

# 魚類養殖における寄生虫の新たな防除技術開発・ 赤潮の早期検知と海水からの病原体の検出技術の開発 (古満目分場)

古満目分場 鈴木 怜

## 1 背景・目的

本県の養殖業はブリ類 11,350 トン（全国第 4 位）、マダイ 6,188 トン（全国第 3 位）、クロマグロ 2,234 トン（全国第 3 位）と全国有数の生産量を誇っており、その中でも宿毛湾（宿毛市、大月町）での生産量が、ブリ類 8,738 トン、マダイ 5,003 トン、クロマグロ 2,234 トンと多くを占めている（農林水産省 2019、2020）。

近年、西日本の養殖場では微胞子虫 *Microsporidium* 属を原因とするべこ病の発生が深刻な問題となっているが、宿毛湾でもブリ類やマダイ等に重度の感染が確認されている。また、宿毛湾では有害プランクトン等による赤潮も増加しており、平成 25 年には 146,110 千円の被害が生じた（水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1980-2020、図 1）。

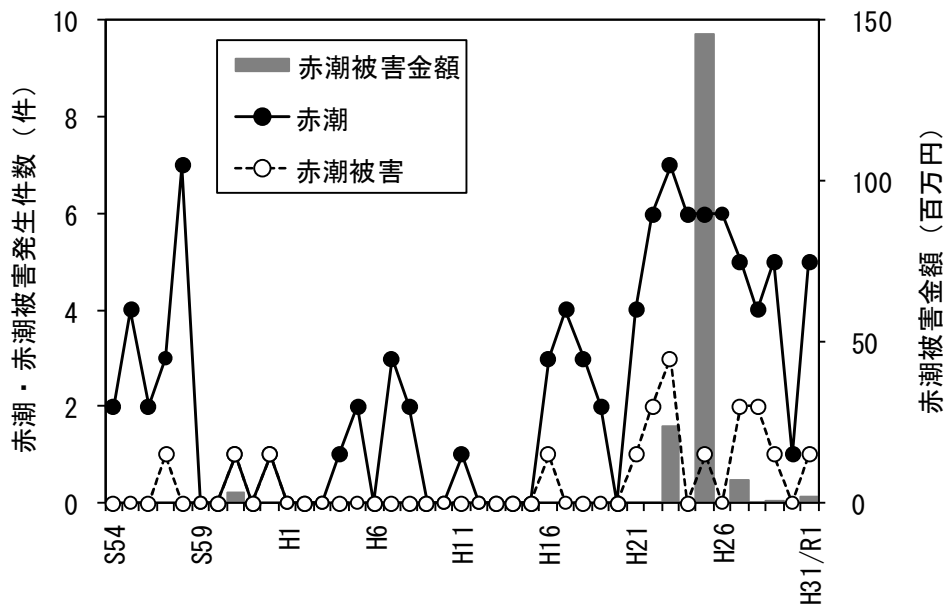


図 1 宿毛湾（高知県海域）における赤潮・赤潮被害発生件数及び赤潮被害金額

本事業では、魚病及び赤潮被害の軽減・予防、早期対策体制の構築等を目的に、海水中に存在する微量な病原体及び有害プランクトンをリアルタイム PCR を用いて検出・定量するための技術開発を行った。

## 2 方法

### (1) 魚病（べこ病）

## 1) サンプリング

サンプリングは平成 31 年 4 月から令和 2 年 3 月にかけて、柏島、古満目、大島中央及び小筑紫中央の 4 地点で行った (図 2)。柏島及び古満目では採水器 (リゴ- B 号透明採水器, 離合社) を用いて 1m 層の海水を採取した。また、サンプリング時にはハンディー水質計 (YSI Pro2030, ワイエスアイ・ナノテック社) を用いて採水層の水温、塩分及び溶存酸素量を測定した。大島中央及び小筑紫中央では内径 30mm のホースを用いて 0-10m 層の海水を柱状採水した。また、サンプリング時には直読式総合水質計 (AAQ-RINCO, JFE アドバンテック社) を用いて採水層の水温、塩分及び溶存酸素量を測定した。

