

赤潮の早期検知と海水からの病原体の検出技術の開発

増養殖環境課 谷口 越則・齋田 尚希

1 背景・目的

県内ではブリ類 11,350 t (42 経営体)、マダイ 6,188 t (61 経営体) の養殖生産がある (2018 年漁業センサス、養殖生産統計) が、赤潮及び魚病が甚大な被害を与えている。赤潮プランクトンの検出については、光学顕微鏡を用いた原因プランクトンの形態観察に基づく直接計数が主流であり、その結果に応じて注意喚起を行っている。しかし、この手法では発生初期段階である低密度時期の確認が困難であることから、餌止めや養殖小割の移動を効果的に行うため、より早い段階での赤潮プランクトンの確認と養殖業者への注意喚起が求められている。魚病については、病魚から病原体を検出する検査を行い、有効な薬剤使用等の指導を養殖業者に対してを行っている。しかし、投薬治療が困難な疾病が増加していることから、魚へ感染する前の病原体を確認・定量する手法を導入することにより、予防に重点を置いた対策への転換が求められている。本事業では、当試験場に導入されたリアルタイム PCR 装置 (BioRad 社 CFX96Touch) を用い、海水中の赤潮プランクトンや病原体の遺伝子を発生初期に検知することにより、赤潮や魚病対策を迅速化することを目的とした。なお、平成 31 年度は昨年度に引き続き、赤潮に重点を置いて事業を行った。

2 方法

平成 29 年度に作成したスタンダードサンプルを用いて、漁業被害が想定される赤潮プランクトンについて浦ノ内湾及び野見湾で遺伝子の定量を行った。各湾の対象プランクトンは過去に大きな漁業被害をもたらした種とし、浦ノ内湾では *Chattonella* spp. 及び *Karenia mikimotoi*、野見湾では *Cochlodinium polykrikoides* 及び *Karenia mikimotoi* とした。サンプリングは、過去の知見から赤潮プランクトンの発生源と想定される地点で行い (図 1、2)、遊泳細胞の採取を目的とした 0-10m の柱状採水と、シストからの発芽細胞の採取を目的とした底上 1 m (B-1) の採水を行った。

柱状採水は、高知大学の方法に準拠した。まず、長さ 11m、内径 30 mm の洗濯排水ホースの一端にステンレス製ロープコース (25mm) に沿って U 字型に曲げてロープで固定し、鉛製の錘を取り付けるとともに、もう一端をゴム栓で密閉できるように細工した採水ホースを作成した。このホースを用い、次の手順で採水を行った。

- (1) 採水ホースのロープコース側を調査定点の水深 10m まで垂下する。
- (2) もう一端の口をゴム栓で密閉したうえで、広口の 10L 容ポリタンク内に差し入れる。
- (3) 採水ホースをロープコース側まで手繰り寄せ、同端をポリタンクより高く掲げた状態で、ポリタンク内にあるもう一端のゴム栓を抜く。
- (4) ロープコース側からゴム栓側に向けて高い位置で順にホースを手繰り、ホース内部の海水をすべてポリタンクに収容する。

得られた海水サンプルのうち、2L を孔径 5.0 μ m のメンブレンフィルターで濃縮ろ過し、フ

フィルターから DNA 抽出キット (QIAGEN 社製 DNeasy Plant Mini Kit) で DNA 抽出を行い、リアルタイム PCR 装置を用いて対象プランクトンの遺伝子量 (細胞数換算) を解析した。また、比較のため同地点における表層、2m、5m 及びクロロフィル極大層の海水を北原式採水器を用いて採水し、プランクトン密度を計数した。

調査頻度は、例年の傾向から検鏡で初認される時期 (主に 4~8 月) は月に 2~4 回、その他の時期は月 1 回とした。

なお、昨年度は天然海域に存在し、リアルタイム PCR の検出を阻害する物質により、正確に定量することができなかった。本年度は対処法として、遺伝子抽出液の希釈により阻害物質濃度を閾値未満に低下させることで、検出感度が向上し、正確な定量が可能となったことから、昨年度のサンプルについても再解析を行ったので、併せて結果を掲載する。

3 結果

(1) 浦ノ内湾

Chattonella spp. は、4 月上旬に中学校前で初めて検出された。その後、光松でも検出され、遺伝子量が増加傾向を示した。5 月 15 日には光松で初めて検鏡でも確認された。その後、遺伝子量、検鏡による計数値ともに増加し続け、7 月 2 日に赤潮を形成した。最高遺伝子量は、7 月 31 日に光松の B-1 で採取された海水から検出された 661.7cells/mL であった。以降、増減を繰り返していたが、10 月下旬以降、遺伝子はほとんど確認されなくなった (図 3、4)。

K. mikimotoi は平成 30 年から継続して検出されており、平成 31 年 1 月には検鏡で確認された。3 月からは遺伝子量、4 月からは検鏡による計数値でも増加傾向を示し、5 月 1 日に赤潮を形成した。最高遺伝子量は、6 月 19 日に中学校前の 0-10m で採取された海水から検出された 261.8cells/mL であった。10、11 月は遺伝子が検出されなかったが、12 月以降は遺伝子が検出され続けた (図 5、6)。

(2) 野見湾

C. polycrroides は、6 月上旬に湾奥ブイの 0-10m で遺伝子が初めて検出され、6 月下旬には馬の背の B-1 で、7 月上旬には同じく馬の背の 0-10m で遺伝子が検出されたものの、7 月中旬以降は検出されなくなった。令和 2 年 2 月から再び遺伝子が検出され、3 月には検鏡でも確認された。最高遺伝子量は 2 月 28 日に湾奥ブイの B-1 で採取された海水から検出された 0.049cells/mL であった。(図 7、8)。

K. mikimotoi は、6 月上旬に馬の背の 0-10m で遺伝子が検出され、同日に検鏡でも確認された。6 月中旬には、湾奥ブイでも遺伝子が検出された。その後、両定点ともに増加傾向を示したものの、赤潮の形成には至らなかった。その後も馬の背では、低密度ながらも 12 月まで継続して遺伝子が検出された。令和 2 年 2 月には湾奥ブイでも遺伝子が検出され、以降増加傾向を示した。最高遺伝子量は 8 月 8 日に馬の背の 0-10m で採取された海水から検出された 0.189cells/mL であった (図 9、10)。

