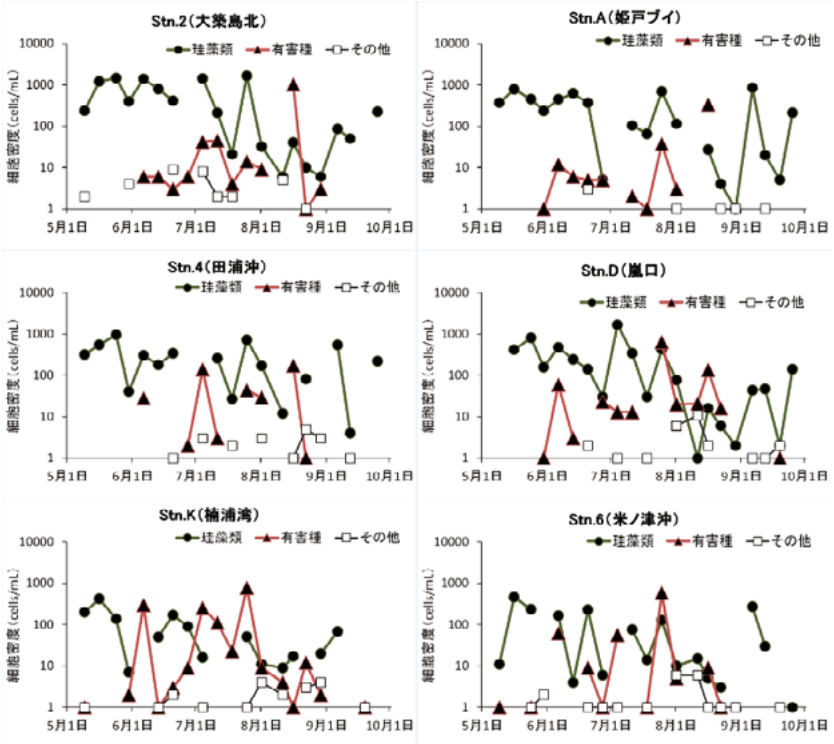


図 9. 八代海 6 定点の表層におけるプランクトン細胞密度の推移.

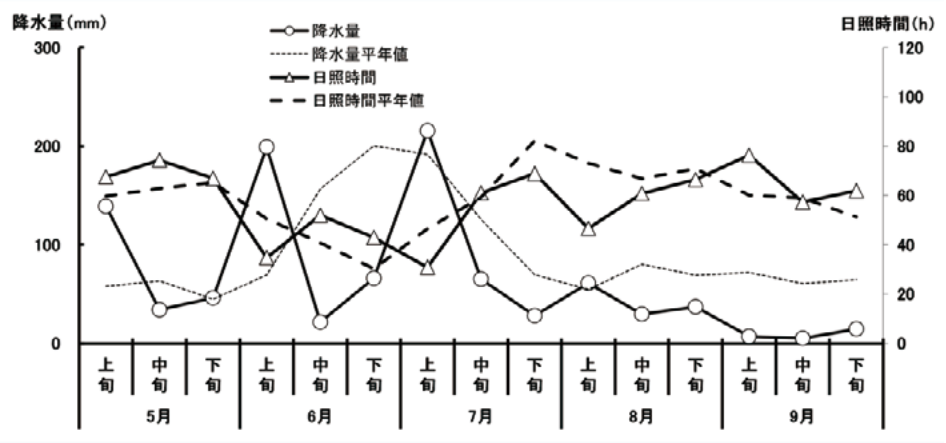


図 10. 調査期間中の降水量，日照時間の推移（八代アメダス）.

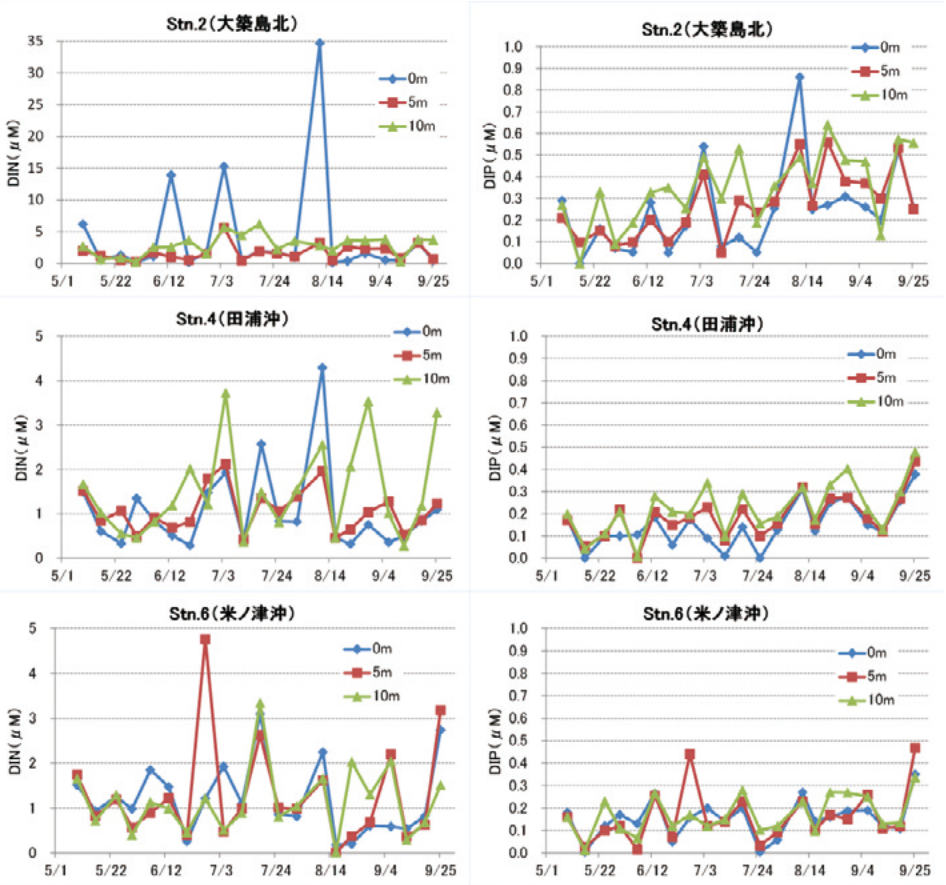


図 11. 八代海 3 定点（北部：Stn.2，中部：Stn.4，南部：Stn.6）における DIN，DIP の推移.

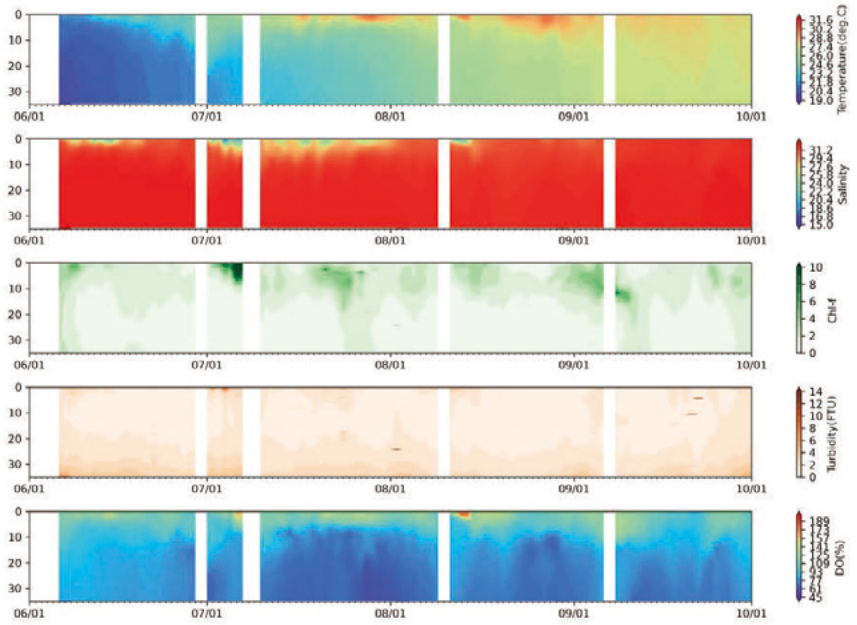


図 12. 大型観測ブイ（Stn.A）における水温，塩分，クロロフィル蛍光，濁度および溶存酸素飽和度の鉛直プロファイルの経時変化.

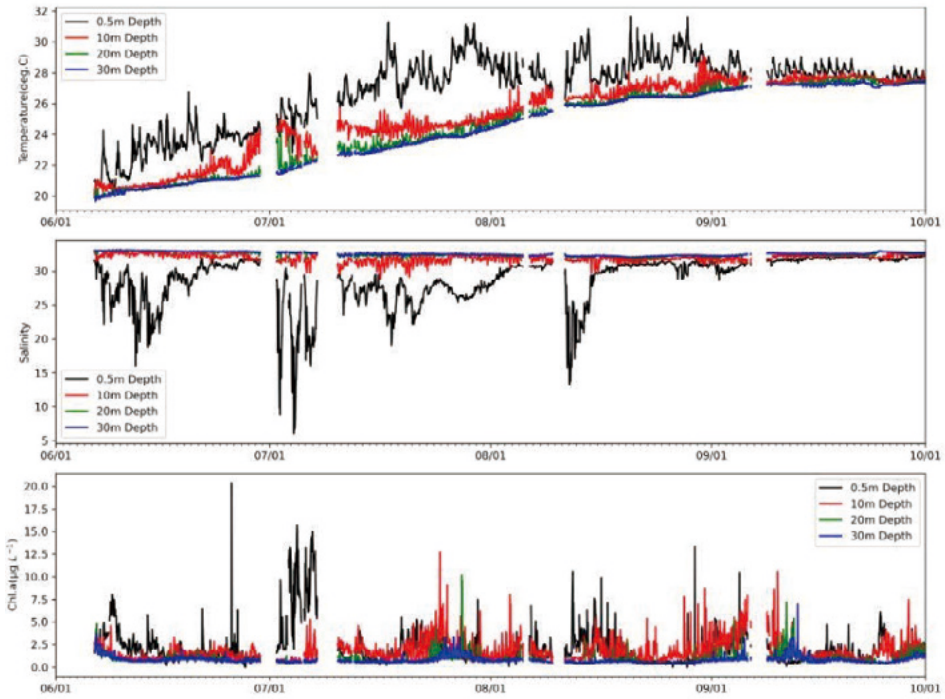


図 13. 大型観測ブイ（Stn.A）の各深度層における水温（上段），塩分（中段），クロロフィル a 濃度（下段）の経時変化.

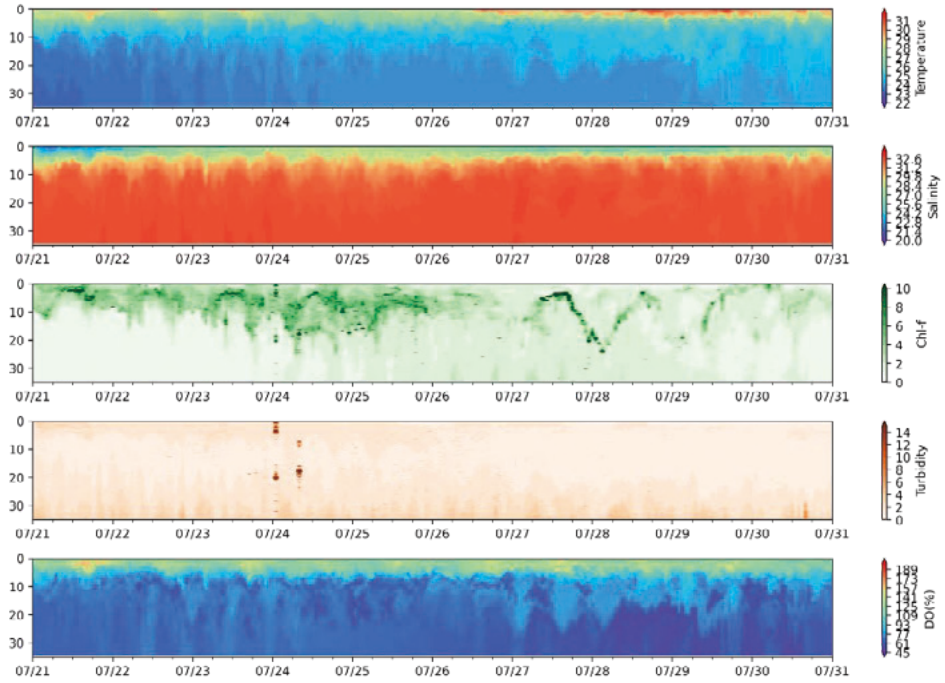


図 14. 大型観測ブイ（Stn. A）における水温，塩分，クロロフィル蛍光，濁度および溶存酸素飽和度の鉛直プロファイルの経時変化 (7 月 21～31 日の拡大).

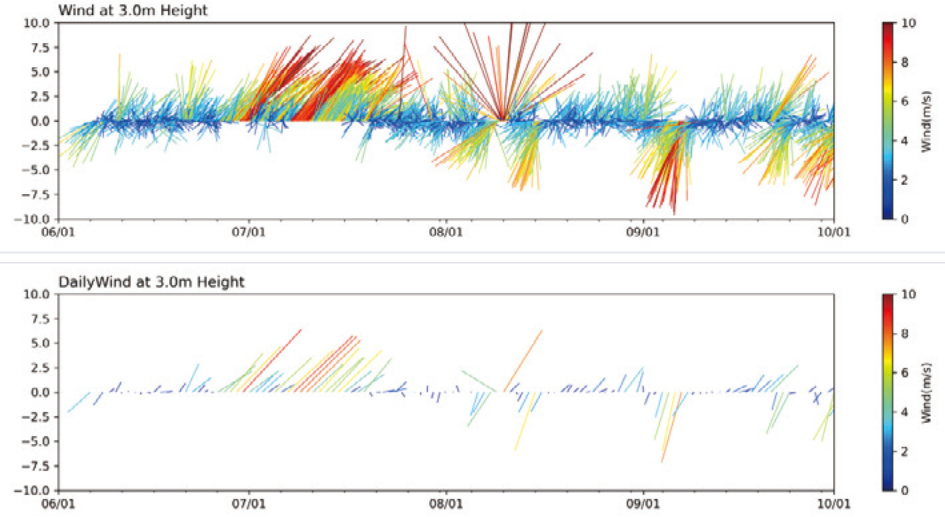


図 15. 大型観測ブイ（Stn.A）における風向風速の経時変化（上段：時別値，下段：日平均値）.

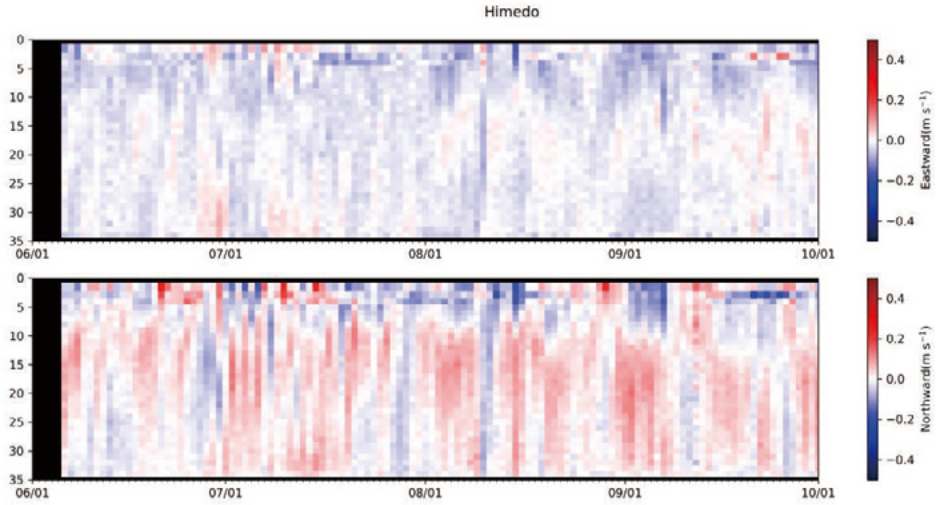


図 16. 大型観測ブイ（Stn.A）における流向流速の経時変化．上段は東西成分流速 (東向きが正) を，下段は南北成分流速 (北向きが正) を示す．

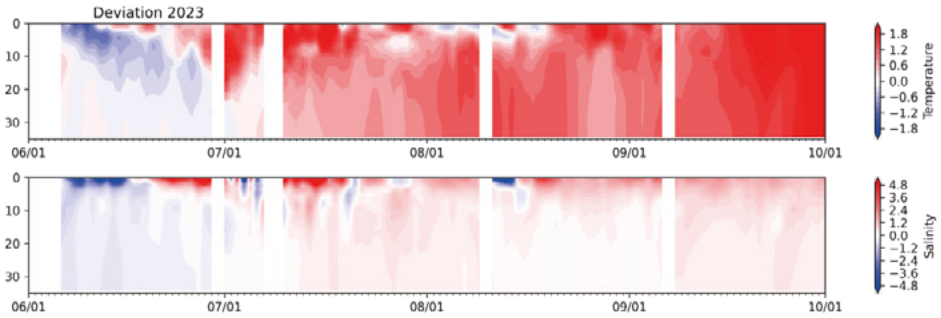


図 17. 大型観測ブイ（Stn.A）における水温（上図），塩分（下図）の期間平均観測結果（2013～2021 年）との偏差の経時変化．

図 18. 八代海赤潮等広域監視システムホームページ

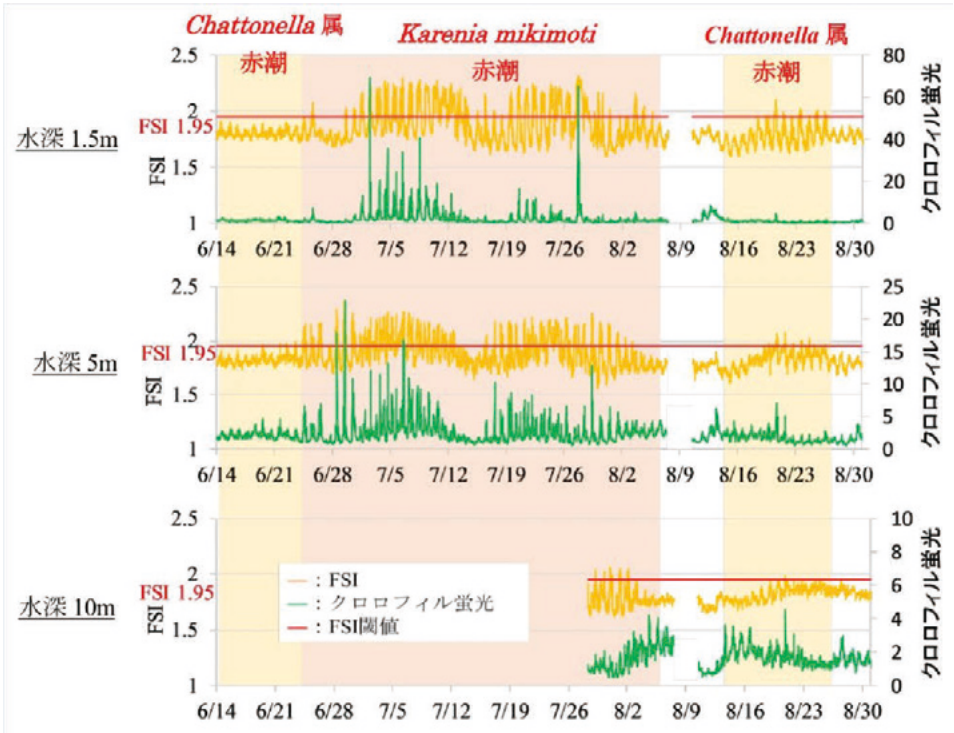


図 19. 楠浦湾の水深 1.5m，5m および 10m の FSI およびクロロフィル蛍光（6 月～8 月抜粋）

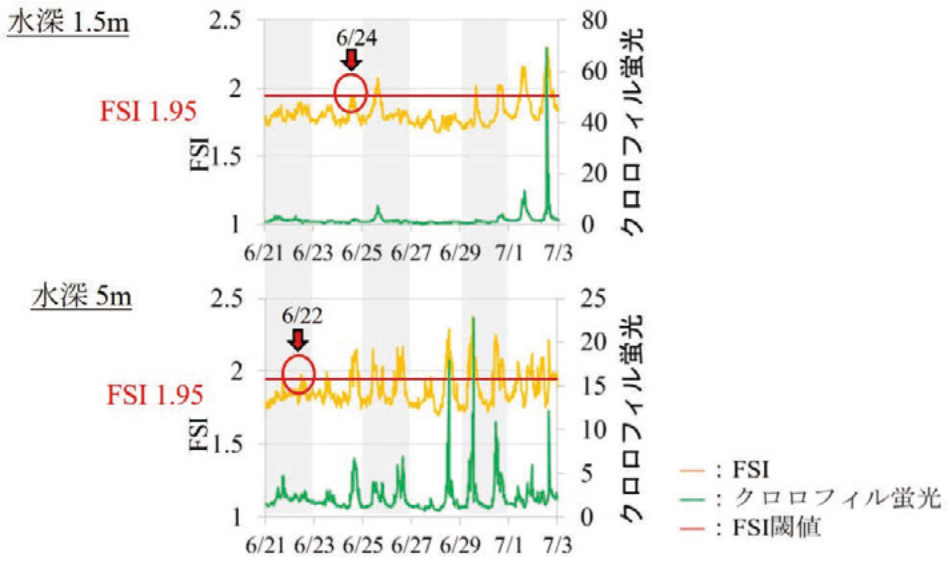


図 20. 楠浦湾の水深 1.5m および 5m の FSI およびクロロフィル蛍光（*K. mikimotoi* の初期発生時期）

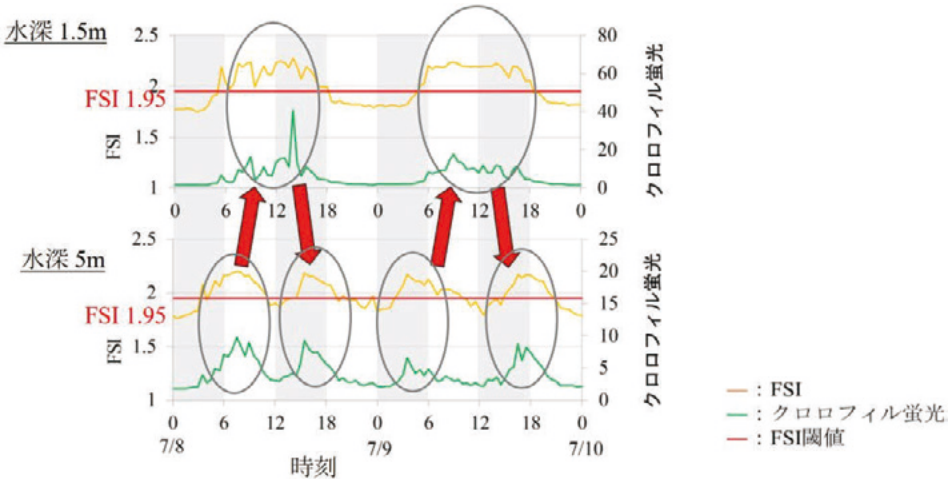


図 21. 楠浦湾の水深 1.5m および 5m の FSI およびクロロフィル蛍光（*K. mikimotoi* の発達時期）

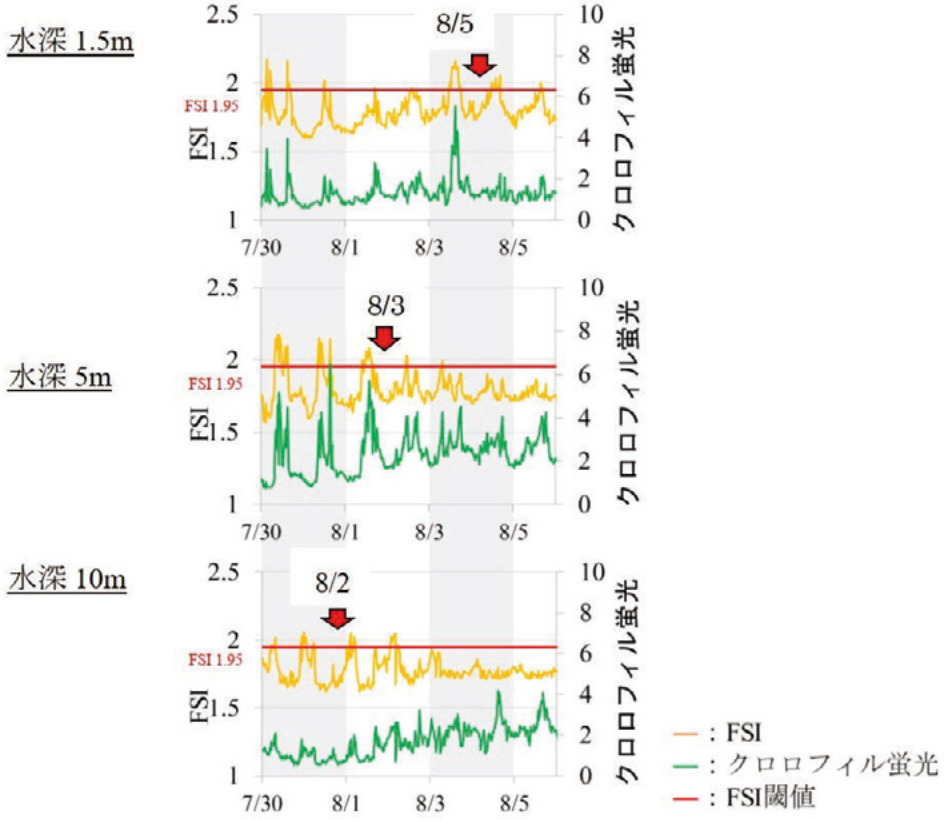


図 22. 楠浦湾の水深 1.5m，5m および 10m の FSI およびクロロフィル蛍光（*K. mikimotoi* の衰退時期）

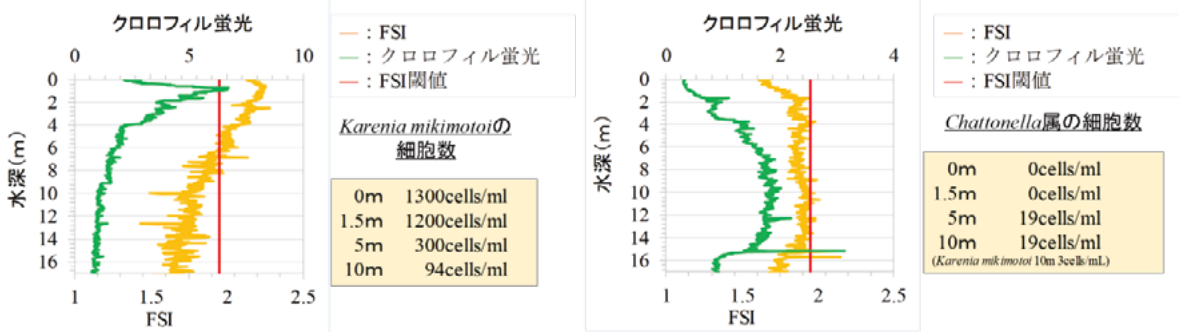


図 23. 楠浦湾における FSI およびクロロフィル蛍光の鉛直分布（左：*K.mikimotoi* の赤潮時（7 月 25 日），右：*Chattonella* 属の赤潮時（8 月 22 日））