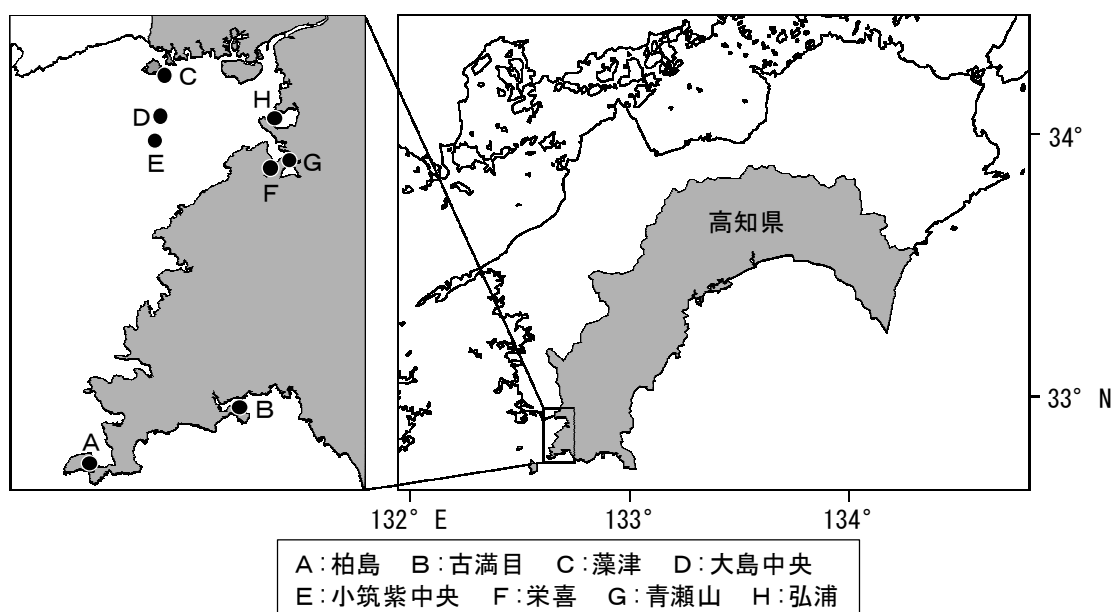


図 2 サンプリング地点

## 2) 分析

サンプリングした海水は孔径  $1.0 \mu\text{m}$  のメンブレンフィルター (Omnipore JAWP04700, メルク社) でろ過し、フィルター上に *Microsporidium* 属を捕集した。ろ過量は、柏島及び古満目は 2 または 5L、大島中央及び小筑紫中央はろ過できる限界量 (1.3-4.5L) とした。フィルターからの DNA の抽出は、ジルコニアボールによる破碎及びプロテインナーゼ K (キアゲン社) によるタンパク質分解処理を行った後、抽出キット (DNeasy Plant Mini Kit, キアゲン社) を用いて行った。また、11 月 11 日以降の柏島で採取したサンプルについては、別の抽出キット (Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit, ザイモリサーチ社) も併用した。

*Microsporidium* 属の検出・定量は、リアルタイム PCR (CFX96 Touch リアルタイム PCR 解析システム, バイオ・ラッド ラボラトリーズ社) を用い、国立研究開発法人 水産研究・教育機構 増養殖研究所が開発した方法で行った。前年度事業では DNA 抽出物  $1 \mu\text{L}$  を希釈せずに分析に供したが、同海域でべこ病が発生していたにもかかわらず *Microsporidium* 属は一度も検出されなかった (鈴木 2020)。その要因について検討したところ、①高知県西部海域に出現する *Microsporidium* 属はプライマーまたはプローブ結合部位の塩基配列に変位が生じている、②抽出物中に含まれるテンプレート DNA の量が少ない、③サンプリング地点は養殖生簀に隣接しており、また、河川水の影響を強く受けている地点もあることから、PCR 阻害物質が多く含まれ

ている等が考えられた。そこで、海水の分析を行う前に、使用しているプライマー及びプローブで採水地点に存在する *Microsporidium* 属が検出できるかどうかの予備試験を行った。柏島でべこ病に感染したマダイ稚魚を採取し、筋肉中に確認されたシストから DNA を抽出、海水サンプルと同条件（プライマー、プローブ、反応条件等）で分析を行った。また、海水サンプルの分析は、分析に供する DNA 抽出物の量を  $3\mu\text{L}$  に増やすと共に、阻害物質の影響を減らすために 10 倍希釈した DNA 抽出物の分析も行った。

