

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
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
山崎康裕
大分県農林水産研究指導センター水産研究部
毛利文香，西山雅人，宮村和良
鹿児島県水産技術開発センター
久保 満，中島広樹，脇田敏夫
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，原因種に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判定基準を新たに設定する。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6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毒性の判定基準の確立を行った。

① 生化学的手法によるカレニア属の毒性因子探索

Karenia mikimotoi および *Karenia selliformis* の毒性因子は不安定であるが、これまでに、*K. selliformis* のヒメダカおよびシオミズツボワムシ、ウサギ赤血球に対する毒性および溶血活性が固相抽出によって安定的に分画および濃縮可能であることを明らかにした(湯浅ほか 2024)。そこで、令和6年度は、*K. selliformis* の固相抽出分画液を養殖対象生物であるマダイ稚魚およびメガイアワビ稚貝に暴露して、毒性を確認した。*K. selliformis* の細胞浮遊液(Ks-6株)を20°C, 12 hL:12 hD, 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の条件で約 10,000 cells mL⁻¹ になるよう培養し、ガラスフィルター(GF; GF/C, Whatman)濾過液を5 L 調製した。GF 濾過液を固相抽出担体 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、カラムに純水, 50%メタノール, 70%メタノール, 100%メタノールの順で各1 L を通過させ、脱塩した溶出液を得た。各溶出液をロータリーエバポレーター(N-1300V-W, 東京理化工械)を用いて乾固させ、改変 SWM-3 培地 500 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 株細胞浮遊液, 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20°Cでマダイ稚魚に最長6時間, メガイアワビ稚貝に最長24時間暴露し、横臥およびへい死率を求めた。マダイ稚魚については、500 mL の試料が入った1 L 容量のガラスビーカーに2尾ずつ(体長:47.8±5.9 mm, 体重:2.25±0.71 g)投入し、通気によって溶存酸素濃度を7.0 mg L⁻¹以上となるように試験終了まで維持した。また、横臥直後もしくは6時間生残した個体から鰓を採取し、片野固定液に浸漬して4°Cで保存した。固定試料をパラフィン包埋して切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。染色した組織切片を光学顕微鏡で観察し、組織像を得た。メガイアワビ稚貝については、500 mL の試料が入った500 mL 容量のガラストールビーカーに5個体ずつ(殻長:21.2±1.7 mm, 体重:0.94±0.18 g)投入し、通気によって溶存酸素濃度を9.0 mg L⁻¹以上となるように試験終了まで維持した。

Karenia 属の毒性成分にタンパク質が含まれる可能性を検討するため、*K. selliformis* 細胞浮遊液をタンパク質分解酵素のトリプシンで処理した際のヒメダカ、シオミズツボワムシ(以下ワムシ)に対する毒性とウサギ赤血球に対する溶血活性を調べた。トリプシン(207-19183, 富士フィルム和光純薬)を最終濃度50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ になるよう約4,000 cells mL⁻¹ のKs-6株の細胞浮遊液200 mL に添加し、20°C, 12 hL:12 hD, 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の条件で24時間反応させた。トリプシンの濃度については、事前に様々な濃度(0~2,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)で*K. selliformis* 細胞を処理し、24時間後の細胞密度や遊泳速度に影響がないことが確認できた50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ を適用した。また、対照試験区として、事前に100°Cで10分間加熱して失活させたトリプシンを添加した区を設けた。各試験区をヒメダカ、ワムシ、ウサギ赤血球に最長6時間暴露し、へい死率および溶血率を求めた。ヒメダカについては Yuasa and Shikata (2024) に従い、200 mL の試料が入った500 mL 容量のガラストールビーカーに4尾ずつ(体長:27.7±2.6 mm, 体重:0.19±0.05 g)投入し、通気によって溶存酸素濃度を9.0 mg L⁻¹以上となるように試験終了まで維持した。ワムシについては山崎ほか(2023)に従い、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°C, 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で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100 cells mL⁻¹ となるよう調整したKs-6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 培地のみワムシを収容し、対照区とした。48 ウェルプレートは、20°C, 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ のインキュベーターにて6時間静置し、暴露開始から1時間おきに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。ウサギ赤血球を用いた溶血アッセイは湯浅ほか(2024)に従い、ウサギの保存血液(003-00053-01, 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(Allegra X-30R, ベックマンコールター)を用いて遠心分離し(420×g, 10分, 4°C), 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、Ks-6株の細胞浮遊液を500 cells mL⁻¹になるように希釈し、ディスポーザブルガラス試験管(14-961-27, Thermo Fisher Scientific)に1 mLずつ分注した。その後、4%の赤血球懸濁液を1 mLずつ各試験管へ添加し、20°C、150 μmol photons m⁻² s⁻¹の条件で静置した。最長6時間反応させ、試験管から試料を150 μLマイクロチューブに分取して遠心分離(360×g, 10分, 4°C)にかけ、得られた各試料の上清100 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 SkyHigh, 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(富士フィルム和光純薬, Polyxyethylene(10)Octylpheny Ether)の2%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。

$$\text{溶血度 (\%)} = (\text{試料の吸光度} - \text{NC 区の吸光度}) / (\text{PC 区の吸光度} - \text{NC 区の吸光度}) \times 100$$

また、新規毒性診断技術として、令和5年度に引き続き*K. selliformis*溶血活性検出法の手法検討を行った。まず、令和5年度の検討において溶血環の検出感度が高いことが明らかとなったウマ血液寒天培地(51004, 日水製薬)を用いた検量線の作成を試みた。具体的には、陽性対照区として使用するTritonX-100を滅菌改変SWM-3培地により15段階に希釈した試料(0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%)を6 mL容量スクリー管瓶(5-101-03, アズワン)に調製した。また、*K. selliformis*細胞浮遊液(Ks-6株, 改変SWM-3培地にて20°Cで6日間培養, 10,800 cells mL⁻¹, 702 cells/穴)および陰性対照区(改変SWM-3培地)も調製した。湯浅ほか(2024)で報告された手法に従い、ウマ血液寒天培地に設けた穴に試料を滴下し(65 μL/穴, 3穴/試料), 20°Cのインキュベーターにて24時間静置した。その間、白色LEDライト板上で血液寒天培地の写真を7回撮影した(試料滴下後0, 1.5, 3, 6, 21, 24, 27時間後)。撮影した写真についてImageJを用いて、穴もしくは溶血環の面積をそれぞれ一回測定した。また、経過時間毎の溶血面積(溶血環の面積-試料滴下後0時間後における穴の面積)を算出した。この際、3穴の平均値および標準偏差を算出し、得られた値に基づき検量線を作成した。*K. selliformis*細胞浮遊液については、得られた溶血面積の値を検量線の式に代入することにより、TritonX-100等量溶血活性(%)を算出した。

次に、様々な細胞密度の*K. selliformis*細胞浮遊液やメタノール抽出液に対する溶血活性について、溶血活性を評価した。供試試料は、5段階の細胞密度に調製した*K. selliformis*細胞浮遊液(Ks-6株; 改変SWM-3培地にて15°Cで12日間培養; 10,000 cells mL⁻¹, 620 cells/穴; 4,000 cells mL⁻¹, 248 cells/穴; 1,000 cells mL⁻¹, 62 cells/穴; 500 cells mL⁻¹, 31 cells/穴; 100 cells mL⁻¹, 5 cells/穴), 3種のメタノール抽出液(50%, 70%, 100%メタノール抽出液)および陰性対照区(改変SWM-3培地)を用いた。いずれの試料も3本ずつ調整した。検量線の作成には、TritonX-100を9段階に希釈した試料(0.01, 0.03, 0.04, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%)を用いた。上述した方法に基づき、これら供試試料をウマ血液寒天培地に滴下した後、15°Cのインキュベーターにて24時間静置し、それぞれのTritonX-100等量溶血活性(%)を算出した。

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、毒性の異なる培養株および培養条件の*K. mikimotoi*および*K. selliformis*の抽出液について、液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS/MS)を用いたノンターゲット分析を進め、魚介類の毒性と相関する化合物群が示された(湯浅ほか2024)。令和6年度は、LC/MS/MS分析によって毒成分の候補化合物の絞り込みを進めるため、固相抽出により分画した*K. selliformis*の毒性含有画分の試料を作製し、毒性を評価した。*K. selliformis*の細胞浮遊液(Ks-6株)を20°C、

12 hL:12 hD, 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で約 10,000 cells mL^{-1} になるよう培養し、ガラスフィルター (GF; GF/C, Whatman) 濾過液を 1 L 調製した。GF 濾過液を固相抽出担体 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、カラムに純水, 50%メタノール, 70%メタノール, 100%メタノールの順で各 500 mL~1 L を通過させ、脱塩した溶出液を得た。各溶出液をロータリーエバポレーター (N-1300V-W, 東京理化工機) を用いて乾固させ、改変 SWM-3 培地 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 株細胞浮遊液, GF 濾過液 (当日調製), GF 濾過液 (調製後 3 日間 4°C で保存), 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 培地をヒメダカに最長 6 時間暴露し、へい死率を求めた。ヒメダカについては、200 mL の試料が入った 500 mL 容量のガラストールビーカーに 4 尾ずつ (体長: 26.8 \pm 1.8 mm, 体重: 0.18 \pm 0.05 g) 投入し、通気によって溶存酸素濃度を 8.0 mg L^{-1} 以上となるように試験終了まで維持した。

③ シャットネラの細胞外多糖と魚毒性の関係探索

有害赤潮プランクトンが有する細胞外多糖が細胞の粘性をあげる原因となり、魚毒性に寄与することが考えられる。これまでに、*Chattonella* 培養株における細胞外多糖の精製手法を確立し、強毒株と弱毒株間で構成単糖に大きな差がないことを明らかにした (湯浅ほか, 2024)。そこで令和 6 年度は、強毒株と弱毒株の細胞外多糖画分を用いて、多糖の粘性に関与する硫酸基量を定量した。

1. *Chattonella marina* Ago03 株 (強毒), Ago04 株 (弱毒) および 4KGY 株 (栄養欠乏時に強毒性を示す) を改変 SWM-3 培地で 25°C, 7 日間培養した。400 mL の細胞浮遊液を 50 mL 容 TPX チューブ 8 本に分注し、超音波破碎機 (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剥離させた。
2. 3,500 rpm, 4°C 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) を取り付けアミコン濃縮機 (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、凍結乾燥にかけてさらに濃縮した。
6. 濃縮したグリコカリックス画分を 2.5 mL の PBS に溶解し、この内 2 mL をフィルター (ポアサイズ 0.45 μm) でろ過した後、Sephadex G-100 を用いてゲルろ過クロマトグラフィーに供した。
7. 溶出画分を 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。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。
8. 精製グリコカリックスを水に対して透析後、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。これをさらに 100 mg mL^{-1} に分注し、終濃度 2 N トリフルオロ酢酸 (TFA) 中で、120°C, 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。
9. 硫酸基量の定量は、QuantiChrom Sulfate Assay Kit (DSFT-200, フナコシ) を用いて行った。得られた加水分解産物 100 μL に対しトリクロロ酢酸 100 μL を混合し、14,000 rpm で 5 分間遠心分離し上清を回収した。回収した上清に塩化バリウム溶液 100 μL を添加し、室温で 5 分静置した後 600 nm の吸収波長で濁度を測定し、検量線から硫酸基量を定量した。
10. 細胞の粘性に寄与する要因として、多糖鎖中の硫酸基修飾の他に単糖の結合様式が考えられるため、精製グリコカリックスを穏やかな酸条件で限定的に加水分解して糖鎖の構造解析を行っ

- た。精製グリコカリックスを終濃度 50 mM TFA 中で 120°C, 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。
11. 加水分解後のサンプル 20 μg を 100 μL の蒸留水に溶解し、100 μL の標識試薬（組成: NaBH_3CN 6.125 mg, 4-アミノ安息香酸エチルエステル 61.25 mg, 酢酸 71.75 mg, メタノール 612.5 μL ）と混合した後、ドライバスで 80°C, 30 分蛍光標識した。
 12. 反応後エアポンプで乾固し 200 μL の蒸留水に溶解した後、ジエチルエーテル 1 mL と混合しボルテックスした。その後、混合物を 3,000 rpm, 4°C で 1 分間遠心し、上層のエーテル層を除去した。この操作を 7 回繰り返した後、エアポンプで乾固した。
 13. Amide-80 カラム (Tosoh) を装着した高速液体クロマトグラフィーに供して蛍光を指標にオリゴ糖を検出した。

④ プランクトンの毒性を識別する DNA の探索

本課題は、有害プランクトンにおける毒性の高低を識別する DNA 配列を特定し、DNA 検出法を用いた魚毒性診断技術を開発することを目的とした。*Chattonella* 属の 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することが報告されている (Shikata et al. 2021)。そこで、令和 5 年度に確立した形態学的に *Chattonella marina* complex と判別される魚毒性が未知の培養株 (119 株; 神奈川県, 静岡県, 広島県, 高知県, 大分県, 熊本県, 鹿児島県産株) および魚毒性が既知の株 (4 株; 三重県, 香川県, 熊本県産株) について 25°C, 12 hL:12 hD, 250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で培養し、培養 2 日目と 7 日目に細胞密度の算出と化学発光試薬 L-012 およびルミノメーター (ルミネッセンサー-Octa, ATTO) を用いた化学発光法による O_2^- レベルの計測 (Shikata et al. 2021) を行った。得られた結果に基づき、魚毒性未知株から 8 株 (Cha13ISE02 株, HHJJ1_31 株, OST09 株, KKR04 株, Cha2Oval60721 株, KMM13 株, HHJJ1_30 株, OST35 株) および魚毒性既知株から 2 株 (Ago03 株, Ago04 株) を選抜し、25°C で 7 日間の培養後に約 6,000 cells mL^{-1} に調整してマダイ稚魚に対する暴露試験を行い、選抜株の魚毒性を評価した。30 cm 水槽に 3 L の各株の細胞浮遊液を 25°C で準備し、細胞密度と O_2^- レベルを計測後、マダイ稚魚を 2 尾ずつ (体長: 53.2 ± 10.5 mm, 体重: 3.42 ± 2.01 g) 投入し、通気によって溶存酸素濃度を 7.0 mg L^{-1} 以上となるように試験終了まで維持した。さらに、選抜株を含む 25 株の DNA 抽出物を用いて、*Chattonella* 属の分子系統解析に用いられる DNA 領域である、リボソーム DNA の一領域 (ITS 領域)、葉緑体 DNA の一領域 (*rbcL* 領域) およびミトコンドリア DNA の一領域 (CO1 領域) について、既報のプライマーセット (Demura et al. 2009) により PCR を行い、各領域の塩基配列を決定した。決定した配列と国内外より報告されている配列について多重配列整列を行った後、ブートストラップサンプリングを 1,000 回に設定した近隣結合法に基づく分子系統樹を作成し、Lum et al. (2022) が報告した ITS 領域における本属のクレード名に従い、供試株のクレード分けを行った。また、得られたクレードと魚毒性との対応関係を確認した。

また、*Chattonella* 属の既知の強毒株と弱毒株について、細胞を認識して結合する DNA アプタマーを探索した。令和 6 年度は、キャピラリー電気泳動法により各株に特異的に結合する DNA アプタマーの候補を選抜した。DNA が細胞表面に結合しやすい性質を利用して、フォワード領域 (20 塩基)、ランダム領域 (25 塩基)、リバース領域 (20 塩基) からなる一本鎖 DNA のライブラリーを作成した。その中から、*C. marina* の Ago03 株と Ago04 株に結合する DNA アプタマーを、高分子増強キャピラリー過渡的等速電気泳動法 (PectI 法) と、類似配列群に分けるクラスタリング法を用いた定量的処理に基づく大規模次世代シーケンサー解析を組み合わせた方法 (シングルラウンドキャピラリー電気泳動選抜法; SR-CE 選抜法) によって選抜した。SR-CE 選抜法は、キ

キャピラリー電気泳動を用いて DNA アプタマーの選抜操作を 1 回で完了するものである。また、PectI 法は泳動液にポリエチレンオキサイド (PEO) を添加し、キャピラリー過渡的等速電気泳動 (ctITP) により試料の濃縮・分離を行う。ctITP による生体粒子の単一ピークへの高度な濃縮を達成しつつも、泳動液中への PEO 添加によるピークフォーカシング効果により、キャピラリーゾーン電気泳動による分離段階でも単一ピークを分裂させずに保持する手法である。

PectI 法によって *C. marina* 細胞と DNA アプタマーの複合体を分画し、選抜プールとした。この選抜プール中の *C. marina* 表面に結合した DNA を PCR で増幅し、次世代シーケンサーにより選抜プール中の DNA 配列を解読した。その後、類似性の高い配列群を形成しているファミリーを抽出し、ファミリーの親配列を DNA アプタマーの候補配列とした。各 DNA アプタマー候補配列を、共焦点レーザー顕微鏡による結合実験と蛍光偏光解消法による解離平衡定数 (K_d /nM) の決定を実施した。

2) 既存の毒性診断技術のマニュアル改訂と現場検証

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 (湯浅ほか 2023)。しかしながら、これらの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い。本課題では、本種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、手法の簡易化等を検討した。

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することが報告されている (Shikata et al. 2021)。しかし、水産生物の赤潮プランクトンに対する感受性は魚種等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魚介類に暴露し、それらのへい死率と O_2 レベルとの関係を解析した。2024 年 7 月 3~4 日に東町漁業協同組合の協力下で、マダイ、シマアジ及びマサバを用いた現場赤潮海水の暴露試験を行った。2024 年 7 月 3~4 日の朝、薄井近辺の東町漁協管内で水揚げされた、シマアジ (尾叉長 336.2 ± 14.1 mm, 体重 $1,168 \pm 171$ g), マダイ (尾叉長 367.9 ± 2.7 mm, 体重 $1,697 \pm 187$ g), マサバ (尾叉長 377.4 ± 14.3 mm, 体重 668.0 ± 78.0 g) を購入し、調査船の活け間で赤潮発生海域まで輸送した。船上検鏡しながら、*Chattonella* 属の細胞密度の異なる地点においてバケツで表層採水を行い、500 L 容量のパンライト水槽に 8 割程度の赤潮海水を満たした。エアーのセット、 O_2 レベルの計測、各種の水質計測を行った後、シマアジ 2 尾とマダイ 2 尾は同じ水槽に、マサバは 10 尾ずつを各水槽に投入し、暴露開始 4 時間後まで生死観察を行った。高気温による暴露海水の昇温を防ぐため、パンライト水槽の底に板氷と土嚢を敷き、その上にパンライト水槽を重ねたものを試験水槽とした。また、暴露試験中に水温を測定し、適宜氷嚢を暴露海水に浮かべた。横臥した時点でへい死とみなし、魚体を水槽から引き上げた。横臥個体および生残個体から鰓を採取し、片野固定液に浸漬して冷蔵保存した。固定試料をパラフィン包埋して切片を作製し、HE 染色を行った。染色した組織切片を光学顕微鏡で観察し、組織像を得た。

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 (以下、従来法とする) 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。このため昨年度は、ワムシのピックアップを行うことなく密度調整したワムシ浮

遊液に試料を暴露する方法（以下、新法とする）で毒性試験を行い、へい死個体でなく生残（遊泳）個体を計数することで従来法の課題の解決を試みた。この結果、新法は従来法より簡便に試験のセッティングが可能であり、かつ、客観的なデータの取得が期待された（湯浅ほか 2024）。しかし、1 検体の毒性判定のためにワムシの計数を複数回行う必要があるため、毒性試験のさらなる簡易化が求められる。そこで本課題では、高密度に濃縮したワムシ浮遊液に赤潮藻を暴露し、ワムシ個体群の生残（遊泳）状況を目視で判定する手法（以下、目視判定法とする）を考案し、従来法による毒性検出結果と比較した。

目視判定法は、以下の手順で実施した。まず、湯浅ほか（2024）の方法に従い、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、25°C、100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、および塩分 30 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、濃縮したワムシ浮遊液をセミマイクロディスポーザブルキュベット（バイオ・ラッドラボラトリーズ；以下、キュベットとする）に 0.6 mL ずつ添加した。その後、暴露密度が 10^3 および $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ となるよう調整した 5 株（IMR4 株、Mie09 株、Mie19 株、KASO09 株および KASO11 株）の *K. mikimotoi* の細胞浮遊液を各キュベットに 1.4 mL ずつ添加して各キュベットの最終液量を 2.0 mL とし、キュベットキャップで密閉した。また、改変 SWM-3 培地のみワムシを収容し、対照区とした。全てのキュベットは、25°C、100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のインキュベーターにて 5 時間静置し、暴露開始から 4 時間および 5 時間後におけるワムシ個体群の遊泳の有無を目視観察した。