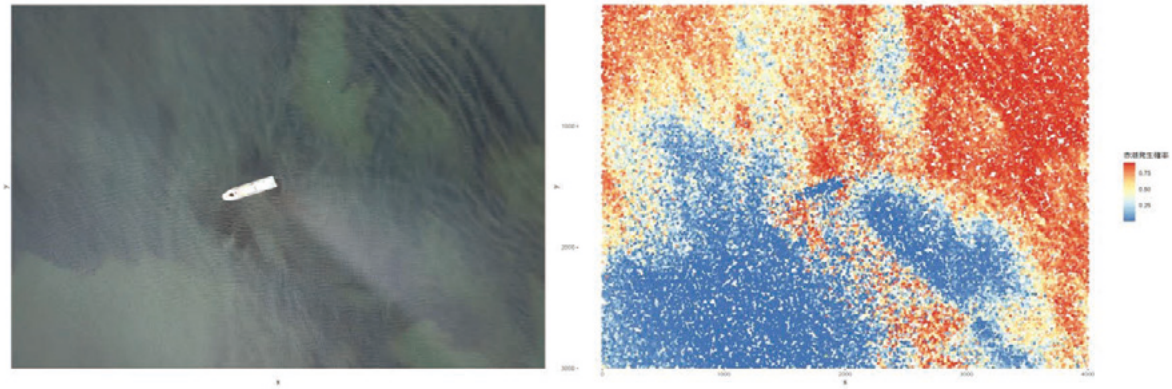


図 24. 赤潮の空撮（左）と判定結果（右）. 暖色ほど赤潮発生確率が高いことを表す.

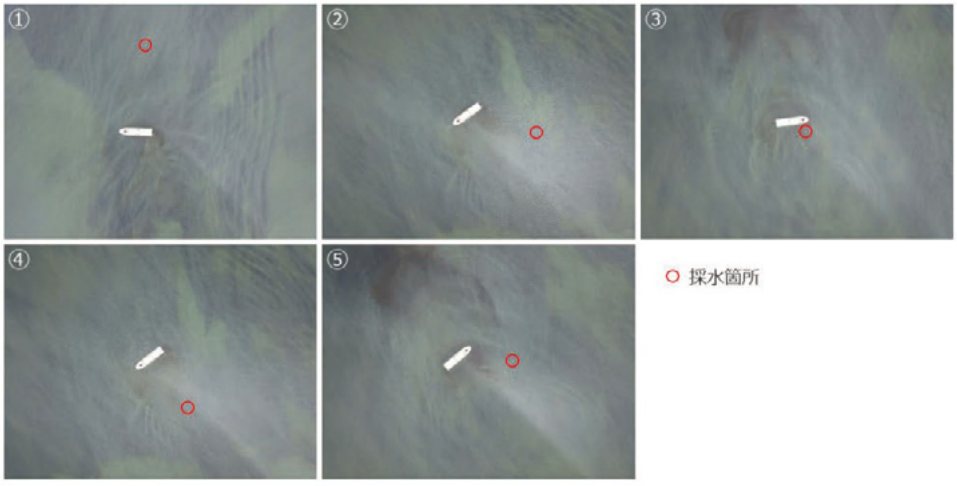


図 25. 誤判別された写真.

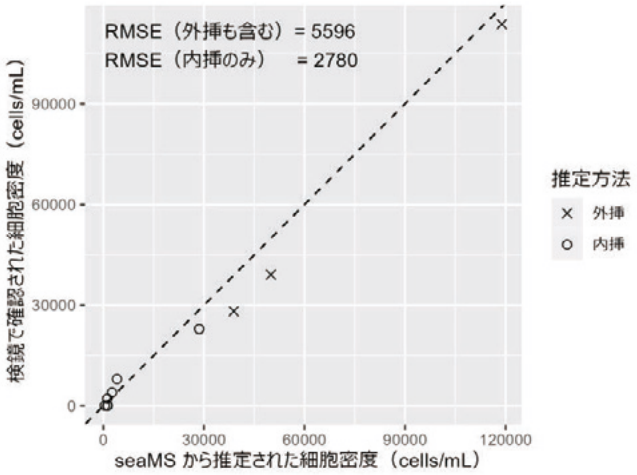


図 26. *K. mikimotoi* 細胞密度の観測値と推定値の比較. 点線は 1:1 を表す.

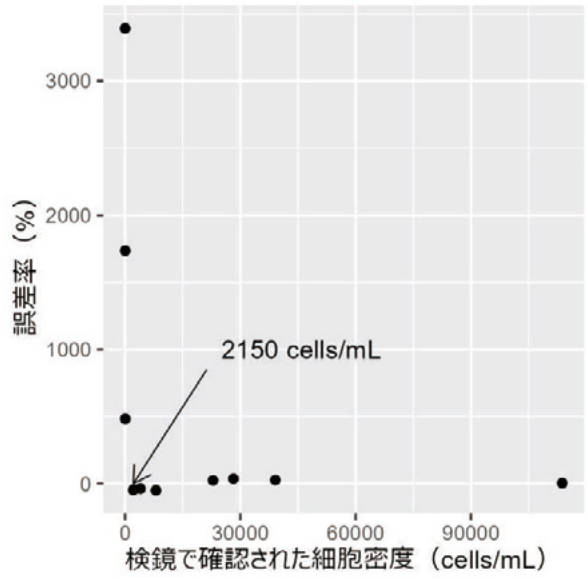


図 27. *K. mikimotoi* 細胞密度の観測値と誤差率.

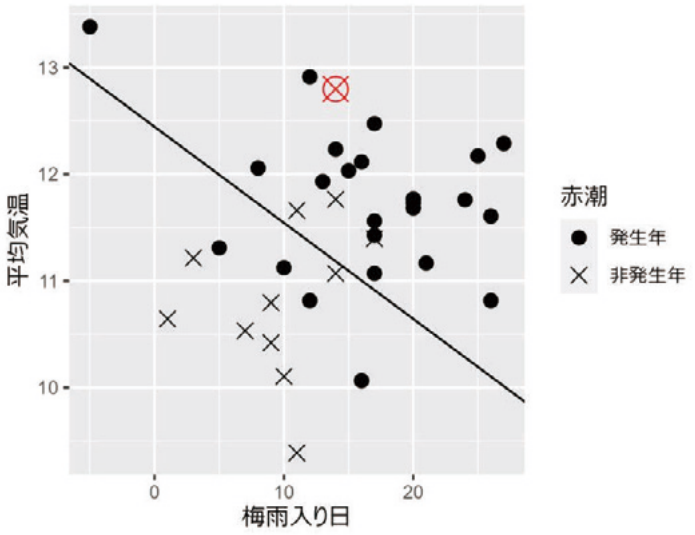


図 28. 梅雨入り日と平均気温の関係. 赤印は今年度のプロットを，実線は判別直線を表す.

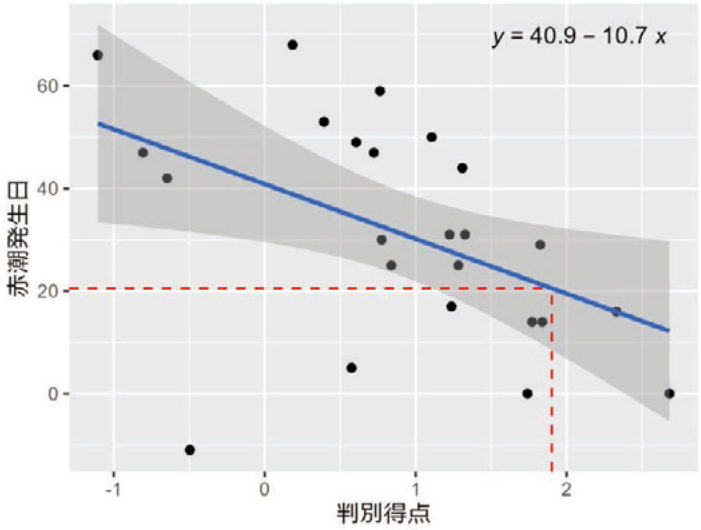


図 29. 判別得点と赤潮発生日の関係. 青線が回帰直線，赤破線が推定結果，網掛けが 95% 信頼区間を表す.

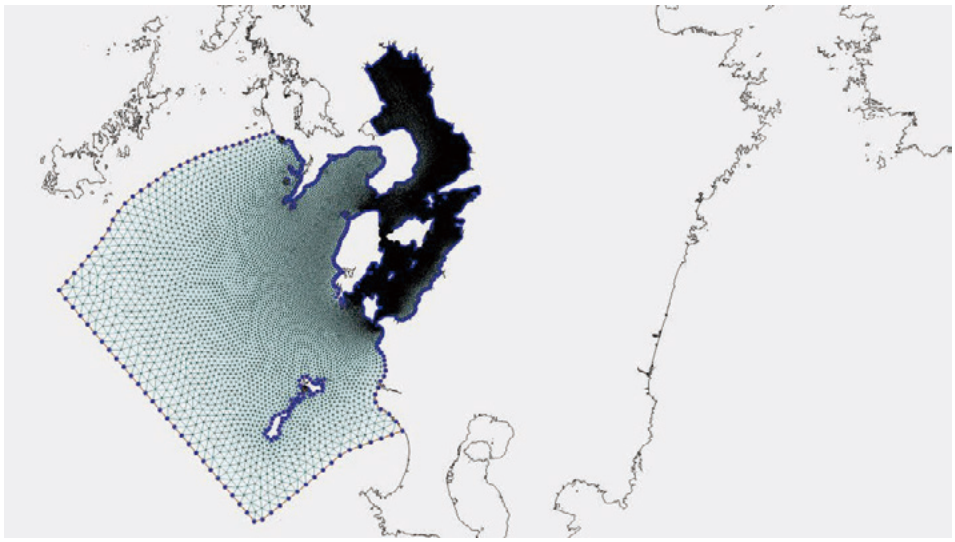


図 30. 八代海流動モデルに使用される格子図（全計算領域）

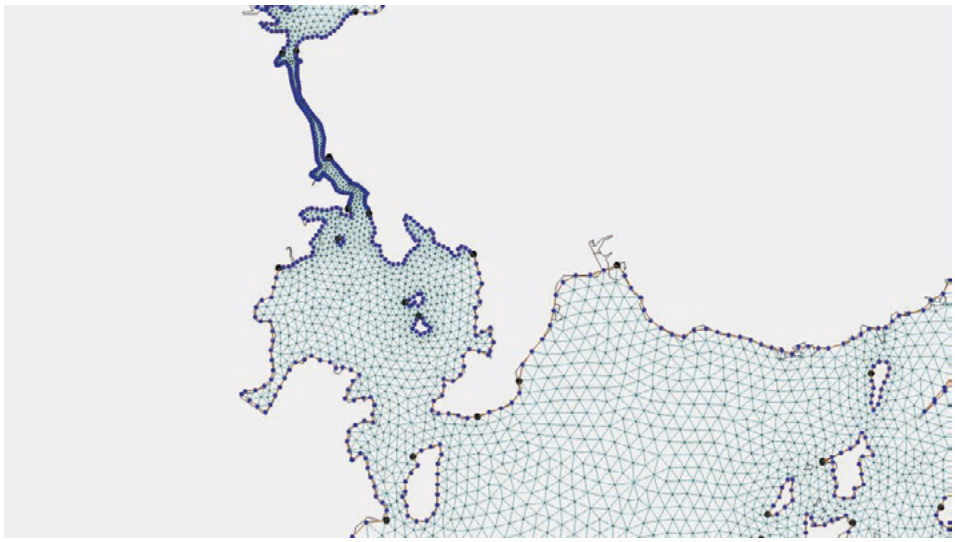


図 31. 八代海流動モデルに使用される格子図（楠浦湾周辺拡大）

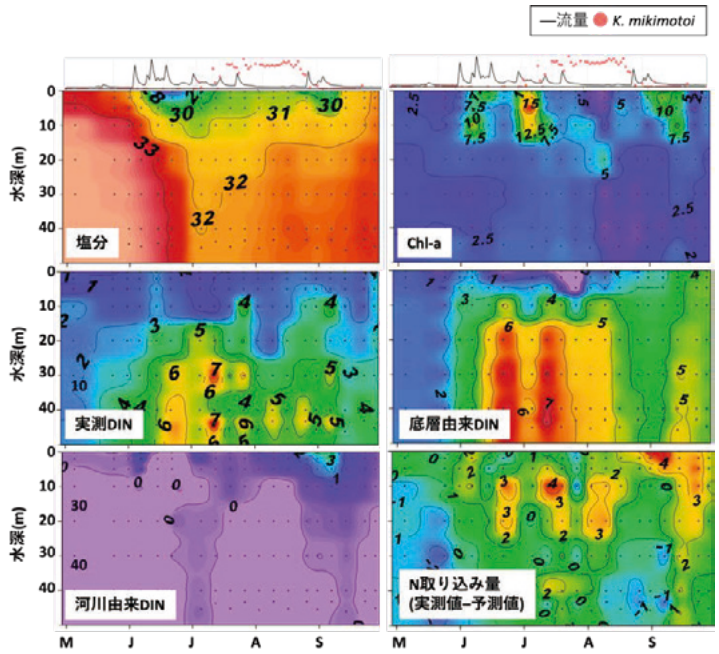


図 32. 2015 年の八代海南部海域における塩分，クロロフィル a 濃度，DIN 濃度の実測値，底層由来の DIN 濃度，河川由来の DIN 濃度および DIN 取込み量の時系列変化.

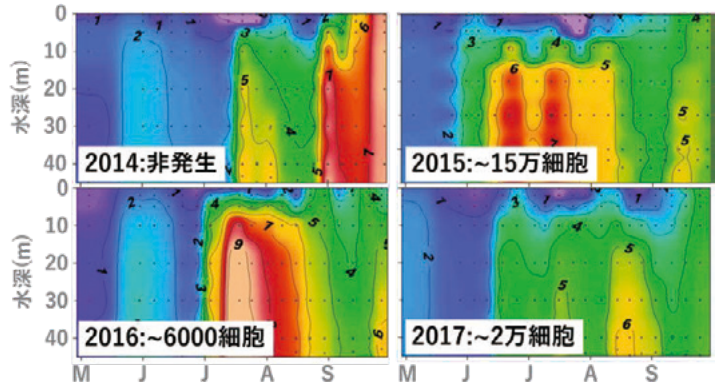


図 33. 2014 年から 2017 年の八代海南部海域における底層由来 DIN 濃度の時系列変化. 図中の細胞数は *K. mikimotoi* の最大細胞数を示す.

２）赤潮の被害軽減手法の開発
ア．魚毒性診断技術の開発

水産研究・教育機構 水産技術研究所（廿日市）
湯浅光貴，西村朋宏，坂本節子
水産研究・教育機構 水産技術研究所（五島）
紫加田知幸，北辻さほ，秋田一樹
水産研究・教育機構 水産技術研究所（横浜）
内田肇
水産研究・教育機構 水産大学校
山﨑康裕
大分県農林水産研究指導センター水産研究部
野田誠，毛利文香，宮村和良
鹿児島県水産技術開発センター
今吉雄二，赤塚麻美
埼玉大学大学院 理工学研究科
西山佳孝，小竹敬久
北里大学 医学部
西槇俊之，勝村啓史，新井雄太，小川元之

１　全体計画

（1）目的

近年，本邦沿岸域において *Karenia mikimotoi* 等赤潮による甚大な被害が頻発している。有害赤潮は長期化することも多く，魚介類のへい死という直接的な被害だけでなく，餌止めなどの対策を講じることによって生じる「間接的な損失」も大きい。一方で，赤潮の魚毒性は赤潮原因プランクトンの生理状態等によって大きく変動することが知られている。そのため，魚毒性が高い時に餌止め等の苦肉の策を限定すれば被害軽減につながるはずである。これまでに，海水のスーパーオキシド（O_2^-）レベルやワムシに対する毒性を指標にした現場赤潮の毒性を計測する技術が開発され，モニタリング項目としての実用が期待されている。しかしながら，現場を想定した条件検討や現場実証試験の蓄積等が不十分であり，現場普及には至っていない。また，有害赤潮による魚介類のへい死機構は未だ全容解明には至っておらず，原因種よって異なる毒因子が魚介類のへい死に関与する可能性があるため，原因種ごとに毒性診断技術を開発する必要がある。*Karenia* 属に関しては魚毒因子が不明であるが，細胞から毒性を含有する画分を抽出できる可能性が見出されている。そこで，本課題では，生化学的・分析化学的な技術等を用いて毒性と相関する因子を見出し，現場へ適用可能な毒性定量法を新たに確立する。既存の毒性診断技術については手法の改良および現場普及を行う。

２　令和 5 年度計画および結果

（1）　目的

全体計画と同じ。

（2）方法

1）新規毒性診断技術の開発

Karenia 属および *Chattonella* 属を対象とした新たな毒性診断技術を開発するために，毒性と相関する因子の探索や定量手法の確立を行った。

① 生化学的手法によるカレニア属の毒因子探索

① -1 血液寒天培地を用いた簡易毒性評価技術の開発

主に *Karenia* 属の毒性を対象とした簡易毒性評価技術の開発を目指して，血液寒天培地を用いた溶血活性検出法の検討を行った。ウマ血液寒天培地（51004，日水製薬株式会社）及びヒツジ血液寒天培地（51062，日水製薬株式会社）を用いて，溶血環の検出および検出感度の比較を行った。まず，各寒天培地について乾熱滅菌済みのパスツールピペットを用いて穴をあけた。この際，1 試料につき 3 穴を作成した。下記に記す各試料を 1 穴につき 65 µL 接種し，20°C のインキュベーターにて 24 時間静置した後，白色 LED ライト板上で血液寒天プレート全体の写真を撮影した。ImageJ を用いて溶血環と穴の半径をそれぞれ 3 回測定して，その比率（溶血環半径／穴半径）の平均値を算出し，溶血比率とした。供試試料は，改変 SWM-3 培地にて培養した *K. selliformis* 培養液（Ks-6 株，14,133 cells mL^{-1}，919 cells/穴），陽性対照区（1％ Triton X-100；改変 SWM-3 培地で希釈して調製），陰性対照区（改変 SWM-3 培地）を用いた。

次に，血液寒天培地を用いた現場海水試料の溶血活性試験を行い，本法が現場試料についても利用可能であるのか否か検討した。2023 年 6 月から 7 月にかけて熊本県・鹿児島県の八代海及び大分県佐伯湾より得た現場海水試料（*K. mikimotoi* を様々な細胞密度で含む）より 45 試料を調製し，ウマ血液寒天培地に接種した。この際，試料を熱処理（100°C，5 分）した試験区も設けた。さらに，現場海水試料中の細菌に由来すると思われる溶血活性（偽陽性）を抑制するための諸条件を検討した。*K. selliformis* 培養液（Ks-6 株，1,600 cells mL^{-1}，104 cells/穴），広島湾より得た現場海水試料（*K. selliformis* や *K. mikimotoi* を含まないが多数の珪藻を含む），*K. selliformis* 培養液と現場海水を等量混合させた試料及び *K. selliformis* 培養液と滅菌ろ過した現場海水を等量混合させた試料を調製し，ウマ血液寒天培地に接種した。試料と陽性対照区（0.25％ Triton X-100）の溶血環の幅を測定し，その比率（試料/陽性対照）の平均値を算出することで，溶血環の比率とした。この際，全ての試料について抗生物質混合液（AM9 ; Provasoli et al. 1959）を添加する試験区（試料 1 mL に対し AM9 を 0.2mL 添加）を追加で設け，4°C 及び 20°C にて 24 時間静置し，各試験区の溶血環の比率を比較した。

① -2 カレニア属の毒性が安定的する条件の探索

K. mikimotoi および *K. selliformis* の毒性因子は不安定であり，毒本体に関する詳細は不明である。令和 5 年度は，*K. mikimotoi* より毒性の高い *K. selliformis* 培養株を使用して，毒性因子を分画・維持するため，培養液のフィルター濾過液や細胞破砕液の毒性が安定する条件を検討した。各試料の毒性は貝類の毒性を大まかに推定可能な溶血試験やワムシへの暴露試験，およびヒメダカへの暴露試験を行うことで評価した。

まず，生細胞の非存在下で毒性が維持される条件を特定するために，*K. selliformis* の培養液（Ks-6 株）を 20℃，12 hL:12 hD，150 µmol m^{-2} s^{-1} の条件で約 4,000 cells mL^{-1} になるよう培養し，超音波破砕液，凍結融解液，ポリカーボネートフィルター（PCF; 10418312, Whatman）濾過液，ガラスフィルター（GF; GF/C，Whatman）濾過液を調製した。各試料 200 mL を 500 mL 容トールビーカーに入れて通気した後，20℃の海水で飼育したヒメダカ 4 尾を収容して最長 6 時間暴露した。次に，GF 濾過液における毒性の保存性を把握するために，上記と同様の条件で 11,300 cells mL^{-1} まで培養した Ks-6 株の GF 濾過液を作製し，調製直後，20℃で 1 日間保存，4℃で 1 日間保存，-20℃で 1 日間保存した試料を作製した。各試料をシオミズツボワムシ（以降，ワムシと表記）および上記と同様にヒメダカ暴露し，6 時間後のへい死率を算出した。また，凍結融解液以外の試料をウマ血液寒天培地に接種し，前述の方法に従い 24 時間後の溶血比率を算出した。ワムシへの暴露試験は，山﨑ほか（2023）の方法に従い実施した。まず，48 ウェルプレート（IWAKI）の各

ウェルに 0.1 mL の改変 SWM-3 培地を添加した後，20℃, 150 μmol m^{-2} s^{-1}，12 hL:12 hD, で 7〜10 日間培養したワムシを 0.1 mL あたり 10 個体になるようピペットで採取して添加した。その後，各試料を 0.8 mL ずつ添加し，各ウェルの最終液量を 1 mL とした。また, 改変 SWM-3 培地のみにワムシを収容し, 対象区とした。48 ウェルプレートは, 20℃, 100 μmol m^{-2} s^{-1} のインキュベーターにて静置し, 暴露開始から 6 時間後のワムシのへい死個体数を光学顕微鏡下で計数して生残率を算出した。