4 考察

浦ノ内湾における *Chattonella* spp. は、遺伝子の初検出から最高遺伝子量に至るまで継続し

て検出され続けた期間が4か月であり、昨年度の1.5か月に比べ長かった。また、サンプリング回数を増やしたことで、詳細なモニタリングを実施できた。昨年度得られた結果と合わせると *Chattonella* spp. の遺伝子量の増加幅と経時変化から、緩やかな傾きを示すと本種の発生が大規模かつ長期間であった。一方、急激な傾きを示すと小規模かつ短期間である傾向がみられたことから、その後の動向を予測できる可能性があり、赤潮の早期検知手法として有効性が高いと考えられた。

K. mikimotoi は、浦ノ内湾内にほぼ周年にわたり存在していることが確認され、細胞の増殖を遺伝子量調査によって低密度時期から確認することが可能となった。昨年度までの知見と合わせると、上述した *Chattonella* spp. と同様に、*K. mikimotoi* の遺伝子量の増加幅と経時変化から、緩やかな傾きを示すと大規模かつ長期間であり、急激な傾きを示すと小規模かつ短期間である傾向がみられた。これら両種の増殖について一定、予測できる可能性が示唆された。

また、昨年度及び本年度において、遺伝子量が増加傾向を示している場合に、検鏡で細胞数の減少が確認されても、再び増殖に転じるケースが確認されている。検鏡法では北原式採水器を用いて、特定の水深の海水を採取することで、高密度の生息層を特定することが可能である。一方、50cmでもずれると2~3オーダー程細胞数を読み違えることもある。遺伝子量調査で行っている0-10mの鉛直採水は高密度な水深を特定できないが、北原式採水器による検鏡法と比較して、相対的に対象種の存在や細胞数を確認することができる。検鏡法、遺伝子量調査ともに一長一短があり、それぞれの手法を組み合わせることで相互に補完することができることから、今後は両手法の併用によるモニタリングの実施が望ましいと考えられる。

野見湾については、対象としたプランクトンの増殖があまり確認されず、遺伝子量調査結果の有効性を示すに至らなかったが、浦ノ内湾のような毎年、赤潮が発生する海域でデータを収集し、予察手法を確立することにより、他海域でも遺伝子量調査によるモニタリングから動態予測に応用できる可能性があることから、野見湾においても遺伝子量調査によるモニタリングを継続する予定である。