従来法は、山崎ほか（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、25°C、100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、および塩分 30 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 $10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ となるよう調整した *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 培地のみワムシを収容し、対照区とした。48 ウェルプレートは、25°C、100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のインキュベーターにて 5 時間静置し、暴露開始から 1 時間おきに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。

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

令和 6 年 6 月から 8 月にかけて八代海でシャットネラの増殖が確認されたため、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実施し、SNS 等を用いて関係各機関へ情報共有を行った。令和 6 年 6 月 13 日、7 月 5 日、7 月 23 日、30 日に東町漁業協同組合の協力を得て、図 1 で示した定点における採水試料の *Chattonella* 細胞密度および O_2^- レベルを計測した。

(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性因子探索

Karenia selliformis の細胞浮遊液をマダイ稚魚に暴露した結果、500 cells mL^{-1} では全尾が 6 時間生残したが、1,500 cells mL^{-1} では暴露 1 時間で 16.7% の個体が横臥し、6 時間で 33% の個体が横臥した（図 2A）。4,000 cells mL^{-1} では、1 時間以内に全尾が横臥した（図 2A）。また、GF 濾過液や固相抽出液をマダイ稚魚に暴露した結果、GF 濾過液暴露区では 1 時間以内に全尾が横臥し、100% メタノール溶出液暴露区では 6 時間で 33% の個体が横臥した（図 2A）。50% メタノール溶出液と 70% メタノール溶出液、改変 SWM-3 培地の暴露区では全尾が 6 時間生残した（図 2A）。各試験区の横臥個体もしくは生残個体の鰓について組織解析を実施した結果、*K. selliformis* 細胞浮遊液を暴露された個体で生残・横臥に関わらず鰓組織の二次鰓弁上皮とその基部からの細胞剥離が改変 SWM-3 培地（対照区）に比べて顕著に認められた（図 3）。また、GF 濾過液と 100% メタノール

溶出液を暴露された個体でも同様の損傷が確認された。50%メタノール溶出液と 70%メタノール溶出液, 改変 SWM-3 培地を暴露した試験区では, 顕著な損傷や変化は認められなかった (図 3)。これらの結果は, 令和 5 年度に実施したヒメダカへの暴露試験における組織解析と同様の結果であり, 海産の養殖対象魚であるマダイに対しても強い毒性があることが確認された。メガイアワビ稚貝へ 1,500, 3,000, 6,000 cells mL⁻¹ の *K. selliformis* 細胞浮遊液を暴露した結果, 24 時間後のへい死率がそれぞれ 53, 80, 87%であった (図 2B)。また, GF 濾過液や固相抽出液をメガイアワビ稚魚に暴露した結果, GF 濾過液では 24 時間で 53%の個体が, 100%メタノール溶出液では 60%の個体がへい死した (図 2B)。50%メタノール溶出液と 70%メタノール溶出液, 改変 SWM-3 培地の暴露区では全個体が 24 時間生残した (図 2B)。

トリプシンで 24 時間処理した *K. selliformis* 細胞浮遊液をヒメダカに暴露した結果, トリプシンを含む培地を暴露した試験区では全尾が 6 時間生残したが, 未処理の細胞浮遊液暴露区では 1 時間で 42%, 6 時間で 100%の個体がへい死し, トリプシン処理した細胞浮遊液を暴露した区では 6 時間で 42%の個体がへい死した (図 4A)。加熱によって失活したトリプシンで処理した細胞浮遊液の暴露区では, 未処理区と同様に 1 時間で 50%, 6 時間で 100%の個体がへい死した (図 4A)。一方で, 同じ試料をワムシに暴露した結果, トリプシンを含む培地を暴露した試験区では全個体が 6 時間生残したが, それ以外の試験区では 1 時間で 40~47%, 6 時間で 97~100%の個体がへい死した (図 4B)。また, 各試料の暴露 6 時間後の溶血活性は, トリプシンを含む培地を暴露した試験区で 4.8%, 未処理区で 100%, トリプシン処理区で 51%, 加熱トリプシン処理区で 91%であった (図 4C)。以上の結果から, ヒメダカへの毒性成分と溶血成分にはタンパク質が含まれることが示唆された。また, ワムシ毒性はトリプシン処理の影響を受けなかったが, ワムシは感受性が極めて高いために試験区間で毒性に差が見られなかった可能性がある。

20°C の条件にて, 15 段階に希釈した TritonX-100 試料について検量線の作成を試みたところ, いずれの経過時間においても, 0.01, 0.02 および 0.03% TritonX-100 区において溶血環は見られなかった。これより, 検量線の作成には 0.04~2.0% TritonX-100 区の値を用いた。また, 試料滴下後 1.5, 3 および 6 時間後の結果もしくは 21, 24 および 27 時間後の結果は, それぞれほぼ同様であった。これより, 以降の解析には, それぞれを代表して滴下 6 時間後および 24 時間後の値を用いた。溶血活性の反応の程度については, 0.1% TritonX-100 区を境に差異が見られた。すなわち, 0.1% 以下の希釈試料においては, 6 時間後を境にほとんど溶血反応が進まなくなり, 21~27 時間後におけるそれらの溶血面積とほとんど差異は無かった。これより, 0.1%以下の希釈試料では, 滴下 6 時間後において溶血反応がほぼ停止することが示唆された。一方で, 0.1%を超える希釈試料では, 0.25% TritonX-100 区において滴下 24 時間後で溶血反応がほぼ停止したものの, それ以外の試料では滴下 27 時間後まで溶血反応が進んでいた。以上の結果より, 滴下 6 時間後および 24 時間後のいずれにおいても, 0.04%~0.1%および 0.1%~2% TritonX-100 区に分けた 2 種類の検量線を作成した (図 5)。これより, 目的とする試料の溶血活性を測定する際には, 試料の溶血面積が 0.1% TritonX-100 区のそれよりも小さい場合は, 滴下 24 時間後 (あるいは 6 時間後) の 0.04%~0.1% TritonX-100 区より得られた検量線を使用し, 0.1% TritonX-100 区のそれよりも大きい場合には, 滴下 24 時間後の 0.1%~2% TritonX-100 区より得られた検量線を使用すれば良いと考えられた。次に, 20°C で培養した *K. selliformis* 細胞浮遊液 (Ks-6 株, 10,800 cells mL⁻¹, 702 cells/穴) の溶血活性を測定したところ, 0.26% TritonX-100 等量であることが明らかとなった (図 5C)。

15°C の条件にて, 9 段階に希釈した TritonX-100 試料について検量線の作成を試みたところ, いずれの経過時間においても, 0.01, 0.03 および 0.04% TritonX-100 区において溶血環は見られなかった。これより, 検量線の作成には 0.1%~2% TritonX-100 区の値を用いた (図 6A)。また, いずれの区においても, 上述した 20°C 条件と比較して溶血環は小さかった。これより, 20°C 条件においては 0.04% TritonX-100 区においても溶血環が見られたことも鑑みて, 15°C 条件は 20°C と比較して溶血反応が進み難いことが明らかとなった。次に, 15°C で培養した 5 段階の細胞密度に調製した *K. selliformis* 細胞浮遊液 (Ks-6 株) および 3 種のメタノール抽出液 (50%, 70%, 100%

メタノール抽出液)の TritonX-100 等量溶血活性を検討したところ, *K. selliformis* 細胞浮遊液 10,000 cells mL⁻¹ 区 (620 cells/穴), 4,000 cells mL⁻¹ 区 (248 cells/穴) および 100%メタノール抽出液において, それぞれ 0.12±0.01%, 0.09±0.001%および 0.10±0.003% TritonX-100 等量の溶血活性が得られた。一方で, その他の試験区では溶血活性が見られなかった (図 6B)。

② 分析科学的手法によるカレニアの毒性診断技術の開発

LC-MS/MS 分析に供する試料の魚毒性をヒメダカに対する暴露試験で確認した結果, GF 濾過液を暴露した区では 3 時間以内に全尾がへい死したが, 3 日間冷蔵保存した GF 濾過液暴露区では, 全尾が 6 時間生残した (図 7)。また, 50%メタノール溶出液, 70%メタノール溶出液の暴露区では全尾が 6 時間生残したが, 100%メタノール溶出液では 3 時間以内に全尾がへい死した (図 7)。

③ シャットネラの細胞外多糖と魚毒性の関係探索

多糖の粘性に寄与する硫酸基の含有量を調べた。その結果, 強毒の Ago03 株から得たグリコカリックスと弱毒の Ago04 株から得たグリコカリックスの中に含まれる硫酸基の量には差がないことが分かった (図 8)。加えて, 限定加水分解で生じるオリゴ糖のパターンについても比較したが, 両者の間に顕著な違いは見られなかった (図 9A)。さらに, 窒素欠乏条件で強毒性を示す 4KGY 株も用いてグリコカリックスの糖の結合様式を解析した。その結果, Ago03 株, Ago04 株, 4KGY 株の間で単糖の結合様式に差がないことが分かった (図 9A, B)。したがって, 魚毒性やスーパーオキシド産生量と相関しているのはグリコカリックスに含まれる糖含量の違いであり, 構成糖や結合様式ではないことが考えられた。一方で, グリコカリックスには低分子の糖フラクションが多く含まれていることも分かった。現在のグリコカリックス精製法では, 限外濾過濃縮の際に低～中分子の多糖が濾過膜を素通りして捕捉できていない可能性がある。今後, 低～中分子の多糖画分を回収して, 強毒株と弱毒株で違いがあるか調べる必要がある。また, 多数の *Chattonella* 強毒株, 弱毒株のコレクションを対象にグリコカリックスの糖分析を行い, 糖含量や糖鎖構造とスーパーオキシド産生量, 魚毒性の相関を調べる必要がある。

④ プランクトンの毒性を識別する DNA の探索

Chattonella 属の 123 培養株における培養 2, 7 日目の細胞密度および O₂⁻レベルを図 10A, B に示した。O₂⁻レベルは既知の強毒株よりも高い株や既知の弱毒株よりも低い株が複数認められた (図 10B)。O₂⁻レベルを指標に *Chattonella marina* var. *antiqua* (*C. antiqua*), *Chattonella marina* var. *marina* (*C. marina*), *Chattonella marina* var. *ovata* (*C. ovata*) からそれぞれ強毒候補株と弱毒候補株を選抜し, マダイ稚魚へ暴露した結果を図 11A, B に示した。O₂⁻レベルと 6 時間後のマダイ横臥率の相関図を作成した結果, *C. antiqua* では決定係数 R²が 0.934, *C. marina* では R²が 0.815 であり, 高い相関関係が認められた (図 12A, B)。一方, *C. ovata* は供試が 2 株であったために正確な決定係数を算出できなかったが (図 12C), マダイ横臥率が 35%の株で O₂⁻レベルが低く, マダイ横臥率が 0%の株で O₂⁻レベルがやや高かった (図 11A, B)。したがって, *C. antiqua* と *C. marina* では既報 (Shikata et al. 2021) のとおり O₂⁻レベルと魚毒性に正の相関関係が認められたが, *C. ovata* では正の相関関係が認められなかった。今後は, *C. ovata* の供試株数を増やし追試験を行うことにより, O₂⁻レベルと魚毒性の相関関係を再度検討する必要がある。また, 塩基配列の決定に供した 25 株について, ITS 領域は 25 株, CO1 領域は 16 株, *rbcL* 領域は 24 株の配列を決定することに成功した。各領域に基づく分子系統樹を作成したところ, 供試株は 24 株が *C. marina* complex (Clade III) に, 1 株が *Chattonella subsalsa* (Clade II) に属することが明らかとなった (図 13)。*C. marina* complex (Clade III) に属した 24 株は, ITS 領域においては単クレードに属したものの (図 13A), *rbcL* 領域および CO1 領域においてはそれぞれ 2 つのサブクレード (Subclade IIIa および IIIb, サブク

レード名は本研究により報告)に属した(図13B,C)。またITS領域において、*C. subsalsa*は、温帯域である地中海(イタリアおよびチュニジア)から分離された株で構成されるClade I、ならびに太平洋・大西洋(イタリア、タイ、シンガポール、フィリピン、アメリカ東南海域およびブラジル)の温帯・熱帯域から分離された株で構成されるClade IIの2つのクレードに分けられる(図13A)。このうち、*C. subsalsa*に属した1株はClade IIに属した(図13A,B,C)。なお、これまでに本邦における本種の報告例は無く、本研究により初めてその分布が確認された。一方で、いずれの領域においても、*C. marina complex*(Clade III)におけるクレードやサブクレードとO₂産生能との間に対応関係は見られなかった(図13A,B,C)。以上の結果より、*Chattonella*属の分子系統解析に用いられる3領域(ITIS領域、*rbcL*領域およびCO1領域)は、いずれもO₂産生能との対応が得られないことが明らかとなった。今後は、他のDNA領域による分子系統解析もしくは他の分子生物学的解析手法により、*Chattonella*属の毒性の強弱を識別するDNAの塩基配列が特定されることが望まれる。

次に、*C. marina*のAgo03株(強毒)およびAgo04株(弱毒)に結合するDNAアプタマー候補を選抜した。Ago03株に対する候補として3種類のDNAアプタマー候補を選抜したが、Ago03株との結合実験の結果、いずれもAgo03株とは特異的に結合しなかった。一方、Ago04株に対する候補として選抜した3種類のDNAアプタマーは、Ago04株に対して特異的に結合し、極めて低い解離平衡定数(K_d/nM)を示した(図14)。また、DNAアプタマーの末端は蛍光標識されていることを利用し、選抜したDNAアプタマーがAgo04株の細胞表面に結合している様子も蛍光顕微鏡で確認することができた(図15)。したがって、Ago04株に特異的に結合するDNAアプタマーを選抜することができたと言える。Ago03株に対する特異的なDNAアプタマーを選抜できなかった理由として、Ago03株の細胞表面が細胞外多糖グリコカリックスで覆われているため、DNAが結合しにくい状況にあったことが考えられる。今後、グリコカリックスを剥離した細胞でDNAアプタマーの選抜を行う予定である。また、他の*Chattonella*株や、*K. mikimotoi*などの他の有害種を対象としたDNAアプタマーの選抜も行う予定である。

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

令和6年7月3日に八代海で発生した*Chattonella*赤潮を船上でマダイとシマアジに暴露し、生残率とO₂レベルを計測した。コントロール、薄、中、濃の各試験区の*Chattonella*細胞密度はそれぞれ1,146,498,800 cells mL⁻¹であった。マダイは全試験区で全尾が4時間生残したが、シマアジは濃区では2時間で全尾へい死し、中区では3時間で全尾がへい死した(図16A)。薄区では67%の個体が4時間生残し、コントロール区では全尾生残した(図16A)。暴露海水のO₂レベルはコントロール、薄、中、濃の順で低く、一部のシマアジのへい死が生じた薄区のO₂レベルは約30,000であった(図16B)。O₂レベルは特に濃区で水槽へ採水前から採水後で大きく減少しており(図16B)、これはバケツ採水による刺激が原因であると考えられた。令和6年7月4日に実施した八代海におけるマサバに対する*Chattonella*赤潮の暴露試験では、コントロール、薄、中の試験区を設置し、各試験区の*Chattonella*細胞密度は5,118,412 cells mL⁻¹であった。マサバは中区では2時間で全尾へい死し、薄区では4時間で40%が生残した(図17A)。コントロール区では90%が生残した(図17A)。暴露海水のO₂レベルはコントロール、薄、中の順で低く、60%のマサバがへい死した薄区のO₂レベルは約180,000であった(図17B)。コントロール区で一部のマサバがへい死したが(図17A)、これは500Lの試水に10尾を投入したことによるストレスが原因と考えられるため、今後の試験の際は収容尾数を減らす必要がある。組織解析では、シマアジ、マサバともに一次鰓弁上皮間に血球漏出や粘液性の付着物が顕著に確認された(図18)。また、二次鰓弁上皮間に*Chattonella*と思われる細胞を捉えることに成功した(図19)。以上の結果から、シマアジおよびマサバはO₂レベルがそれぞれ30,000、180,000程度でへい死が生じたため、O₂レベルによるへい死警戒基準値を数万程に定めることや、魚種により異なったへい死警戒基準値を定めるこ

とを検討す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

ワムシ毒性試験のさらなる簡易化を目的として、5株の *K. mikimotoi* をワムシに5時間暴露し、従来法と目視判定法で得られた結果を比較した。従来法では、Mie09株の暴露区を除いたすべての株の暴露区において、経時的にワムシへい死数が増加した(図20)。また、各株を4時間暴露した時点でのワムシに対する毒性はMie19株が最も強く、それ以降はKASO09株、IMR4株およびKASO11株の順で毒性が強かった。

同様に、目視判定法でも従来法と同じ傾向で毒性が観察された。図21に示した 10^4 cells mL⁻¹ 暴露区では、従来法で毒性が強かったMie19株とKASO09株の暴露区では、ほぼ全てのワムシが遊泳力を失い、キュベット底部に沈降した。また、IMR4株とKASO11株の暴露区ではワムシは、対照区と比較して遊泳個体数が大きく減少した。なお、 10^3 cells mL⁻¹ 暴露区でも同様の傾向を確認することができた。一方、Mie09株の暴露区におけるワムシの遊泳個体数は、5時間経過後も対照区と差異が認められなかった。これらの結果から、目視判定法は従来法より大幅な簡易化を図ることができた。しかしながら、目視判定法には客観的な毒性判定基準や判定手法の確立が必須であることに加え、現場試料の採水・濃縮方法などの検討、および赤潮の養殖対象魚介類に対する毒性との対応関係の精査などを進める必要もある。

今後、現場調査と室内実験の両面からさらなる検討を行い、目視判定法を現場での毒性判定に有効な手法として普及するための基礎的知見の集積に努める必要がある。

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

令和6年6月13日、7月5日、7月23日、30日に東町漁業協同組合の協力を得て、図1で示した定点における採水試料の *Chattonella* 細胞密度および O₂⁻レベルを計測した。各定点における *Chattonella* の細胞密度は表1に、O₂⁻レベルは図22A, B, C, Dに示した。7月5日の採水試料には全ての定点で 100 cells mL⁻¹ 以上の *Chattonella* が含まれており、O₂⁻レベルも 10^6 以上の値が検出されたため、SNSを用いて関係各県市の赤潮担当者と漁業協同組合に細胞密度と O₂⁻レベルの情報共有を行った。

引用文献

- Demura M., Noël M. H., Kasai F., Watanabe M. M., Kawachi M. Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* and *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity. *Phycologia* 2009; **48**: 518-535.
- Lum W. M., Lim H. C., Lau W. L. S., Law K., Teng S. T., Benico G., Leong S. C. Y., Takahashi K., Gu H., Lirdwitayaprasit T. Leaw C. P., Lim P. T., Iwataki M. Description of two new species *Chattonella tenuiplastida* sp. nov. and *Chattonella malayana* sp. nov. (Raphidophyceae) from South China Sea, with a report of wild fish mortality. *Harmful Algae* 2022; **118**, 102322.
- 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.
- 山崎康裕, 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.
- Yuasa K, Shikata T. *Karenia selliformis* grown under moderate light intensity exerts strong toxicity to fish. *Plankton Benthos Res.*, 2024; **19(3)**: 108-115.
- 湯浅光貴, 北辻さほ, 坂本節子, 紫加田知幸, 秋田一樹, 内田肇, 山崎康裕, 内山郁夫, 西出浩世, 斎藤義昭, 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．

湯浅光貴，西村朋宏，坂本節子，紫加田知幸，北辻さほ，秋田一樹，内田肇，山崎康裕，野田誠，毛利文香，宮村和良，今吉雄二，赤塚麻美，西山佳孝，小竹敬久，西槇俊之，勝村啓史，新井雄太，小川元之．2) 赤潮の被害軽減手法の開発．ア．魚毒性診断技術の開発．令和5年度漁場環境・改善推進事業のうち海域特性に応じた赤潮・貧酸素水塊，栄養塩類対策推進事業．(1) 赤潮等による漁業被害への対策技術の開発・実証・高度化報告書，赤潮共同研究機関，広島．2024；228-251．

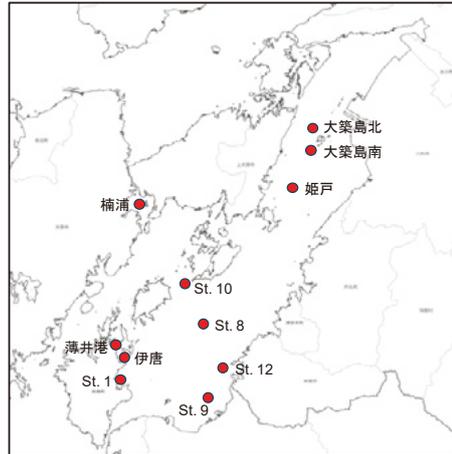


図1. 八代海における調査定点.