次に，毒性が不安定である原因を調べるため，*K. selliformis* の細胞破砕液を同種培養液に添加した際のヒメダカに対する毒性を調べた。約 7,000 cells mL^{-1} の *K. selliformis* 培養液（Ks-6 株）200 mL を 3,000 rpm, 20℃, 5 分間の遠心分離にかけて集藻し，藻体をハンディソニケーター（UR-20P，株式会社トミー精工）を用いて超音波破砕もしくは 100℃で 10 分間加熱後にハンディソニケーターで懸濁した試料を作製した。各細胞破砕液 1 mL を約 10,000 cells mL^{-1} の *K. selliformis* 培養液もしくは改変 SWM-3 培地 200 mL に添加し，ヒメダカ 4 尾を投入した。試験は 3 回繰り返し行い，暴露 6 時間後のへい死率を調べた。また，同じ試料をウマ血液寒天培地に接種し，24 時間後の溶血環の比率を算出した。

次に，*K. selliformis* の毒成分の熱安定性を調べるために，10,000 cells mL^{-1} の *K. selliformis* 培養株（Ks-6 株）について，培養液，GF 濾過液，GF 濾過液を 100℃で 10 分間加熱した試料を作製し，ヒメダカおよびワムシ，ウマ血液寒天培地に暴露して 6 時間後のへい死率および 24 時間後の溶血環の比率を調べた。ウマ血液寒天培地を用いた試験については，加熱後の GF 濾過液試料を-20，4，20℃で 7 日間保存したのちに同様に試験を行い，試験開始 24 時間後の溶血環の比率を求めた。

最後に, *K. selliformis* の毒成分を安定的に分画する方法を検討するために, *K. selliformis* 培養液（Ks-6 株）の GF 濾過液を固相抽出で分画し, 毒性の有無を調べた。10,200 cells mL^{-1} の *K. selliformis* 培養液 2,000 mL を用いて GF 濾過液を作製し, 固相抽出担体 Diaion HP-20（13607, メルク）を充填したガラスカラムを通過させた。その後，カラムに 50%，70%，100%メタノールの順で各 300 mL を通過させ，溶出液を得た。各溶出液をロータリーエバポレーター（N-1300V-W, 東京理化器械）を用いて乾固させ，滅菌濾過海水 200 mL に溶解し 50%メタノール溶出液，70%メタノール溶出液，100%メタノール溶出液を得た。Ks-6 株培養液，GF 濾過液，50%メタノール溶出液，70%メタノール溶出液，100%メタノール溶出液，改変 SWM-3 培地をヒメダカおよびワムシ，ウサギ赤血球，ウマ血液寒天培地に暴露し，6 時間後の横臥もしくはへい死率，および 1〜24 時間後の溶血度もしくは溶血環の比率をそれぞれ求めた。ウサギ赤血球を用いた溶血アッセイは，ウサギの保存血液（株式会社日本バイオシーラム）を受領後 3 日以内にクリーンベンチ内で 2 mL ずつ 15 mL 容チューブへ分注し，リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を 8 mL 添加した後，均一に懸濁するよう静かに攪拌した。その後，多目的冷却遠心機（CAX-371，株式会社トミー精工）を用いて遠心分離し（420 × *g*，10 分，4℃），上清を取り除いた。また，上清が透き通るまで（最大 3 回）同様の洗浄を繰り返し，洗浄した赤血球は終濃度が 4 %になるように PBS に懸濁した。一方，各分画液を段階的に希釈し，各濃度の分画液を 2 枚の U 底 96 ウェルプレート（Corning）80 μL ずつ分注した。その後，4 %の赤血球懸濁液を 80 μL ずつ各ウェルへ添加し, 2 枚のプレートのうち 1 枚は試料の蒸発防止のためラップで包み，もう 1 枚にはラップの上からアルミホイルを巻いて遮光した。これらのプレートは，20℃のインキュベーター内に明条件（150 μmol m^{-2} s^{-1}）および暗条件（0 μmol m^{-2} s^{-1}）で静置した。5 時間反応後，プレート自体を遠心分離（360 × *g*，10 分，4℃）にかけ，得られた各試料の上清 90 μL を平底 96 ウェルプレート（Corning）に気泡が入らないように注意して回収した。最後に，得られた各試料上清の 480 nm の吸光度を，マイクロプレートリーダー（MULTISKAN GO, Thermo Fisher SCIENTIFIC）を用いて測定した。なお，溶血活性の陽性対照区（PC）には，完全溶血を引き起こす Triton X-100 （富士フイルム和

光純薬株式会社， Polyxyethylene(10)Octylpheny Ether）の 4 %溶液（v/v）を用い，陰性対照区（NC）には改変 SWM-3 培地を用いた。また，試験区の溶血度は次式より算出した。

溶血度（%）=（試料の吸光度 – NC 区の吸光度）/（PC 区の吸光度 – NC 区の吸光度）× 100

ヒメダカの横臥直後もしくは 6 時間生残した個体について，片野固定液による固定もしくは液体窒素で凍結し，鰓組織のパラフィン切片および凍結切片を作製した。パラフィン切片はヘマトキシリン-エオジン（HE）染色をして光学顕微鏡下で観察し，凍結切片については蛍光顕微鏡下でクロロフィル自家蛍光の観察を実施した。

② 分析化学的手法によるカレニアの毒性診断技術の開発

これまでに，*K. mikimotoi* の毒性と相関する化合物を特定するために毒性が異なる *K. mikimotoi* 培養株の液体クロマトグラフ/質量分析装置（LC-MS/MS）分析を実施し，強毒株で多い化合物群を抽出した（湯浅ら 2023）。本課題では，毒性が変化する培養条件で培養した *K. mikimotoi* および *K. selliformis* を LC-MS/MS 分析に供し，毒性と相関する化合物群を探索した。

まず，毒性が変化する培養条件を特定するため，異なる光強度で培養した *K. mikimotoi*（IMR4 株）及び *K. selliformis*（Ks-6 株）をブリに暴露して毒性を評価した。試験は生物種ごとに 2 回実施した。*K. mikimotoi* については，22℃，12 hL:12 hD，170 µmol m^{-2} s^{-1} で増殖させた後，各光強度（1 回目：100, 170, 780 µmol m^{-2} s^{-1}，2 回目：65, 170, 460 µmol m^{-2} s^{-1}）で 4 日間培養した。30 cm 水槽に培養液を 5 L 入れてブリ稚魚（平均体重：1 回目 11 g，2 回目 17 g）を 3 尾収容し，最長 6 時間暴露した。暴露した培養液の細胞密度は 1 回目が 7,000 cells mL^{-1}, 2 回目が 10,000 cells mL^{-1} に設定した。*K. selliformis* については, 22℃, 12 hL:12 hD，150 µmol m^{-2} s^{-1} で増殖させた後，各光強度（50, 150, 825 µmol m^{-2} s^{-1}）で 2 日間（1 回目）もしくは 4 日間（2 回目）培養した。30 cm 水槽に培養液 5 L を入れてブリ稚魚（平均体重：1 回目 0.6 g，2 回目 3.2 g）を 10 尾（1 回目）もしくは 5 尾（2 回目）収容し，最長 6 時間暴露した。暴露した培養液の細胞密度は 1 回目が 2,000 cells mL^{-1}，2 回目が 2,500 cells mL^{-1} に設定した。両種の試験において，DO はエアー調節により 7.5 mg L^{-1} 以上を維持した。暴露中の光強度は 23 µmol m^{-2} s^{-1} であった。各回の試験は 2〜4 回繰り返しで実施した。また, *K. selliformis* については 20℃, 0, 10, 150, 400, 1,000 µmol m^{-2} s^{-1}, 12 hL:12 hD の条件で 3 日間培養し，ヒメダカに暴露した。試験は 3 回繰り返し行い暴露 6 時間後のへい死率を算出した。

上記暴露試験の結果を踏まえて，*K. mikimotoi* 培養株（IMR4 株）および *K. selliformis* 培養株（Ks-6 株）を明条件（150 µmol m^{-2} s^{-1}）で 10 日間，または明条件で 7 日後に暗条件（0 µmol m^{-2} s^{-1}）で 3 日間培養し，各培養液 50 mL を冷凍保存した。湯浅ら（2023）で使用した魚毒性の異なる *K. mikimotoi* 培養株の試料について, 差分解析によるノンターゲット分析により，魚介類の毒性と相関する化合物群を検索し，毒性と相関する化合物群を再抽出した。リストアップされた化合物群について，明もしくは暗培養条件で培養した *K. mikimotoi* および *K. selliformis* の冷凍試料を逆相固相抽出カラムで抽出し, LC-MS/MS を用いて分析した。

③ シャットネラの細胞外多糖と魚毒性の関係性探索

有害赤潮プランクトンが有する細胞外多糖は粘性の原因となり，魚毒性と関与すると考えられている。これまでに，魚毒性が高まる培養条件で O_2^- レベルと細胞外多糖が増加することを明らかにした。O_2^- レベルに加えて細胞外多糖の簡易計測が可能になれば，シ

ャットネラの魚毒性をより正確に把握できると考えられる。そこで，細胞外多糖の詳細な化学的性 *Chattonella* 培養株から細胞外多糖を抽出・精製し，HPAEC-PAD による構成糖分析から毒性に関わる構造を推定した。方法の詳細は下記のとおりである。

1. *Chattonella marina* complex の Ago03 株および Ago04 株を 25℃の改変 SWM-3 培地で 7 日間培養した（25℃，250 μmol m^{-2} s^{-1}，12 hL:12 hD）。400 mL の培養液を 50 mL 容 TPX チューブ 8 本に分注し，超音波破砕機（UR-20P, 株式会社トミー精工）の最小出力（Power control：0）で処理し，グリコカリックスを細胞から遊離させた。
2. 3,500 rpm , 4℃で 5 分間遠心分離し，上清（グリコカリックス画分）を回収した。
3. グリコカリックス画分を限外濾過フィルター（Biomax 300 kDa PBMK07610; Merck Millipore）を装着したアミコン濃縮機（UFSC40001, Merck Millipore）に移し，液量が 5 mL 以下になるまで濃縮した。
4. 濃縮したグリコカリックス画分（3 mg 程度）を 15,000 rpm で遠心し，上清を回収した。
5. 上清を水に対して透析し，その後凍結乾燥にかけることでさらに濃縮した。
6. 濃縮したグリコカリックス画分を 2.5 mL のリン酸緩衝液に溶解し，この内 2 mL をフィルター（孔径 0.45 μm）でろ過した後，Sephadex G-100 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにかけた。
7. 溶出画分は 2 mL ずつ回収し，フェノール-硫酸法により，糖濃度を測定した。
8. 高分子の糖濃度が高い画分を精製グリコカリックスとした。

精製グリコカリックスは水に対して透析後，凍結乾燥により濃縮し，最終的に糖濃度が 1 mg mL^{-1} となるように蒸留水に溶解した。終濃度 2 N トリフルオロ酢酸（TFA）中で，120℃，60 分間の加水分解処理を行った後，遠心エバポレーターで TFA を除去した。得られた糖の加水分解産物を高速液体クロマトグラフィー（Dionex ICS-5000+: Thermo Fisher Scientific）に供して，単糖（フコース，ラムノース，アラビノース，ガラクトース，グルコース，マンノース，キシロース，ガラクツロン酸，グルクロン酸）を検出し，各単糖のモル濃度比を算出した。

2）既存の毒性診断技術のマニュアル改訂と現場普及

これまでに，O_2^-レベルを指標とした魚毒性診断技術およびワムシ毒性試験による毒性診断技術についてマニュアルを作成した（湯浅ら 2023）。しかしながら，本診断技術は一般のユーザーによる現場での実施例はほとんどなく，様々なケースに対応できる手法か否かについて十分に検討されていなかった。本課題では，本手法の実用化に向けて，これらの毒性診断技術について，現場サイドと共同で現場検証を行いながら，手法の簡易化を検討し，参考資料データを取得した。

① 毒性診断技術の現場検証

これまでの研究により，有害赤潮プランクトンによる O_2^-の産生レベルはブリやマダイといった養殖魚に対する毒性の高低と相関し，ワムシへの毒性はアワビへの毒性と相関することは検証されている（山﨑ほか 2023）。しかし，有害赤潮プランクトンの毒性は環境条件によって大きく変化するうえ，水産生物の赤潮プランクトンに対する感受性は生物種や年齢によって大きく異なることが知られている。本課題では，様々な環境条件下における赤潮の O_2^-レベルや一定時間内のワムシのへい死率について，警戒を呼び掛けるための基準値を定めることを目的に，環境条件を計測しながら赤潮海水を様々な年齢の魚介類に暴露し，それらのへい死率と O_2^-レベルおよびワムシのへい死率との関係を定量的に解析した。O_2^-産生レベルを指標とする魚毒性診断技術については，八代海において O_2^-を大量に産生するシャットネラ赤潮が発生した場合，各年齢の複数魚種に対する現場赤潮海水の暴露試験を実施し，魚のへい死率，へい死時間，組織変化等を計測すると同時に O_2^-レベルを計測する計画であったが，シャットネラ細胞密度が暴露試験に必要な

密度を継続しなかったため，未実施となった。

ワムシアッセイによる貝類に対する毒性診断技術の現場検証を行うために，大分県海域で発生した *K. mikimotoi* について，現場で貝類へのへい死率，へい死時間，組織変化等を調べ，同時にワムシへの毒性を計測した。令和 5 年 7 月 25 日 9 時に大分県佐伯湾鶴見ポンツーンにてメガイアワビの稚貝（殻長約 1.0 cm）10 個体が入った虫籠を 4 個ずつ 0, 5, 12 m 層に設置し，現場赤潮海水へ暴露を開始した。暴露後 6 時間おきに各層から虫籠を 1 つずつ回収し，メガイアワビ 10 個体中の衰弱もしくはへい死数を調べた。7 月 25 日 9 時から 26 日 9 時まで 3 時間おきに 0, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12 m 層から採水し，全採水試料について *K. mikimotoi* の細胞数を計数し，細胞密度を求めた。また，6 時間おきに採水した海水をワムシへ暴露し，暴露 2 時間後のへい死率を求めた。また，暴露後 0 および 24 時間の採水試料についてオートアナライザー（QuAAtro, ビーエルテック）により栄養塩濃度分析を実施した。なお，無機態窒素（NO_3-N＋NO_2-N＋NH_4-N）を DIN，リン（PO_4-P）を DIP とした。また，*K. mikimotoi* 赤潮海水の暴露による生残もしくはへい死したメガイアワビの組織解析を実施した。各水深における *K. mikimotoi* の細胞密度を考慮して，水深 12 m で 24 時間暴露後の生残およびへい死個体を片野固定液で固定し，パラフィン切片の HE 染色を行った。

② ワムシ毒性試験の簡易化とマニュアル改訂

既存のワムシ毒性試験による毒性診断技術には，ワムシのピックアップに膨大な時間を要することや生死判定が主観的判断に基づいていることなど，改善すべき点が残されている。本課題では，赤潮藻に暴露されたワムシの遊泳個体のみを計数して生残率を算出する新法の実験条件を確立し，へい死個体数からワムシの生残率を算出する従来法と比較した。

既存のワムシ毒性試験（以下，従来法とする）は，山﨑ほか（2023）の方法に従い実施した。まず，48 ウェルプレート（IWAKI）の各ウェルに 0.1 mL の改変 SWM-3 培地を添加した後，20℃, 150 μmol m^{-2} s^{-1}，および塩分 32 にて 7 日間培養したワムシを 0.1 mL あたり 10 個体になるようピペットで採取して添加した。その後，暴露密度が 10^3 cells mL^{-1} となるよう調整した *K. selliformis*（Ks-6 株）および *K. mikimotoi*（21KmA3AK 株）の細胞浮遊液を 0.8 mL ずつ添加し，各ウェルの最終液量を 1 mL とした。また，改変 SWM-3 培地のみにワムシを収容し，対象区とした。48 ウェルプレートは，20℃，150 μmol m^{-2} s^{-1} のインキュベーターにて静置し，暴露開始から 2 時間後のワムシのへい死個体数を光学顕微鏡下で計数して生残率を算出した。

新規のワムシ毒性試験（以下，新法とする）は，以下の手順で実施した。まず，改変 SWM-3 培地で満たしたシャーレに孔径 100 μm のセルストレーナー（アズワン）を浸漬させた後（図 20AB），20℃, 150 μmol m^{-2} s^{-1}，および塩分 32 にて 7 日間培養したワムシ浮遊液をセルストレーナーに少しずつ注ぎ入れてワムシの濃縮および洗浄を行うとともに，実体顕微鏡下でワムシの個体数を計数して密度を算出した。次に，暴露密度が 10^3 cells mL^{-1} となるよう調整した *K. selliformis*（Ks-6 株）および *K. mikimotoi*（21KmA3AK 株）の細胞浮遊液を 24 ウェルプレート（IWAKI）の各ウェルに 0.8 mL ずつ添加した。その後，暴露密度が 40 individuals mL^{-1} となるよう調整したワムシ浮遊液を 0.2 mL ずつ添加し，各ウェルの最終液量を 1 mL とした。また，改変 SWM-3 培地のみにワムシを収容し，対象区とした。24 ウェルプレートは，20℃，150 μmol m^{-2} s^{-1} のインキュベーターにて 2 時間静置し，暴露開始から 2 時間後における 0.5 mL の試料に含まれるワムシの遊泳個体数および全個体数を実体顕微鏡下でそれぞれ計数し，生残率を算出した。

③ スーパーオキシド検出法のマニュアル改訂および実用化

スーパーオキシドレベルを指標とした赤潮の魚毒性推定マニュアルについてシャットネラの O_2^-産生に関する室内実験を行い，参考資料データを追加することを目的とした。*Chattonella marina* complex の無菌培養株（4KGY 株）を 6 段階の温度（17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30℃），450 μmol m^{-2} s^{-1}，12 hL:12 hD の光条件で前培養した。その後，対数増殖期の細胞を異なる塩分（15, 25, 33 psu）の培地へ植え継ぎ，増殖が停止するまで各温度で培養した。培地は Mn 無添加の改変 SWM-3 培地を用いた。培養開始後，1〜3 日おきにサンプリングして，発光法による O_2^-レベルの計測及び検鏡による細胞計数を実施した。

スーパーオキシド検出法による魚毒性診断技術を現場赤潮のモニタリング項目として実用するために，八代海でシャットネラが増殖したタイミングで化学発光法による O_2^-レベルの計測を赤潮モニタリング時に研究サイド（水産技術研究所）と現場サイド（鹿児島県水産技術開発センター）が共同で実施した。令和 5 年 6 月 13 日，22 日，30 日，10 月 3 日，11 月 14 日，12 月 14 日の鹿児島県水産技術開発センターによる定期赤潮調査時に図 23A に示した 5 点における採水試料の O_2^-レベルを計測した。また，令和 5 年 6 月 29 日〜7 月 3 日，5 日，12 日，13 日に東町漁業協同組合の協力を得て，水産技術研究所による赤潮モニタリングを実施し，図 23A に示した 5 点における採水試料の O_2^-レベルを計測した。また，現場シャットネラ赤潮の O_2^-レベルが維持される時間を検討するために，7 月 5 日に採水した試料のうち，楠浦，嵐口，幣串の 0，2 m の海水について O_2^-レベルを採水直後および採水の 3〜5 時間後に計測した。採水の 3〜5 時間後の計測に使用した海水試料は，採水後に現場海水を満たしたクーラーボックス内へ試料の入った容器ごと投入し，計測まで保管した。

(3) 結果および考察

1) 新規毒性診断技術の開発

① 生化学的手法によるカレニア属の毒因子探索

① -1 血液寒天培地を用いた簡易毒性評価技術の開発

ウマ血液寒天培地及びヒツジ血液寒天培地について，溶血環の検出感度を比較したところ，両方の寒天培地で *K. selliformis* 培養液の溶血活性は検出可能である一方で，前者の検出感度の方が後者のそれと比較して高いことが明らかとなった（図 1）。したがって，以降の試験にはウマ血液寒天培地を使用することとした。

次に，熊本県・鹿児島県の八代海及び大分県佐伯湾より得た，*K. mikimotoi* 細胞を様々な密度で含む 45 現場海水試料について溶血活性試験を行い，本法が現場試料についても利用可能であるか否か検討した。その結果，1 試料に設けた 3 穴の試験区全てで溶血活性が検出できない場合や（図 2A），3 穴全てで溶血活性が検出できても試料を熱処理すると活性が検出できない場合等（図 2C），結果が安定しない事例が多々見られた。この際，各穴において細菌の増殖が見られると共に，溶血環が検出される場合があったこと（図 2B, D），3 穴とも溶血環が検出された試料を熱処理すると，溶血環が非検出になるとともに，細菌の増殖も確認されなかった（図 2C, D）。これより，細菌に由来すると思われる溶血活性（偽陽性）が，現場海水試料を扱う際には問題となることが明らかとなった。その他にも，*K. mikimotoi* 細胞を比較的多く含む試料（6,950 cells mL^{-1}）においても溶血活性が見られなかったことより，本種の溶血活性を検出するには，より高い細胞密度が必要であると考えられた。次に，細菌由来と思われる溶血活性を抑制する手法を検討するために，広島湾より得た現場海水試料（*K. selliformis* や *K. mikimotoi* を含まないが多数の珪藻を含む）を用いた溶血試験を行った。その結果，細菌由来と思われる溶血活性は，試料への抗生物質混合液（AM9）の添加もしくは 4°C で 24 時間静置することにより抑えられることが示唆された（図 3）。ただし，本試験で得られた細菌由来と思われる溶血活性は非常に弱かったことや，本試験は 1 試料のみの検討であったことから，今後の更な

る検討が必要と考えられた。

① -2 カレニア属の毒性が安定する条件の探索

Karenia selliformis（Ks-6 株）の培養液，超音波破砕液，凍結融解液，ポリカーボネートフィルター（PCF）濾過液，ガラスフィルター（GF）濾過液をヒメダカに暴露した結果，培養液では 6 時間以内に全てのヒメダカがへい死し，GF 濾過液では 6 時間以内に約 25%のヒメダカがへい死した（図 4A）。それ以外の暴露液では全て 6 時間生残した（図 4A）。ウマ血液寒天培地に対する溶血活性は，GF 濾過液および超音波破砕液で検出されたが，PCF 濾過液では認められなかった（図 4B）。これらの結果から，*K. selliformis* の毒性物質および溶血活性物質は GF 濾過によって細胞と分離した状態で回収できることが明らかとなった。また，溶血活性は，超音波破砕液でも検出されると共に，GF 濾過液のそれと比較して強い活性が見られたことから，溶血活性には複数物質が関与している可能性が考えられた。次に，GF 濾過液で毒性および溶血活性が残存することが明らかとなったため，毒性の保存性を検討した結果，ヒメダカは全ての試験区で 6 時間生残した（図 5A）。ワムシは GF 濾過液作製直後の試料で全ての暴露個体がへい死したが，各温度で 1 日間保存した試料では毒性が消失し，全て 6 時間生残した（図 5B）。溶血活性についても，GF 濾過液作製直後の試料で溶血環が確認されたが，各温度で 1 日間保存すると溶血活性は残存するもののおよそ 1/2 程度に減衰することが明らかとなった（図 5C）。ヒメダカが GF 濾過液作製直後の試料でもへい死しなかった原因として，*K. selliformis* の毒成分が極めて不安定であり，濾液作製過程で毒成分量がヒメダカの致死量を下回った可能性が考えられた。また，毒成分はいずれの温度においても少なくとも 1 日間の保存で減衰することが判明した。