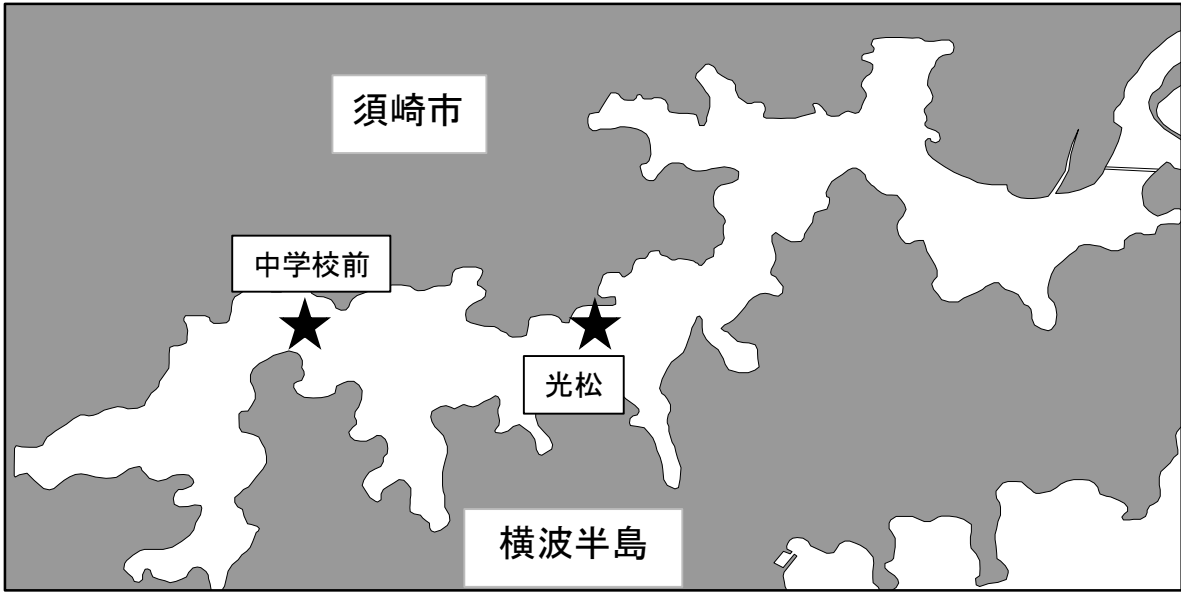


図1 浦ノ内湾における調査定点



図2 野見湾における調査定点

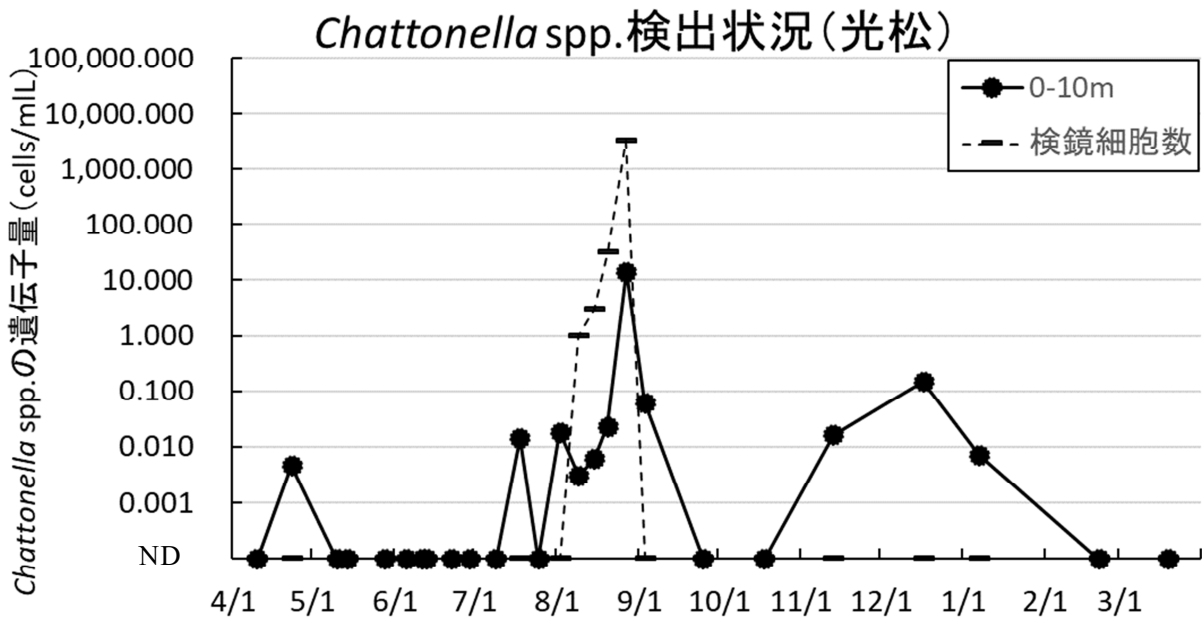
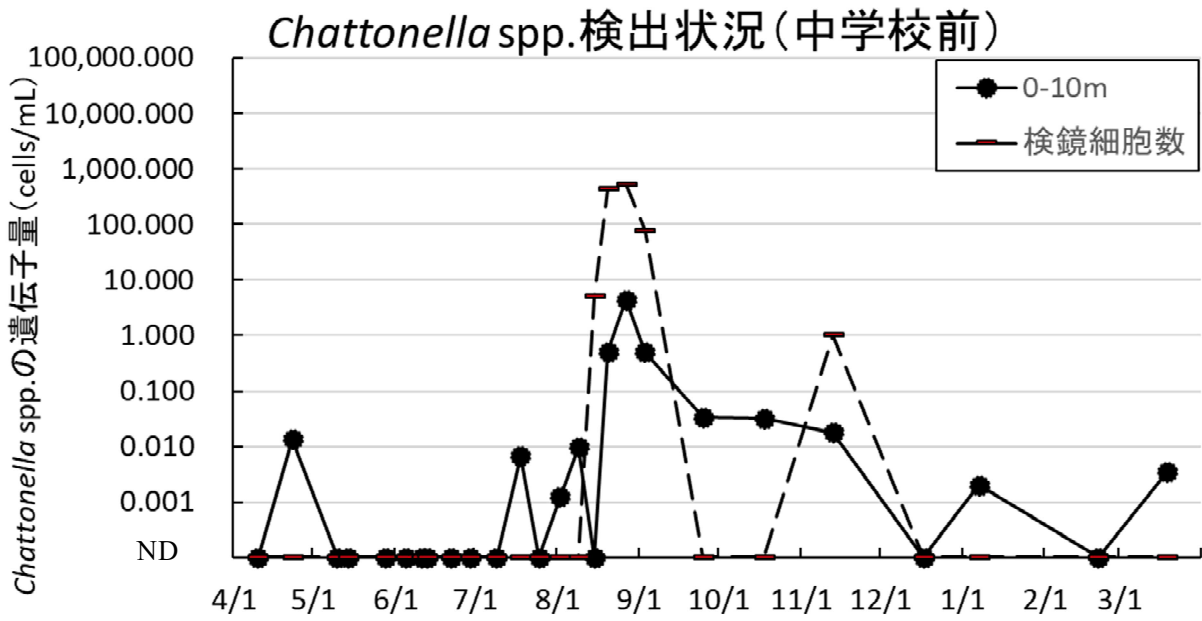


図3 平成30年度における浦ノ内湾の *Chattonella* spp. の遺伝子検出状況

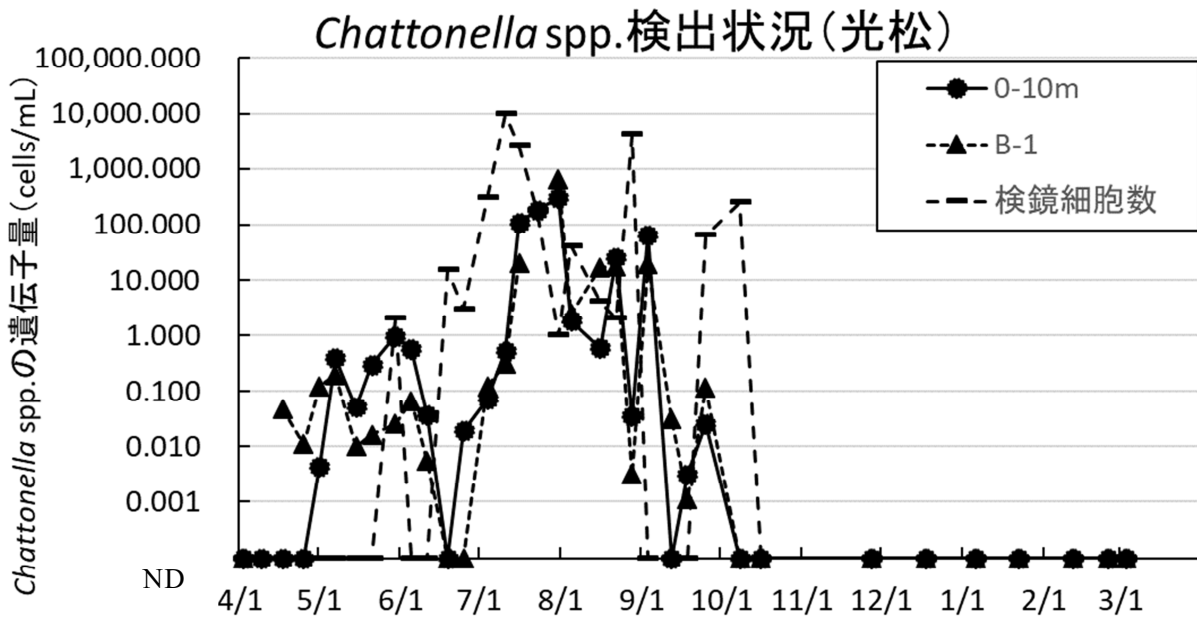
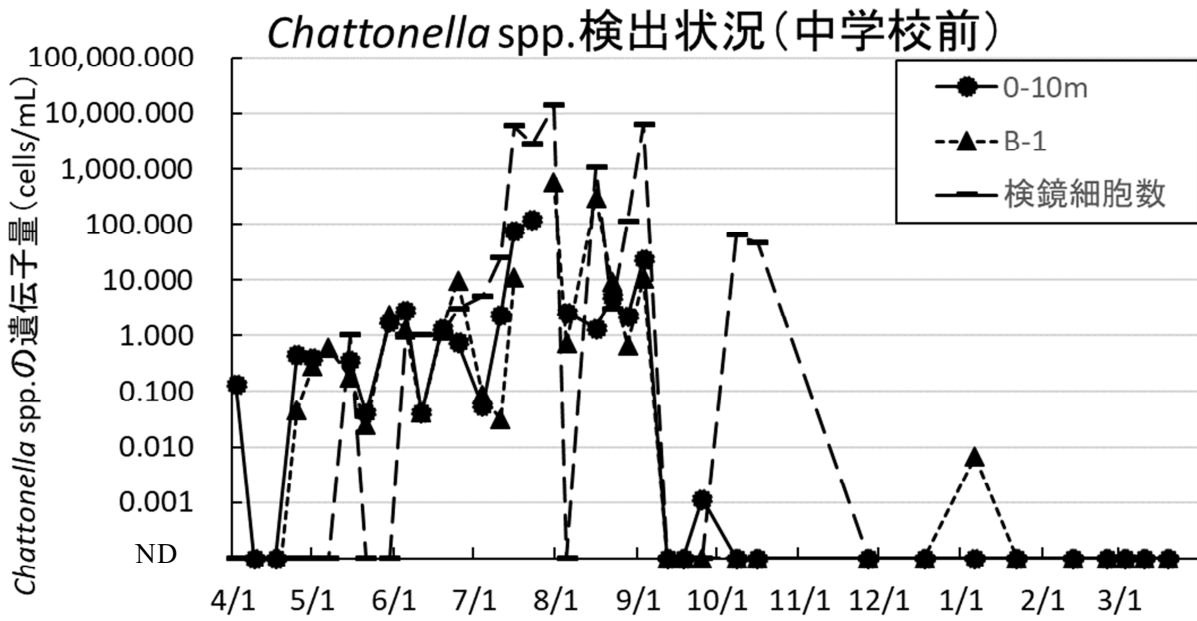