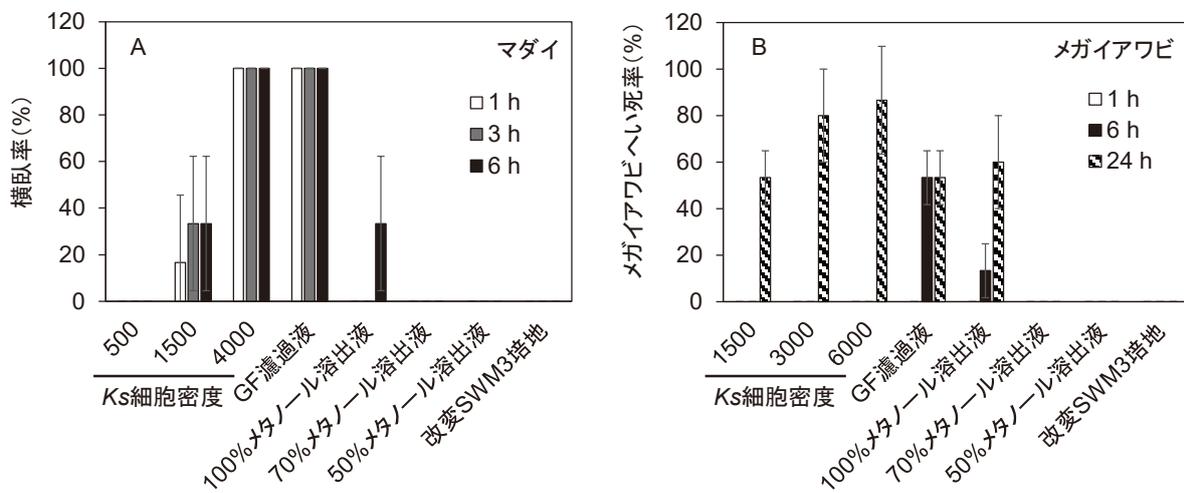


図2. *Karenia selliformis* (*Ks*) の細胞浮遊液および固相抽出液の (A) マダイおよび (B) メガイアワビに対する毒性.

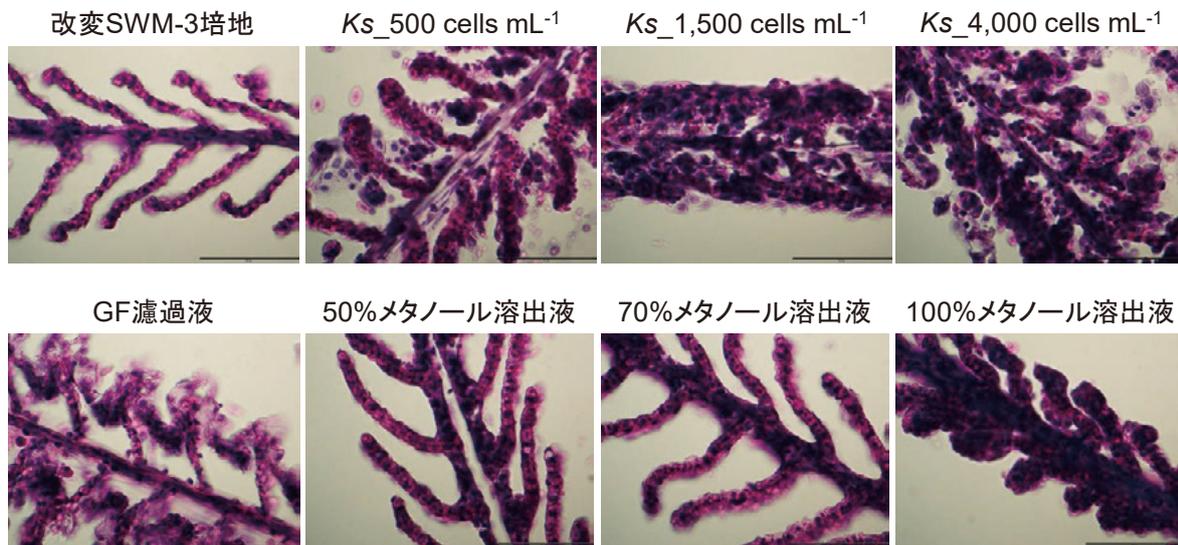


図3. *Karenia selliformis* (*Ks*) の細胞浮遊液および固相抽出液を暴露されたマダイ鰓組織におけるヘマトキシリン・エオジン染色.

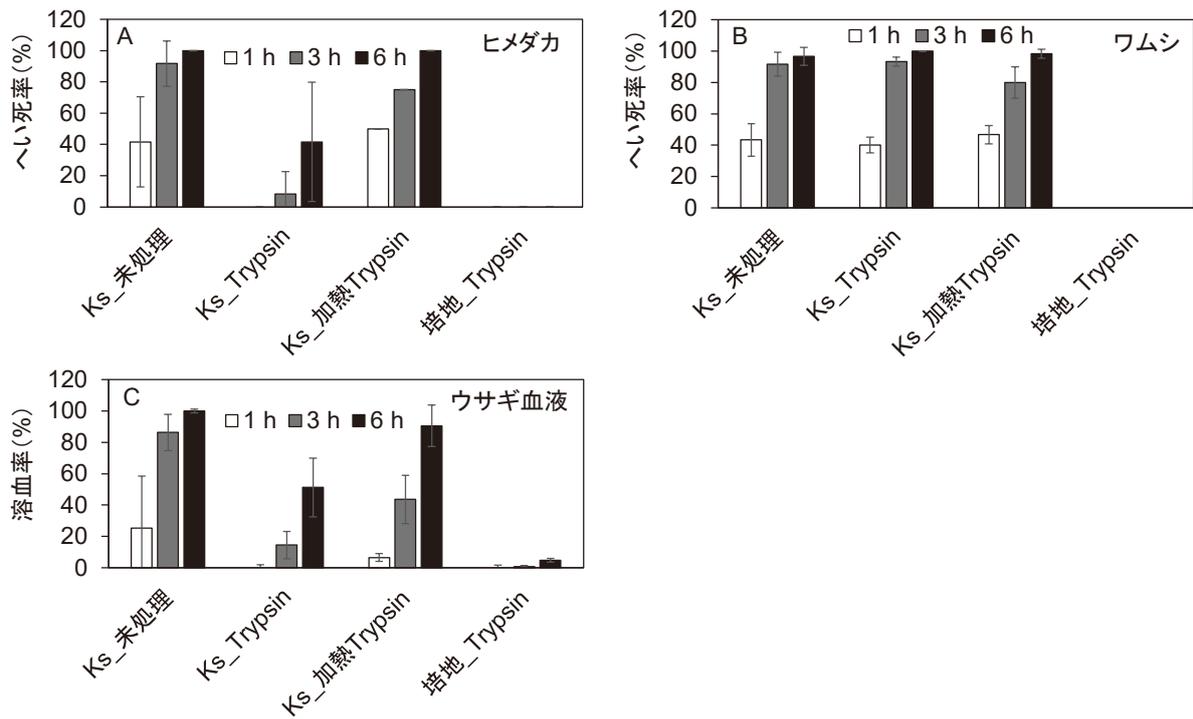


図 4. *Karenia selliformis* (Ks) の細胞浮遊液および固相抽出液の (A) ヒメダカおよび (B) ワムシに対する毒性と (C) ウサギ赤血球に対する溶血活性.

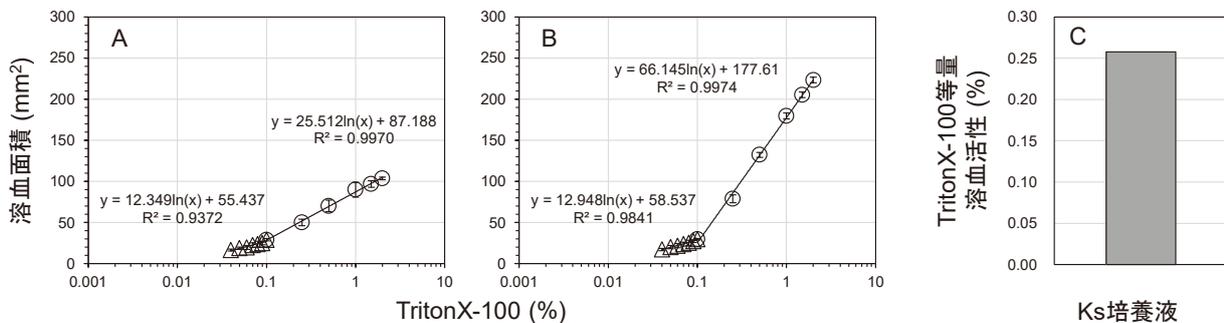


図 5. ウマ血液寒天培地を用いた TritonX-100 段階希釈試料による溶血面積の検量線および *Karenia selliformis* 細胞浮遊液の TritonX-100 等量溶血活性 (20°C 静置). Ks : *Karenia selliformis*. (A) 試料滴下 6 時間後における検量線. (B) 試料滴下 24 時間後における検量線. (C) *K. selliformis* 細胞浮遊液を 20°C において 6 日間培養した試料 (10,800 cells mL⁻¹, 702 cells/穴) の試料滴下 24 時間後における TritonX-100 等量溶血活性.

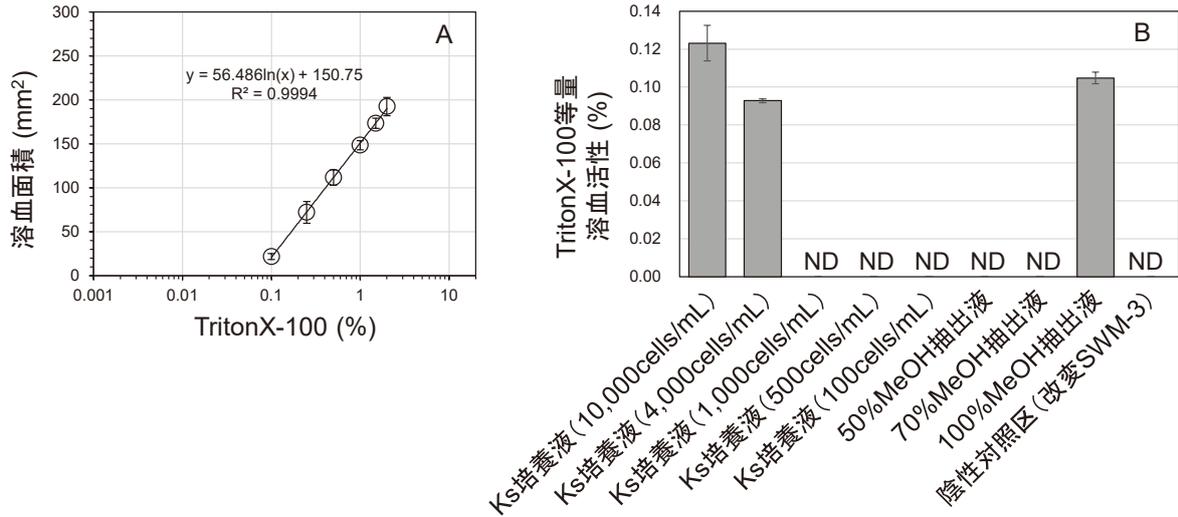


図 6. ウマ血液寒天培地を用いた TritonX-100 段階希釈試料による溶血面積の検量線ならびに *Karenia selliformis* 細胞浮遊液およびメタノール抽出液の TritonX-100 等量溶血活性 (15°C 静置). Ks : *K. selliformis*. MeOH : メタノール. (A) 試料滴下 24 時間後における検量線. (B) *K. selliformis* 細胞浮遊液を 15°C において 12 日間培養した試料ならびにメタノール抽出液の試料滴下 24 時間後における TritonX-100 等量溶血活性.

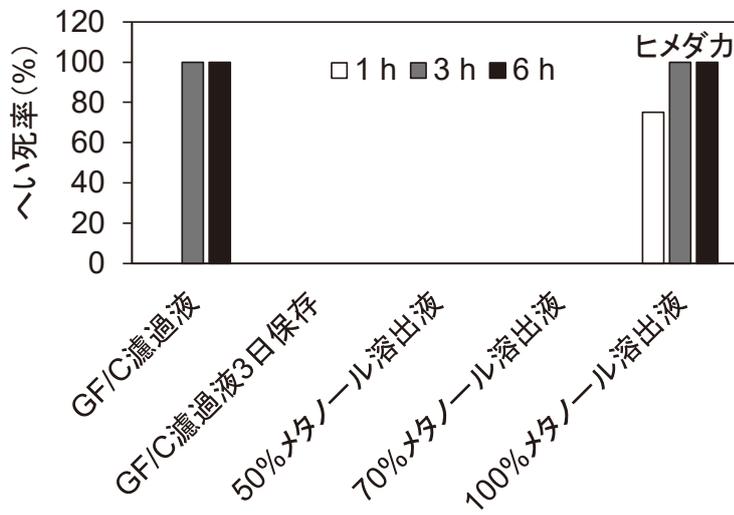


図 7. *Karenia selliformis* の GF 濾過液および固相抽出液のヒメダカに対する毒性.

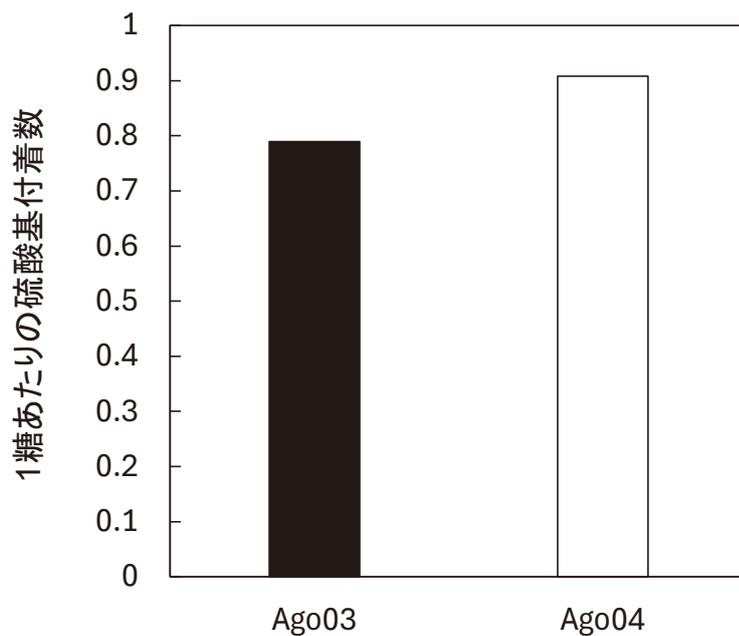


図 8. *Chattonella marina* の強毒株および弱毒株におけるグリコカリックスの糖に含まれる硫酸基量.

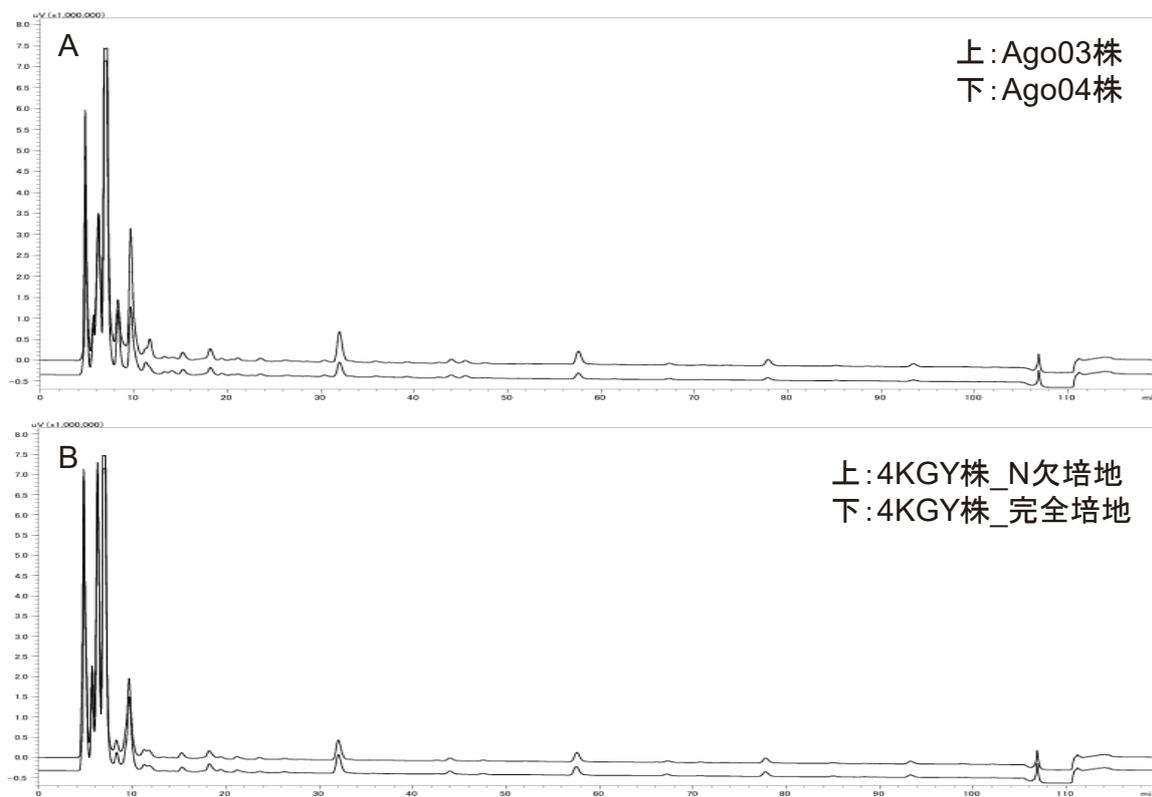


図 9. *Chattonella marina* の (A) Ago03 株 (強毒) と Ago04 株 (弱毒) のオリゴ糖パターンおよび、(B) 4KGY 株における窒素欠乏培地と完全培地のオリゴ糖パターンのクロマトグラム.