次に，毒性が不安定である原因を調べるため，*K. selliformis* 培養液に *K. selliformis* の細胞破砕液を添加した結果，培養液および培養液に熱処理した破砕液を添加した試料で全てのヒメダカが 6 時間以内にへい死し，培養液に超音波破砕液を添加した試料では約 40%のへい死率であった。それ以外の暴露液では全てのヒメダカが 6 時間生残した（図 6A）。この結果から，*K. selliformis* の細胞破砕液は *K. selliformis* 培養液の毒性を減衰させること，熱処理によって毒性の減衰効果がなくなることが明らかとなった。したがって，*K. selliformis* の毒成分は熱によって失活する自身の細胞内因子よって分解する可能性が考えられた。一方で，溶血活性は，培養液と培養液に超音波破砕液を添加した試料及び培養液に熱処理した破砕液を添加した試料の全てで同程度の溶血環の比率を示した（図 6B）。また，*K. selliformis* の毒成分の熱安定性を調べた結果，ヒメダカは培養液と GF 濾過液では全て 6 時間以内にへい死したが，加熱した GF 濾過液では全個体が生残した（図 7A）。ワムシは培養液で全個体へい死，GF 濾過液で 56%の個体がへい死し，加熱した GF 濾過液では全個体 6 時間生残した（図 7B）。一方で，溶血活性は，培養液と GF 濾過液，加熱 GF 濾過液の全てで検出され，加熱によって活性が 1/2 程度に減衰することが明らかとなった（図 7C）。また，加熱後に 20, 4, -20℃で保存した GF 濾過液の試料については，7 日間その活性を維持することが可能であった（図 7D）。以上の結果から，*K. selliformis* の毒成分を減衰させる因子だけでなく，ヒメダカやワムシに対する毒因子本体も加熱によって失活することが明らかとなった。一方で，溶血活性物質は，熱に安定であることが示され，試料を加熱すると少なくとも 7 日間は保存可能になることが明らかとなった。したがって，ヒメダカやワムシに対する毒成分と溶血活性物質は，異なる物質が関与する可能性が示唆された。

上記の結果から，*K. selliformis* のヒメダカやワムシに対する毒成分は PCF を通過しないこと，GF 濾過液の状態では毒性が長時間保持されないこと，細胞内因子によって失活することが明らかとなったため，安定的に保存するためには毒性を減衰させる因子と分

離させる必要があると考えられた。そこで，疎水性物質を吸着する担体を使用した逆相固相抽出を行った。*K. selliformis* 培養液および各分画液（50%，70%及び 100%メタノール溶出液）ならびに GF 濾過液をヒメダカおよびワムシに暴露した結果，ヒメダカは培養液で 83%，100%メタノール溶出液で 87%のへい死率であった。それ以外の分画液では全個体が 6 時間生残した（図 8A）。ワムシは，培養液および GF 濾過液で全ての個体がへい死し，100%メタノール溶出液で 50%のへい死率であった（図 8B）。それ以外の分画液では全ての個体が 6 時間生残した（図 8B）。また，ヒメダカ鰓のパラフィン切片について組織解析を行った結果，*K. selliformis* 培養液と 100%メタノール溶出液を暴露した個体では改変 SWM-3 培地に比べて，鰓組織の鰓弁上皮とその基底部からの細胞剥離が顕著に認められた（図 9）。その他の組織として，肝臓，腎臓など観察したが顕著な病変は認められなかった。また，ヒメダカの培養液暴露区について，鰓の凍結切片の蛍光顕微鏡観察を実施した結果，僅かにクロロフィル自家蛍光が認められたが，細胞の形態は維持しておらず（図 10），*K. selliformis* 細胞は鰓へほとんど付着しないと考えられた。上記メタノール溶出液の溶血活性を調べた結果，ウマ血液寒天培地およびウサギ赤血球において，70%および 100%メタノール溶出液で明確に検出され，両試験において 100%メタノール溶出液の活性は 70%メタノール溶出液のおよそ 10 倍高かった（図 11）。なお，本分画液の溶血活性物質が，過去に数種の鞭毛藻類から見出された光依存型溶血活性物質（Kuroda et al. 2005; Miyazaki et al. 2005）である可能性を考慮して，ウサギ血液を用いた溶血試験については明および暗条件にて実施したが，両条件間で明確な差は確認されなかった（図 11AB）。したがって，*K. selliformis* が有する溶血活性物質は光非依存的に赤血球を溶血させることが示唆された。

以上の結果から，*K. selliformis* の毒成分は疎水的性質を有するために固相抽出によって分画可能であり，分画作業には数日間を要しているが毒性を高い状態で維持していたため，毒成分を濃縮した状態で安定的に分画できることが判明した。これはメタノール溶出によって毒成分を失活させる因子が分離もしくは失活したことが要因であると考えられる。また，100%メタノール溶出液は培養液と同様に鰓組織の損傷を生じさせたことから，*K. selliformis* の毒成分は細胞から遊離した状態でも毒性および溶血活性を発揮できると考えられた。

② 分析化学的手法によるカレニアの毒性診断技術の開発

異なる光強度で培養した *K. mikimotoi* をブリ稚魚に暴露した結果，170 μmol m^{-2} s^{-1} で最も毒性が強く，それよりも低いもしくは高い光強度で培養した場合，毒性が低下することが分かった（図 12）。実環境中で本種は昼間，50～300 μmol m^{-2} s^{-1} の深度層に集積して光合成活性を高く維持することが知られており（Aoki et al. 2017; Shikata et al. 2017），生理的に好ましい光条件下で魚毒性が高まると考えられた。一方で，*K. selliformis* については，培養光強度と魚毒性との間に明確な関係性は観察されなかった（図 13）。そこで，*K. selliformis* については異なる光強度で培養後，ヒメダカに暴露した。その結果，150, 400 μmol m^{-2} s^{-1} では全ての個体がへい死したのに対し，0 μmol m^{-2} s^{-1} では全ての個体が 6 時間生残し，10 μmol m^{-2} s^{-1} では 16%のへい死率であった。また，1,000 μmol m^{-2} s^{-1} では僅かに毒性が低下し，75%のへい死率であった（図 14）。したがって，*K. selliformis* は少なくともヒメダカに対して 10 μmol m^{-2} s^{-1} 以下の培養光強度で毒性が低下することが示唆された。

魚毒性の異なる *K. mikimotoi* の培養株について，差分解析によるノンターゲット分析により魚介類の毒性と相関する化合物群として *m/z* 490.3, *m/z* 518.4, *m/z* 546.4 を見出した。また，毒性の異なる株間で毒性と相関を示さない化合物群として *m/z* 745, 773 を検出した。これらの化合物群についてそれぞれ，明もしくは暗条件培養により毒性が異なる *K.*

mikimotoi および *K. selliformis* 凍結試料の LC-MS/MS 分析を行った。*K. mikimotoi* の暗条件培養試料は明条件培養試料と比較して全体的にトータルイオンクロマトグラムの強度が減少しており，毒性と相関性を示さない化合物群の強度は 30-50％に対し，相関性を示した化合物群は約 10％であった（図 15)。*K. selliformis* の明もしくは暗条件培養試料においても同様に相関性を示す化合物群が大幅に減少した（図 15)。明条件で培養した *K. mikimotoi* と *K. selliformis* 間で毒性と相関性を示す化合物群を比較すると，毒性の高い *K. selliformis* の方が *K. mikimotoi* の約 3 倍高い強度で検出された（図 15)。以上の結果から，*K. mikimotoi* の異なる毒性の培養株を用いた解析から毒性と相関を示す化合物群として見出された *m/z* 490.3，*m/z* 518.4，*m/z* 546.4 は，毒性が変化する培養条件においても *K. mikimotoi* と *K. selliformis* の両種で毒性と相関することが示され，カレニア属の魚毒性に関与する化合物群である可能性が示唆された。

③ シャットネラの細胞外多糖と魚毒性の関係性探索

シャットネラ強毒株 Ago03 および弱毒株 Ago04 を培養し，超音波処理による抽出，限外ろ過による濃縮，透析による脱塩によりグリコカリックス画分を調製した。これをゲルろ過クロマトグラフィーに供したところ，画分 25～40 前後に高分子のシングルピークとして精製グリコカリックス画分が得られた（図 16)。Ago03 株と Ago04 株の精製グリコカリックス画分がほぼ同じ位置に溶出されたことから，グリコカリックスの分子サイズはこれらの 2 つの株間で差がないことがわかった（図 16)。構成単糖の割合はモル比でガラクトースが Ago03 株で 26.3%，Ago04 株で 24.6%と一番多く，次いでラムノースが Ago03 株で 16.9%, Ago04 株で 16.2%, フコースが Ago03 株で 15.6%, Ago04 株で 18.6%, マンノースが Ago03 株で 16%，Ago04 株で 15.5%と含有が多かった。またキシロースとグルクロン酸も Ago03 株と Ago04 株で 10%前後含有されていた。グルコースは 3%前後と含有が少なく，アラビノースとガラクツロン酸は 0.5%以下と含有量が非常に少なかった（図 17)。以上の結果から，強毒株と弱毒株間で構成糖の種類およびこれらの比率に大きな差がないことが明らかとなった。今後，細胞粘性に関与することが考えられる硫酸基量の違いについて調べる必要がある。

2）既存の毒性診断技術のマニュアル改訂と現場普及

① 毒性診断技術の現場検証

大分県佐伯湾鶴見ポンツーンにおける令和 5 年 7 月 25 日 9 時から 26 日 9 時の *K. mikimotoi* はおよそ 5 m 以深に分布しており，日周鉛直移動はほとんど観測されなかった。最高細胞密度は 7 月 25 日 15 時における 12 m 層の 702 cells mL^{-1} であり，以降，細胞密度は減少して 7 月 26 日 9 時における 12 m 層の細胞密度は 170 cells mL^{-1} であった（図 18A)。溶存無機態窒素（DIN）濃度は，7 月 25 日と 26 日ともに全層で *K. mikimotoi* の半飽和定数である 0.78 μM（山口 1994）を上回っていたが，溶存無機態リン（DIP）濃度は 7 月 25 日と 26 日ともにほとんどの水深で *K. mikimotoi* の半飽和定数である 0.14 μM（山口 1994）を下回っていた（図 18B)。ワムシの暴露試験の結果，0 m の海水ではほとんどへい死しなかったが，5 m および 12 m の海水で 50～70%程度のへい死が確認された（図 18C)。メガイアワビにおいても，0 m の海水ではほとんど衰弱およびへい死しなかったが，5 m および 12 m の海水で約 40%の衰弱およびへい死が確認された（図 18D)。また，水深 12 m の *K. mikimotoi* を含む海水で 24 時間暴露したメガイアワビの生残個体およびへい死個体の組織解析を行った結果，メガイアワビのへい死個体である鰓組織は，生残した個体の鰓組織に比べて鰓弁上皮全体の組織崩壊が顕著に認められ，暴露による鰓への影響を確認できる結果が得られた（図 19)。以上の結果から，試験期間の *K. mikimotoi* を含む海水は衰退過程にあり，その原因の一つとしてリン欠乏が考えられた。この時，*K. mikimotoi*

を含む海水は十分にメガイアワビ稚貝をへい死させる毒性を有しており，その毒性はワムシへの暴露試験によって簡易的に検出することができた。今年度は赤潮の衰退期のみでの試験実施であったが，今後は増殖期や定常期の赤潮においても実施することで，異なる毒性を有する *K. mikimotoi* 赤潮のワムシやアワビに対する影響を調べる必要があると考えられた。

② ワムシ毒性試験の簡易化とマニュアル改訂

ワムシ毒性試験の簡易化を目的として，*K. selliformis*（Ks-6 株）および *K. mikimotoi*（21KmA3AK 株）をワムシに 2 時間暴露し，従来法と新法で得られた結果を比較した。その結果，従来法と新法による *K. selliformis*（Ks-6 株）暴露区のワムシ生残率は，それぞれ 3%および 11%であった。また，従来法と新法による *K. mikimotoi*（21KmA3AK 株）暴露区のワムシ生残率は，それぞれ 87%および 86%であった（図 20C）。よって，ワムシ毒性試験の新法は，従来法と同等の毒性リスク評価が可能であった。

一方，ワムシ毒性試験の簡易化という観点では，ワムシの生死判定に実験者間の差異が現れ易い従来法に比べ，ワムシの遊泳個体を計数する新法では，より客観的なデータを取得することが可能であると考えられる。また，新法ではワムシを 10 個体ずつピペットで採取する必要がないため，実験手技の容易さも長所として挙げられる。しかしながら，ワムシの計数を行う機会が従来法より増える点については，短所となり得ると考えられる。なお，セルストレーナーを用いたワムシの濃縮と洗浄については，ワムシ浮遊液中に含まれる残餌や糞などを容易に取り除くことができるため，従来法で毒性試験を実施する際にも導入することが望ましいと考えられた。

今後，現場調査と室内実験の両面から更なる検討を行い，新法の有効性を検証する必要がある。また，現場で多検体の迅速かつ正確な毒性リスク評価を実現するために，新法を更に簡便化した試験方法の検討も進める必要がある。

③ スーパーオキシド検出法のマニュアル改訂および実用化

Chattonella のスーパーオキシド（O_2^-）産生に及ぼす，水温と塩分の影響を調べた。*Chattonella* は 17.5℃及び 30℃の 15 psu 以外の水温・塩分条件で増殖した（図 21）。増殖速度は 25℃，25 psu で最高（1.0 divisions day^{-1}）となり，この水温・塩分条件から遠ざかるほど低下した。細胞密度（47,833 cells mL^{-1}）は 22.5℃，25 psu で最高となったが，その 80%以上の値が低温（17.5℃）や低塩分（15 psu）の一部を除く，幅広い条件で認められた（図 21）。培養液の O_2^-レベル（試験期間中の最高値）は 22.5℃, 25 psu（1.1×10^7 Relative Luminescence Units; RLU）で最大となったが，17.5℃及び 30℃，15 psu を除く全ての条件でブリ当歳魚をへい死させる致死 O_2^-レベル（$>10^6$ RLU）（Shikata et al. 2021）に達した（図 22）。また，致死 O_2^-レベルの持続日数は 20℃，15 psu（24 日間）及び 22.5℃，15 psu（21 日間）で，他の条件よりも圧倒的に長かった（図 22）。細胞あたりの O_2^-レベルは 20℃，25 psu で最高となったが，20℃，33 psu 及び 27.5℃，25 psu においても最高値の 90%以上と高かった（図 22）。増殖速度もしくは最高細胞密度と O_2^-の各パラメータとの間でスピアマンの順位相関係数を算出して相関分析（有意水準 : $p<0.05$）を実施した。増殖速度は培養液の O_2^-レベルと有意な正の相関（$\rho=0.628$）が認められたが，細胞あたりの O_2^-レベルや致死 O_2^-レベルの持続日数とは相関がなかった。最高細胞密度は培養液の O_2^-レベル（$\rho=0.876$）や細胞あたりの O_2^-レベル（$\rho=0.503$）と有意な正の相関が認められたが，致死 O_2^-レベルの持続日数とは相関がなかった。これらの結果より，増殖に適した水温・塩分条件下において O_2^-産生が活発に行われる傾向にあるが，高い産生レベルの維持には他の要因が大きく影響する可能性が考えられた。次に，得られたデータを用いて，培養液の O_2^-レベル（max O_2^-）を目的変数，水温（*T*，℃）及び塩分（*S*，psu）を説明変数と

して重回帰分析を行った。得られた重回帰式は以下のとおりで，重回帰係数 R は 0.825，有意確率は 0.10 であった。下式は当てはまりが良くなかったので，今後，塩分条件を増やす等の措置が必要である。

$$\max O_2^- = -54377400.03+3548003.221T-2249.632T^3+369541.532S-353.016S^3+377.378TS^2$$

次に，八代海において O_2^- レベルの計測を赤潮のモニタリングで実用した。鹿児島県水産技術開発センターによる O_2^- レベルのモニタリングの結果，*Chattonella* が 10 cells mL^{-1} 以上検出された（図 23C）6 月 22 日 Stn. 12 においてブリ当歳魚をへい死させる致死 O_2^- レベル（Shikata et al. 2021）である 10^6 RLU に近い O_2^- レベルが検出された（図 23B）。一方で，*Chattonella* がほとんど検出されていない（図 23C）10 月 3 日，11 月 14 日，12 月 14 日に計測した O_2^- レベルは全採水地点で極めて低い値を示した（図 23B）。また，幣串，御所浦島，嵐口，樋島東，姫戸における *Chattonella* 細胞密度は 0~10 m 層にかけて高く（図 23D），O_2^- レベルも 0~10 m 層で高い傾向にあった（図 23E）。また，7 月 2 日の御所浦島 0 m，7 月 3 日の嵐口 0 m，樋島東 0 m，姫戸 0 m，7 月 13 日の姫戸 2, 5, 10 m の海水では O_2^- レベルが 10^6 RLU を超えた（図 23E）。これらの赤潮海水は，*Chattonella* による魚類のへい死リスクが極めて高いと判断されたため，SNS を用いて関係各県市の赤潮担当者や漁業協同組合に O_2^- レベルの情報共有を行った。また，7 月 5 日の楠浦，嵐口，幣串における 0, 2 m 層の海水を用いて，現場シャットネラ赤潮の O_2^- レベルが維持される時間を検討した結果，クーラーボックスで 3 もしくは 4 時間保存後に再計測した楠浦および嵐口の *Chattonella* を含む海水では O_2^- レベルがやや増加もしくはやや減少した。一方で，クーラーボックスに保存後 5 時間後に再計測した幣串の海水では O_2^- レベルが 0, 2 m 共に 10 倍以上減少した（図 24）。したがって，クーラーボックス内で 5 時間以上保管すると，大幅に O_2^- レベルが変化する可能性が考えられた。今後は，室内で赤潮海水の保存方法を詳細に検討する必要がある。

引用文献

Aoki K, Kameda T, Yamatogi T, Ishida N, Hirae S, Kawaguchi M, Syutou T. Spatio-temporal variations in bloom of the red-tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi* in Imari Bay, Japan, in 2014: factors controlling horizontal and vertical distribution. *Mar. Poll. Bull.,* 2017; **124**: 130-138.

Kuroda A, Nakashima T, Yamaguchi K, Oda T. Isolation and characterization of light-dependent hemolytic cytotoxin from harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Comp. Biochem. Physiol. Part-C: Toxicol. Pharmacol.* 2005; **141**: 297-305.

Miyazaki Y, Nakashima T, Iwashita T, Fujita T, Yamaguchi Y, Oda T. Purification and characterization of photosensitizing hemolytic toxin from harmful red tide phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat. Toxicol.* 2005; **73**: 382-393.

Provasoli L, Shiraishi K, Lance J R. Nutritional idiosyncrasies of Artemia and Tigriopus in monoxenic culture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1959; **77**: 250-261.

Shikata T, Onitsuka G, Abe K, Kitatsuji S, Yufu K, Yoshikawa Y, Honjo T, Miyamura K. Relationships between light environment and subsurface accumulation during the daytime in the red-tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Mar. Biol.,* 2017; **164**: 1-12.

Shikata T, Yuasa K, Kitatsuji S, Sakamoto S, Akita K, Fujinami Y, Nishiyama Y, Kotake T, Tanaka R, Yamasaki Y. Superoxide production by the red tide-producing *Chattonella marina* complex (Raphidophyceae) correlates with toxicity to aquacultured fishes. *Antioxidants* 2021; **10:** 163.

山﨑康裕，亀尾辰砂，和田佳大，北辻さほ，湯浅光貴，紫加田知幸．シオミズツボワ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 2023；**70**: 52-61.

山口峰生．*Gymnodinium nagasakiense* の赤潮発生機構と発生予察に関する生理生態学的研究．南西海区水産研究所研究報告 1994；**27:** 251-394.

湯浅光貴，北辻さほ，坂本節子，紫加田知幸，秋田一樹，内田肇，山﨑康裕，内山郁夫，西出浩世，斉藤義昭，野田誠，宮村和良，今吉雄二，赤塚麻美，吉満敏，西山佳孝，小竹敬久，西槇俊之，勝村啓史，小川元之．2）有害赤潮の防除及び漁業被害軽減のための技術開発．令和 3 年度漁場環境・改善推進事業のうち栄養塩，赤潮・貧酸素水塊に対する被害軽減技術等の開発．（2）赤潮被害防止対策技術の開発報告書，赤潮共同研究機関，広島．2023；233-260.

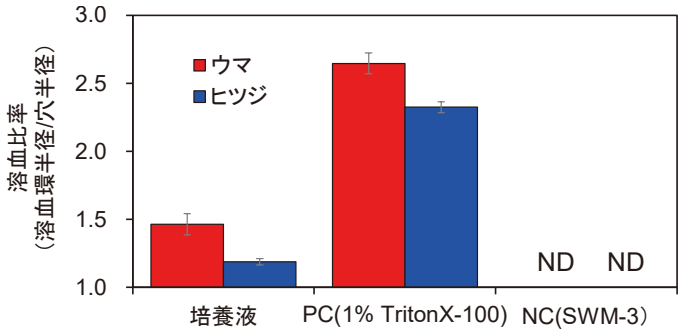


図 1. *Karenia selliformis* 培養液の溶血活性に対する血液寒天培地 2 種の検出感度の比較. PC: 陽性対照区. NC: 陰性対照区. ND: 非検出.

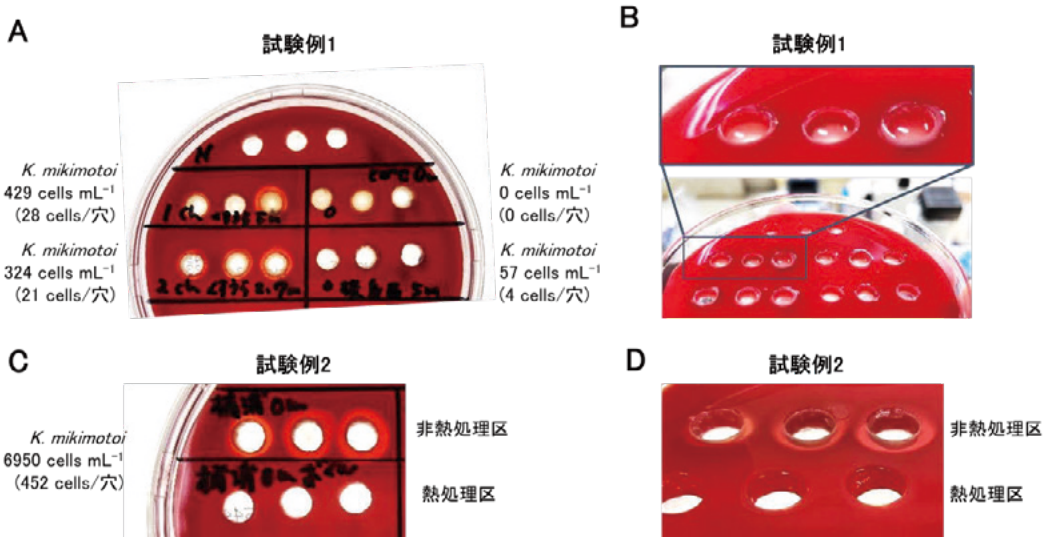


図 2. 現場海水試料のウマ血液寒天培地を用いた溶血活性試験結果の例. A, C. 現場海水試料による溶血環の検出. B, D. 血液寒天培地に増殖した細菌の様子. A, B. 試験例 1. C, D. 試験例 2.

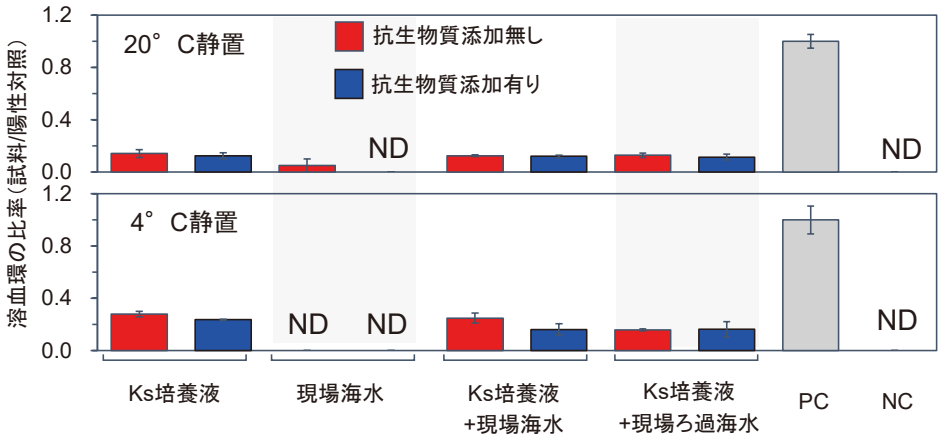


図 3. ウマ血液寒天培地を用いた現場海水に含まれる細菌に由来すると思われる溶血活性の抑制試験. 抗生物質: AM9. Ks: *K. selliformis*. 現場海水: 広島県産海水（*K. selliformis* や *K. mikimotoi* は含まないが多種の珪藻を含む）. PC: 陽性対照区（0.25% Triton X-100）. NC: 陰性対照区. ND: 非検出.