図4 平成31年度における浦ノ内湾の Chattonella spp. の遺伝子検出状況

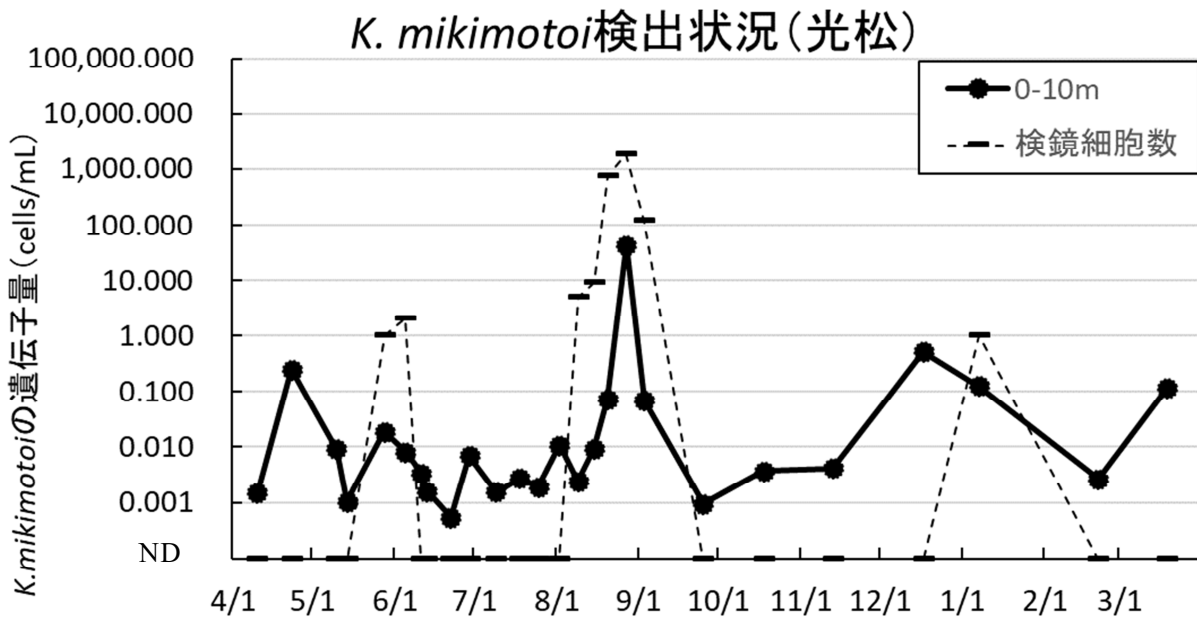
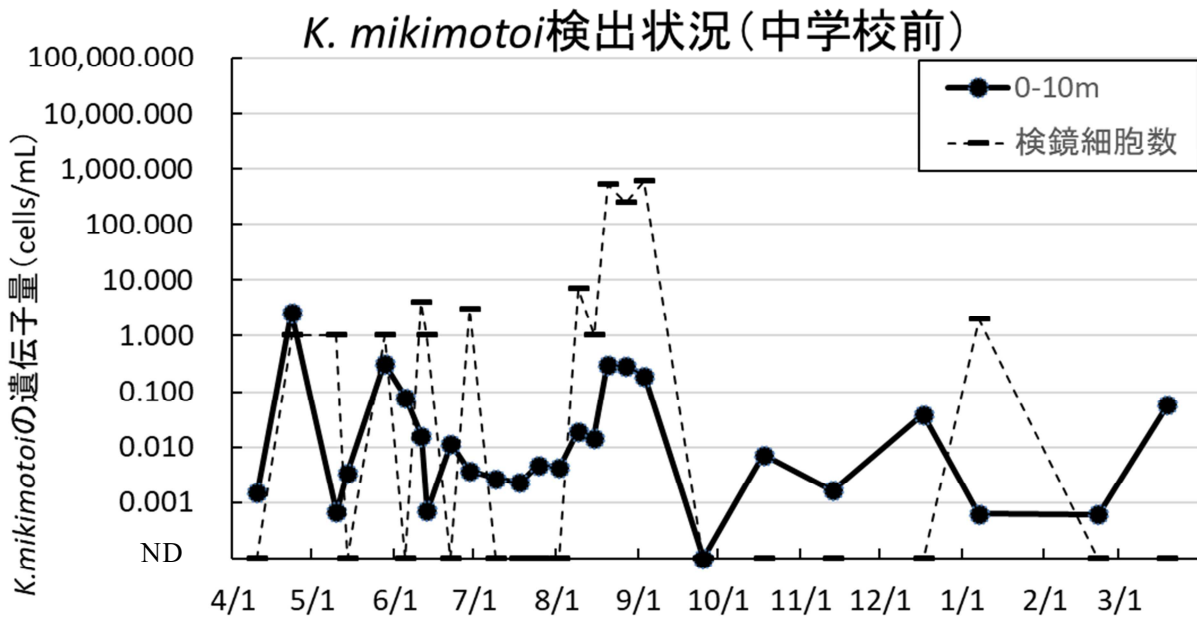