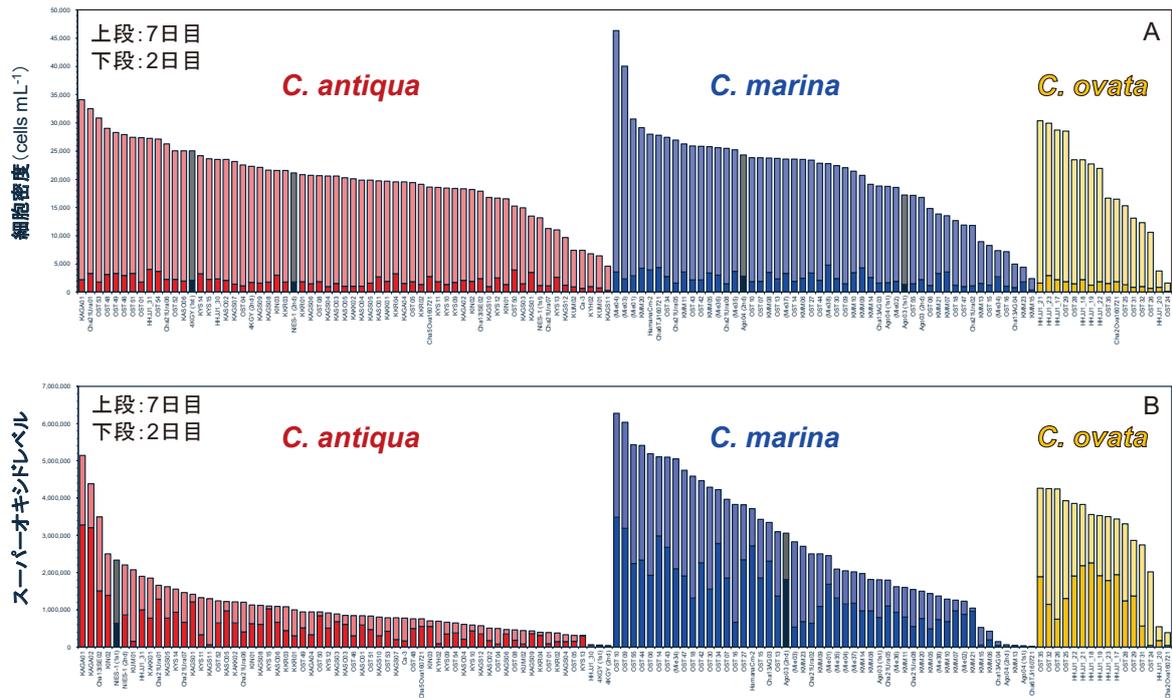


図 10. *Chattonella* 属の新規培養株における培養 2 日目と 7 日目の (A) 細胞密度および (B) スーパーオキシドレベルの積み上げ棒グラフ。灰色縦棒：魚毒性既知株。

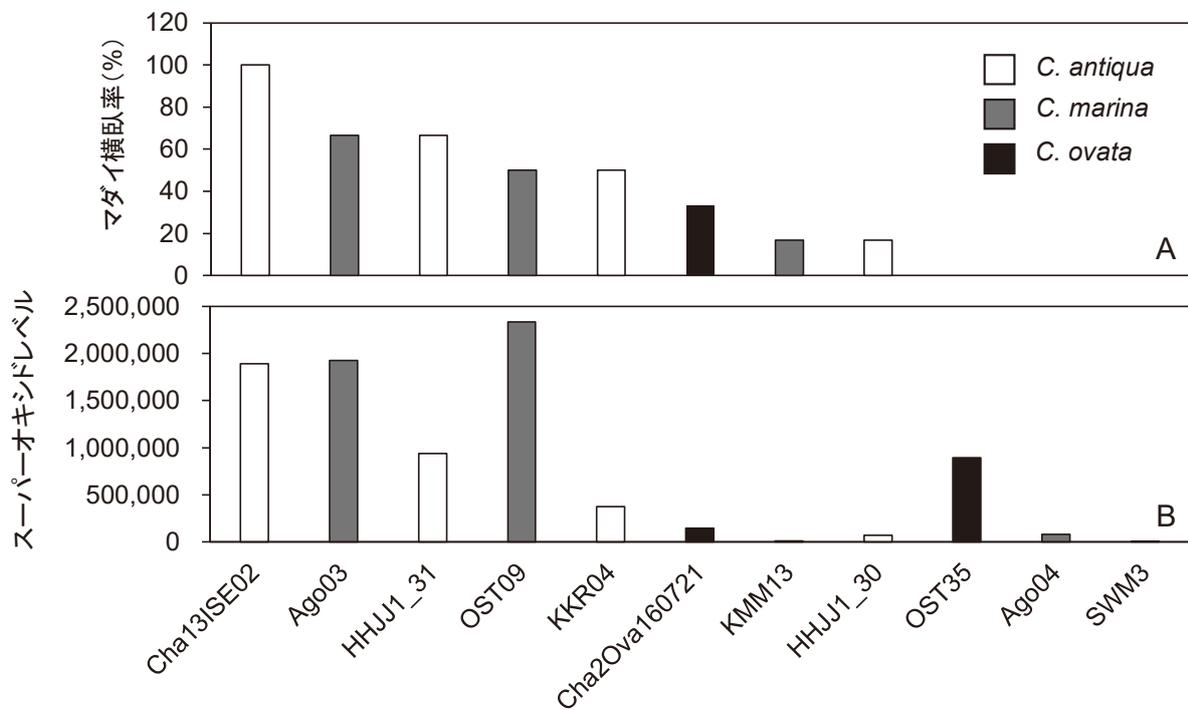


図 11. *Chattonella* 属培養株の (A) マダイへの毒性および (B) スーパーオキシドレベル。

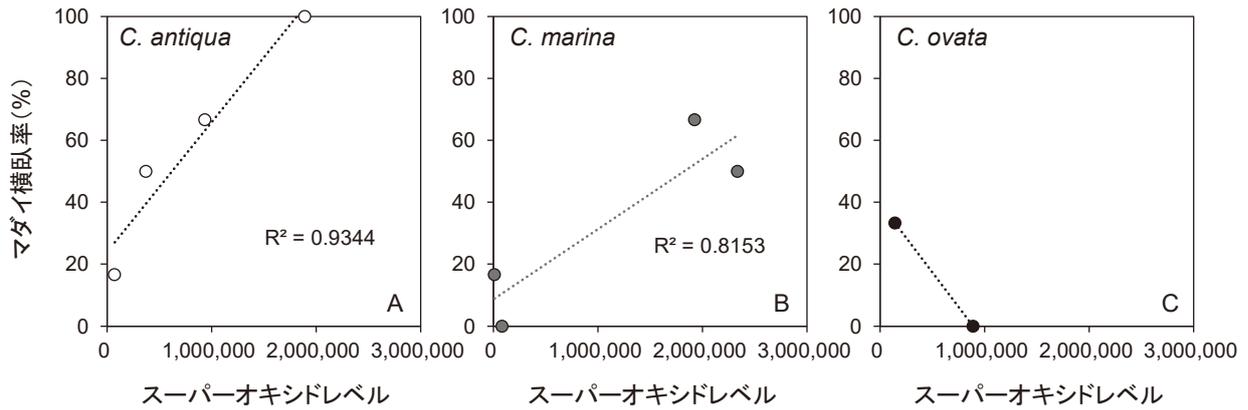


図 12. (A) *Chattonella antiqua*, (B) *Chattonella marina*, (C) *Chattonella ovata* 培養株におけるマダイへの毒性とスーパーオキシドレベルの相関図.

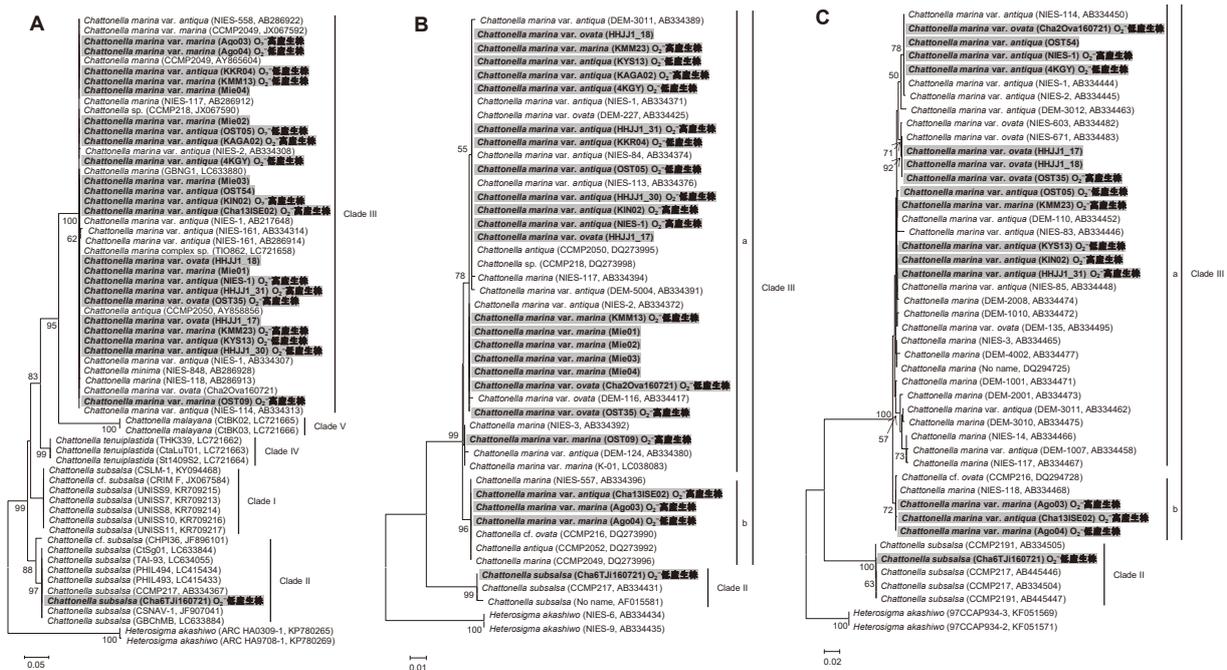


図 13. *Chattonella* 属選抜株等の分子系統樹. (A) ITS 領域, (B) *rbcL* 領域, (C) COI 領域. 本研究において決定した配列は、太字および灰色背景で示す. 選抜株については、株名の右横に O₂ 産生能を示す. 枝上の数値はブートストラップ値を示し、50 以上の場合のみ示す.

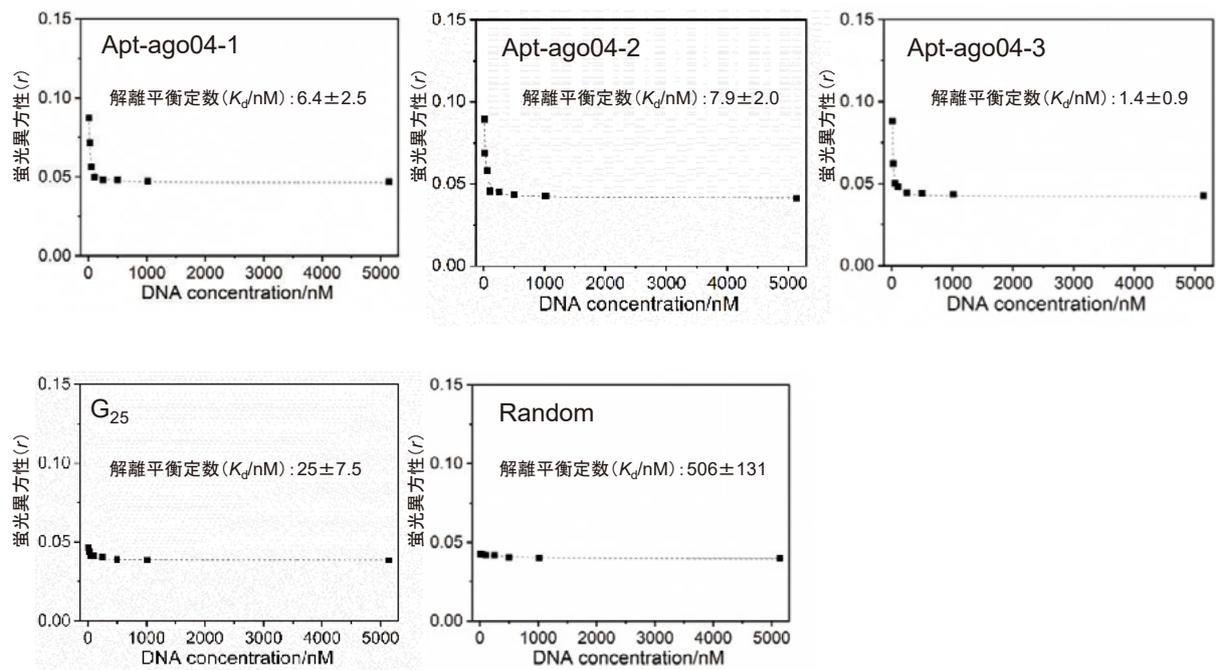


図 14. *Chattonella marina* の Ago04 株に対する DNA アプタマーの蛍光異方性と解離平衡定数.

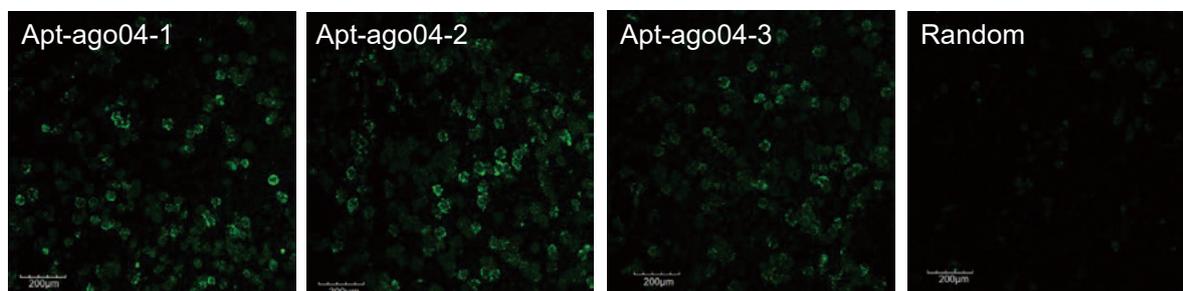


図 15. DNA アプタマーと結合した *Chattonella marina* の Ago04 株の蛍光顕微鏡画像.

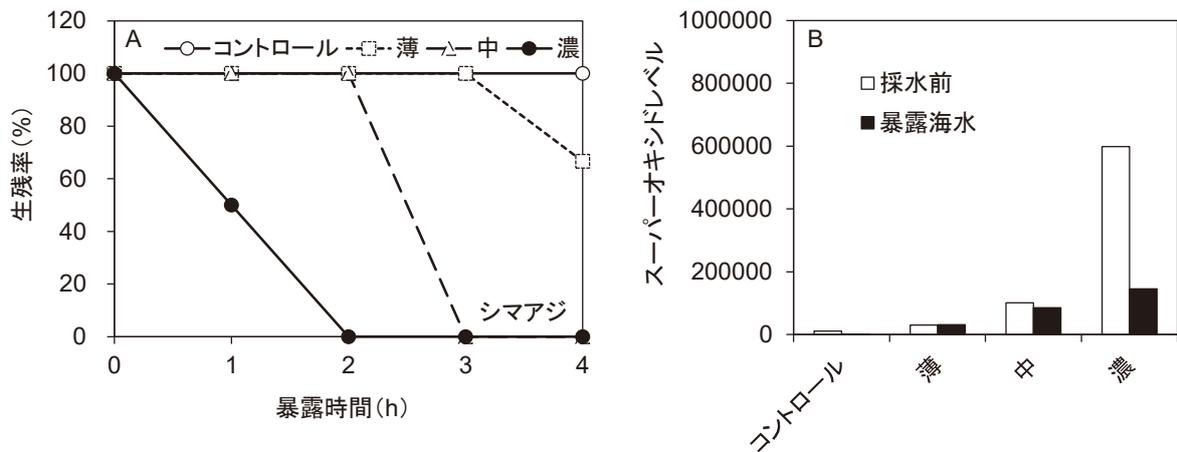


図 16. *Chattonella* 属を含む八代海の赤潮海水を船上でシマアジに暴露した際の (A) 生残率と (B) 各試験区のスーパーオキシドレベル.

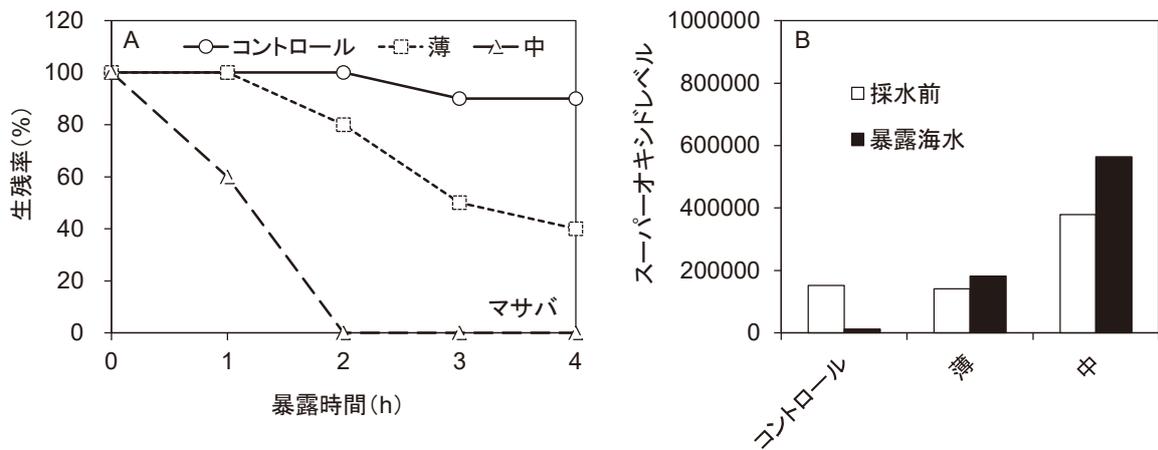


図 17. *Chattonella* 属を含む八代海の赤潮海水を船上でマサバに暴露した際の (A) 生残率と (B) 各試験区のスーパーオキシドレベル.

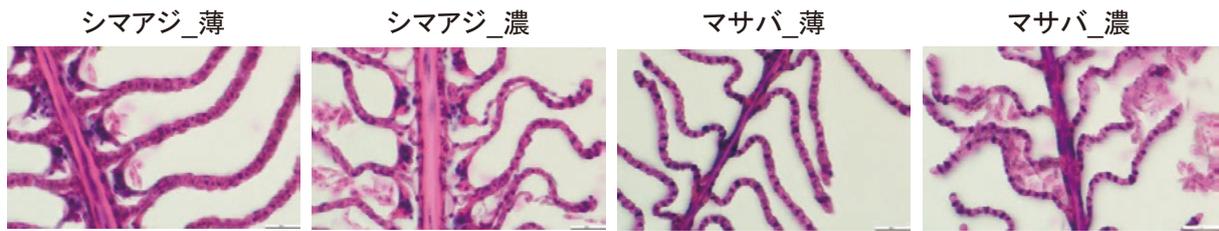


図 18. *Chattonella* 属を含む八代海の赤潮海水を暴露したシマアジおよびマサバの鰓組織におけるヘマトキシリン・エオジン染色.

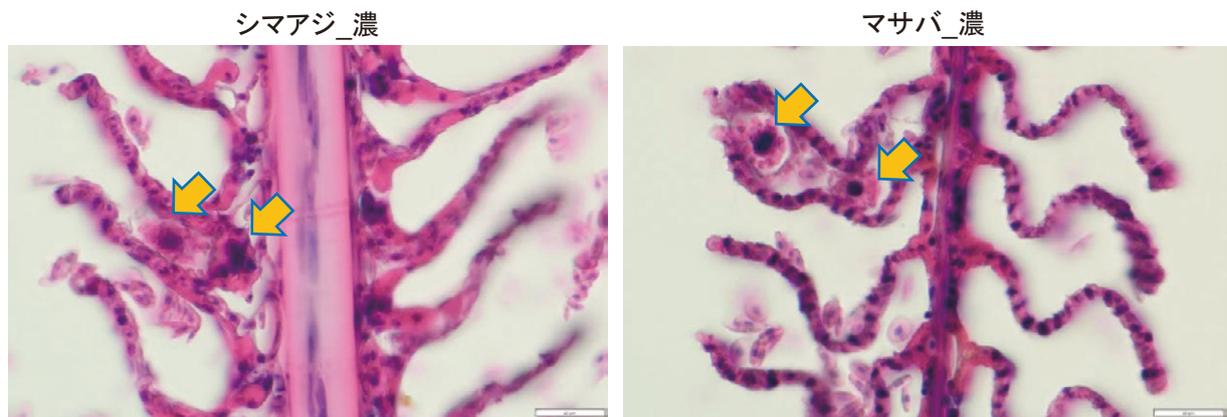


図 19. *Chattonella* 属を含む八代海の赤潮海水を暴露したシマアジおよびマサバの鰓組織におけるヘマトキシリン・エオジン染色. 黄色矢印は *Chattonella* と思われる細胞を示している.

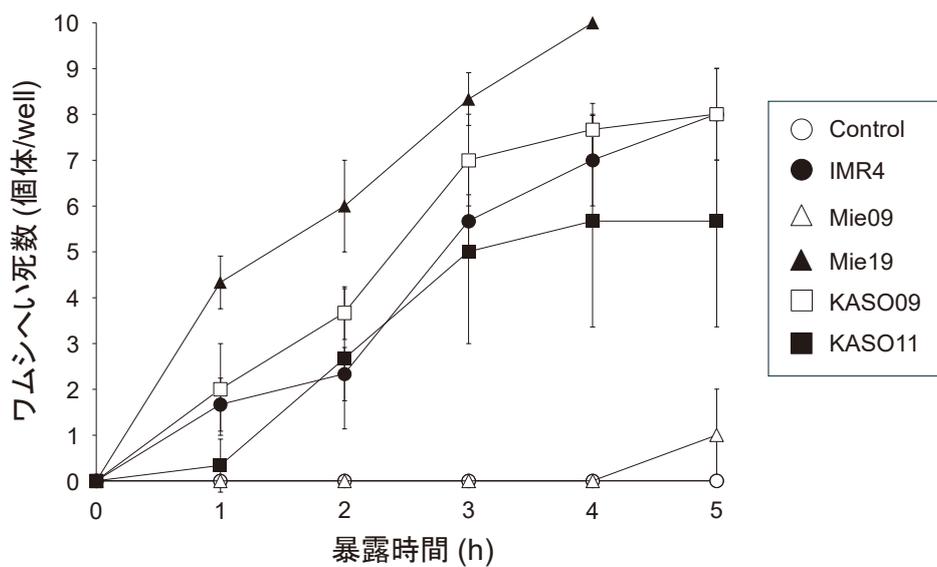


図 20. 48 ウェルプレート内で *Karenia mikimotoi* 培養株を暴露されたワムシのへの死数.