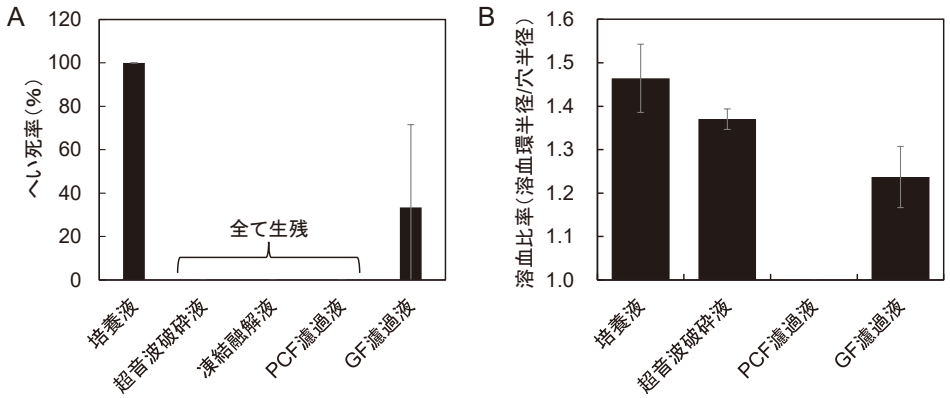


図 4. *K. selliformis* 培養液および破砕液, 分画液の A. ヒメダカに対する毒性と B. ウマ血液寒天培地における溶血活性.

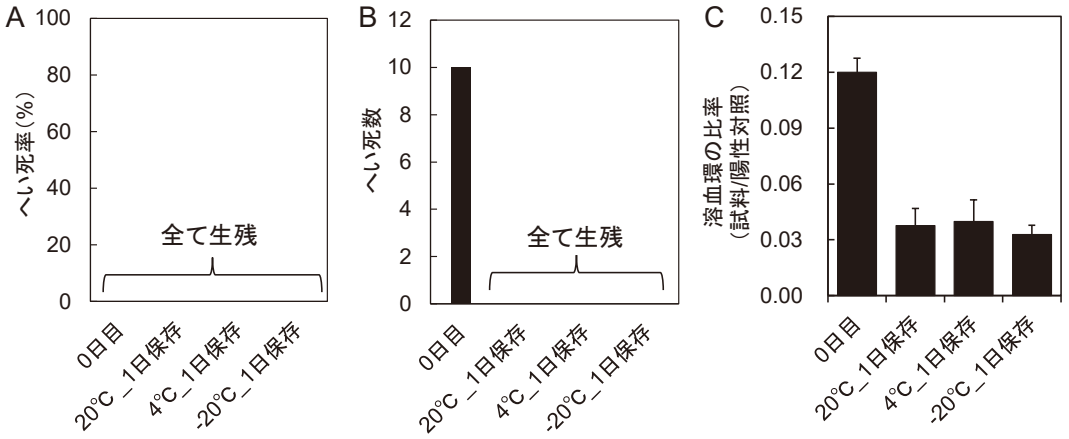


図 5. 異なる温度で保存した *K. selliformis* のガラスフィルター濾過液の A. ヒメダカおよび B. ワムシに対する毒性と C. ウマ血液寒天培地における溶血活性.

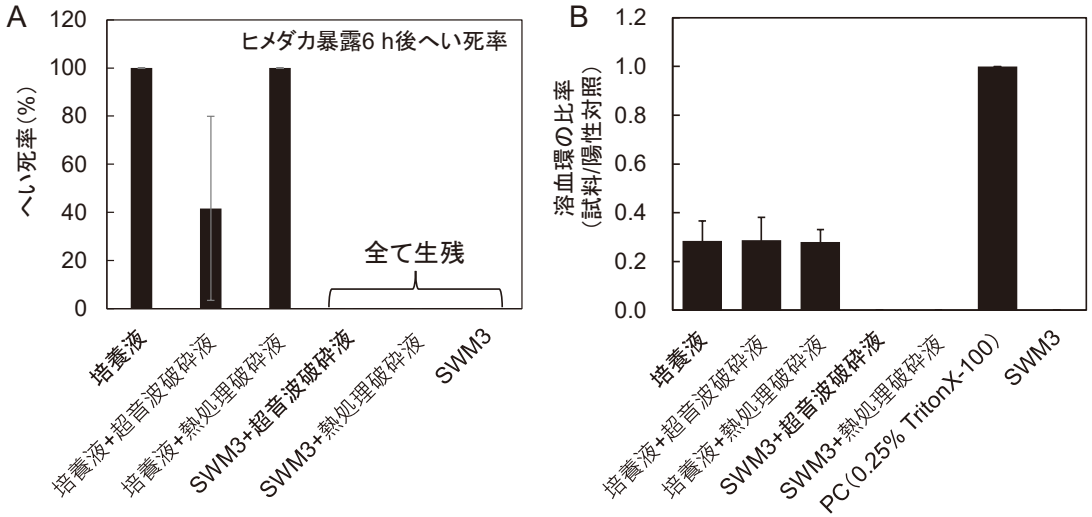


図 6. *K. selliformis* の細胞破砕液を添加した *K. selliformis* 培養液の A.ヒメダカに対する毒性と B. ウマ血液寒天培地における溶血活性.

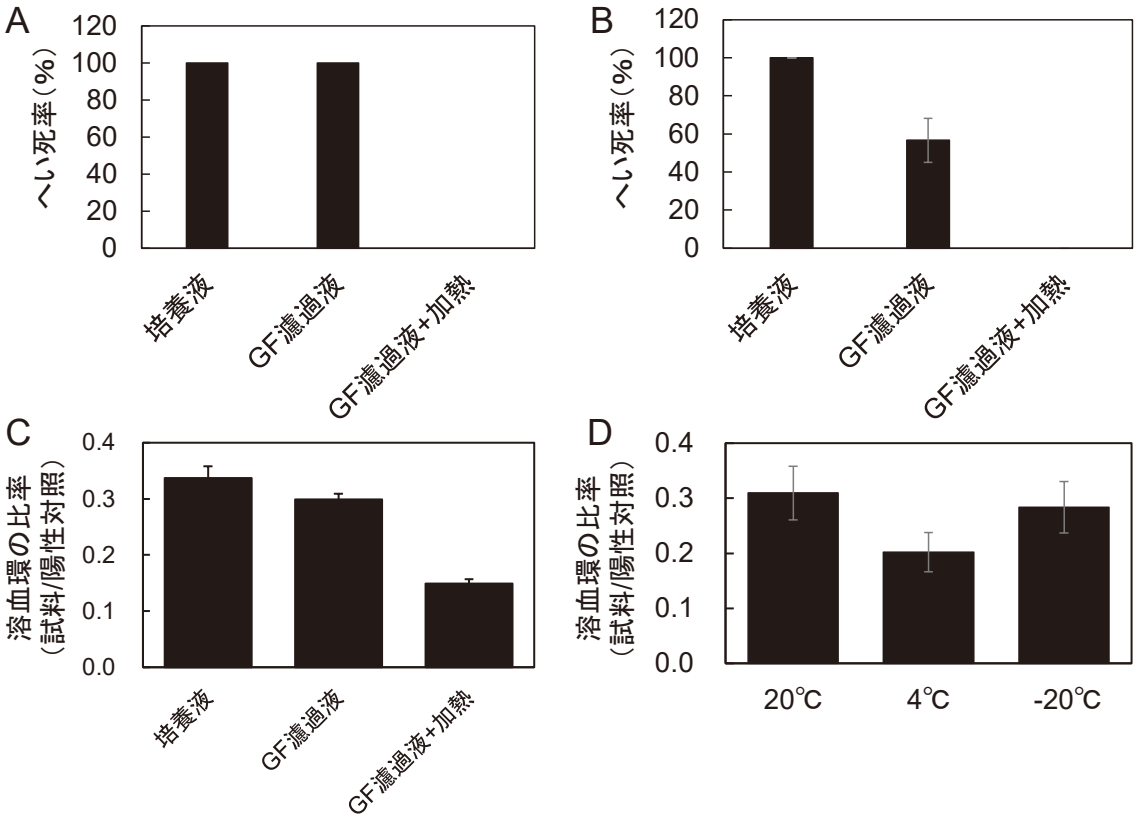


図 7. *K. selliformis* ガラスフィルター濾過液の A. ヒメダカ, B. ワムシへの毒性および C. ウマ血液寒天培地における溶血活性に対する加熱の影響と, D. 加熱後のガラスフィルター濾過液を 7 日間異なる温度で保存した時のウマ血液寒天培地における溶血活性.

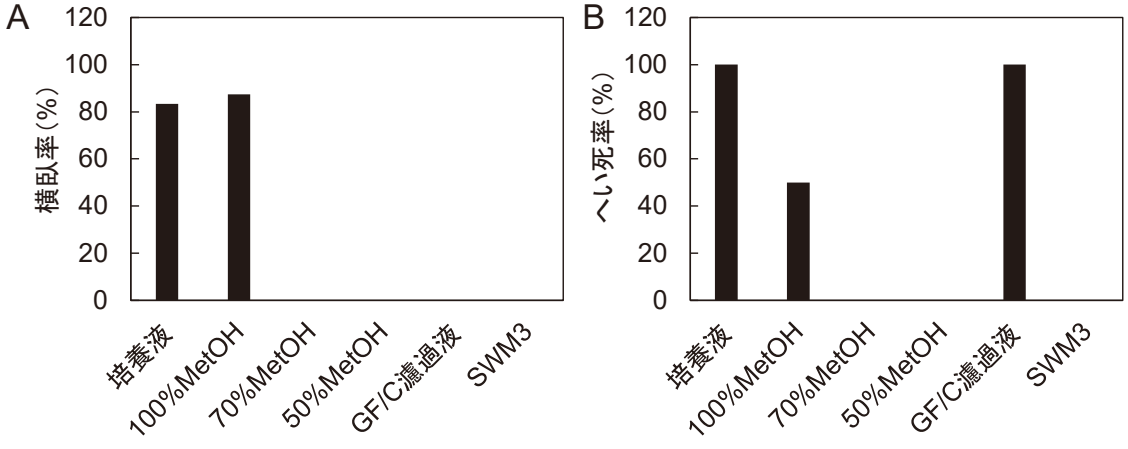


図 8. 固相抽出により分画した *K. selliformis* ガラスフィルター濾過液の A. ヒメダカおよび B. ワムシに対する毒性. 試験は 2~3 回繰り返した.

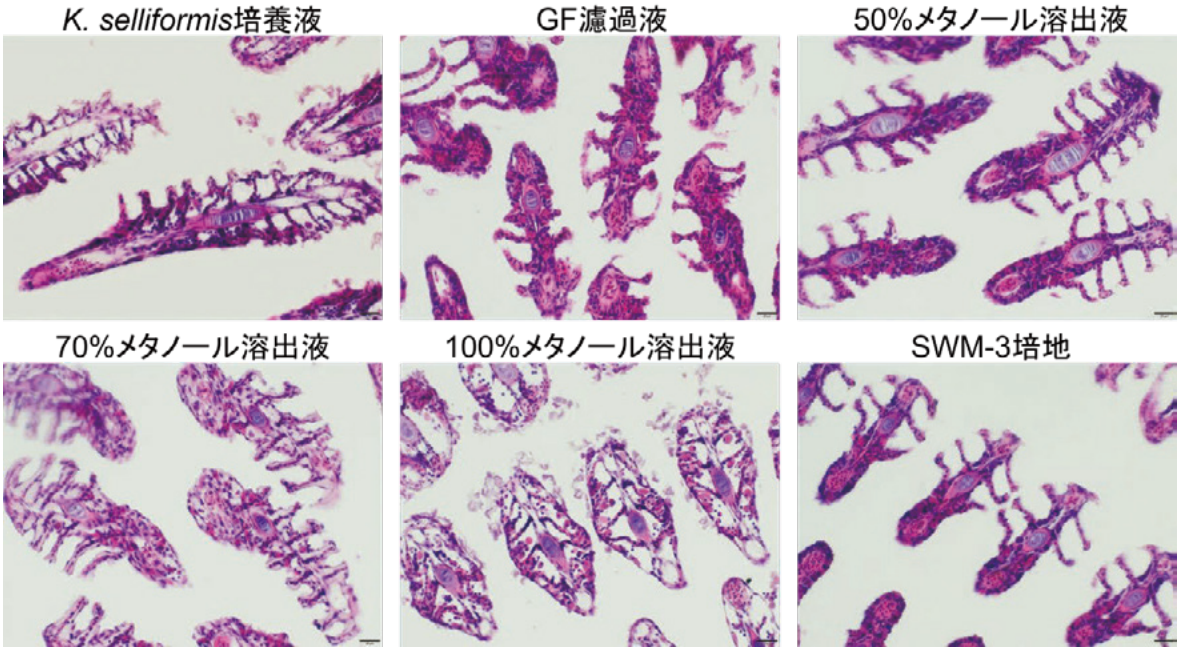


図 9.ヒメダカ鰓組織におけるパラフィン切片の HE 染色画像.

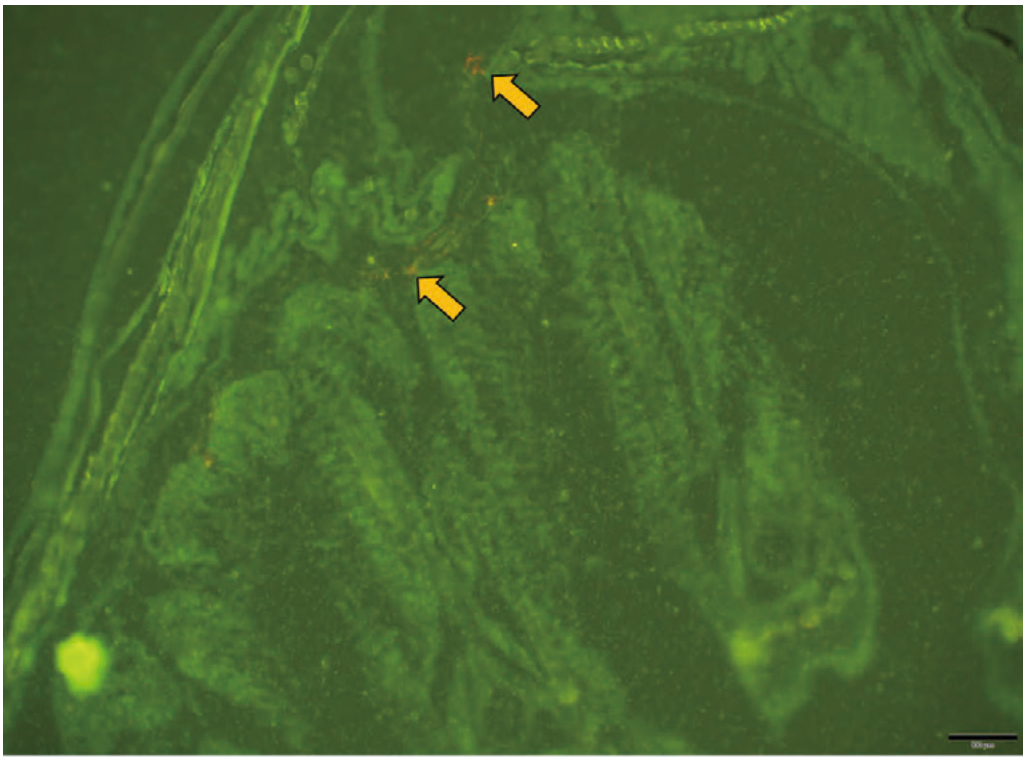


図 10. ヒメダカ鰓組織における凍結切片の蛍光顕微鏡画像. 矢印で示した場所はクロロフィル自家蛍光を示す.

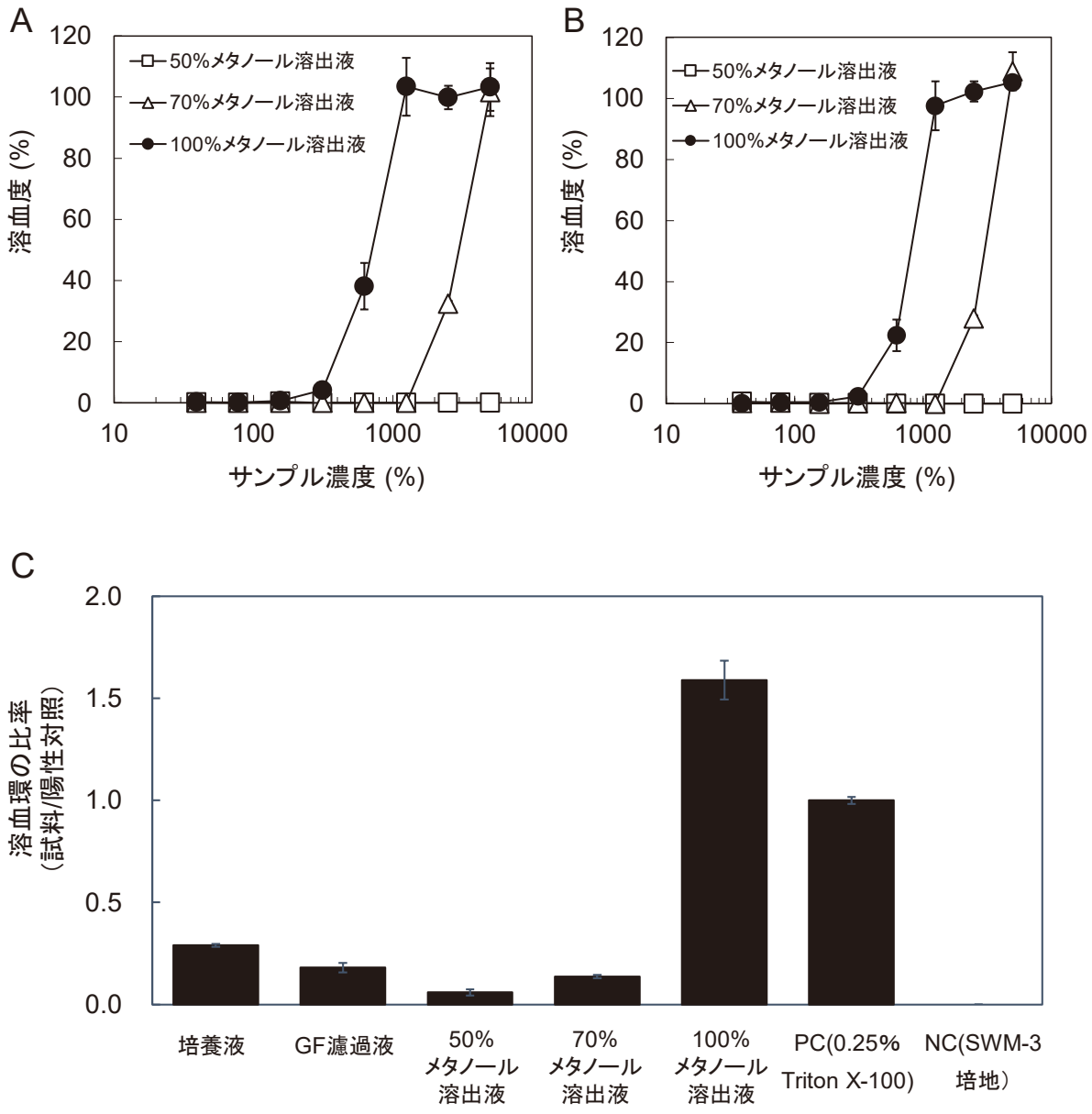


図 11. 固相抽出により分画した *K. selliformis* ガラスフィルター濾過液の A. ウサギ赤血球に対する明所での溶血活性と B. 暗所での溶血活性および C.ウマ血液寒天培地における溶血活性.

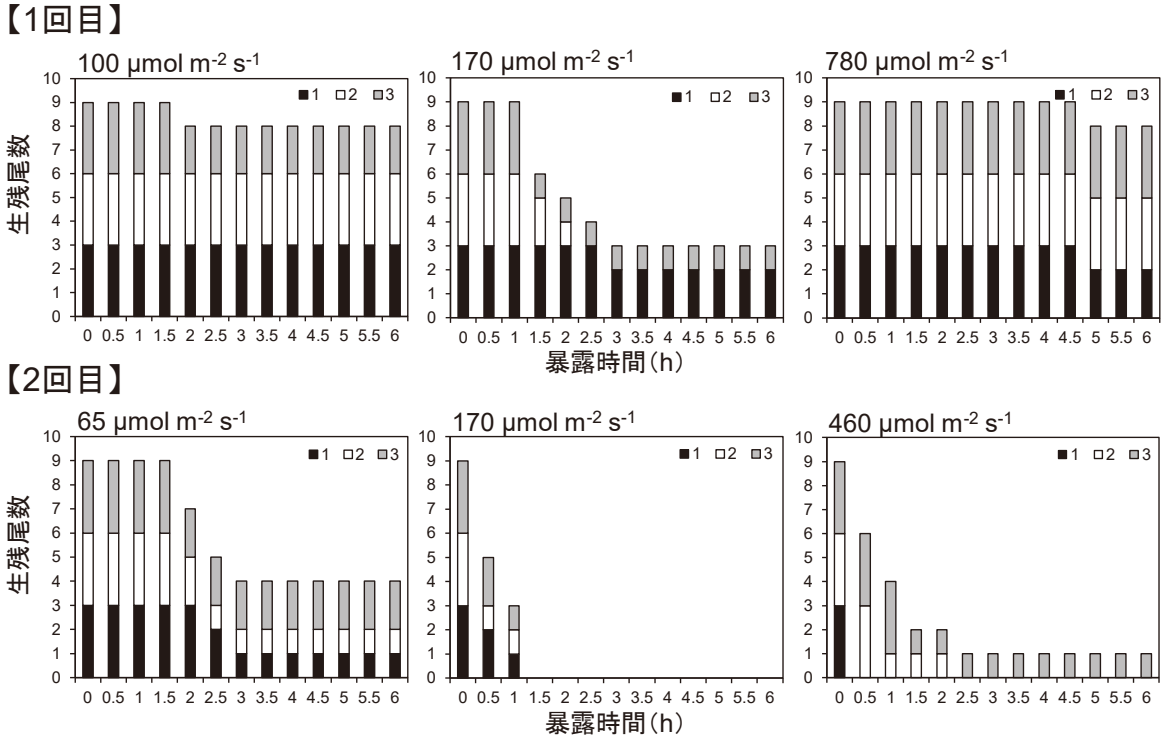


図 12. 異なる光強度で培養した *K. mikimotoi* のブリに対する毒性.

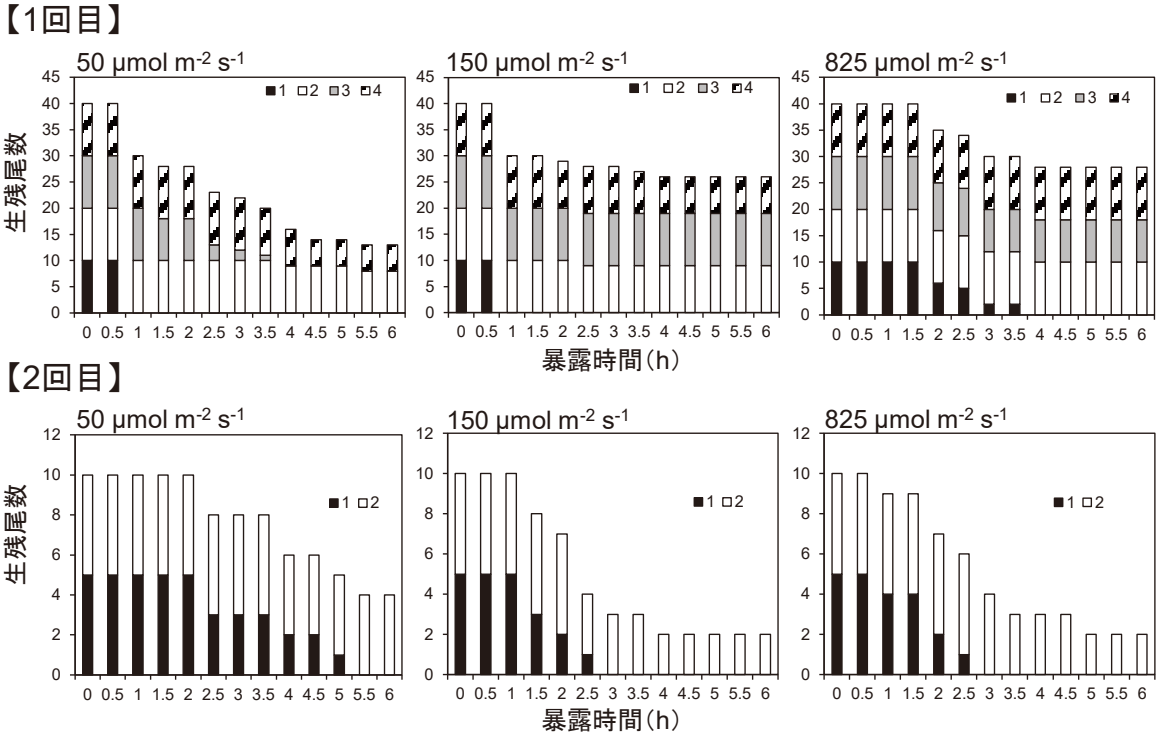


図 13. 異なる光強度で培養した *K. selliformis* のブリに対する毒性.