図5 平成30年度における浦ノ内湾の *K. mikimotoi* の遺伝子検出状況

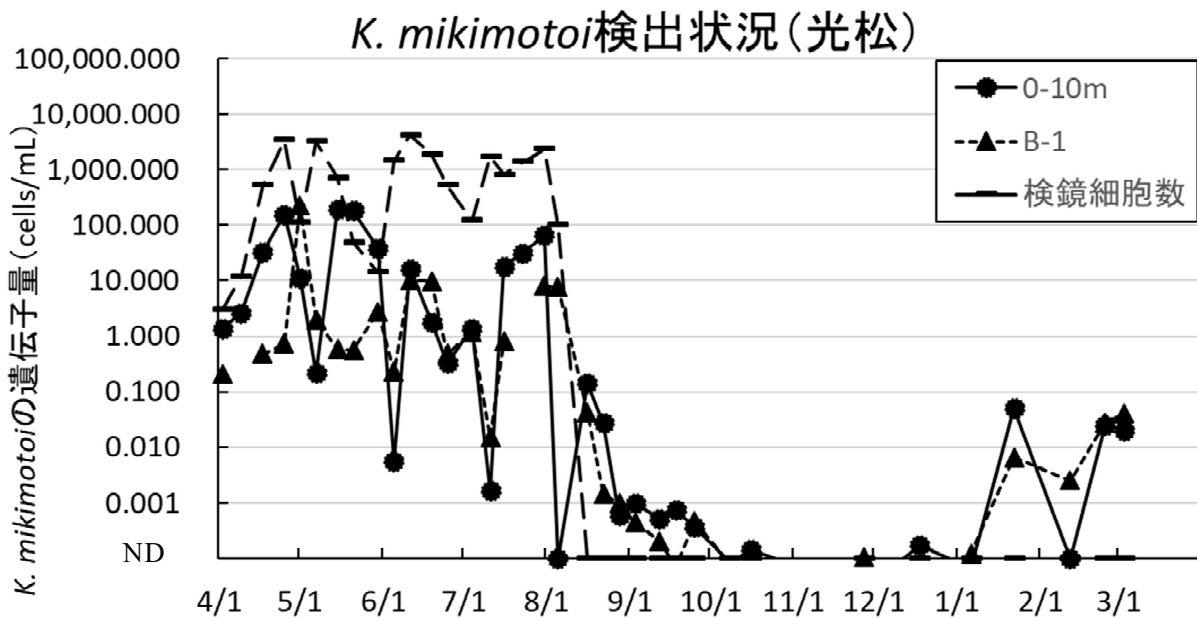
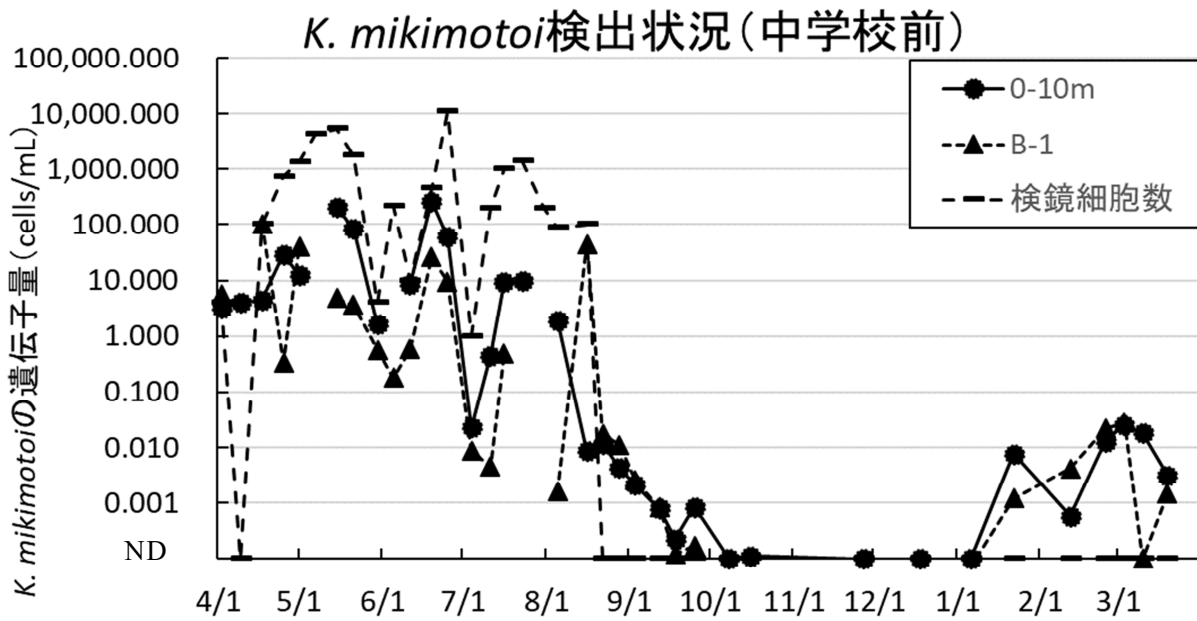