## （２）有害プランクトン

### １）サンプリング

サンプリングは平成 31 年 4 月から令和 2 年 3 月にかけて、宿毛湾内の 6 地点（藻津、大島中央、小筑紫中央、栄喜、青瀬山及び弘浦）で行い（図 2）、表中層（0-10m 層柱状、内径 30mm のホースを使用）及び底層（B-1m 層、リゴ-B 号透明採水器を使用）の海水を採取した。また、サンプリング時には直読式総合水質計（AAQ-RINCO, JFE アドバンテック社）を用いて 1-10m 層の水温、塩分、溶存酸素量及びクロロフィル a 量の測定も行った。

### ２）分析

サンプリングした海水は孔径  $3.0\mu\text{m}$ （Whatman 111112, GE ヘルスケア・ジャパン社）または  $5.0\mu\text{m}$ （Omnipore JMWP04700, メルク社）のメンブレンフィルターでろ過し、フィルター上にプランクトンを捕集した。ろ過量は、表中層サンプルはろ過できる限界量（0.8-5.5L）、底層サンプルは 1-2L とした。また、表中層サンプルに関しては 1L 濃縮検鏡も行い、有害種を計数した。

フィルターからの DNA の抽出は、ジルコニアボールによる破碎処理を行った後、抽出キット（DNeasy Plant Mini Kit, キアゲン社）を用いて行った。

検出・定量はリアルタイム PCR（CFX96 Touch リアルタイム PCR 解析システム, バイオ・ラッド ラボラトリーズ社）を用いて国立大学法人 愛媛大学 南予水産研究センターが開発した方法で行った。対象種は *Cochlodinium polykrikoides*、*Chattonella* 属及び *Karenia mikimotoi* とした。

サンプリング地点は養殖生簀に隣接しており、また、河川水の影響を強く受けている地点もあることから、PCR 阻害物質が多く含まれている可能性が考えられた。また、赤潮発生時等にもサンプリングを行ったことから、抽出物中に含まれる DNA 量が多すぎる可能性も考えられた。そこで、DNA 抽出物を希釈なし、10 倍希釈、100 倍希釈及び 1,000 倍希釈の 4 段階で分析し、検鏡結果と比較して検出・定量成績の良い希釈値を求めた。

検出限界値はスタンダードサンプルの最小値（*C. polykrikoides* : 0.2cell、*Chattonella* 属 : 0.25cell、*K. mikimotoi* : 0.25cell）とした。例えば、ろ過量 5L、10 倍希釈で分析を行った時の検出限界値は、*C. polykrikoides* の場合  $0.0004\text{cell/mL}$  ( $=0.2\text{cell}/5000\text{mL}\times 10$ ) である。

## 3 結果と考察

### （１）魚病（べこ病）

#### １）サンプリング地点環境（図 3）

柏島は、水温  $17.0\text{-}28.2^{\circ}\text{C}$ 、塩分  $32.7\text{-}34.9$ 、溶存酸素量  $5.4\text{-}8.0\text{mg/L}$  の間で推移した。古満

目は、水温 16.5-28.3℃、塩分 31.6-34.9、溶存酸素量 5.8-8.4mg/L の間で推移した。大島中央（0-10m 層平均）は、水温 17.0-28.8℃、塩分 32.3-34.5、溶存酸素量 5.3-7.2mg/L の間で推移した。小筑紫中央（0-10m 層平均）は、水温 17.2-28.7℃、塩分 32.5-34.6、溶存酸素量 5.4-7.3mg/L の間で推移した。