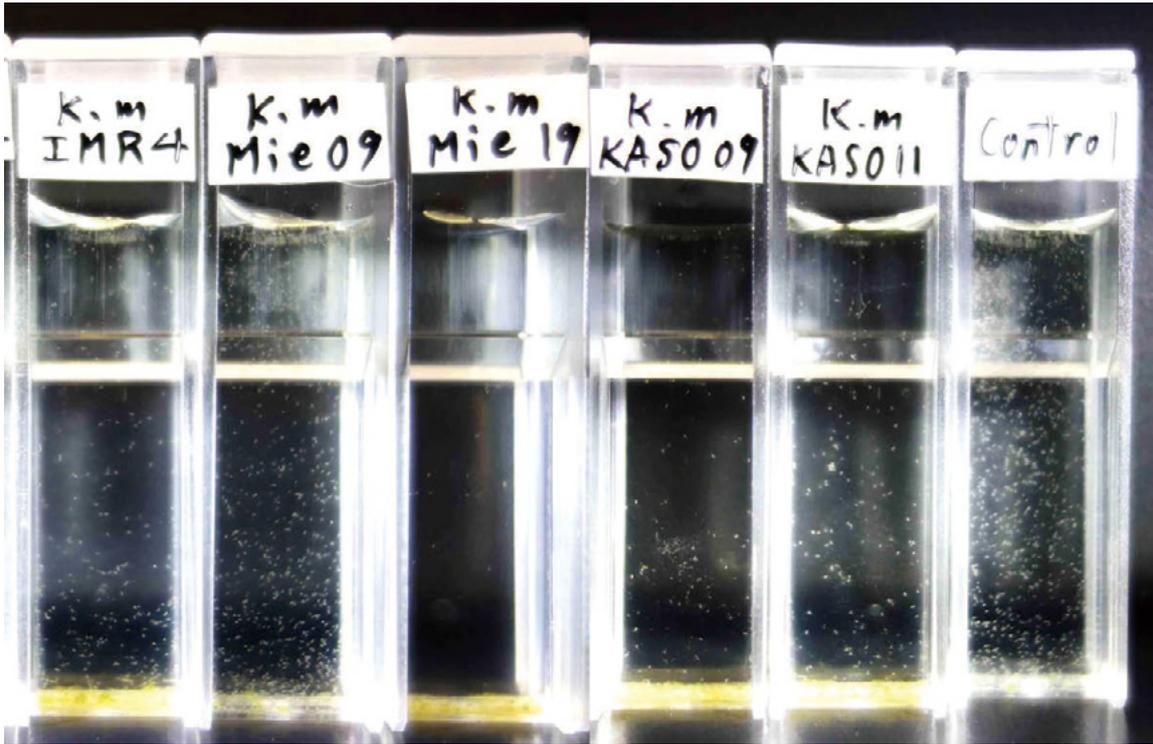


図 21. キュベット法による *Karenia mikimotoi* 培養株のワムシ毒性試験の様子。

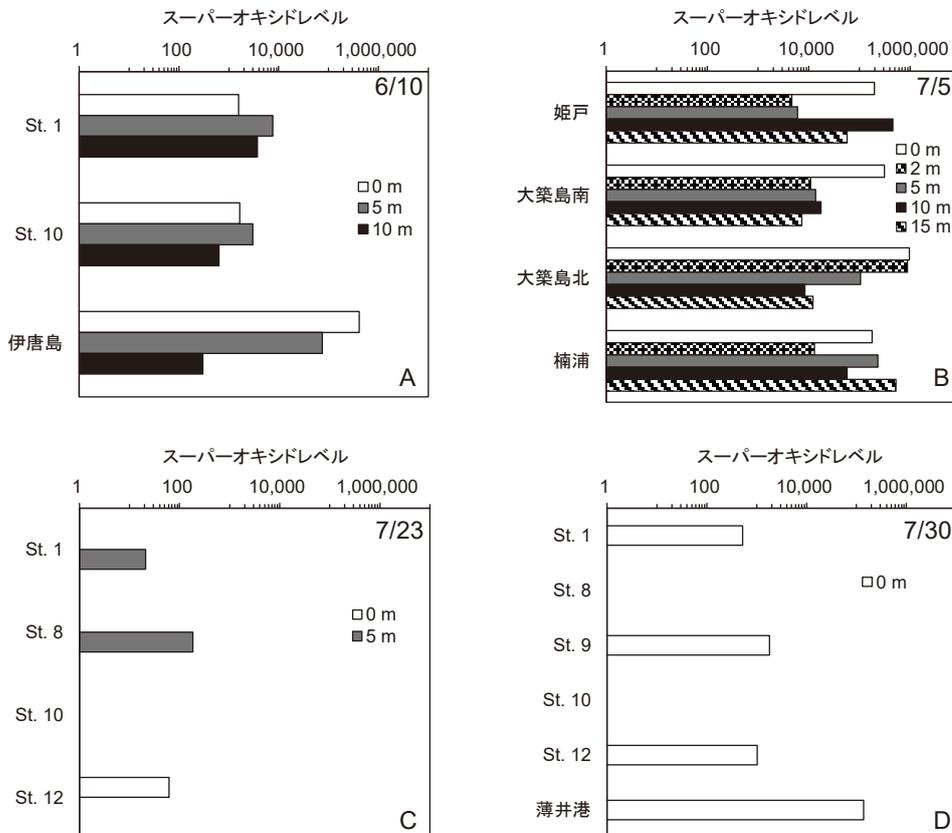


図 22. 八代海の各定点における (A) 令和 6 年 6 月 10 日, (B) 令和 6 年 7 月 5 日, (C) 令和 6 年 7 月 23 日, (D) 令和 6 年 7 月 30 日のスーパーオキシドレベル。

表. 1 八代海における各調査定点の *Chattonella* 属の細胞密度 (cells mL⁻¹) .

採水地点	深度 (m)	6月10日	7月5日	7月23日	7月30日
St. 1	0	9	—	0	0
	5	8	—	0	—
	10	12	—	—	—
St. 8	0	—	—	0	0
	5	—	—	0	—
St. 9	0	—	—	—	0
St. 10	0	5	—	2	0
	5	5	—	0	—
	10	4	—	—	—
St. 12	0	—	—	0	0
	5	—	—	0	—
薄井港	0	—	—	—	0
伊唐島	0	467	—	—	—
	5	11	—	—	—
	10	1	—	—	—
姫戸	0	—	116	—	—
	2	—	90	—	—
	5	—	90	—	—
	10	—	142	—	—
	15	—	76	—	—
大築島南	0	—	405	—	—
	2	—	112	—	—
	5	—	74	—	—
	10	—	40	—	—
	15	—	14	—	—
大築島北	0	—	620	—	—
	2	—	310	—	—
	5	—	9	—	—
	10	—	3	—	—
	15	—	0	—	—
楠浦	0	—	110	—	—
	2	—	115	—	—
	5	—	179	—	—
	10	—	175	—	—
	15	—	693	—	—

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

竹内泰介, 渥美貴史, 坂下奨吾, 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

河住大雅, 中嶋康生, 松村貴晴, 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6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) 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ご協力をいただき, 2024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打ち合わせ及び底泥採取作業の実施など、普及活動を行った。また、今後は底泥採取や散布を現場関係者のみ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、2024 年度にヘテロカプサ赤潮が発生した徳島県鳴門市ウチノ海における本赤潮終息後の海底泥を徳島県より供試いただき、メタバーコーディング解析およびネットワーク解析に着手した。具体的な方法は以下の通りである。ヘテロカプサが発生した海域の底泥 (表層約 3 cm) を採取して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、底泥より攪拌振盪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 及び 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 2024 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、検鏡を行なった。海水は、湖中央に位置する St.2 及び湖奥に位置する St.6 の 0 から 5 m を採取して、1 mL 中の珪藻類を計数し、属レベルで分けた。また、同海水 1,000 mL をメタバーコーディング解析に供した。具体的には、Sterivex HV フィルター-0.45 µm (Merk Millipore, Germany) 内に 1,000 mL を濃縮することで粒子を回収し、RNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、RNA later™ 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 (解析中)。

(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

三重県英虞湾立神定点や同湾周辺において、2024 年 6~10 月上旬までヘテロカプサによる赤潮は形成されなかった。10 月 25 日には、英虞湾最奥や湾奥で最高細胞密度 106 cells/mL の出現報告があったが、10 月 31 日には終息した。愛知県三河湾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、最高細胞密度は湖奥 (St.6) の 6 m 深で約 6 cells/mL であった。その後、ヘテロカプサは、加茂湖全体において数細胞レベルで検出されたものの細胞密度は増加せず、10 月末には終息した。

リアルタイム PCR 法による HcRNAV 定量結果を図 2~4 に示す。それによると、2024 年の英虞湾、三河湾、加茂湖の海水中における HcRNAV は極めて低密度であり、今年度にヘテロカプサが増殖しなかったことを反映していた。底泥中の HcRNAV の密度は、英虞湾では $1.2\sim 5.5 \times 10^4$ copies/g (図 2)、三河湾では $1.4\sim 18 \times 10^3$ copies/g (図 3) と、調査期間中ほとんど変動がなかったが、前年度より減少傾向が認められた。一方、加茂湖の底泥は、HcRNAV 密度が増減することはなかったが、常に高密度 ($1.5\sim 5.3 \times 10^6$ copies/g) で検出された (図 4)。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 が底泥に蓄積していることが示唆された。今後は、底泥に蓄積している HcRNAV の感染力や蓄積深度を調査し、底泥採取の頻度を下げられるかどうか検討する。

2024 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。2024 年度の加茂湖の環境について図 5 に示す。加茂湖原黒定点の 7~10 月では、水温は $19.4\sim 29.5$ °C、塩分は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 月下旬まで、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。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いた。6 月には新潟県、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、加茂湖調査を行った。今年度はヘテロカプサが発生しなかったため底泥散布は行わず、次年度以降の底泥散布に向けて 12 月に底泥採取を実施し、海底泥採取法の現場の方々への普及に努めた。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。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、来年度中の公開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、瀬戸内海でヘテロカプサが発生したため、徳島県鳴門市ウチノ海の海底泥における HcRNAV の密度や感染タイプについて調査した。分析に供した海底泥中の HcRNAV 密度は、 1.4×10^6 copies/g であり高密度であった。また、HcRNAV の感染タイプはほとんどが UA2 であった。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瀬戸内海でも HcRNAV が高密度で存在し、主に UA2 タイプではあるが、多様なタイプの HcRNAV が存在することが明らかとなった。また、近年の新潟県加茂湖や愛知県三河湾や三重県英虞湾では、UA1 はほとんど検出されず、UA2 が主体になりつつあった。今年度の瀬戸内海で発生した HcRNAV の主体も UA2 であったことから、全国的に UA2 が主体となってきていることが推定される。ただし、遺伝子情報を元にしたネットワーク解析では、HcRNAV の感染タイプは海域によってクラスターが分かれることが示唆されており (Nakayama and Hamaguchi, 2022)、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

2024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、加茂湖の St.2 (湖央) 及び St.6 (湖奥) で採取した湖水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、最も高かった9月10日でも St.2 で細胞密度 1,200 cells/mL, St.6 で細胞密度 2,854 cells/mL であった (図 6)。それらの種組成は、*Chaetoceros* spp. が主体であり、他には、7~9月上旬は *Nitzschia* spp., 9月下旬からは、*Skeletonema* spp., *Thalassionema* spp., *Leptocylindrus* spp. などで構成されていた。

昨年度の加茂湖の珪藻類については、海水試料を 1% グルタルで固定したのち検鏡観察を行なった。昨年度は、珪藻類の密度が全体的に低かったため、その理由として、固定試料を作製してから観察までに時間が空いたこと、採取した深度に珪藻類が少なかったことなどが考えられた。そこで、今年度は、0~5 m の柱状サンプルを採取し、採取後すぐに観察することとした。今年度の観察結果は、昨年度の結果と比べると珪藻類の密度が全体的に 10 倍ほど高かった。さらに、メタバーコーディングの結果と比較することで(解析中)、珪藻類の分布をより正確に把握できるよう手法を改善しているところである。

今年度珪藻類が少なかった要因として、水温が高かったことや貧酸素が 9 月末まで続いたことに加え、*Chattonella* spp. や *Karenia mikimotoi* の増殖も考えられた。両種の増殖は、本湖において初である。*Chattonella* spp. は、8 月下旬から 9 月上旬 (8 月 20 日から 9 月 10 日) にかけて増殖が見られ、ピークは 9 月 10 日で最高細胞密度は 1,582 cells/mL であった。それ以降、急激に減少したが、10 月 23 日の今期最終調査まで低密度で推移した。一方、*Karenia mikimotoi* は、初認が 7 月 11 日であり、その後徐々に増殖し、8 月 20 日がピークであった。最高細胞密度は、294 cells/mL であり、その後は 10 月末まで低密度で推移した。両種とも期間中、概ね 6 m 以深に見られた。

今年度も環境 DNA サンプルを採取し分析しているところである。データが得られた際、検鏡データと統合して解析し、有害種の発生状況や珪藻類などの競合種の推移、環境データと統合し解析する予定である。

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、三重県水産研究所や徳島県立農林水産総合技術支援センター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.
- 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*. *Aquat. Microb. Ecol.* 2004; **34**: 207-218.

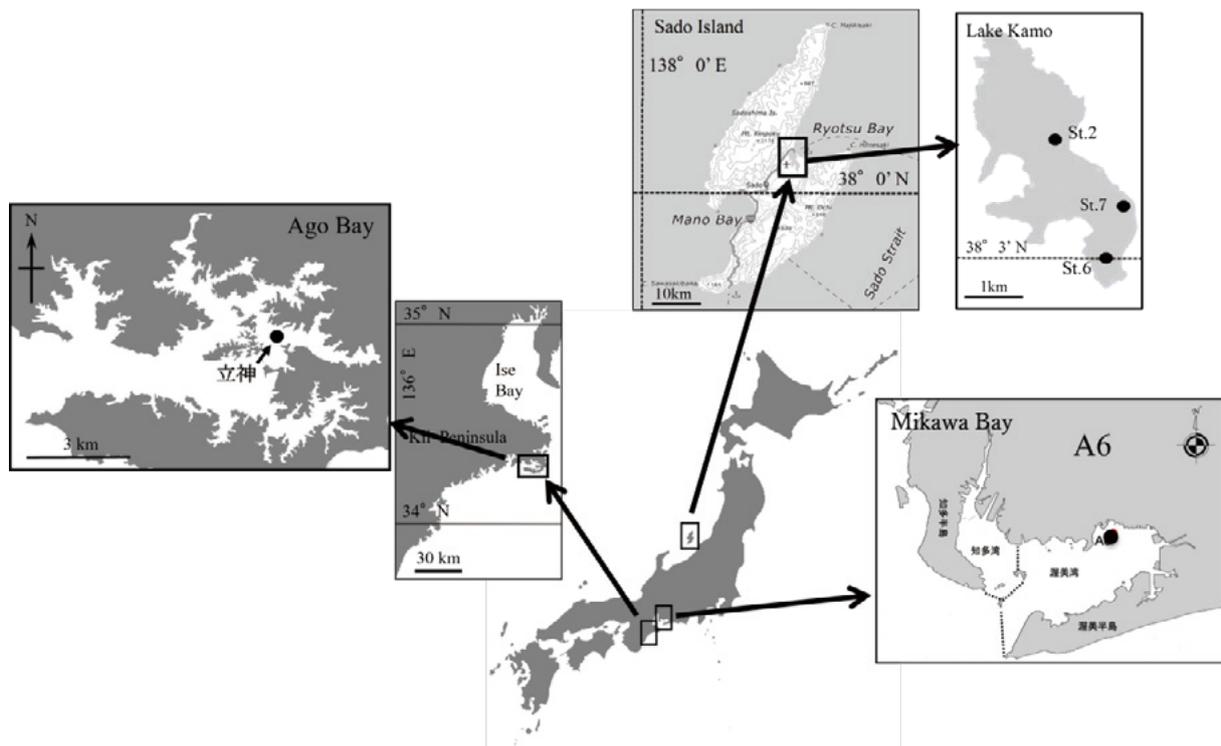


図 1. 試料採取および試験実施地点。
 三重県英虞湾 ●：立神定点（左上）。
 新潟県佐渡市加茂湖 ●St.2：湖央，●St.6：湖奥。
 愛知県三河湾 ●：A6 地点（右下）。

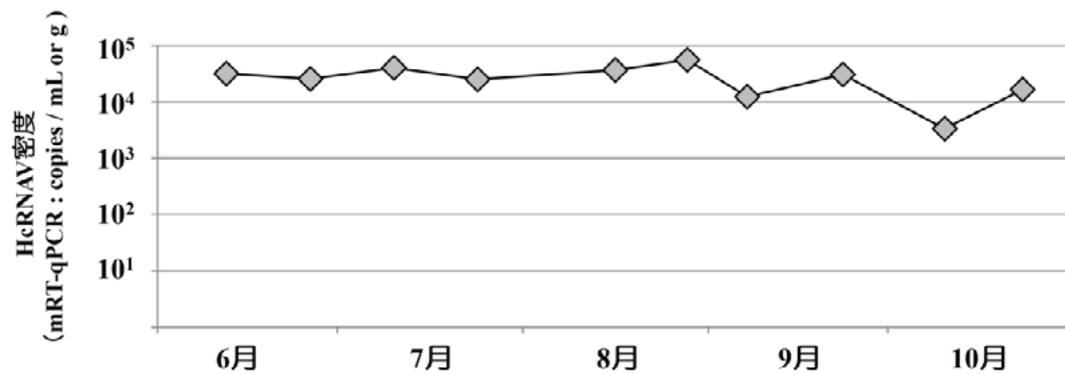


図 2. 2024 年三重県英虞湾立神定点の海水や底泥における HcRNAV 密度 (copies/g).
 値なしは未検出を示す。

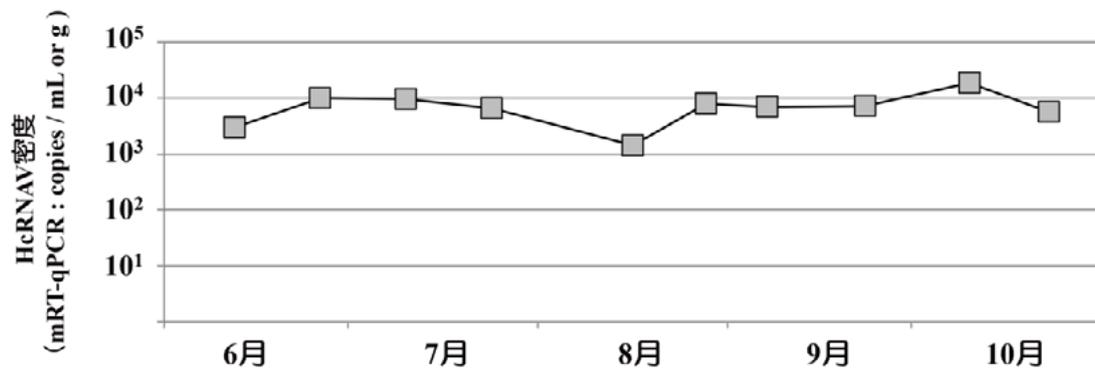


図 3. 2024 年の愛知県三河湾の海水や底泥における HcRNAV 密度 (copies/g). 値なしは未検出を示す.

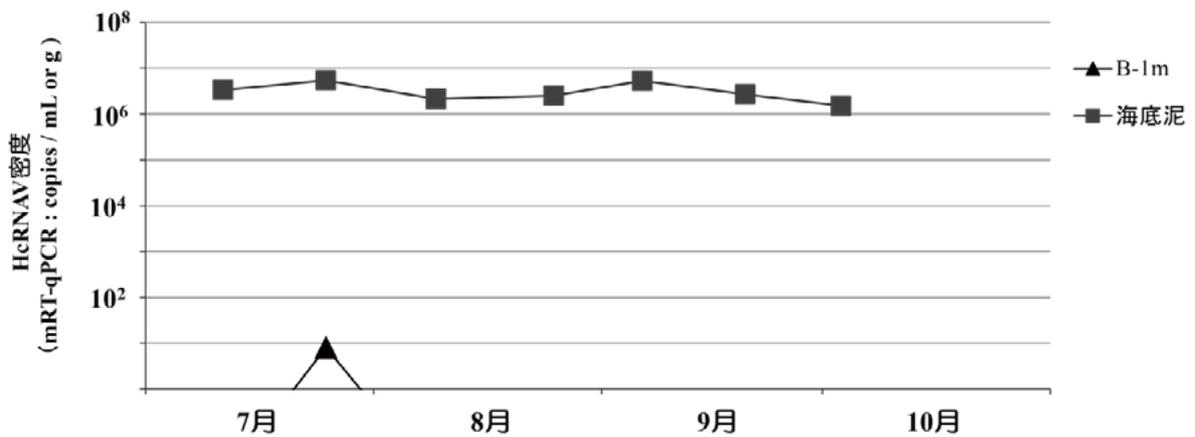


図 4. 2024 年の加茂湖原黒定点 (St.2) における湖水及び底泥中の HcRNAV 発生状況. HcRNAV 密度の単位は, 湖水 : copies/mL, 泥 : copies/g. 値なしは未検出を示す.