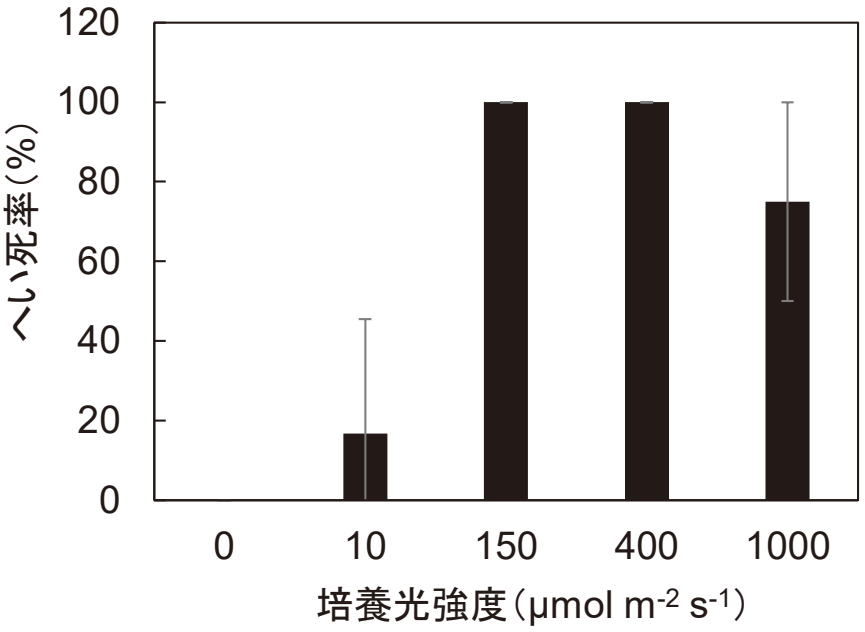


図 14. 異なる光強度で培養した *K. selliformis* のヒメダカに対する毒性.

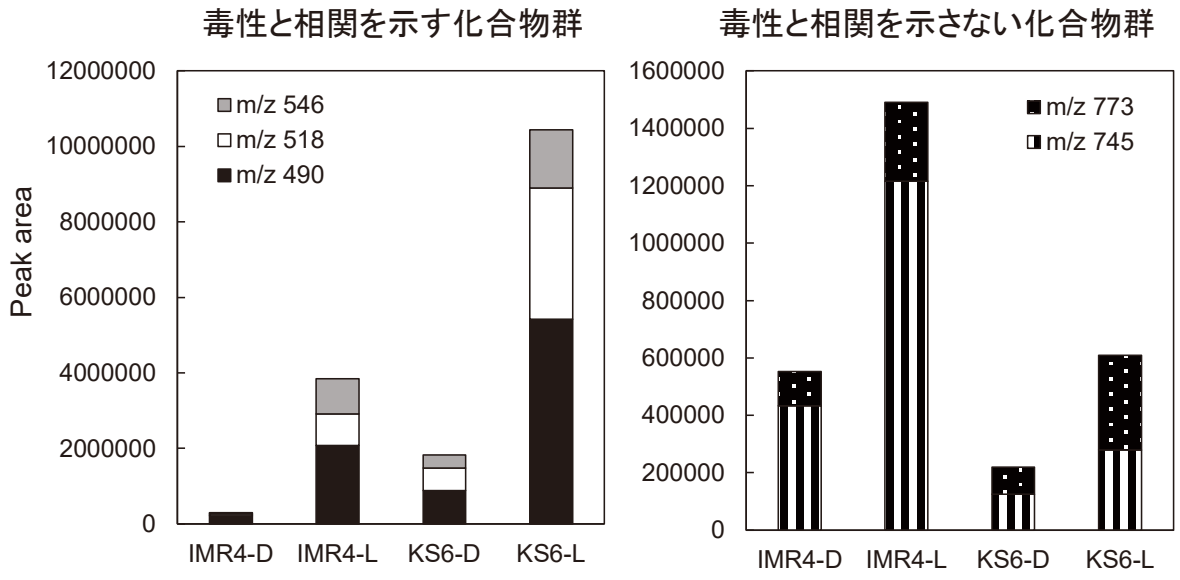


図 15. 明条件または暗条件で培養した *K. mikimotoi* および *K. selliformis* の凍結試料における LC-MS/MS によるノンターゲット分析の結果.

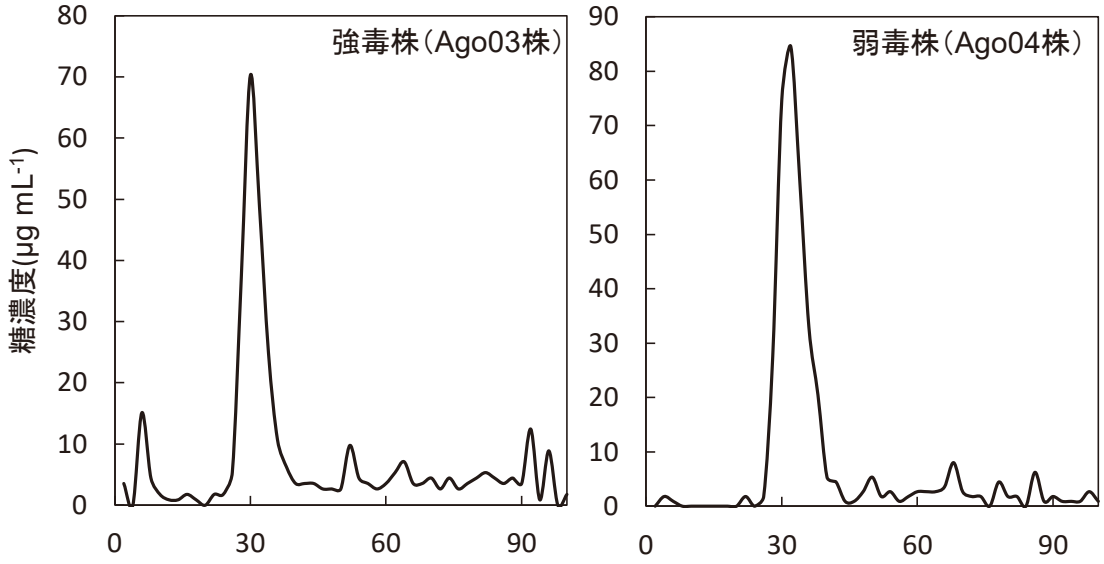


図 16. *Chattonella* 強毒株および弱毒株における単離グリコカリックスのゲル濾過クロマトグラフィーによる精製.

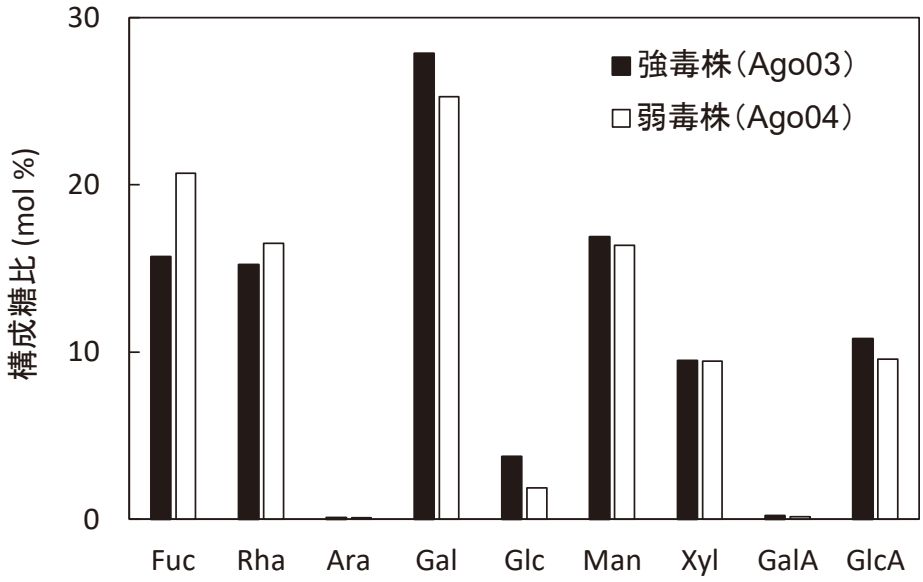


図 17. *Chattonella* 強毒株および弱毒株における精製グリコカリックスの HPAEC-PAD による構成糖分析の結果.

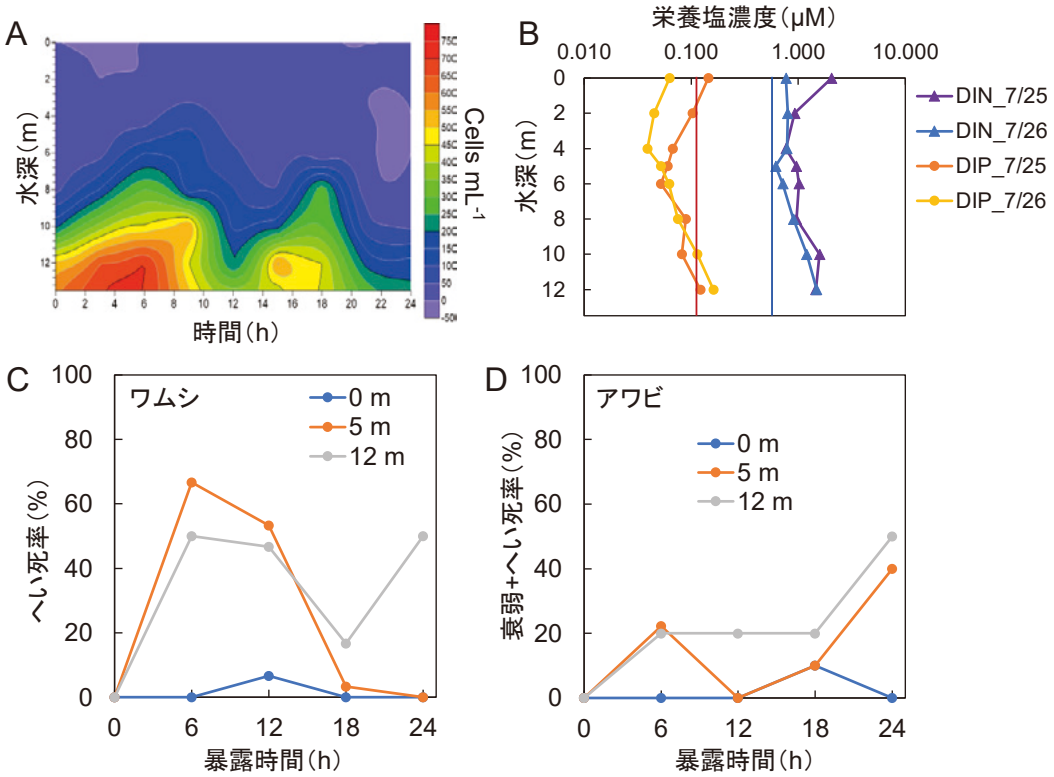


図 18. 佐伯湾の *K. mikimotoi* 赤潮におけるワムシ毒性試験の現場検証. A. *K. mikimotoi* の鉛直分布推移. B.栄養塩の鉛直分布. C. *K. mikimotoi* 赤潮海水のワムシに対する毒性. D. *K. mikimotoi* 赤潮海水のメガイアワビ稚貝に対する毒性.

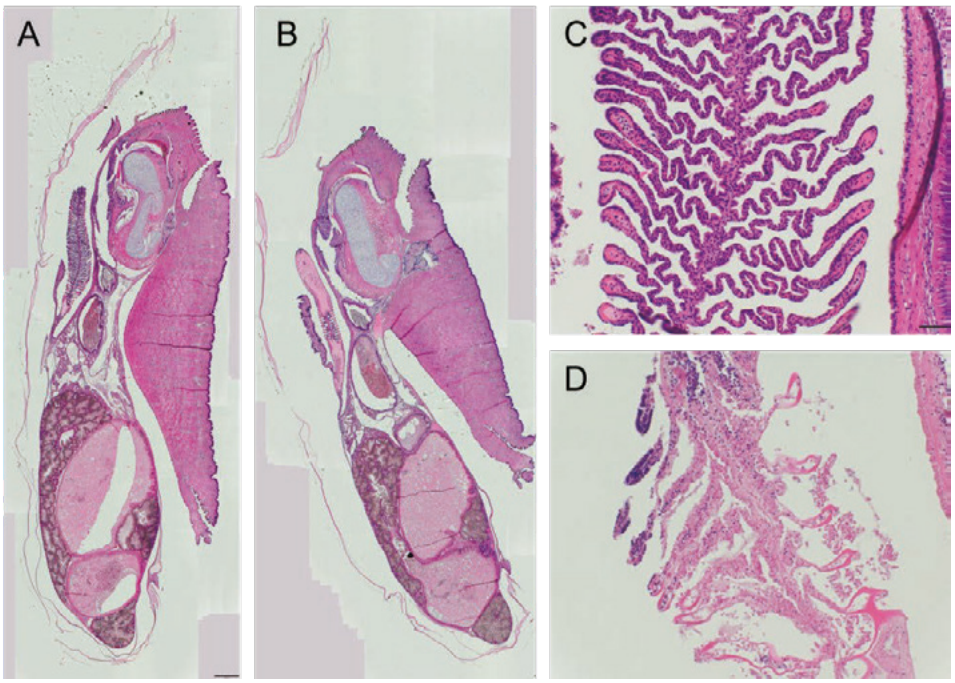


図 19. *K. mikimotoi* 赤潮に暴露されたメガイアワビ稚貝におけるパラフィン切片の HE 染色画像. A.生残個体の全身. B.へい死個体の全身. C.生残個体の鰓. D .へい死個体の鰓.

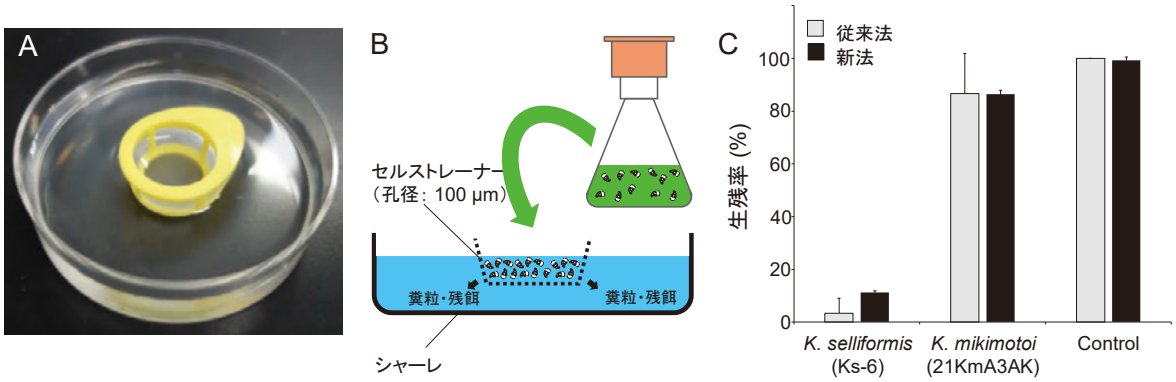


図 20. セルストレーナーを用いたワムシ毒性試験. A .セルストレーナー. B .ワムシの濃縮と洗浄のイメージ図. C. *K. mikimotoi* および *K. selliformis* を 2 時間暴露されたワムシの生残率.

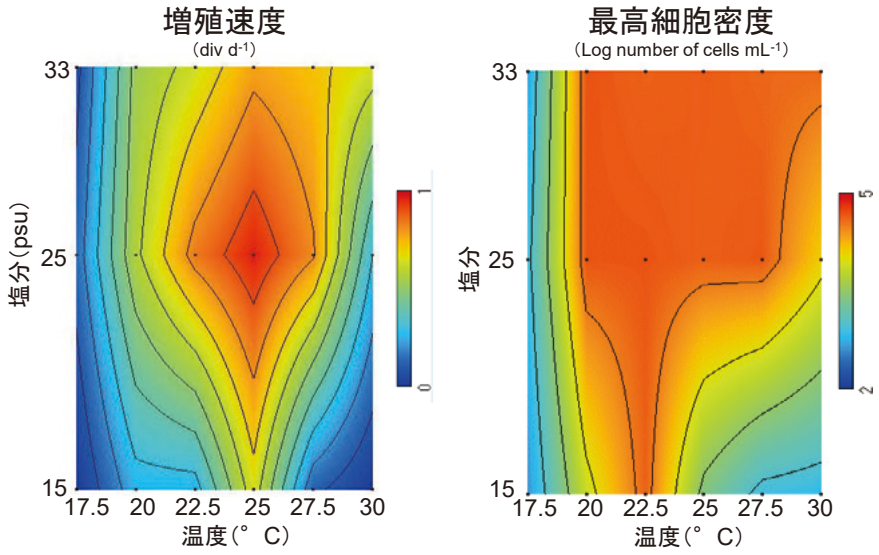


図 21. 異なる水温・塩分における *Chattonella* の増殖.

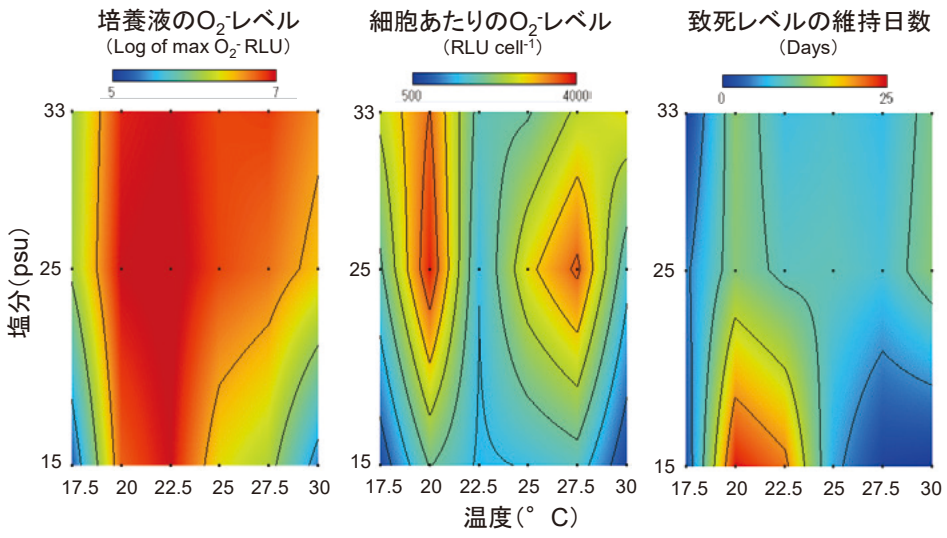


図 22. 異なる水温・塩分における *Chattonella* のスーパーオキシドレベル.

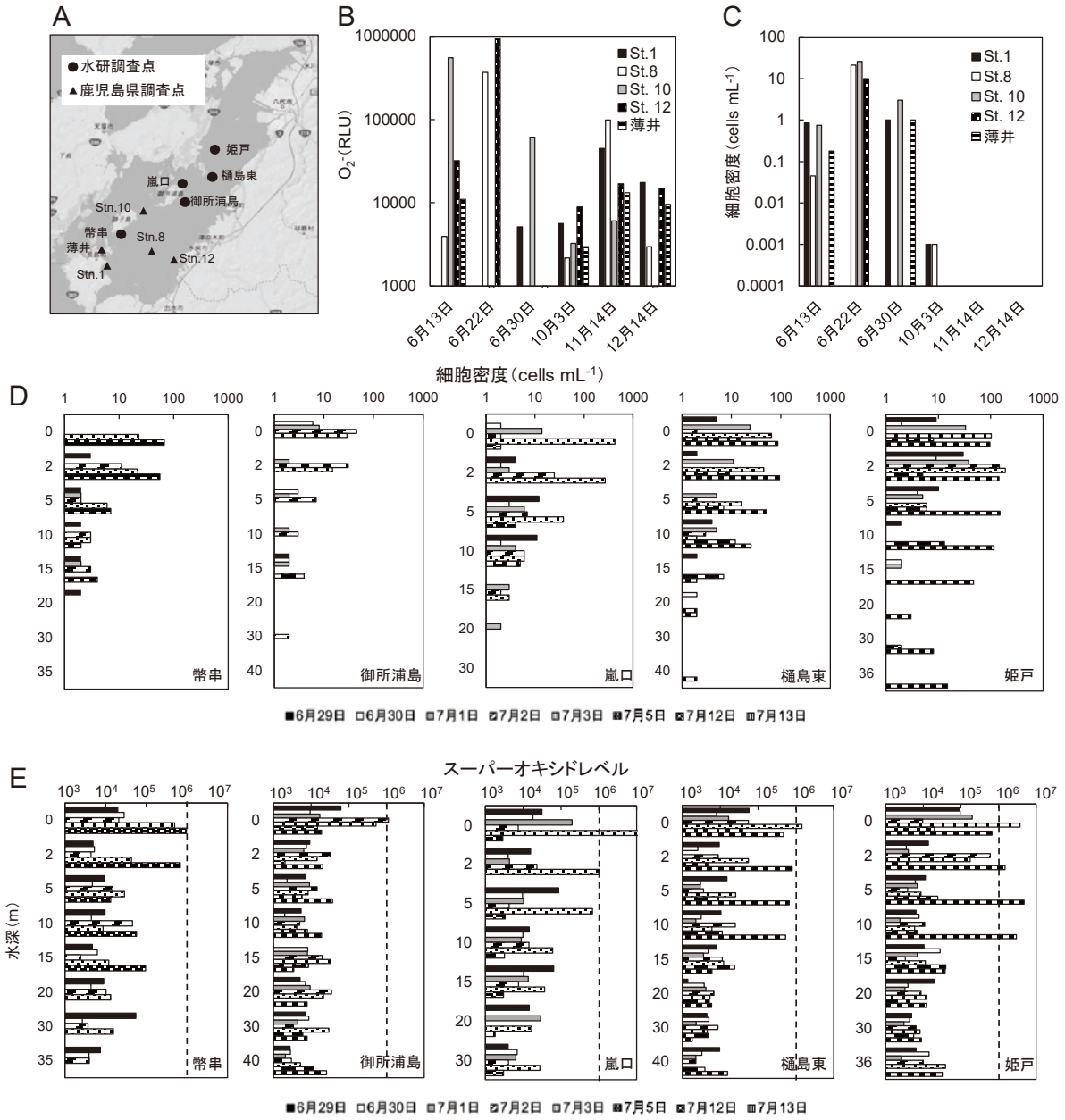


図 23. 八代海における *Chattonella* 赤潮のモニタリング. A.調査定点. B.スーパーオキシドレベル. C. *Chattonella* 細胞密度. D. *Chattonella* 細胞密度の鉛直分布. E.スーパーオキシドレベルの鉛直分布.

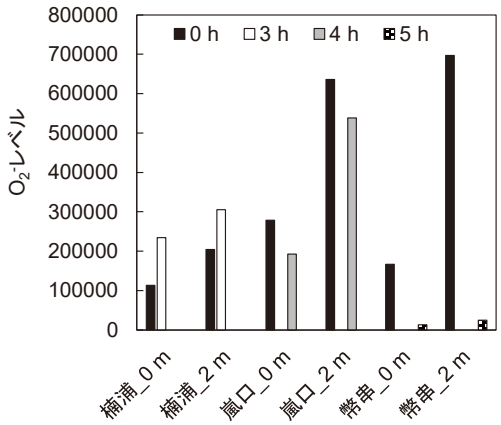


図 24.クーラーボックスで保管した *Chattonella* 赤潮海水のスーパーオキシドレベルの変化.