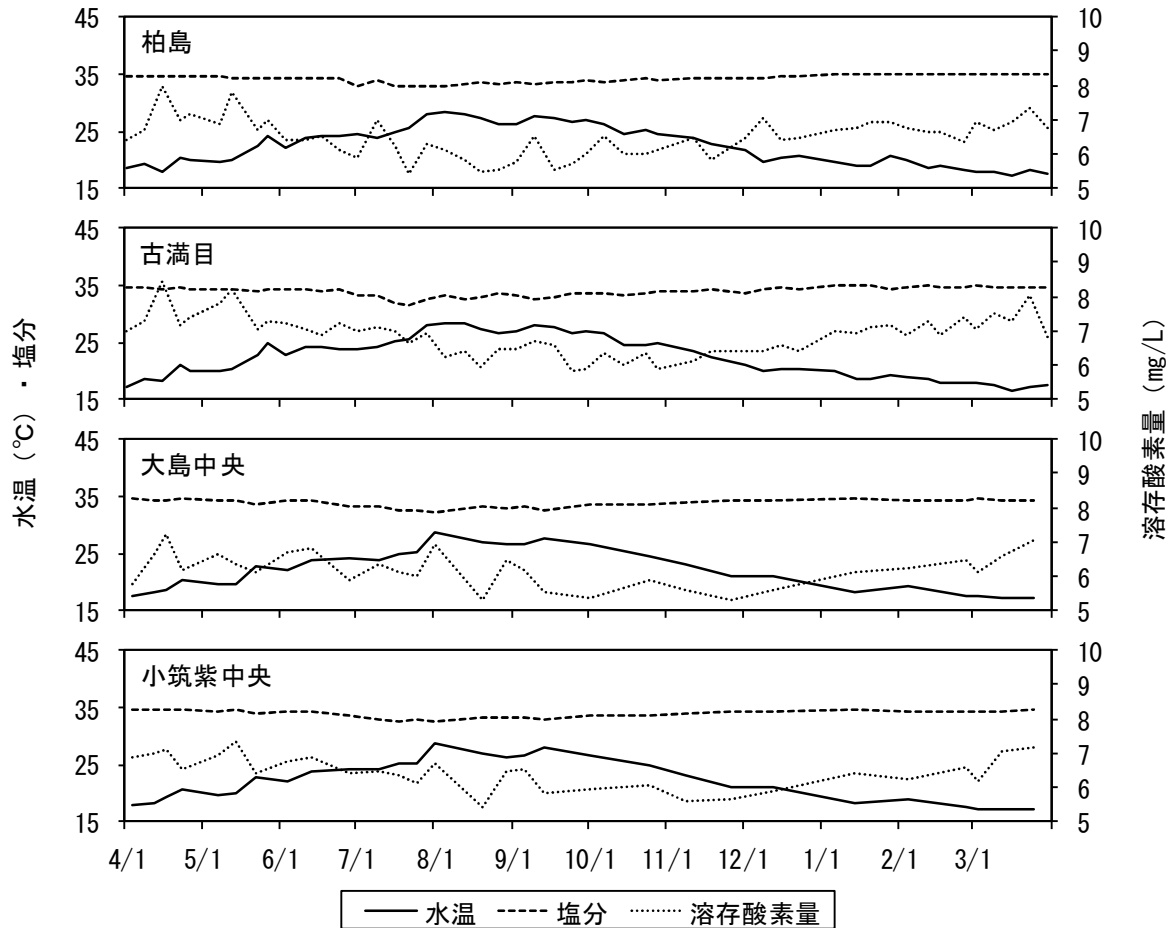


図3 サンプルング時環境（べこ病）

## 2) リアルタイム PCR 分析

### ① 予備試験結果

べこ病に感染したマダイ稚魚 5 尾から抽出したサンプルを分析したところ、全てで陽性反応が得られた。したがって、採水地点周辺海域に出現する *Microsporidium* 属は、使用しているプライマー及びプローブで検出可能であることが確認された。

### ② 分析結果

柏島で採取した 71 サンプル（DNeasy Plant Mini Kit を用いた抽出 51 サンプル、Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit を用いた抽出 20 サンプル）、古満目で採取した 51 サンプル、大島中央で採取した 29 サンプル、小筑紫中央で採取した 29 サンプル、合計 180 サンプルの分析を行ったが、*Microsporidium* 属は検出されなかった。