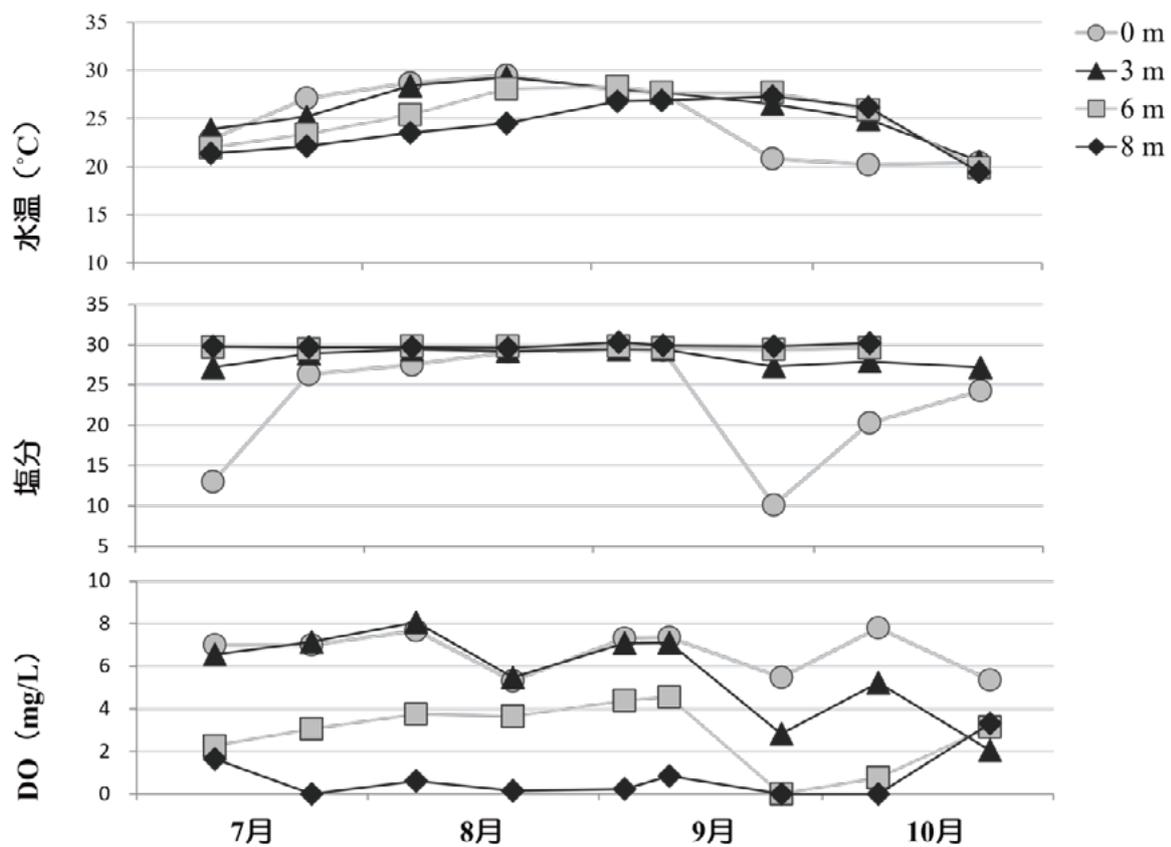


図 5. 2024 年 加茂湖原黒定点 (St.2) における水温，塩分，溶存酸素量 (DO) の変動.

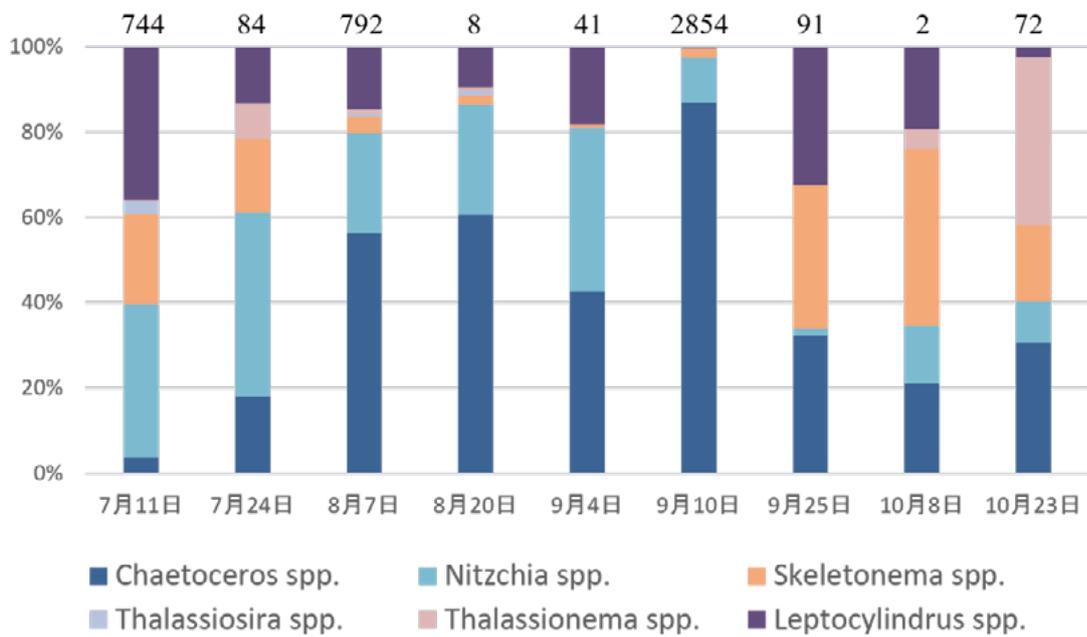
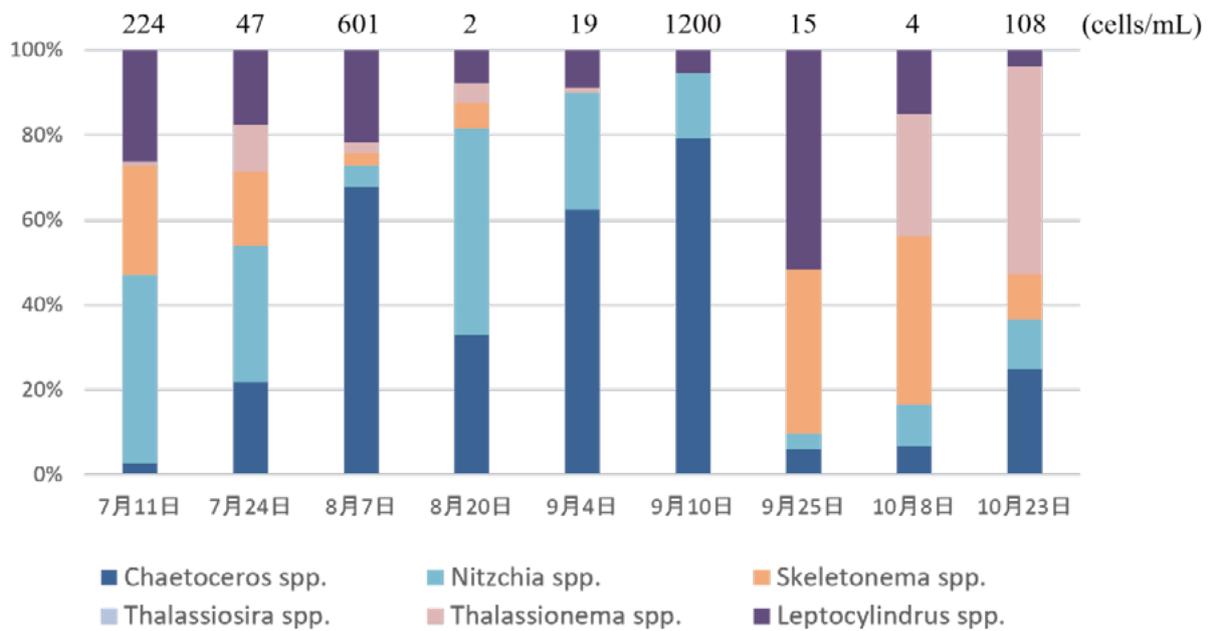


図 6. 2024 年 7~10 月における加茂湖湖水中の珪藻類分布.

上段 : St.2, 下段 : St.6.

グラフ上の数字は細胞密度 (cells/mL) 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
西山雅人, 毛利文香
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, 金子和歌, 黒木貴司
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イ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。一方で, 稚魚など餌止めに対するストレスが大きい時期, あるいは魚病などの罹患歴があつて投薬を行っている養殖魚では, 餌止め自体がストレスとなって減耗を引き起こすリスクがある。加えて, 近年は周年出荷体制が普及するに従い, 餌止めによる品質低下も魚価下落や販路の喪失など, 漁家経営に対して甚大な悪影響を及ぼす。従って, 餌止めによる延命効果のメカニズムを解明し, 赤潮発生下でも給餌を行い, 延命効果を発揮させる手法が渴望されている。

過去の成果において, 餌料成分を改変することで, 飽食条件下においても, ブリが延命する現象を把握した。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6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、処理能力と現地での機動性を高めるための改良を検討した。さらに現地の生簀での使用を想定して、高濃度酸素供給装置の設置・運用を改善し、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および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。

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。

(3) 結果および考察

1) 高濃度酸素発生装置の改良

高濃度酸素の達成のために必要となるナノバブル発生装置について、昨年度フォームジェット方式の高濃度酸素発生装置の処理能力の向上のため、ユニットを拡大しており、本年度もこの装置を用いて試験を実施した。すなわち、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種樹脂を通過さ

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 mm 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化するために、200 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し、ロープで水中を上下できるようにした。酸素濃縮装置は船上に固定し、吸気チューブを經由してフォームジェットへ濃縮酸素を供給するようにした。改良した装置はコンパクトであるため、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。また、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。

2) 酸素供給装置の効果検証および赤潮海水を用いた救命試験の実施

(大分県佐伯湾における試験)

1 回目の試験は 2024 年 8 月 7 日に大分県佐伯湾奥部の鶴見ポンツーン(32.950188N, 131.957266E) に試験生簀を設置して実施した(図 1~4)。海面に 2 m×2 m×2 m の試験生簀を設置して、①通常飼育状態区(対照区, 20 mm 漁網)、②①の状態を高濃度酸素供給区(20 mm 漁網, 図 2)、③①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(図 3, 4)、の 3 試験区を設定して、酸素上昇効果を検証した(図 6)。いずれの生簀にも、ブリの幼魚を 20 尾ずつ投入した。①の試験では、試験前の溶存酸素は 7.4~7.7 mg/L であった。ブリの稚魚を収容すると、5.3~6.6 mg/L まで低下した。一方、遮蔽幕がない通常の漁網である②試験区では、一時的に高濃度酸素は生簀を覆うものの、生簀からの流出が激しいため、最大濃度は 13.2 mg/L が最大であり、その変動幅も激しかった(図 7)。最後に実施した稚魚ネットを内張りした③の試験区では、溶存酸素濃度が 9.1~18.1 mg/L と救命のために必要な濃度をギリギリ上回り、過年度実施した遮蔽幕ありの条件に近い酸素上昇効果が得られた(図 7)。試験実施の 4 日前まで赤潮が発生しており、前日までは *K. mikimotoi* が数百 cells/mL 存在していたが、試験当日は赤潮が消滅して遊泳細胞は非検出であった。投入したブリの稚魚も、対照区、高濃度酸素区のいずれも異常は認められなかった(図 5)。

昨年度と本年度の試験で、小規模な生簀であれば、通常の漁網に目の小さい稚魚ネットを内張りするだけで、遮蔽幕設置に相当する高い溶存酸素濃度を達成することができた。ただし、本試験中稚魚ネットを内張りした試験区では潮流によって網が吹かれて、結果的に生簀の内容積が縮小する現象が生じたので、四面に漬物石を垂下して容積を確保した。いずれにしても、重量があり潮流に吹かれやすい遮蔽幕よりは簡便に設置できることと、餌止めが難しいトラフグの稚魚などの小型生簀では、特別な遮蔽作業を行わなくとも本装置を稼働して生簀内部を高濃度酸素状態に維持できることで、実用性が前進したと判断された。

(長崎県橘湾における試験)

今年度は 6 月下旬から *Chattonella antiqua* による赤潮が橘湾と八代海で発生し、7 月から 8 月にかけて高濃度化して赤潮が大規模化し、シマアジ、マダイ、トラフグ、ブリ等を中心に 15 億円にも及ぶ甚大な漁業被害をもたらした。被害を受けた生産者の現地ヒアリングの結果、比較的水深の浅い沿岸部の生簀では足し網や生簀沈下などの対策が実施できず、かつ赤潮プランクトンの細胞密度も高濃度になることから、従来型の赤潮対策の効果が出にくく、被害を拡大させている実態が浮かび上がった。本装置で発生させた高濃度酸素水は、吐出口から 5 m 離れた地点でも高い酸素濃度を示すことが分かっている(松山ら 2024)。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蟄集する行動を示した場合は、労力とコストのかかる遮蔽幕を設置しなくても、一定の延命効果を発

揮する可能性があり、実用化の最大の隘路が解決されるとの期待がある。このため、本年度は、高濃度酸素水に養殖魚が能動的に蟄集する行動を引き起こすかどうか、確認のための予備的試験を実施した。

試験実施場所は、橘湾奥の雲仙市小浜町富津地先の実生簀 (35.754879N, 130.199549E) において、養殖業者の協力を得て実施した (図 8~9)。この漁場では 7 月に *Chattonella* 赤潮が有明海方面から流入し、シマアジを中心に養殖魚がほぼ全滅した漁場である。生簀が設置されている漁場の水深は 16 m、試験を実施した生簀は 10 m×10 m の角型網生簀で、網底は 5 m である。ここに体長 25 cm 程度のシマアジが数千尾飼育されている。試験は 2024 年 11 月 26 日に実施した。潮流の上流側の生簀の外側に高濃度酸素発生装置を設置し (図 10)、吐出口のノズルを水深 2.5 m にセットし (図 11)、生簀の内部に向けて噴射する設営とした。試験中自動給餌器から投入された餌に魚群が誘引されて動いてしまうので、試験中は生産者の許可を得て自動給餌器 (図 9 中央の緑の装置) を停止した。魚群の様子については、生簀中央部に設置した魚群探知機と水中カメラの両方 (図 12~13) でモニタリングした。

試験開始前と開始後の生簀周辺 (図 14) の溶存酸素濃度の測定結果を図 15 に示した。高濃度酸素稼働前の現地の溶存酸素は、表層から底層まで概ね 7.7~7.9 mg/L の濃度であった。高濃度酸素発生装置を稼働した場合、吐出口近傍では、水深 2.5~9 m にかけて溶存酸素濃度が 10 mg/L を超えて高濃度状態となっていた (図 15)。水深が深いところまで酸素濃度が高くなっている理由としては、図 11 に示したように、フォームジェットの吐出口を分岐させて、水深 2.5 m から水平方向に高濃度酸素水を噴射したものの、水流の勢いで垂直に下ろした塩ビパイプが反り返ったため、2.5 m からやや下方向に向けて高濃度酸素水が噴射されたためである。目視では、高濃度酸素水による白濁水流は生簀の中央手前まで確認できたが、潮流の反対側の生簀外部で計測した結果、最大でも 0.1 mg/L 程度の上昇にとどまっていた (鳥類による食害防止ネットが張られているため、生簀中央部は計測できず)。高濃度酸素は生簀の内部に流入しているが、吐出口から離れるほど移流拡散して、10 m 以上離れると、酸素濃度の上昇はごくわずかな値にとどまった。

次に魚群の鉛直変化について図 16 に示した。シマアジは高濃度酸素の非稼働時は、水深 0.5~2 m 付近に濃密に分布していた。これは、シマアジが人影に反応し、給餌を期待して水面付近に蟄集している状態だと思われる。この魚群の下側に向けて高濃度酸素を噴射すると、5 分あまりで魚群は 2 m 以深に分散して分布する状態が続いた。水中カメラを確認すると、通常状態では水面近くを魚群が群れて盛んにグルグルと回遊していたが、高濃度酸素試験区の方では、魚群が群れる行動が弱く、バラバラになって、深い層をゆっくり遊泳している様子が水中カメラの映像で確認された。高濃度酸素の稼働を停止すると、再び水面付近に蟄集するようになった。高濃度酸素発生装置からは微細な気泡が出るために、この泡に興味を示してシマアジが深い層へ誘引された可能性も否定できないが、魚群が疎密になり、遊泳状態も緩慢になっていたこと、生簀を所有する漁業者にモニターの魚群を確認してもらったところ、酸素濃度が高い時は緩やかに遊泳するとの所感を得たことから、酸素濃度が高い水塊に向けて蟄集した可能性が高いと判断された。

高濃度の赤潮水塊が生簀内部へ流入した場合、ブリはより赤潮プランクトンの細胞密度が低い水塊に移動する忌避行動を示すという (濱本ら 2005)。この特性を利用して、赤潮対策として生簀の大型化 (濱本ら 2005)、網足しによる生簀容積の増加が行われている。今回シマアジについては、高濃度酸素の水塊に蟄集するような行動がみられたことから、他の魚種についても確認が必要である。

魚類が低酸素からの忌避行動あるいは低酸素状態で呼吸量や生理状態を変化させることについては一般的に知られている。その一方で、近年の研究によると、カリフォルニア沿岸のカタクチイ

ワシの長期的な魚群の変化は、水温以外にも、酸素濃度の高い水塊と強く一致することから、より酸素濃度の高い水塊を常に探索している可能性が示唆されている (Howard et al. 2020)。また、最新の研究によると、味蕾複合体の一部であるメルケル様細胞 (MLC) がゼブラフィッシュ稚魚において酸素化学受容細胞として機能し、酸素シグナルの伝達には味覚シグナル伝達経路が使われていることが示されている (Pan and Perry 2024)。すなわち、餌料への趨向性と同じ器官に酸素濃度を感知するセンサーが存在し、酸素濃度にも正の趨向性を示す可能性が示唆される。このことは、生簀の内部の一部でも高濃度酸素が連続的に存在すれば、赤潮によって養殖魚の鰓に障害が発生して低酸素環境に陥った場合、魚が能動的により高い酸素濃度を求めて蟻集する可能性が期待されるものである。この場合、本研究でこれまで実用化の隘路とされた手間のかかる遮蔽幕の設置は省略可能かもしれない。八代海南部のブリ養殖漁場では、生簀が密に配置されているところでは、通常の溶存酸素濃度より 1 mg/L 以上低い水塊が存在し、給餌中は通常より 2 mg/L 以上低下するという (門脇・平田 1984)。このように、生簀の内部で飼育されている魚類は、赤潮発生中にとどまらず、常に低酸素ストレスにさらされており、特に給餌中は溶存酸素濃度の低下がより顕在化することから、鰓の障害発生が激しい赤潮発生中に広く餌止めが行われることは、科学的にみて至極当然のことであろう。

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する。平均粒径は対照区として給餌している餌料と同じ 1 mm とした。また餌料 B の複数成分の濃度を変更して作成した 2 種類の餌料 (餌料 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

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 2024 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 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、14hL:10hD の明暗条件下で 8~9 日間培養を行って試験に用いた。

3) 赤潮プランクトンの強毒株を用いた曝露試験の実施

改良餌料については、通常餌料と同様に体重の 3% となるように 1 日に 1 回給餌して飼育を行った。給餌は曝露試験を実施する前日午前の給餌を最後とし、試験開始前 24 時間は絶食状態とした。

大量培養された *K. mikimotoi* については、目的の細胞密度となるよう GF/C ろ過海水で希釈して

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蟻集するのを確認後、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3～4個体を1ターンとして実施した。曝露試験には、容量10Lの透明バケツを用いた。赤潮プランクトンを含む試水を3.5～8L注入し、実験時はバケツの周囲に所内海水(23～27℃)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) 結果及び考察