図6 平成31年度における浦ノ内湾の *K. mikimotoi* の遺伝子検出状況

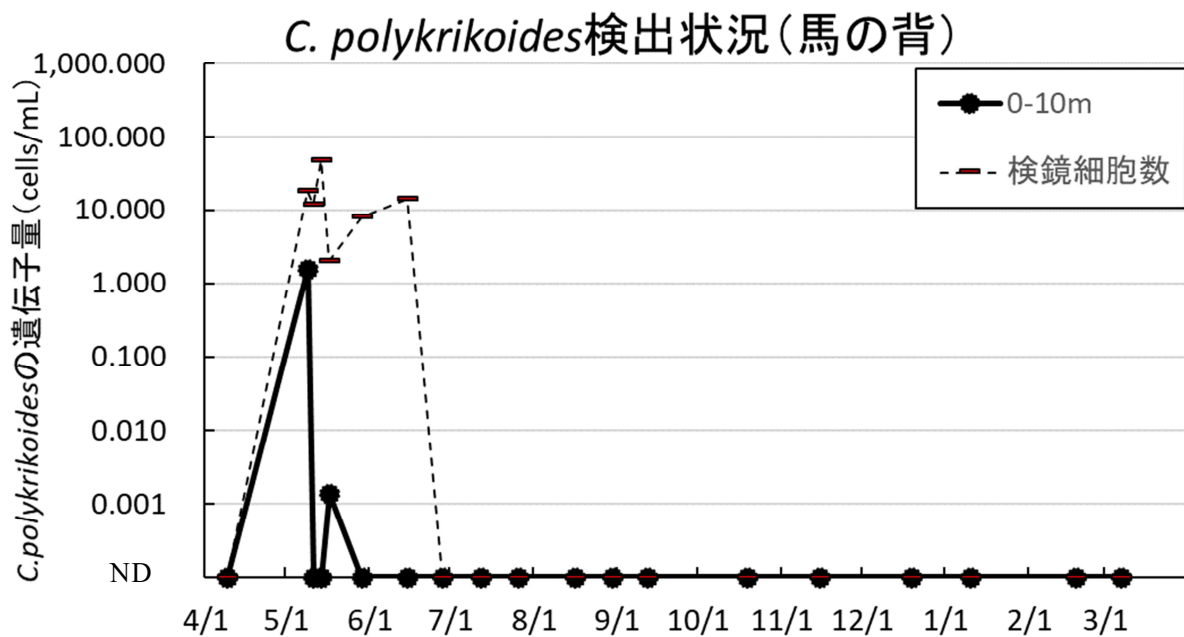
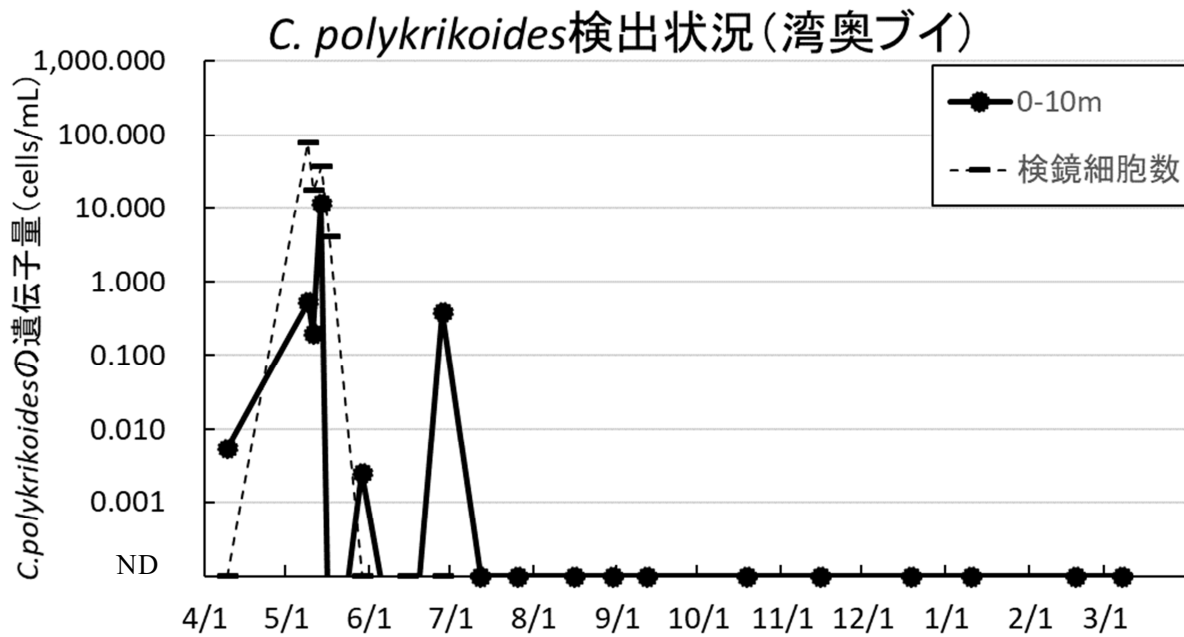