## (2) 有害プランクトン

### 1) サンプリング地点環境 (0-10m 層平均、図 4)

藻津は、水温 16.7-28.2℃、塩分 32.2-34.5、溶存酸素量 5.4-7.9mg/L、クロロフィル a 量 0.3-4.4  $\mu$ g/L の間で推移した。大島中央は、水温 16.8-28.8℃、塩分 32.3-34.5、溶存酸素量 5.3-7.2mg/L、クロロフィル a 量 0.4-2.9  $\mu$ g/L の間で推移した。小筑紫中央は、水温 16.9-28.7℃、塩分 32.5-34.6、溶存酸素量 5.4-7.3mg/L、クロロフィル a 量 0.4-3.5  $\mu$ g/L の間で推移した。栄喜は、水温 17.0-28.0℃、塩分 31.7-34.6、溶存酸素量 5.0-8.1mg/L、クロロフィル a 量 0.5-3.4  $\mu$ g/L の間で推移した。青瀬山は、水温 16.8-27.9℃、塩分 31.2-34.5、溶存酸素量 5.1-8.2mg/L、クロロフィル a 量 0.5-4.1  $\mu$ g/L の間で推移した。弘浦は、水温 16.9-27.8℃、塩分 30.4-34.5、溶存酸素量 5.2-7.8mg/L、クロロフィル a 量 0.3-3.5  $\mu$ g/L の間で推移した。また、各サンプリング地点の調査時の水深は表 1 のとおりであった。

表 1 サンプリング地点の水深

地点	水深 (m)		
	平均	( 最小	- 最大 )
藻 津	36.3	( 32.7	- 39.0 )
大島中央	38.4	( 36.2	- 44.0 )
小筑紫中央	49.4	( 44.5	- 53.7 )
栄 喜	11.5	( 9.6	- 12.3 )
青 瀬 山	16.7	( 15.5	- 17.6 )
弘 浦	24.8	( 20.6	- 27.7 )

### 2) リアルタイム PCR 分析

#### ① 予備試験 (検出・定量成績の良い希釈値の決定) 結果 (図 5)

希釈なしは検鏡結果と比較して検出率が低く、PCR 阻害物質の影響を受けている可能性が高いと考えられた。また、1,000 倍希釈も検出率が低く、テンプレート DNA の濃度が低くなり過ぎていていると考えられた。10 倍及び 100 倍希釈の検出率は高く、出現傾向とほぼ一致する定量結果が得られた。10 倍希釈と 100 倍希釈を比較すると、低密度時の検出率が 10 倍希釈の方が高かったことから、分析は 10 倍希釈で行うこととした。

#### ② 分析結果

##### A *Cochlodinium polykrikoides* (図 6)

*Cochlodinium polykrikoides* は前年度 2 月中旬から検出され始め (齋田・谷口 2019)、本年度も 4 月当初から藻津、栄喜、青瀬山及び弘浦で検出された。濃縮検鏡で検出されたのは 4 月中旬以降であり、低密度時の検出にはリアルタイム PCR が有効であった。

藻津及び栄喜では 4 月 17 日から、大島中央、青瀬山及び弘浦では 4 月 23 日から細胞数が急激に増加した。当日の湾内平均水温は、17 日が 18.4℃、23 日が 20.7℃であった。細胞数の増加が見られてから約 3 週間後の 5 月 6 日に藻津で本種による赤潮が発生し、その翌日には青瀬山及び弘浦でも発生した。7 日の湾内平均水温は 19.8℃であった。リアルタイム PCR 分析による各地点の最高細胞数は、小筑紫中央を除く全ての地点で 5 月 7 日に検出され、藻津 (53.8357 cells/mL)、大島中央 (4.9076 cells/mL)、栄喜 (18.1509 cells/mL)、青瀬山 (44.7768 cells/mL)、