２）赤潮の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
福井県立大学
浜口昌己
三重県水産研究所
奥村宏征，渥美貴史，今井絵美，岡野健次，大田幹司
三重県水産研究所鈴鹿水産研究室
岩出将英
愛知県水産試験場
二ノ方圭介，河住大雅，石田俊朗，柘植朝太郎，大澤　博

１　全体計画
（1）目的

有害赤潮原因藻である *Heterocapsa circularisquama* (以下，ヘテロカプサ)や *Karenia mikimotoi* (以下，カレニア)による赤潮は，西日本や中部地方を中心に被害が確認されてきたが，近年では，北陸や北海道でも同種による赤潮が確認されるなど，有害藻類の分布域は着実に拡大している。2009 年には，新潟県佐渡島の加茂湖において，ヘテロカプサによる赤潮が発生し 2 億円に上る被害が発生した。そのため，前事業課題では，ヘテロカプサに感染するウイルス HcRNAV を含む土着の海底泥を利用した防除技術の開発を行い, 現場での活用を可能にした。本課題では，ヘテロカプサ赤潮が発生する他の海域でも利用できるよう，本手法のマニュアル化を進める。また，本手法を応用することで，他の有害藻類カレニア赤潮などにも適応可能な防除技術開発に着手する。本手法は，赤潮が発生した海域からウイルスを含む海底泥を採取し，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であり，本課題で，効果的かつ効率的な手法への改善も試みる。

２　令和 5 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’’2E）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，2023 年 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)。ヘテロカプサの細胞密度は直接検鏡にて，HcRNAV の密度はリアルタイム PCR 法（Nakayama and Hamaguchi 2016）を用いた定量結果に基づき算出した。リアルタイム PCR による海水および底泥中の HcRNAV 定量手順は次の通りである。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）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 特異的プライマーを用いて定量した（Nakayama and Hamaguchi 2016）。

2）ヘテロカプサ赤潮への底泥散布とマニュアルの作成

昨年度，底泥散布を行った新潟県佐渡市加茂湖では，今年度は，ヘテロカプサ赤潮が発生しなかったため底泥散布は行わず，現場関係者（新潟県，佐渡市，加茂湖漁協等）の方々と底泥散布に関する勉強会の開催及び底泥採取作業の実施など，広く普及活動を行った。また，今後は底泥散布法を現場関係者で実施することが可能になるよう，新潟県佐渡水産技術センターと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，2023 年度にヘテロカプサ赤潮が発生した三重県の英虞湾や五ヶ所湾より底泥（表層約 3 cm）を採取し，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，HcRNAV の遺伝的多様性を評価するため，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た（解析中）。並行して，同底泥中の HcRNAV の密度を限界希釈法により感染タイプごとに測定した。具体的には，底泥より撹拌振騰後に得た遠心上清の濾液を段階希釈し，ウイルス感受性タイプの異なるヘテロカプサ 4 株（HU9433-P 以下，Hu, HCLG1, 05HC06，Kamo6）に 8 本立て（n=8）で接種した。接種後，8 日目までに溶藻がみられたウェル数の組み合わせより最確数（most probable number : MPN）値を算出し，元の試料中の溶藻因子密度（infectious unit / g）を推算するとともに，各宿主に感染した密度を算出することにより，感染タイプ別の密度を推定した。

4）珪藻類等共存種の分布状況

ヘテロカプサ赤潮の発生が予測される 2023 年 7〜10 月の加茂湖で，競合種である珪藻の分布や種組成について情報を収集することを目的とし，[1)] 固定法による観察と[2)] 環境 DNA 解析技術を用いた網羅的解析を実施した。湖水試料は，定期モニタリングの際にバケツや採水器を用いて採取した。具体的な方法としては，[1)] 0 m 及び B−1m から採取した湖水をバイアル瓶に 4 mL 入れ，1mL の 5%グルタールで固定し（終濃度 1%），観察まで 4℃で保存した。[2)] 表層水を 1,000 mL 採取し，Sterivex HV フィルター0.45 μm (Merk Millipore, Germany)内に濃縮することで粒子を回収し，RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を 2 mL 加えた後，保冷剤を入れた発泡スチロールボックスに入れて研究室に持ち帰り，解析まで冷凍保存した。DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて DNA を抽出し，メタバーコーディング解析を生物技研（株）に依頼した。解析は，得られたデータのリード数や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）数を計算し，時系列で比較した。得られたデータのうち，リード数が 100 以上のものを有効として解析に供試した。

（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

2023 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や同湾周辺において 8 月末から 9 月中旬まで観察された。立神定点における最高細胞密度は，9 月 25 日の 20 cells/mL であったが（図 2），定点以外の周辺海域では，1mL 当たり数千細胞レベルまで増殖が認められた。愛知県三河湾 A6 地点では同種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 日で，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せず，9 月 6 日の調査では，それぞれの地点の 6 m 以深で，約 20 cells/mL 確認された。その後，同種は減少したまま 10 cells/mL 以上増えることはなく，10 月末には終息した（図 3）。

リアルタイム PCR 法による HcRNAV 定量結果によると，2023 年の英虞湾の海水では，表層及び底層ともに 8 月下旬から 9 月上旬にかけて，HcRNAV の密度はヘテロカプサの増殖とともに増加していることが認められた（図 2）。底質中の HcRNAV も同様の増加が認められ，9 月上旬から 10 月上旬にかけて，4.4×10〜3.0×10^3 copies/g まで増加したことより，海水中でヘテロカプサに感染して増殖し，海底に堆積したと考えられた。三河湾の海水からは，HcRNAV は検出されなかったが，底泥中の HcRNAV 密度は，昨年度から変化なく，1.4×10^3〜1.9×10^4 copies/g で推移した (図 4)。

2021〜2022 年の調査結果から，三重県英虞湾の観測定点においてヘテロカプサの出現は認められていなかったものの，HcRNAV については増減が認められていた。ウイルスは宿主が存在しなければ増殖できないため，HcRNAV 密度の増減は，ヘテロカプサの出現が定点では認められなくとも，湾内に生息していることを示した。ヘテロカプサは 10 年ほど前から英虞湾ではほとんど検出されなくなっていたが，近年の底質における HcRNAV の増加や今年度のヘテロカプサの増殖から，ヘテロカプサは湾内のどこかで生息し，条件が揃えば増殖することを示すものであった。加茂湖では，今年度はヘテロカプサの増殖が認められなかったため，湖水ではほとんど HcRNAV は検出されず，底質では HcRNAV 密度が増減することはなかったが，常に高密度で検出された。このことから，2009 年より毎年ヘテロカプサが発生していたため，ヘテロカプサに感染した後に沈降した HcRNAV が低質に蓄積していることが示唆された。

2023 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。2023 年度の加茂湖の環境について図 6 に示す。加茂湖原黒定点の 6 ~ 10 月では，水温は 20.1〜31.0 ℃，塩分は 7 月の降雨の影響によって表層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，6〜10 月上旬まで，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，10 月下旬以降は回復傾向であった。3 m 以浅では，6 mg/L 以上の溶存酸素濃度を維持した。全体的に，例年より水温は高めで，10 月上旬まで高水温や貧酸素状態が続いた。

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

本年度は，底泥散布法のマニュアル作成や本法の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の方々に集まっていただき，加茂湖調査を行うとともに，勉強会においてヘテロカプサ赤潮対策や加茂湖の水産生物の維持について広く意見交換を行った。

また，来年度以降の底泥散布に向けて，海底泥の採取法を現場の方々へ普及するため，加茂湖で 12 月に底泥採取を実施した。これに関しては，表層泥を約 3 cm 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）については，関係者と一緒に取り組むことで，技術の普及とともに協力体制の強化に努めた（図 7）。マニュアル作成については，新潟県佐渡水産技術センターのご尽力により，第一案を作成するに至った。来年度は，凍結泥の解凍法，ヘテロカプサ赤潮海水との混合，静置による HcRNAV 増殖の誘導，加茂湖への散布法など，現場で容易に活用できるような手法となるようさらに検討し，来年度には完成を目指すこととする。

3）ヘテロカプサウイルス HcRNAV の多様性に関する研究

今年度は，三重県英虞湾や五ヶ所湾でヘテロカプサが発生したため，発生中や終息後の海底泥を採取し，HcRNAV の密度や感染タイプについて調査した。これまでの感染試験や遺伝子解析の結果から，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（UA1, UA2, CY タイプ）存在することが明らかになっている（Tomaru et al. 2004, Nakayama et al. 2013）。さらに，毎年のモニタリング結果から，その感染タイプは海域や時期によって異なることや年々変化していることが明らかとなっている（Nakayama and Hamaguchi, 2022）。今年度得られた結果によると，ヘテロカプサが発生した英虞湾の 8 月 28 日および 9 月 11 日の底泥中の HcRNAV 密度は高く，感染タイプは UA1 タイプが主体であった。9 月 25 日になると，底泥中の HcRNAV 密度は減少し，感染タイプは UA1 タイプが主体であったが，CY タイプの増加も認められた（図 8）。五ヶ所湾の終息後に採取した泥については，HcRNAV 密度は低く，感染タイプは UA1 が主体であった。新潟県加茂湖や愛知県三河湾の近年の調査結果では，UA1 はほとんど検出されず，UA2 が主体になりつつあった。今年度の英虞湾や五ヶ所湾で発生した HcRNAV の主体が UA1 であったことから，宿主であるヘテロカプサは他の海域と異なる感染型を持つことが推察された。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，これらの結果を遺伝的側面からも検証するために，今年度ヘテロカプサの発生した海域の泥を集めて多様性解析を行なっているところである。季節や海域ごとのさらなる知見の蓄積が必要であると考えられる。

4）珪藻類等共存種の分布状況

2023 年 7 ~ 10 月にかけて，ヘテロカプサの増殖と競合関係にあると推察される珪藻類について知見を収集するため，加茂湖で採取した湖水の固定試料について顕微鏡による観察及び計数を行った。その結果，全体を通して珪藻類の細胞密度は低く，最も多かった日は 7 月 25 日 7.2 m 層で細胞密度 439 cells/mL，次いで 8 月 9 日 0 m 層の 256 cells/mL であった（図 9）。種類は，*Chaetoceros* spp.が主体であったが，時期によって，*Skeletonema* spp.，*Nitzschia* spp.，*Thalassionema* spp.や *Ceratium furca* などが認められた。

一方，環境 DNA による 18SrDNA のメタバーコーディング解析の結果においては，総リード数約 40,000～50,000 の内，カイアシ類の占める割合が最も高かった。珪藻類のリード数は，約 4,000～15,000 で，多いときは珪藻類が全体の 30%近くを占めた（表 2）。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）数について，加茂湖の調査期間中の総 OTU 数は 21 ~ 50，そのうち珪藻類の OTU 数は 1～18（3.8～42.9%）であった。OTU 数が多いほど異なる塩基配列群が多く，すなわち，多様度が高いことを示す。それによると，8 月 23 日は珪藻類の OTU の割合が 42.9%であり，リード数の割合は 25.7%で高くなかったが，多様であったことが示された。一方，10 月 8 日のリード数を見ると，珪藻類の割合は全体の 31.1%と高かったが，OTU の割合は 8 月 23 日の値より低く，多様度は相対的に高くなかったことが推察された。また，10 月 2 日は珪藻類のリード数も OTU 数も低かったことから，珪藻類の密度も多様度も低かったことが示唆され，検鏡結果と一致した。しかしながら，全体的に，環境 DNA 解析による結果と顕微鏡観察による結果は，あまり一致しなかったため，検鏡に関して試料採取法を改善する予定である。

また，環境 DNA 解析では，今回は 18SrDNA 領域を見ることで加茂湖内に生息する生物の情報を大きく捉えることができたが，珪藻類を属や種レベルで把握することができなかった。今後，属や種レベルの情報を得られるよう同サンプルの 28SrDNA 領域を解析し，珪藻類の詳細な情報を得る予定である。解析した試料に関しては，今年度は，7～8 月上旬の試料を採取できなかったため，8 月 23 日以降の試料を用いた。来年度は，7 月のモニタリング開始時期から試料採取を開始し，データの蓄積を図る予定である。

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，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

Tomaru Y, Katanozaka N, Nishida K, Shirai Y, Tarutani K, Yamaguchi M, Nagasaki K. Isolation and characterization of two distinct types of HcRNAV, a single- stranded RNA virus infecting the bivalve-killing microalga *Heterocapsa circularisquama*. Aquatic Microbial Ecology 2004; **34**: 207–218 DOI 10.3354/ame034207.

表 1. 三重県海域における HcRNAV の感染タイプ別密度.

ヘテロカプサ培養株 Hu, HCLG1, 05HC06, Kamo06 に，各底泥試料中の HcRNAV が感染した密度（単位：infectious unit / g）.

湾	採取点	Hu	HCLG1	05HC06	Kamo06
五ヶ所湾	礫浦湾口	46	0	0	0
五ヶ所湾	礫浦	5	0	0	0
五ヶ所湾	迫間	2200	6	0	0
英虞湾	立神 8/28	1,404,000	0	0	0
英虞湾	立神 9/11	2,780,000	168	230	0
英虞湾	立神 9/25	93	7,700	3,320	2,060

表 2. 18SrDNA メタバーコーディング解析による 2023 年加茂湖の珪藻類の分布.

	加茂湖 St.2 0m				
	8/23	9/6	9/20	10/2	10/18
18S総リード数	46,768	44,541	40,014	45,949	46,772
珪藻類リード数	12,008	5,768	4,037	2,510	14,566
珪藻類（%）	25.7	12.9	10.1	5.5	31.1
総OTU数	42	34	21	26	50
珪藻類OTU数	18	12	8	1	13
珪藻類OTU（%）	42.9	35.3	38.1	3.8	26.0

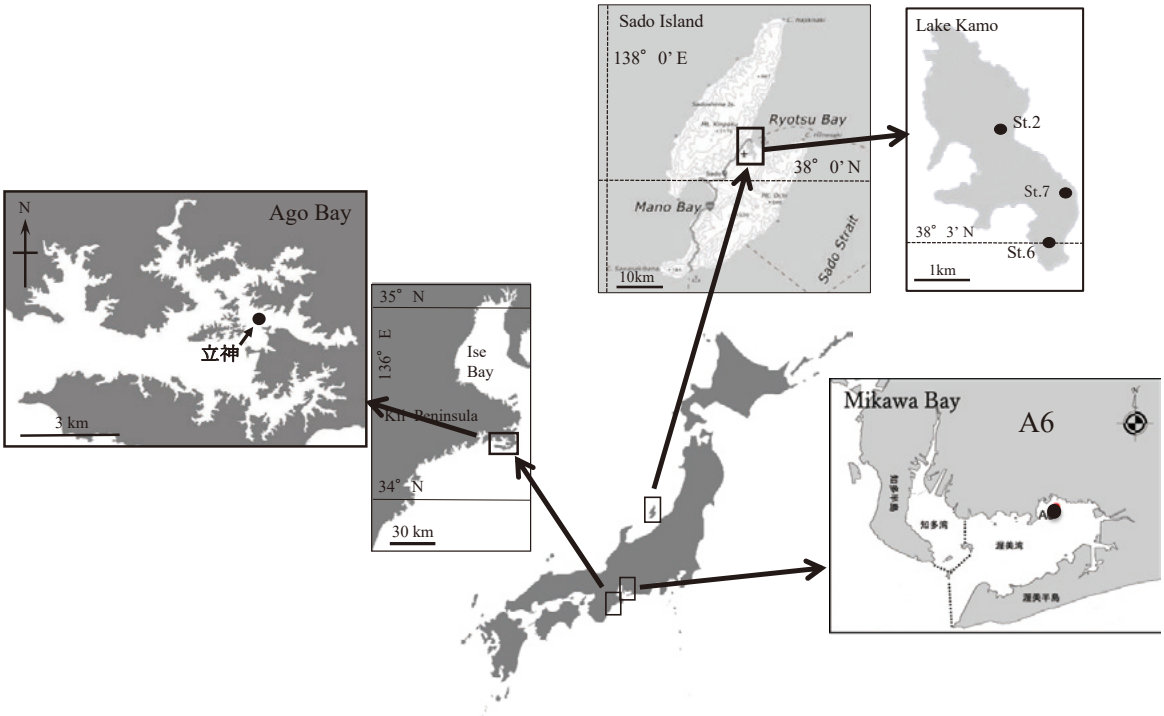


図 1. 試料採取および試験実施地点.

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：カキ殻工場前（右上）.

愛知県三河湾 ●：A6 地点（右下）.

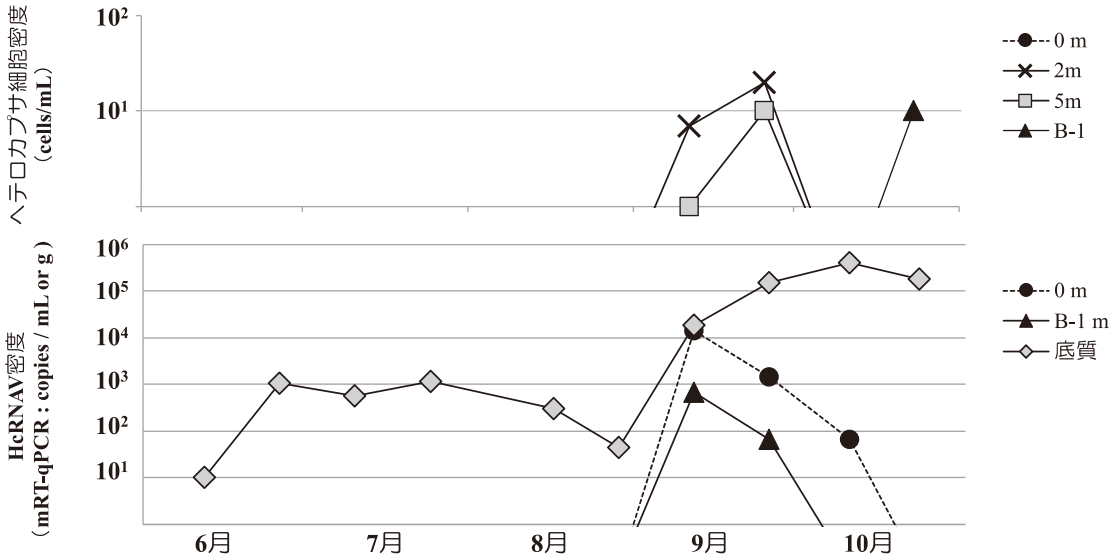


図 2．2023 年の三重県英虞湾立神定点におけるヘテロカプサ及び HcRNAV の発生状況．
（上段）ヘテロカプサ細胞密度．
（下段）海水及び底泥からの HcRNAV 密度．
HcRNAV 密度の単位は，海水 copies/mL，泥 copies/g．
値なしは未検出を示す．

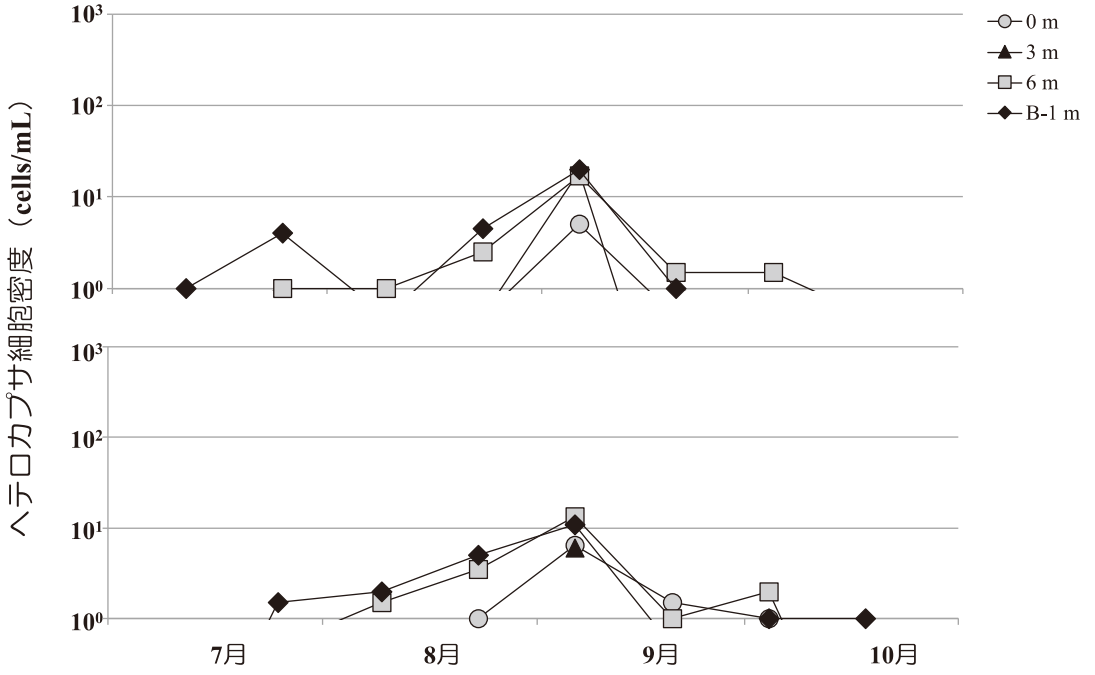


図 3．2023 年 加茂湖の調査定点 2 点におけるヘテロカプサの発生状況．
（上段）St.1 湖奥，（下段）St.2 原黒．
値なしは未検出を示す．

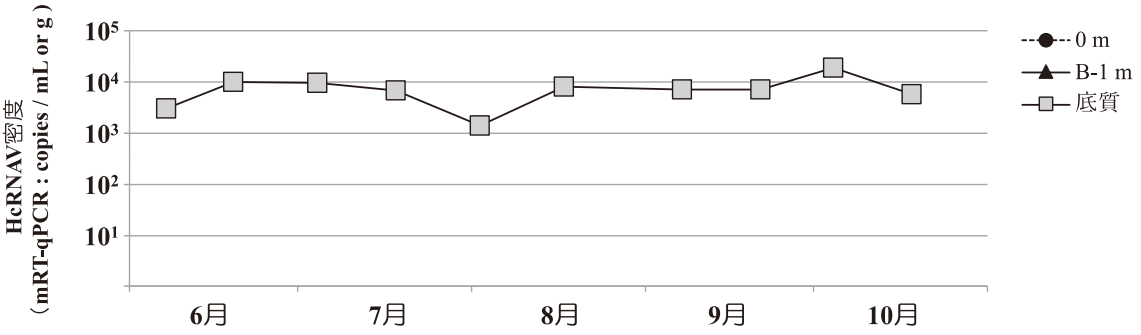


図 4．2023 年の愛知県三河湾における海水及び底質中の HcRNAV の発生状況．
HcRNAV 密度の単位は，海水 copies/mL，泥 copies/g．
値なしは未検出を示す．

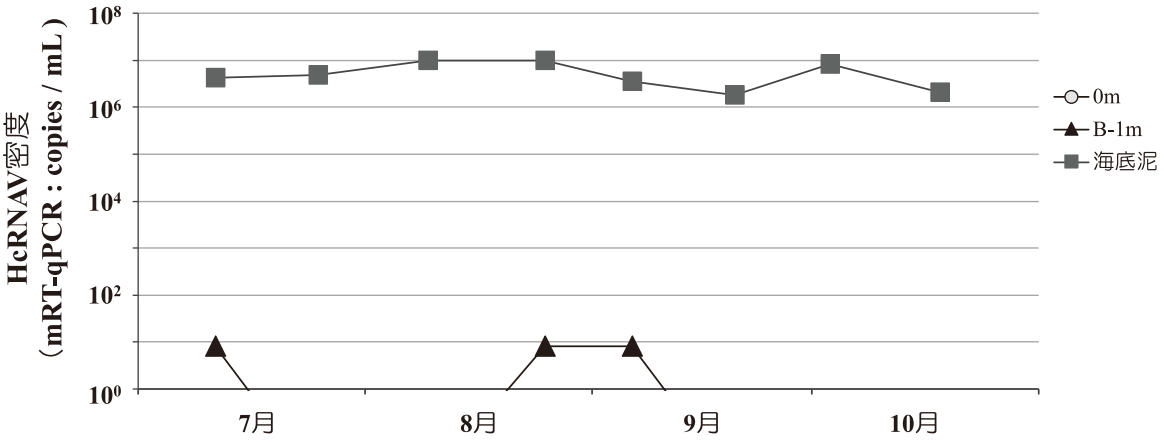


図 5．2023 年の加茂湖原黒定点（St.2）における湖水及び底泥中の HcRNAV 発生状況．
HcRNAV 密度の単位は，湖水 copies/mL，泥 copies/g．
値なしは未検出を示す．

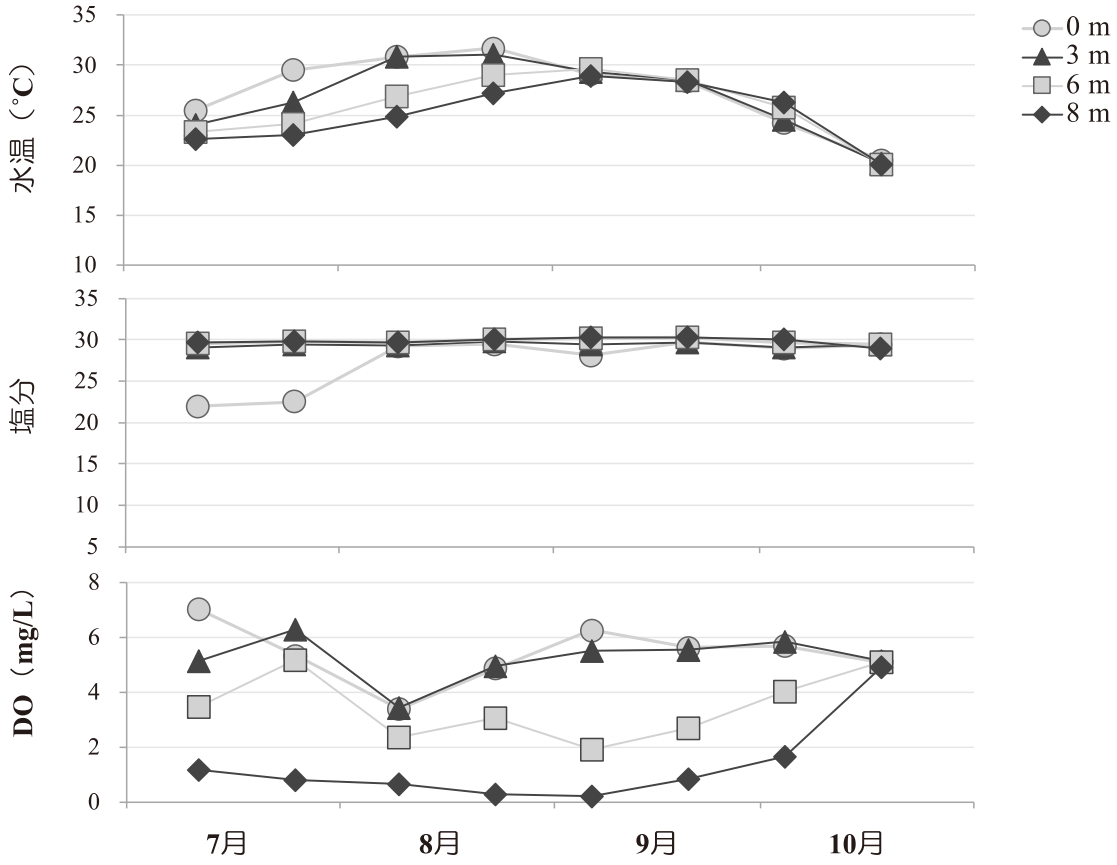


図 6. 2021 年 加茂湖原黒定点（St.2）における水温，塩分，溶存酸素量の変動.