図 7 平成 30 年度における野見湾の *C. polykrikoides* の遺伝子検出状況

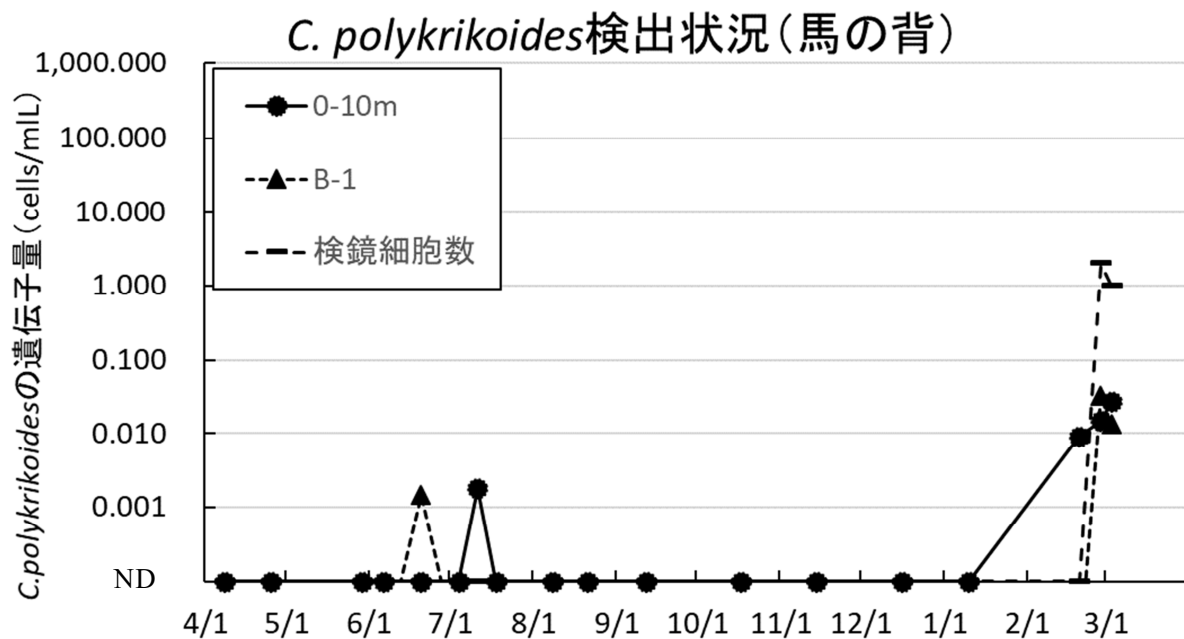
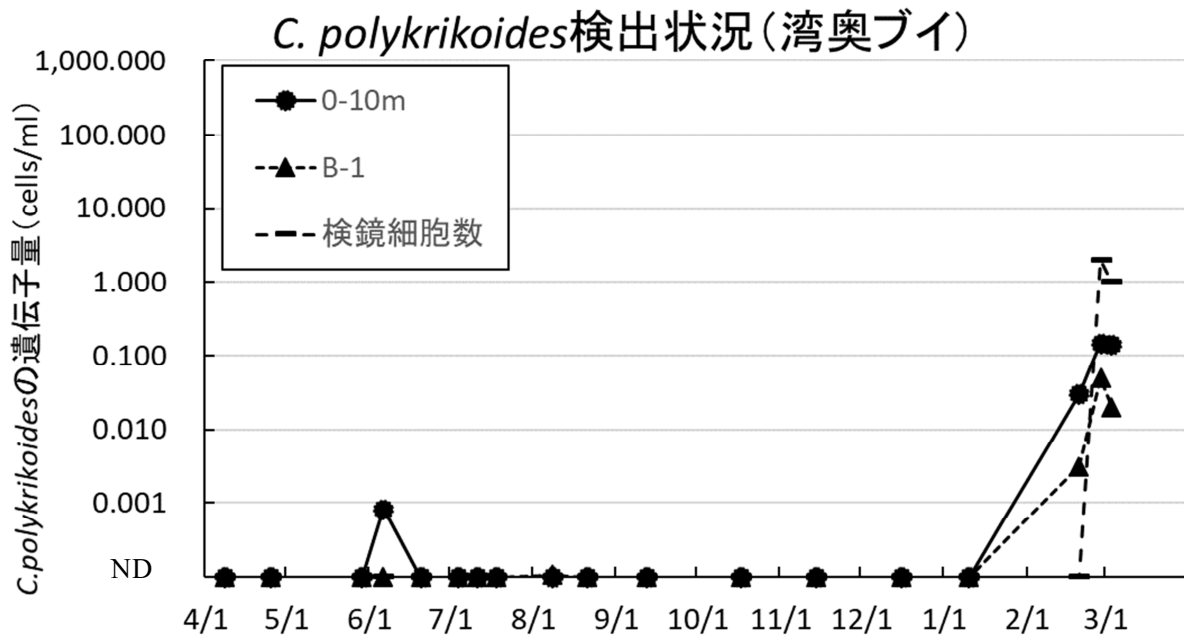


図 8 平成 31 年度における野見湾の *C. polykrikoides* の遺伝子検出状況

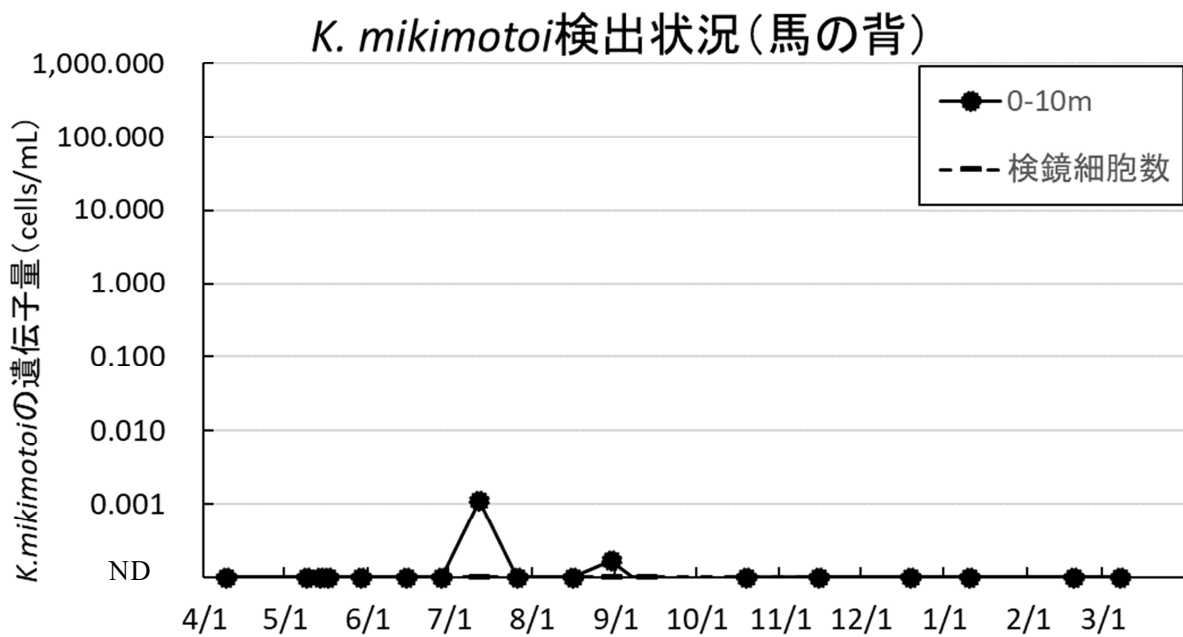
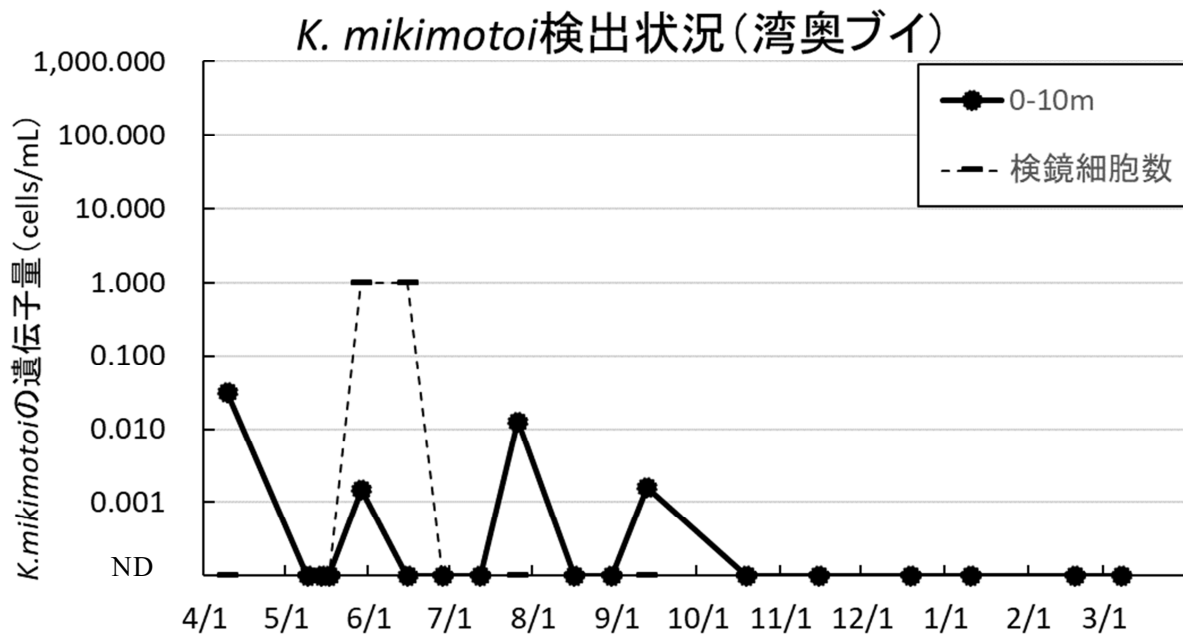