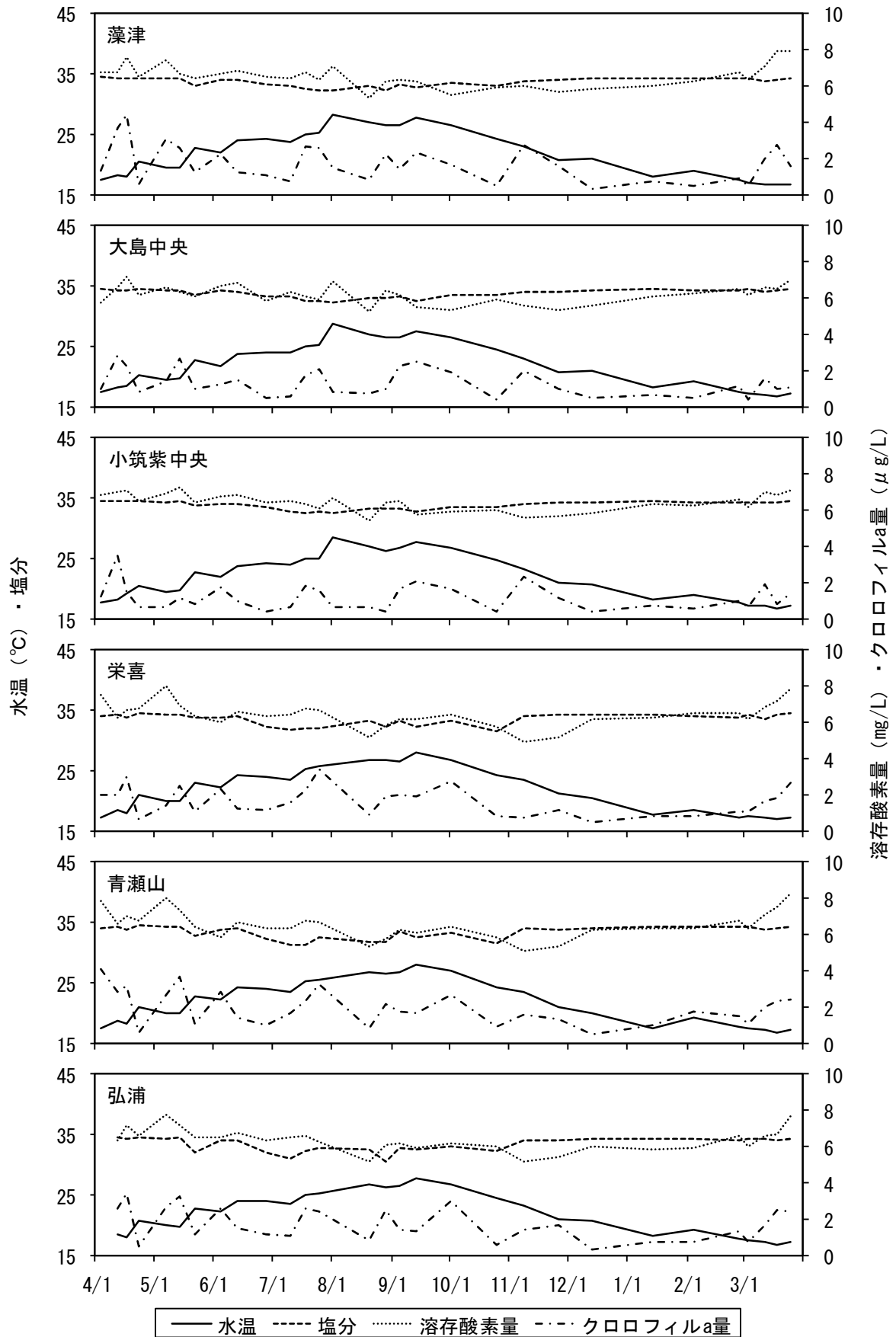


図4 サンプルング時環境 (有害プランクトン)