図 7. 現場関係者への普及：HcRNAV を含む海底泥の採取.

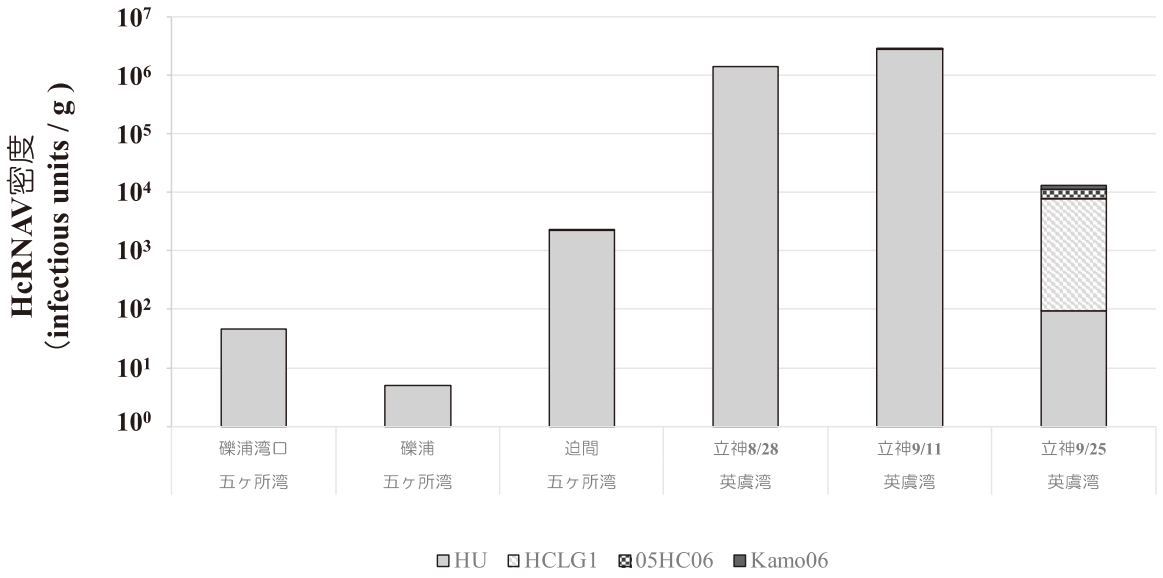


図 8. 2023 年の三重県英虞湾及び五ヶ所湾における泥中の HcRNAV 密度.

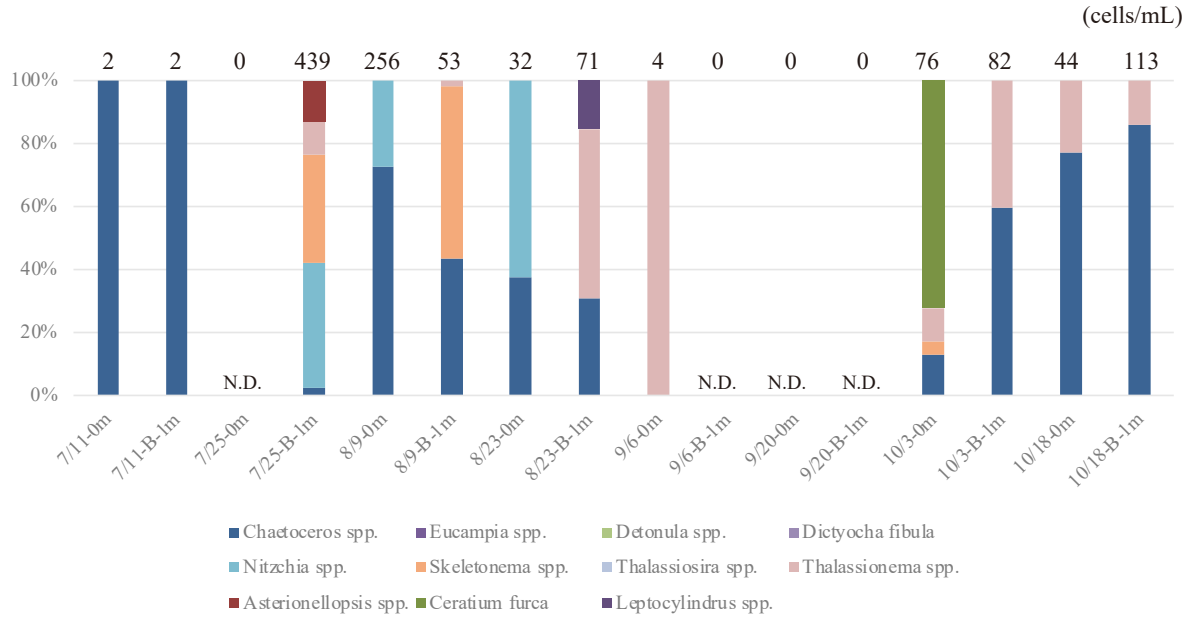


図 9. 2023 年 7～10 月における加茂湖湖水中の珪藻分布.
グラフ上の数字は細胞密度（cells/mL）を示す.
N.D.は未検出を示す.

２）赤潮の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
②　生け簀の魚の救命・延命技術の高度化技術開発と実証

水産研究・教育機構 水産技術研究所
松山幸彦，徳永貴久
大分県農林水産研究指導センター水産研究部
野田　誠
熊本県水産研究センター
阿部慎一郎
海洋エンジニアリング株式会社
伊藤信夫，北村充彰
林兼産業株式会社
藤田幸辰，吉田　歩

１　全体計画

（1）目的

瀬戸内海，土佐湾，八代海海域，鹿児島湾など西日本沿岸では，近年，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が拡大していること，赤潮の初期発生海域や時期，発生環境に周期性が少なく，かつ赤潮発生規模が全海域に及ぶことから，これら予察技術の確立や餌止め，避難の実施による赤潮駆除技術対策は手詰まりとなっているのが実情である。従来型の対策（生簀沈下，生簀容積増大，避難，餌止め）では，赤潮による漁業被害を必ずしも抑制できていないことから，何らかの技術的なブレークスルーが必要である。有明海や八代海海域を中心に赤潮による漁業被害は未だに増え続けており，魚病とともに魚類・貝類養殖業の主要な阻害要因となっている。

本細部課題では，西日本海域において頻発するシャットネラ属，カレニア属，及びコクロディニウム属による赤潮に伴う漁業被害を必要最小限の費用で軽減し，死亡魚の抑制と漁場環境の保全に資することを目的とする。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魚類の死亡が鰓の呼吸機能障害に起因すること，この影響緩和のために，酸素の過飽和が有効であるとの既存試験結果が示された。そこで，赤潮プランクトンが致死的密度で存在していても，溶存酸素を高度に上昇させる手法を駆使して，赤潮が発生しても養殖魚の被害を軽減して，安心して出荷できる手法開発を模索することで，漁業被害防止策の基礎を確立する。

また，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(Matsuyama and Oda 2020)。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っ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渇望されている。

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

を把握した。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餌料へと切り替えて，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。

本細部課題では，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，この改変餌料を赤潮発生時に給餌することで，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を検討する。

以上，これらの革新的な取り組みによって，養殖魚介類を守る技術の開発および実証を行う。

2　令和5年度計画及び結果

(1) 目的

全体計画と同じ

(2) 方法

サブテーマ①：高濃度酸素等併用による養殖魚の救命

1）高濃度酸素発生装置の改良

過年度までに効果が検証された試作品について，現地での試験を積み重ねてきた。実証された試作品について，今年度新たに処理能力を高めるための改良を施した。さらに高濃度酸素供給装置を改良し，その溶存酸素濃度向上性能について評価した。

2）酸素供給装置の効果検証

１）および２）の検討状況を踏まえて，酸素供給装置の有無が致死的赤潮存在下における魚類の延命にどの程度効果があるのか，現地で試験生簀を設置して検討を行った。

3）赤潮海水を用いた救命試験の実施

赤潮分布情報システム等による赤潮モニタリング結果に基づき，試験に好適な時期と海域を事前に特定し，発生した赤潮海水を採取してすみやかに室内へ持ち込む，あるいは現地に簡易な試験生け簀等を敷設し，高濃度酸素水供給装置を用いた救命試験を実施した。試験中の魚毒性への影響等について，養殖対象種となる試験魚を買い上げるもしくはブリの稚魚を投入し，生残時間を指標として定量化することで判定した。

サブテーマ②給餌条件の改変による赤潮発生下での延命効果実証

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した。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B4および餌料B5）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2023年春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（ラブラヴァ：林兼

産業株式会社製）を総尾数の体重の 3〜5%となるように給餌飼育した。今年度の試験に用いた個体の尾叉長は 51.6〜62.1 mm，体重は 1.9〜3.7 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 20 株以上のクローン培養株を作出した（松山ら 2014）。得られた複数株については，シオミズツボワムシ（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（松山ら 2014）。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（MS-SNF 培地, Kim et al. 2020）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°C, 120 µmol photons/m^2/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蝟集するのを確認後，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，容量 10 L の透明バケツを用いた。赤潮プランクトンを含む試水を 3.5〜8 L 注入し，実験時はバケツの周囲に所内海水（23〜27゜C）を掛け流して水温をできるだけ一定に保った。試験中は緩やかな通気を施した。

試験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，試験開始から死亡までの時刻を 1 分単位で記録した。

（3）結果および考察

サブテーマ①：高濃度酸素等併用による養殖魚の救命

1）高濃度酸素発生装置の改良

本課題では，過年度にわたる試験において効果が認められたフォームジェット方式の高濃度酸素発生装置について，処理能力の工場のため，ユニットを拡大した。高濃度酸素発生装置は，株式会社ワイビーエムサービス社製のファビー（酸素ガス濃縮装置，オージネーター601）と図 1 に示したフォームジェット（ファインバブル発生装置, Fjp-12-SP-04S，ワイビーエム株式会社製）を採用した。本装置は大きく水中ポンプ，酸素濃縮装置およびキャビテーションとコアンダ効果によるフォームジェット産生部からなり，すべて 100V の通常電源で稼働させることができる。酸素濃縮装置では，現地大気を吸引し，窒素ガス吸着タイプの特殊な樹脂を通過させて酸素濃度のみを上昇させ（およそ 94%まで上昇），この高濃度酸素をフォームジェット内部で海水と気液混合して 100 nm 程度まで微細化することで，高濃度酸素海水を生成する。高濃度酸素の給気速度は処理量を最大限化するために，100 L の通水量に対して 6 L（6%(v/v)）に設定した。水中ポンプとフォームジェット発生部分はインシュロックで固定して一体化させてあり，ロープで水中を上下できるようにしてある。酸素濃縮装置は船上に固定し，チューブを経由してフォームジェットへ濃縮酸素を供給するシステムである。コンパクトな装置であるため，セッティングに関してウインチなどの重機は不要で

ある。発電機の音以外は非常に静穏で，試験中に魚が音や微細気泡に反応して暴れることはない。フォームジェットのユニットを変更したため，過年度と比較して処理能力が２倍に向上した。

2）酸素供給装置の効果検証

試験は 2023 年 10 月 22 日に大分県水産研究部の試験生簀で実施した（図 2〜4）。1 m X 1 m X 1 m の試験生簀を設置して，①遮蔽幕で四面を密封した状態，②網を張ったのみの解放区，③網の内側にさらに稚魚ネット（4 mm）を張って二重にした試験区の３試験区を設定して，酸素上昇効果を検証した。①の試験では，試験前の溶存酸素は 7.1 mg/L 前後であったが，試験開始後から急上昇し，5 分後には救命のための目安となる 15 mg/L を超えた。生簀内部の溶存酸素の最高濃度は 30 mg/L に達し，一時的に運転を停止しても，12 mg/L を下回ることはなかった。一方，遮蔽幕がない②試験区では，最大濃度は 10 mg/L が最大であり，生簀内部の溶存酸素の変動も潮流の影響を受けて激しかった。最後に実施した稚魚ネットを内張りした③に試験区では，溶存酸素濃度が 10〜13 mg/L と救命のために必要な濃度をギリギリ下回り，遮蔽幕ありの条件に近い酸素上昇効果を示した。

3）赤潮海水を用いた救命試験の実施

今年度は 6 月下旬から *Karenia mikimotoi* による赤潮が八代海で発生し，7 月から 8 月にかけて高濃度化して赤潮が大規模化し，マダイやトラフグを中心に 15 億円にも及ぶ大きな漁業被害をもたらした。7 月 2 日に楠浦湾の小型畜養生け簀に装置を設置して，ここにブリ稚魚を収容して救命効果を実証する試験を行った（図 5）。アメダス本渡の気象データを参照すると，試験前日までの 6 月 29〜7 月 1 日の 3 日の合計降水量が 135.5 mm と豪雨となっており，試験海域の表層は塩分が 12〜18 で推移するなど，低塩分化していた。しかしながら，水深 0.5〜1.0 m にかけて塩分躍層がみられ，この水深での塩分は 24〜30，水深 1.5 m では 29〜30 と変化が少なかった。カレニアはこの塩分躍層直下の 0.5〜1.0 m に高濃度に集積しており，試験期間中は対照区の試験で 2,089〜13,767 cells/mL，高濃度酸素区で 1,530〜13,259 cells/mL で推移していた。なお，試験前の満潮時（9:37）に水深 1.0 m で最大 79,595 cells/mL を記録したが，干潮とともに高密度な細胞は沖へ移流したようである。試験は対照区と高濃度酸素区の２回実施し，いずれも 1 m × 1 m ×1 m の試験生簀の内側に遮蔽幕を設置した状態で試験を実施した。なお，吐出口の溶存酸素濃度はおおよそ 25 mg/L であった（図 6）。試験用のブリ稚魚（尾叉長 43.5 mm，体重 1.14 g）については，図 7 に示した，目開き 4 mm の座布団カゴに 4 尾収容して，*K. mikimotoi* 濃度が高い水深 0.5 m に垂下した。

図 8 に対照区の試験結果を示す。非通気試験区においても，溶存酸素濃度は 11〜15 mg/L の値を示し，多くは 11 mg/L 前後の異常に高い値を示した。これは，*K. mikimotoi* が薄い層にパッチ状に存在して，昼間活発に光合成を行っていたことによるものと推察された。しかしながら，試験魚は最初の 1 尾が開始 22 分後に横転し，供試した 4 尾は試験開始後 37〜57 分後にかけて全数死亡した。令和元年度に伊万里湾で実施した試験（松山ら 2020）によれば，溶存酸素濃度 8〜9 mg/L で推移した対照区の試験で，供試したブリの稚魚が試験開始後 40 分で全滅，酸素濃度を 10〜11 mg/L に上昇させた試験区でも試験開始後 59 分で全滅した結果と類似していた。図 9 に高濃度酸素試験区の結果を示す。溶存酸素濃度は開始後すみやかに救命の目安となる 14〜15 mg/L を超えて，18 mg/L 前後を維持した（最大 27 mg/L）。稼働した２時間の間，試験魚の横転や死亡はみられなかった。このように，天然海域で発生した *K. mikimotoi* 赤潮の救命試験については，過年度の伊万里湾に続き，再現性を確認することができた。

また，図 10 にカレニア赤潮中で発生させた高濃度酸素が，吐出口からどの程度の距離まで影響を及ぼしているか試験している様子を示した。結果を図 11 に示す。今回改良された高濃度酸素は

過年度までのものと比較してスペックが高いため，吐出口から 5 m 離れた地点でも高い酸素濃度を示していた。もちろん，遮蔽幕がなければ稼働停止とともに溶存酸素濃度は通常の状態に戻ってしまうが，仮に養殖魚が赤潮の影響を受けて酸素濃度の高い吐出口近傍に能動的に蝟集する行動を示した場合は，遮蔽幕がなくとも一定の延命効果を発揮する可能性が示唆された。このため，次年度以降は，こうした高濃度酸素水に養殖魚が能動的に蝟集する行動を引き起こすかどうか，確認する必要がある。仮に養殖魚が高濃度酸素に向かって蝟集する行動を起こせば，労力とコストのかかる遮蔽幕設置は回避可能である。

サブテーマ②給餌条件の改変による赤潮発生下での延命効果実証

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 を作成して試験を実施した。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，昨年度までに関与が低いと判断された 3 種類を除いた特定の 2 種類の餌料（餌料 B4 および餌料 B5）を調製し，有効成分の特定を試みた。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 21 日に入手し，流水中で人工餌料を体重の 3〜5%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，*Karenia 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。ただし，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, Watman 社製）でろ過したもので希釈して使用していた。しかし，近年，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弱く白濁し，*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ている。このように，希釈に用いる海水の質によって魚毒性が変動するため，今年度の希釈用の海水は試験前日までに東シナ海に直接面した長崎市下黒崎町の黒崎漁港（32.8350878N 129.7145982E）の表層から採水された清純天然海水（塩分 33.0〜33.6）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：*K. 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 3,292 cells/mL，試験に用いたブリの平均尾叉長は 51.6 mm，平均体重は 1.9 g，平均肥満度は 1.38 であった。試験は対照区，餌料 B 区，餌料 B4 区および餌料 B5 区の全 4 試験区である。ここで用いた餌料 B4 区および餌料 B5 区は，昨年度の試験で弱い延命効果が認められたため，再試験として実施した。各試験区の供試尾数は 5 尾である。試験時の水温は 27.5〜28.4 ° C であった。

1 回目の試験結果を図 12 に示した。対照区については，曝露開始 24 分後からへい死がはじまり，37 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 25 分後に 1 尾目，32 分後に 4 尾目が死亡するなど，延命効果が認められなかった。餌料 B の特定成分のみ濃度下降させた餌料 B4 試験区については， 25 分後に 1 尾目が死亡し，47 分後および 1 時間 28 分後に 3 尾目と 4 尾目が

死亡して全滅した。餌料 B5 は対照区および餌料 B 区とほぼ同じように推移し，34 分後に全滅した。原因は分からないものの，今回の試験では，全体的にブリ稚魚の感受性が高く，全体的に死亡時間が短かった。このため，餌料 B 区の延命効果が明瞭でなかったため，再度試験を実施した。

（改変餌料 4 日間の給餌による影響評価：*K. mikimotoi* 強毒株による 2 回目試験）

餌料 B4 および餌料 B5 の延命効果を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 3,159 cells/mL，試験に用いたブリの平均尾叉長は 56.4 mm，平均体重は 2.6 g，平均肥満度は 1.46 であった。試験は対照区，餌料 B 区，餌料 B4 および餌料 B5 区の全 4 試験区である。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 13 に示した。対照区については，曝露開始 1 時間 25 分後からへい死がはじまり，1 時間 57 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，投入後 15 分程度経過すると遊泳行動が落ち着き，試験終了時となる曝露開始 6 時間後まで全数生残した。餌料 B4 区については，曝露開始 54 分後からへい死がはじまり，それぞれ 1 時間 41 分後および 2 時間 46 分後までに 3 尾目と 4 尾目が死亡して全滅した。餌料 B5 区については，曝露開始 54 分後からへい死がはじまり，それぞれ 1 時間 50 分後および 5 時間 30 分後までに 3 尾目と 4 尾目が死亡して全滅した。2 回目の試験では 1 回目とは異なり，餌料 B の延命効果が過去の試験同様に強く作用した。餌料 B5 は 1 尾試験終了時までに生残するなど一見延命しているように見えるが，3 尾目までの状況に違いはなく，この結果から，餌料 B4 も餌料 B5 の両方とも，単独では延命効果が認められないと判断した。

以上の結果から，餌料 B の延命効果については，5 成分すべてを調製した場合にのみ強力に発現し，過年度までの繰り返し試験に基づけば餌料 B4 および餌料 B5 は有効成分として推定されるものの，単独での調製では全成分を調製した場合と比較して効果が著しく劣ることが結論付けられた。

【対照区における魚毒性のバラツキ要因について：*K. mikimotoi* 強毒株による 3 回目試験】

過年度まで，ブリの稚魚を用いた曝露試験を繰り返し実施してきた。*K. mikimotoi* 強毒株の致死性は，2,000 cells/mL 後半から発現し，4,000 cells/mL を越えると 1 時間前後で全滅することがほとんどである。しかし，実際には，様々な要因，特にハンドリングの統一性の違いにより，この細胞密度ー致死時間の関係は揺れ動くことが経験的に知られている。通気量や試験容積，水温は最も影響を与える要因である。水温は 22 ° C を境に，下まわるほど致死時間が遅延する。また，培養された藻体を希釈後に，静置することなくすぐに曝露試験を実施した場合も致死時間が延命することも多い。さらには，希釈に用いる海水の品質も影響し，清純な天然海水を用いることが望ましい。試験魚の馴致飼育についても，病気の発生による衰弱，土日の給餌を行わなかった後の痩せの発生などの問題で影響を受ける。

こうしたハンドリングの統一性に由来する細胞密度ー致死時間のバラツキについて，ある程度制御された状態で曝露試験を実施してきたが，今年度はかなりバラツキが大きくなった。図 14 に今年度実施した試験のうち，対照区の試験を抜粋して示した。試験日が異なるこの 3 試験区は，いずれも細胞密度が 4,031～4,150 cells/mL とほぼ同じであったにも拘わらず，加熱培地で培養された 4,180 cells/mL では最も魚毒性が低く，ろ過滅菌を行った 4,116 cells/mL では毒性が高まった。培地成分の劣化が疑われたので，ストックの再調整を行って同様にろ過滅菌で培地を調製したところ，すべての試験個体が 30 分以内に全滅するなど，魚毒性の回復がみられた。こうしたことから，現在，培地成分のうち，*K. mikimotoi* の魚毒性に強く作用する成分の絞り込みを実施しており，今後はこうしたバラツキを最小限にして，引きつづき改変餌料の延命効果のための試験を実施していきた

い。

最後に，本年度も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。*K. mikimotoi* で顕著に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.

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.

図 1 今年度改良したファインバブル発生装置（Fjp-12-SP-04S, ワイビーエム株式会社製）

図 2 海面での稼働試験の実施状況（2023 年 10 月 24 日撮影）

図 3 高濃度酸素海水の発生状況（2023 年 10 月 24 日撮影）
撮影のためノズルを水面上に上げたところ

図 4 高濃度酸素海水の発生状況（2023 年 10 月 24 日撮影）
水中で撮影した