図9 平成30年度における野見湾の *K. mikimotoi* の遺伝子検出状況

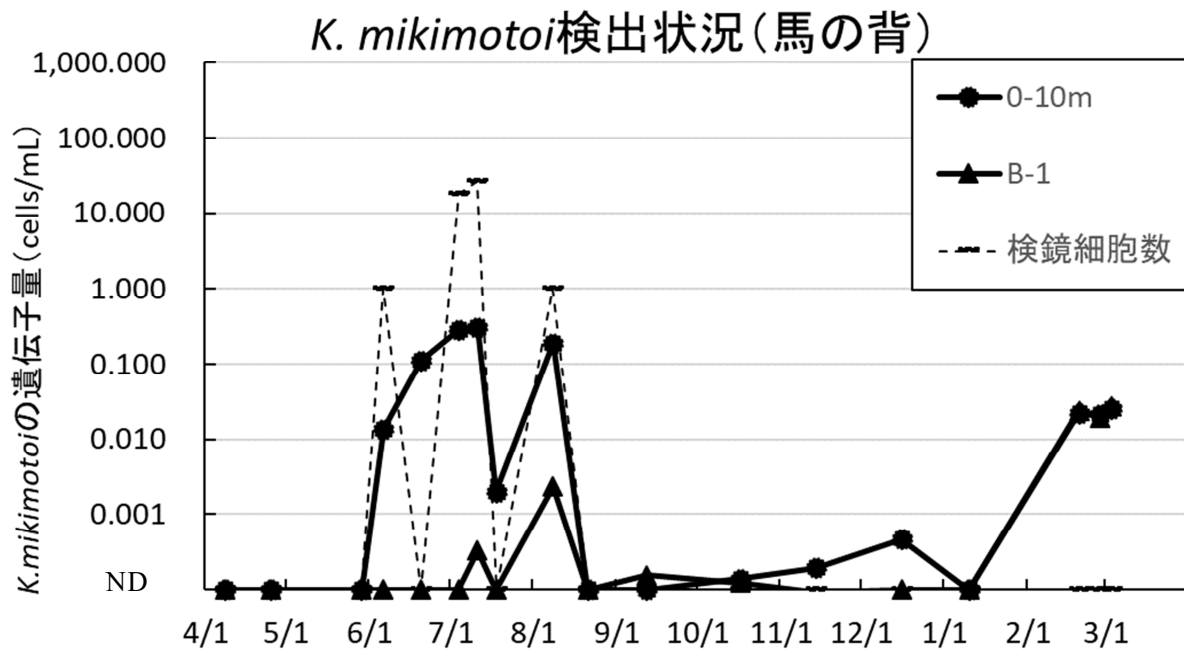
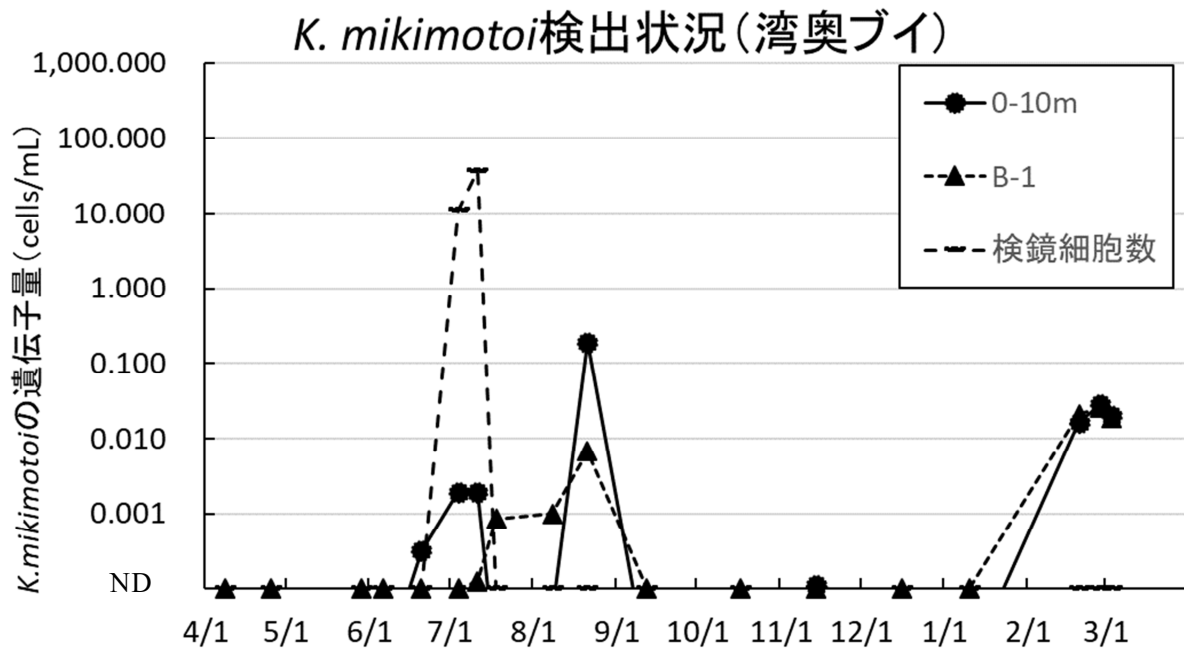


図 10 平成 31 年度における野見湾の *K. mikimotoi* の遺伝子検出状況