1) 餌料成分を改変された餌の調製

今年度も延命効果の高い餌料Bを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、昨年度は餌料Bの複数成分のうち、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)をそれぞれ試験したところ、やや弱い延命効果が認められるケースもみられたが、特定には至らなかった。最終的に残った2成分単独での延命効果は非常に弱かったものの、2成分が同時に調製された場合を想定して試験を実施した。そこで、餌料B4および餌料B5の2成分を同時に調製した新たな餌料を作成し、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11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ぼ認められなかった。また、*K. mikimotoi*の強毒株(2012年大村湾より単離したクローン株、NGU04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、今年度も暴露実験用の希釈用海水については、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3,841 cells/mL、試験に用いたブリの平均尾叉長は57.0 mm、平均体重は2.6 g、平均肥満度は1.39であった。試験は対照区(通常餌)、餌料B区、餌料B4・B5区の全3試験区である。ここで用いた餌料B4・B5区は、過年度の試験でそれぞれ弱い延命効果が認められたが効果を判定できなかつたため、2成分同時に調製した餌料を給餌した試験区である。

各試験区の供試尾数は4尾である。試験時の水温は24.3～25.7℃であった。

1回目の試験結果を図17に示した。対照区については、曝露開始3時間9分後からへい死がはじまったが、試験終了時の5時間32分後までに3尾が生残した（最終生残率75%）。餌料B区については、試験終了時まで全数生残した。餌料Bの2成分を同時に濃度下降させた餌料B4・B5区は2時間8分後からへい死が始まり、3時間49分後に2尾目が死亡したものの、試験終了時まで2尾が生残した（最終生残率50%）。本試験区は後述するように培地成分の再調製前であったため、比較的魚毒性が低く、明瞭な差異が認めにくかった。

（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4,310 cells/mL、試験に用いたブリの平均尾叉長は62.2 mm、平均体重は3.4 g、平均肥満度は1.40であった。試験は対照区、餌料B区、餌料B4・B5区の全3試験区である。各試験区の供試尾数はすべて4尾である。本試験では、培地成分を再調製して培養されたものである。

2回目の試験結果を図18に示した。対照区については、曝露開始26分後からへい死がはじまり、31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25分後からへい死がはじまり、1時間03分後に4尾目が死亡して全滅した。餌料B4・B5区については、曝露開始25分後からへい死がはじまり、それぞれ30分後および37分後までに3尾目と4尾目が死亡して全滅した。餌料Bの延命効果は、対照区の半数致死時間と比較して1.5倍延命したことから（表1）、過年度同様に一定程度の延命効果が認められたが、餌料B4・B5については、対照区とほぼ同様な生残曲線となっていたことから、2成分を同時に調製した餌料B4・B5区についても、それらを単独で調製した試験同様、延命効果がほとんど認められないと判断した（表1）。

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は有効成分の可能性が弱く示唆されたものの、今年度の試験結果によって、延命効果はほとんどない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、この細胞密度一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（松山ら 2024）。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℃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遅延することが多い。さらには、希釈に用いる海水の水質も影響し、微生物による汚染の少ない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一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、それでもなおバラツキがみられた（松山ら 2024）。そこで、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のため、予備的試験を実施した。K. mikimotoi 培養株を培地成分として栄養強化する時に添加する混合成分

（Mixs）をオリジナル培地濃度の1/5に制限した培地で6日間培養したのち、3成分（A、BおよびC）をそれぞれ通常濃度の2倍になるようにスパイクし、さらに3日間培養した。こうして9日間培養された藻体を目的の濃度になるようにろ過海水で希釈して曝露試験を実施した。曝露密度は

2,983~3,400 cells/mL である。試験にはブリ稚魚を3尾ずつ使用した。試験に用いたブリの平均尾叉長は62.1 mm, 平均体重は3.7 g, 平均肥満度は1.56であった。試験時の水温は25.1~27.3 °Cであった。

図19に結果を示した。最終的に Mixs を通常の培地濃度で培養された藻体については、1時間6分後および3時間21分後に2尾目と3尾目が死亡して全滅した。最終的に Mixs を1/5の培地濃度で継続培養された藻体については、2尾目が3時間55分後に死亡したが、試験終了時の6時間後まで1尾生残した(生残率33%)。このように、Mixs を制限すると、魚毒性の低下が発生した。次に、成分Aのみをスパイクして通常濃度の2倍とした試験区は、3尾目が5時間15分後に死亡したが、最終的に1尾生残し、1/5培地と概ね同様の生残時間となった。成分Bのみをスパイクして最終的に通常濃度の2倍とした試験区は、29分後および58分後に2尾目と3尾目が死亡して全滅するなど、明らかに生残時間の短縮が起き、魚毒性の賦活化がみられた。逆に成分Cについては、試験終了時の6時間後まで3尾全数が生残するなど(生残率100%)、対照区と比較しても魚毒性の著しい低下がみられた。

(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4回目試験)

3回目の試験において、成分Bで魚毒性の不活化が、成分Cで逆に魚毒性の阻害がみられたため、再現性確認のために再試験を実施した。

K. mikimotoi 培養株を培地成分として栄養強化する混合成分(Mixs)をオリジナルの培地濃度で9日間培養したもの、および混合成分を1/5として、培養開始4日目に成分Bと成分Cを通常濃度の2倍となるようにスパイクし、さらに6日間培養したものの3試験区を準備した。こうして合計9日間培養された3タイプの藻体を希釈して曝露試験を実施した。曝露密度は4,430~4,580 cells/mL である。試験にはブリ稚魚を3尾ずつ使用した。試験に用いたブリの平均尾叉長は73.0 mm, 平均体重は5.3 g, 平均肥満度は1.33であった。試験時の水温は24.3~27.9 °Cであった。

図20に結果を示した。Mixs を通常の培地濃度で培養された藻体については、1時間25分後および1時間38分後に2尾目と3尾目が死亡して全滅した。成分Bのみをスパイクして通常濃度の2倍とした試験区は、26分後および27分後に2尾目と3尾目が死亡して全滅するなど、3回目の試験同様に魚毒性の不活化が認められた。成分Cについては、試験終了時の6時間後まで3尾全数が生残するなど(生残率100%)、3回目試験同様に魚毒性の低下がみられた。

このことから、培地成分の中でも、K. mikimotoi の魚毒性を不活化する成分と逆に毒性を阻害する成分のいずれもが含まれることが分かった。通常培地作成時の栄養強化では、この魚毒性を不活化する成分Bと阻害する成分Cの両方のいずれもが含まれているために、試験の度に両者の濃度比率が微妙に変化し、実験毎に魚毒性のバラツキを引き起こしている可能性がある。また、K. mikimotoi の強毒株と弱毒株の存在についても、魚毒性が先天的に異なるだけでなく、毒性の強弱に関わる培地成分への感受性の差異を反映している可能性もある。今後の試験では、できるだけ毒性の高い条件で培養して試験を実施する必要がある。

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

- 濱本俊策, 安部昌明, 越智洋雅, 柏山浩史, 赤井紀子. シャットネラ属赤潮による養殖魚へのへい死被害にかかる聞き取り調査の概要と対応について. 平成 15 年度香川県水産業改良善及活動業績集, 2005; **25**: 11-15.
- Howard EM, Penn JL, Frenzel H, Seibel BA, Bianchi D, Renault L, Kessouri F, Sutula MA, McWilliams JC, Deutsch C. Climate-driven aerobic habitat loss in the California Current System. *Sci. Adv.* 2020; **6(20)**: eaay 3188.
- 門脇秀策・平田八郎. 浅海養殖漁場における溶存酸素量の微細分布-I 酸素の水平分布に及ぼす給餌の影響. 水産増殖 1984; 32(3): 142-147.
- 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.
- 松山幸彦, 徳永貴久, 野田 誠, 阿部慎一郎, 伊藤信夫, 北村充彰, 藤田幸辰, 吉田 歩. ②生け簀等の魚の救命・延命技術の高度化技術開発と実証 2) 赤潮被害手法の開発 軽減のための技術開発. イ. 生け簀等の魚介類を守る技術の開発・実証, 令和 5 年度豊かな漁場環境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報告書, 赤潮・貧酸素水塊、栄養塩類共同研究機関. 2024; 262-275.
- Pan, YK, Perry SF. Developing zebrafish utilize taste-signaling pathways for oxygen chemoreception. *Current Biology*, 2024; **34(18)**: 4272 - 4284.e5



図1 海面での稼働試験の実施状況（大分県佐伯市鶴見，2024年8月7日撮影）



図2 対照区（20 mm 漁網）における高濃度酸素水の発生状況
潮流により，画面上部から高濃度酸素水が生簀の外部へ流出している



図3 潮流抑制のために内張りした稚魚ネット（淡青色，目開き4 mm）



図4 稚魚網内張り区における高濃度酸素水の発生状況（2024年8月7日撮影）
対照区と比較して，高濃度酸素の滞留度が高いようである



図5 試験用ブリ稚魚の收容状況 (2024年8月7日撮影)

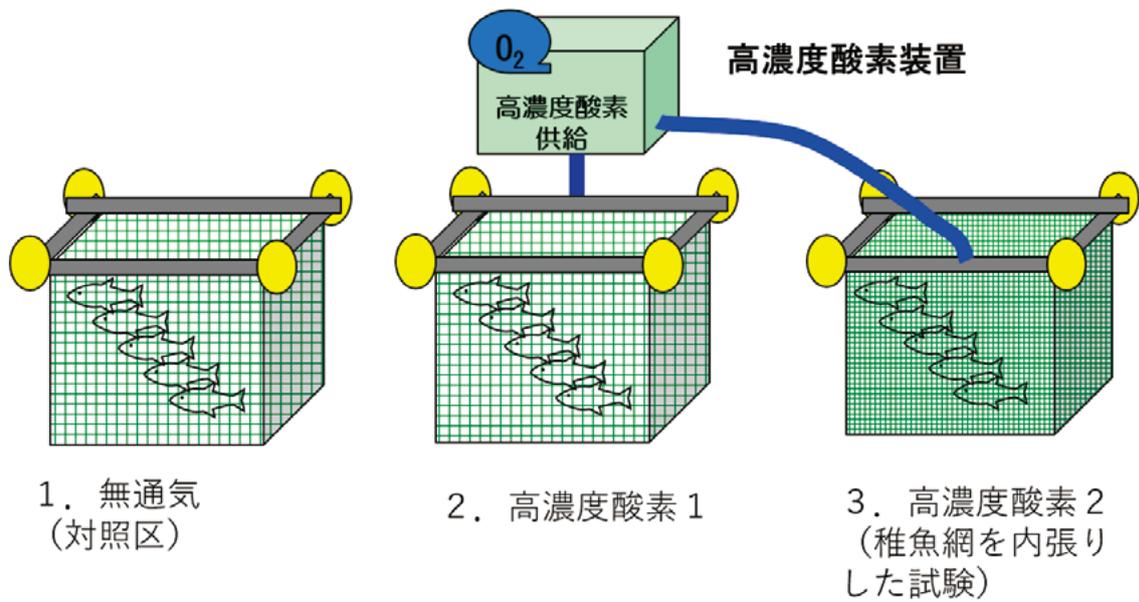


図6 試験設定条件

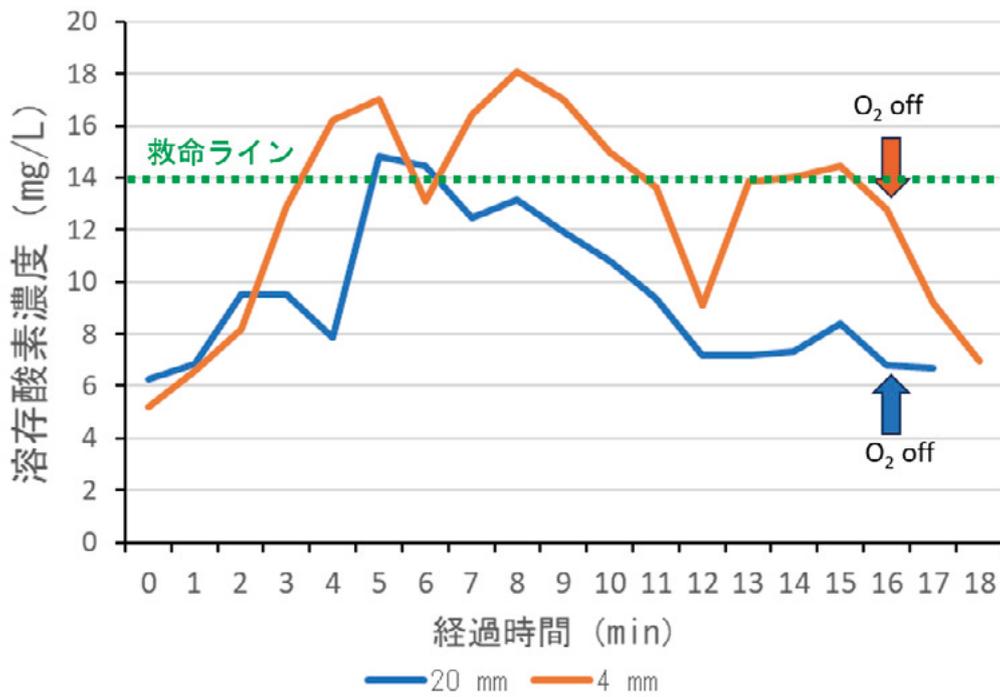


図7 試験生簀内部の溶存酸素濃度の変化
 凡例は網目の目開き，高濃度酸素 1: 20 mm, 高濃度酸素 2: 4 mm



図8 海面での稼働試験の実施状況（長崎市雲仙市富津，2024年11月26日撮影）



図9 試験に使用したシマアジ收容生簀（10m×10m，網底5m）
中央のボックスは自動給餌器

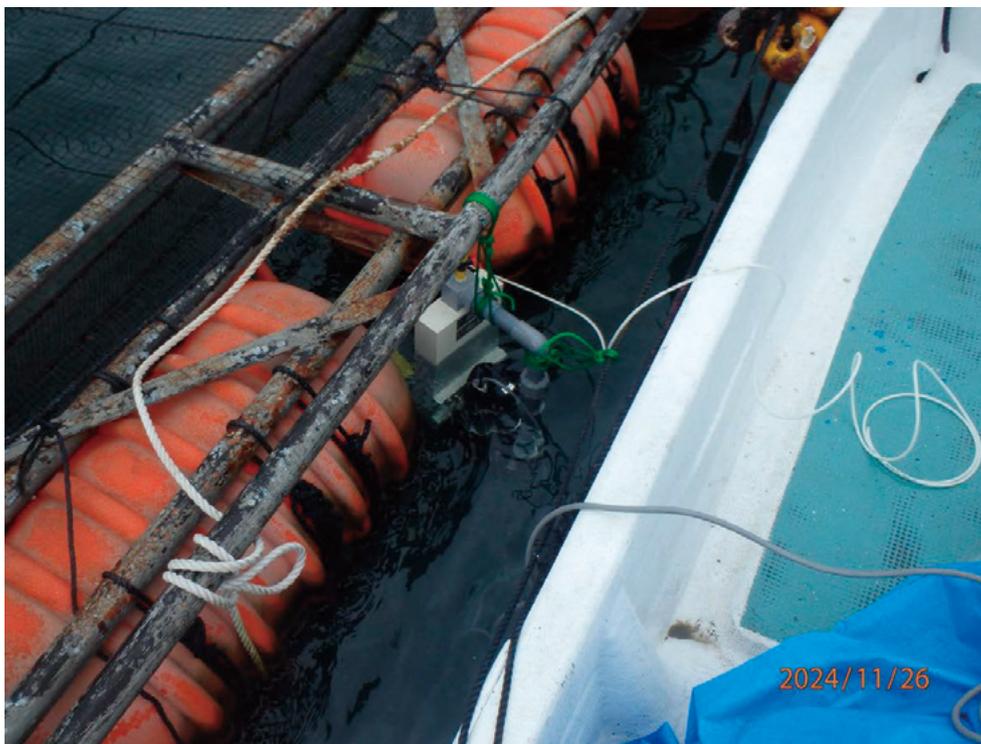


図10 フォームジェットの設置状況（中央）

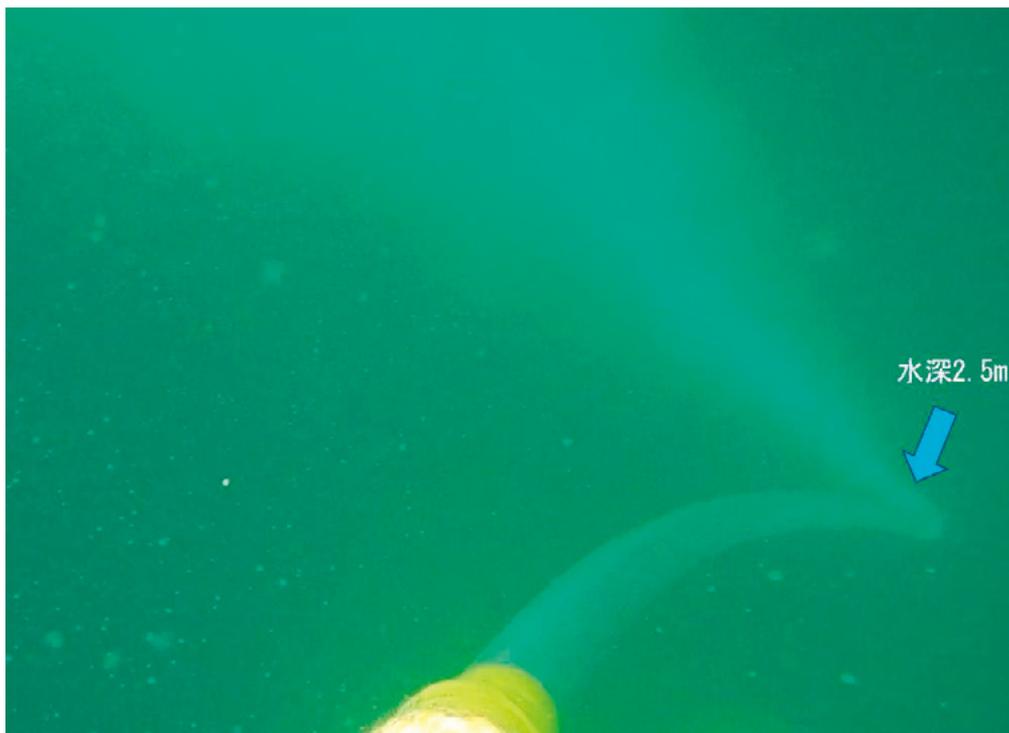


図 11 水中に伸ばしたノズルから噴射されている高濃度酸素水
噴射の反動でノズル先端が下方を向いている状態

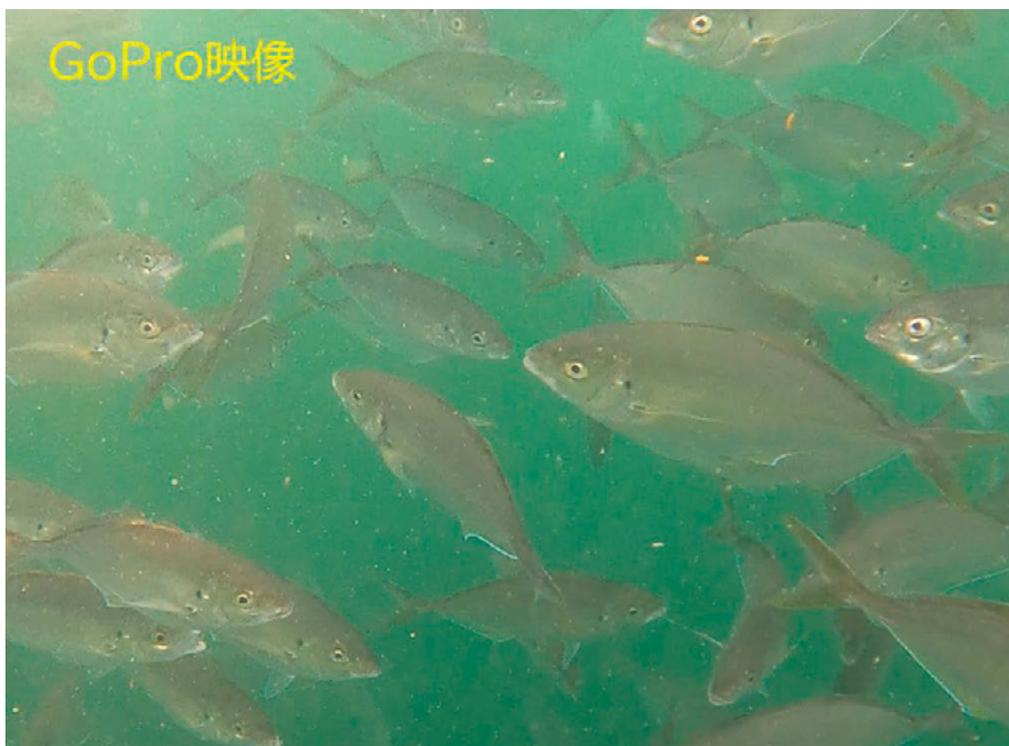


図 12 生簀に収容されているシマアジ (GoPro 撮影)
画質は高解像度であるが、CCD と一体化したモニターが水中にあるため、リアルタイムのモニタリングには不適である



図13 生簀に收容されているシマアジ（簡易型水中カメラの映像）
 CCDカメラとモニターが分離しているため、船上で魚群の状態をリアルタイムで観察できる。
 廉価品であるため、複数箇所に多数のカメラを設置可能。

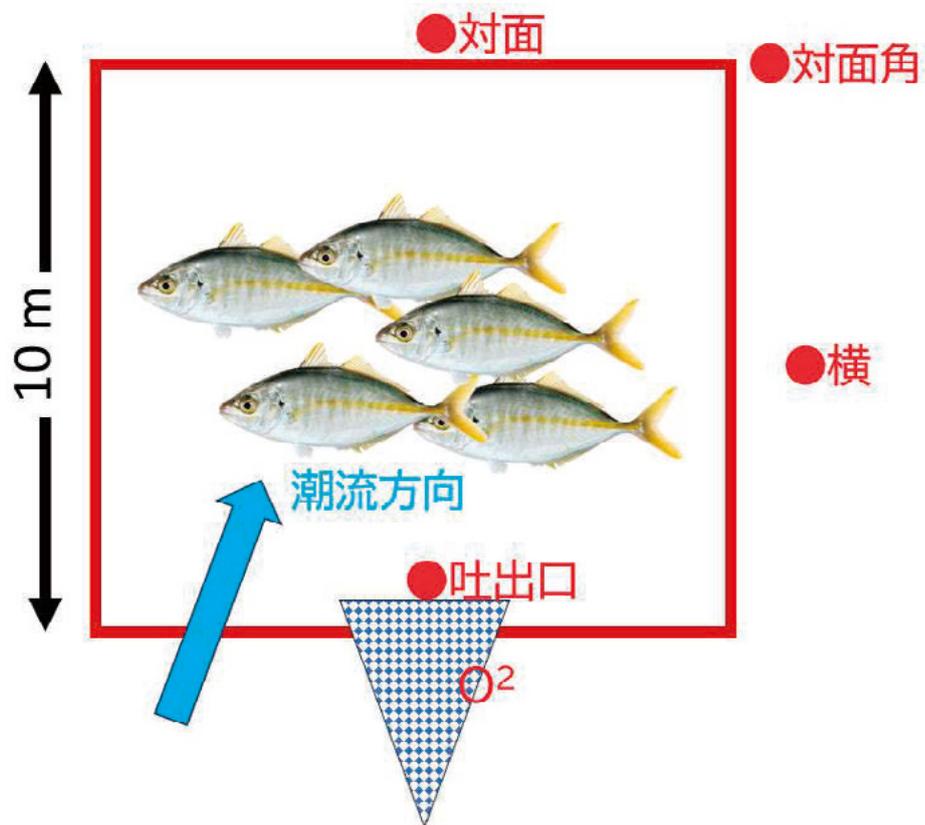


図14 高濃度酸素の噴射場所および溶存酸素の観測点の概略図
 それぞれの定点で、海面から海底までの溶存酸素を計測した

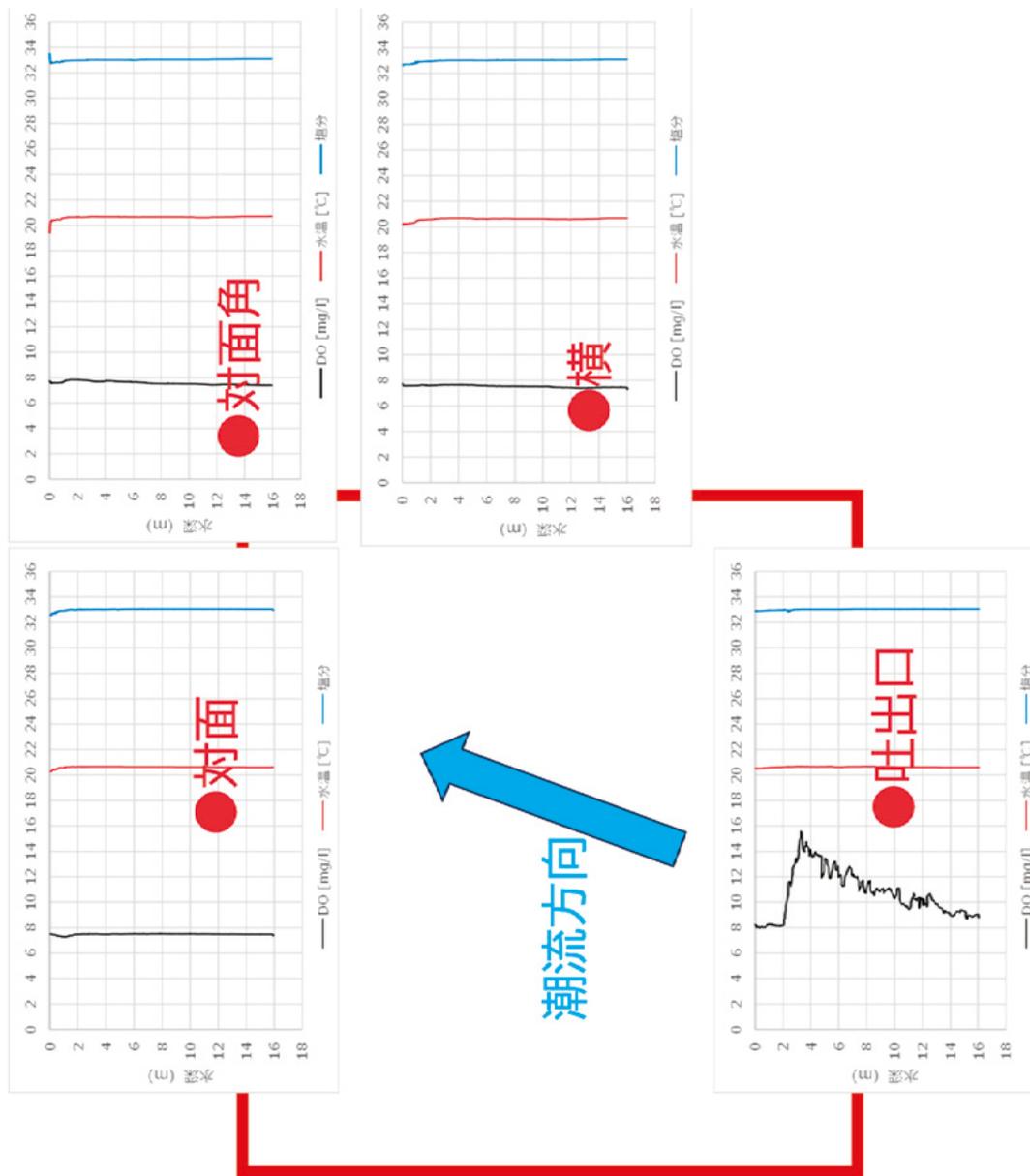


図 15 生簀周辺の水温，塩分，溶存酸素の鉛直分布

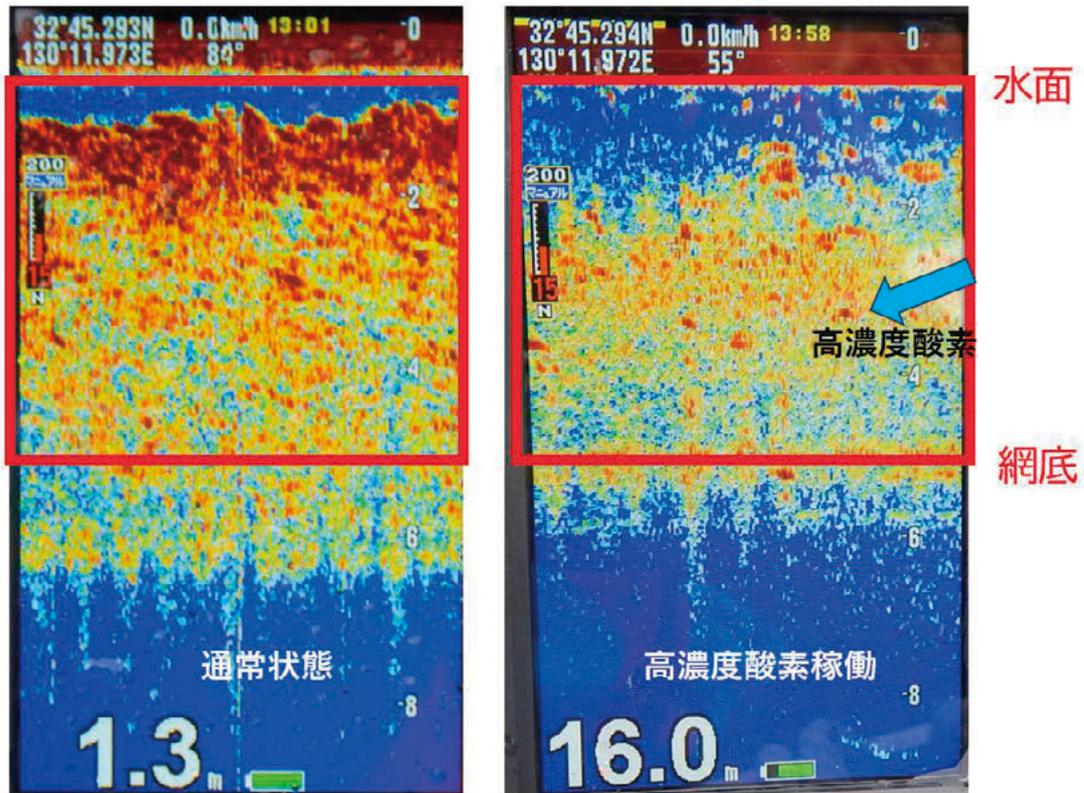


図 16 魚群探知機による魚群の分布状況
 左：通常状態 右：高濃度酸素噴射中の分布

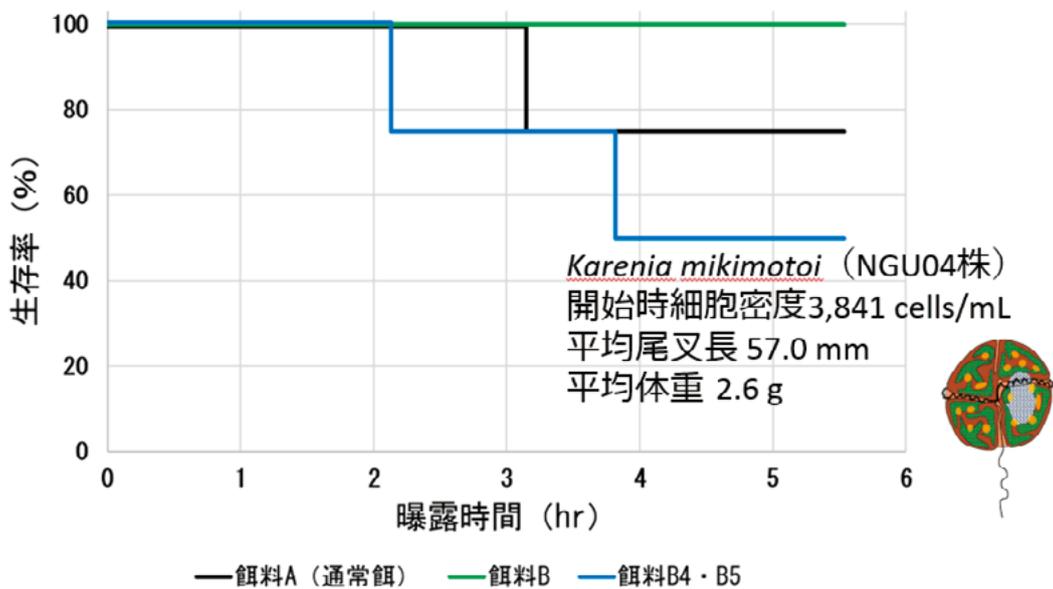


図 17 異なる餌料 B の給餌 (4 日間) がブリ稚魚の生存率に与える影響
 (*Karenia mikimotoi* 曝露時：1 回目実験)

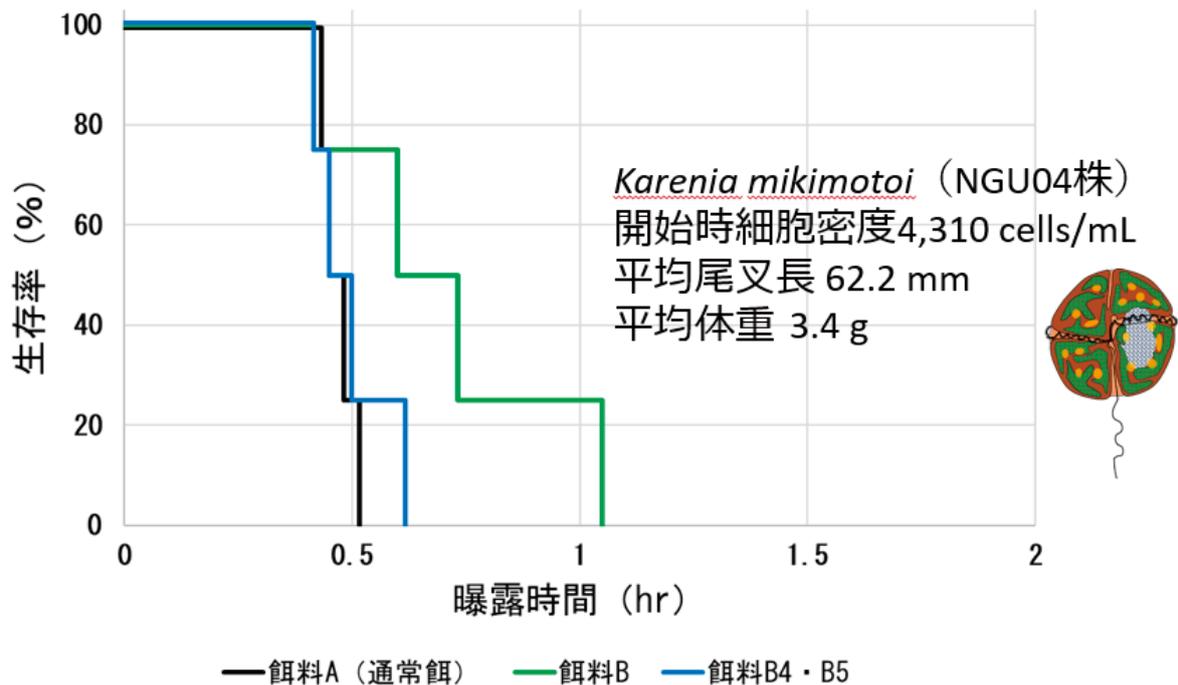


図 18 異なる餌料 B の給餌 (4 日間) がブリ稚魚の生存率に与える影響
 (*Karenia mikimotoi* 曝露時 : 2 回目実験)

表 1 餌料 B の各成分を調整・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	150 以上
B1	104~303
B2	125
B3	69~115
B4	101~106
B5	98~113
B4・B5	<u>100</u>

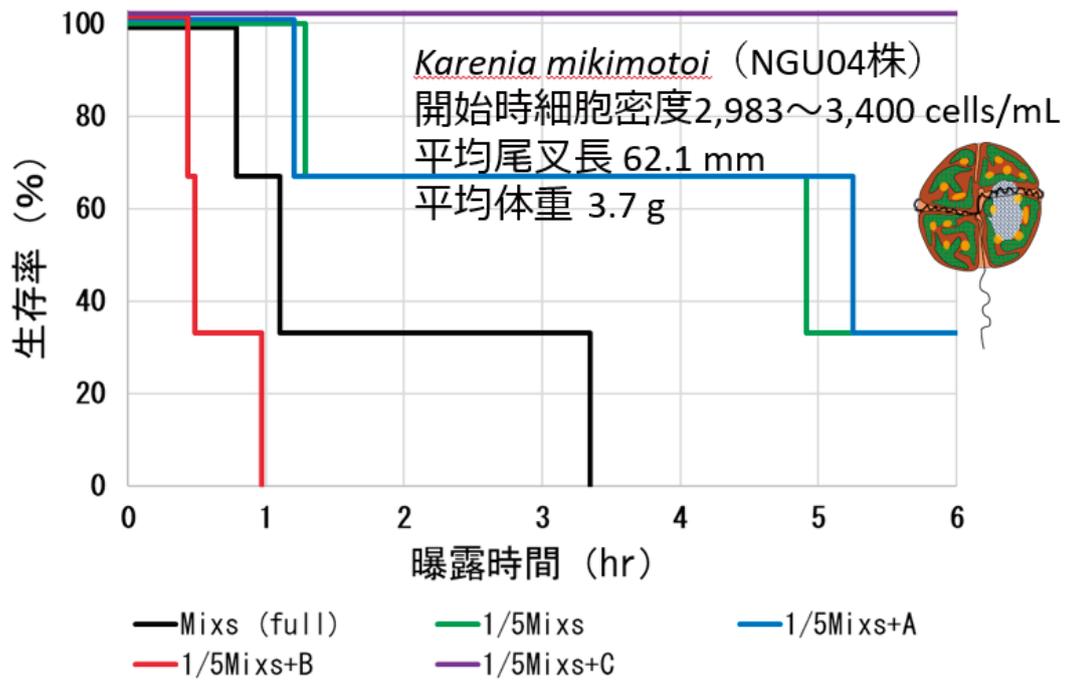


図 19 異なるロットの培地で培養された場合のブリ稚魚の生存率に与える影響
 (*Karenia mikimotoi* 曝露時：3 回目実験)

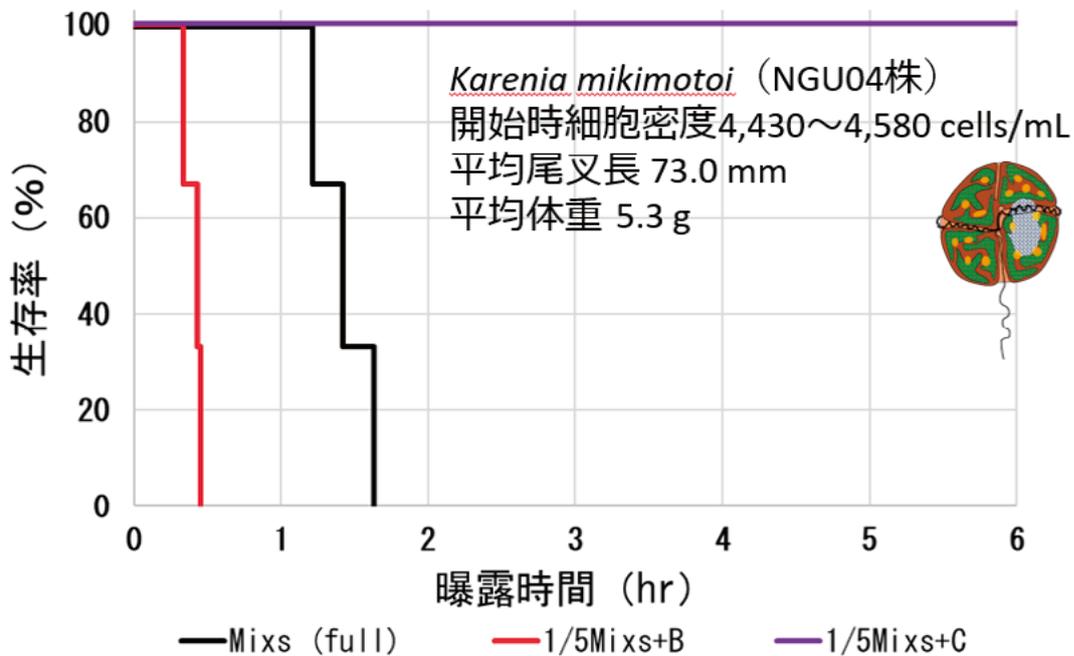


図 20 異なるロットの培地で培養された場合のブリ稚魚の生存率に与える影響
 (*Karenia mikimotoi* 曝露時：4 回目実験)