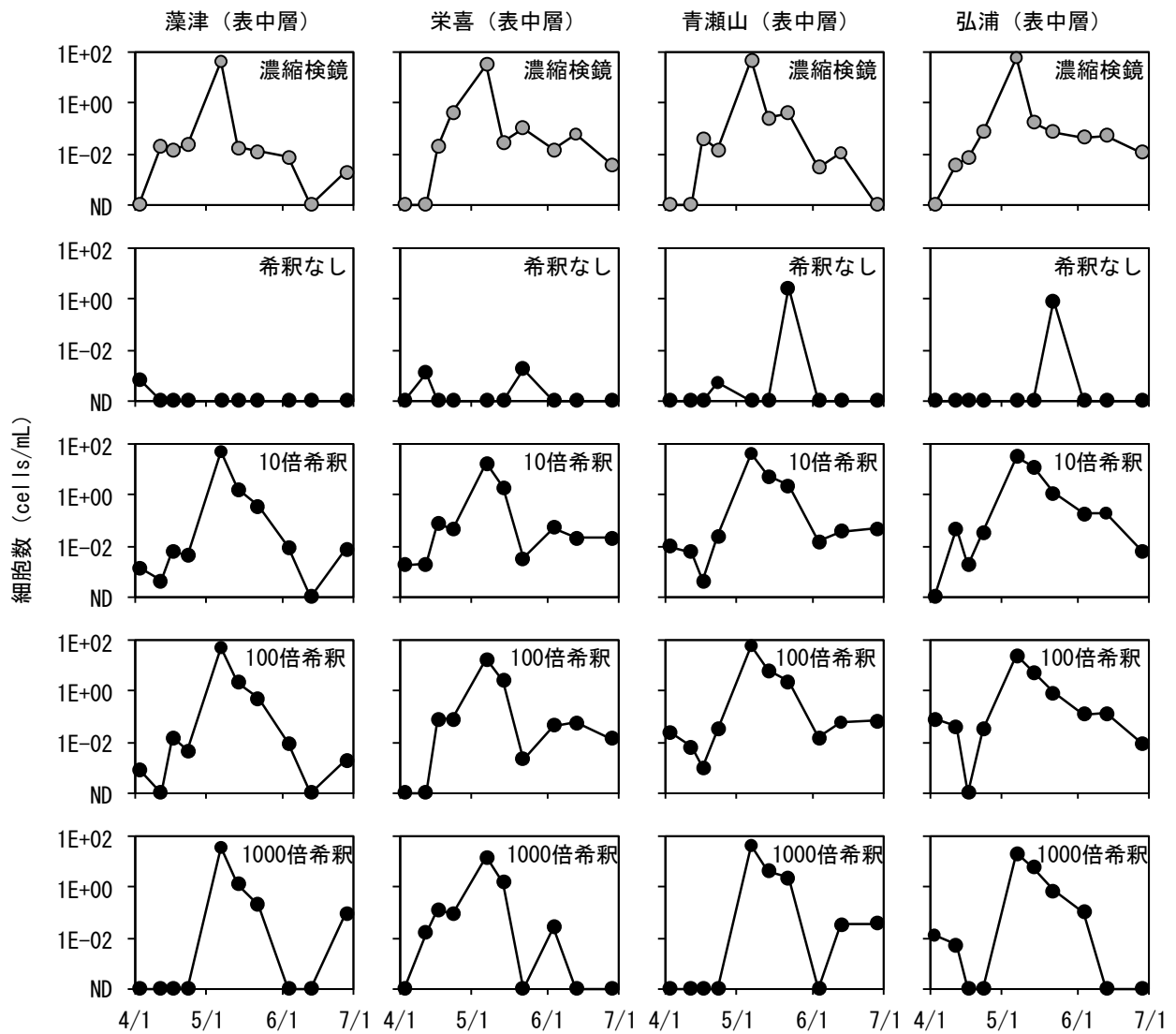


図5 各希釈段階における *Cochlodinium polykrikoides* の検出

弘浦 (33.3122cells/mL) であった。小筑紫中央は5月22日の0.5193cell/mLが最高であった。5月7日をピークに細胞数は減少に転じ、6月から9月にかけては全ての地点で1cell/mL未満で推移、10月以降はほぼ検出されなくなった。

これまで、宿毛湾の *C. polykrikoides* 赤潮に関しては、湾奥南東部（栄喜、青瀬山及び弘浦）が初期発生源になっている可能性が高いと考えられてきたが（鈴木ら 2012-2015）、本試験においても同様の結果となった。また、これらの地点に加えて、藻津も初期発生源となっている可能性が示唆されたが、藻津に近い愛媛県御荘湾では、前年度1月下旬から *C. polykrikoides* 赤潮が発生しており、2月中旬頃からは湾外にも拡散していた（愛南町水域情報ポータル）。したがって、これらが潮流等によって流れてきて検出されていた可能性も考えられるため、今後もモニタリングを継続し、検証する必要がある。

*Cochlodinium polykrikoides* は前年度2月中旬から検出され始め（齋田・谷口 2019）、4月中旬から急激に増加、5月に赤潮となったが、本年度2、3月は全く検出されなかった。*Karenia mikimotoi* に関して、冬季の細胞数とそれに続く夏季の赤潮発生との間に関連性が示唆されていることから（宮川ら 2018）、来年度、宿毛湾で *C. polykrikoides* 赤潮が発生しなければ同様

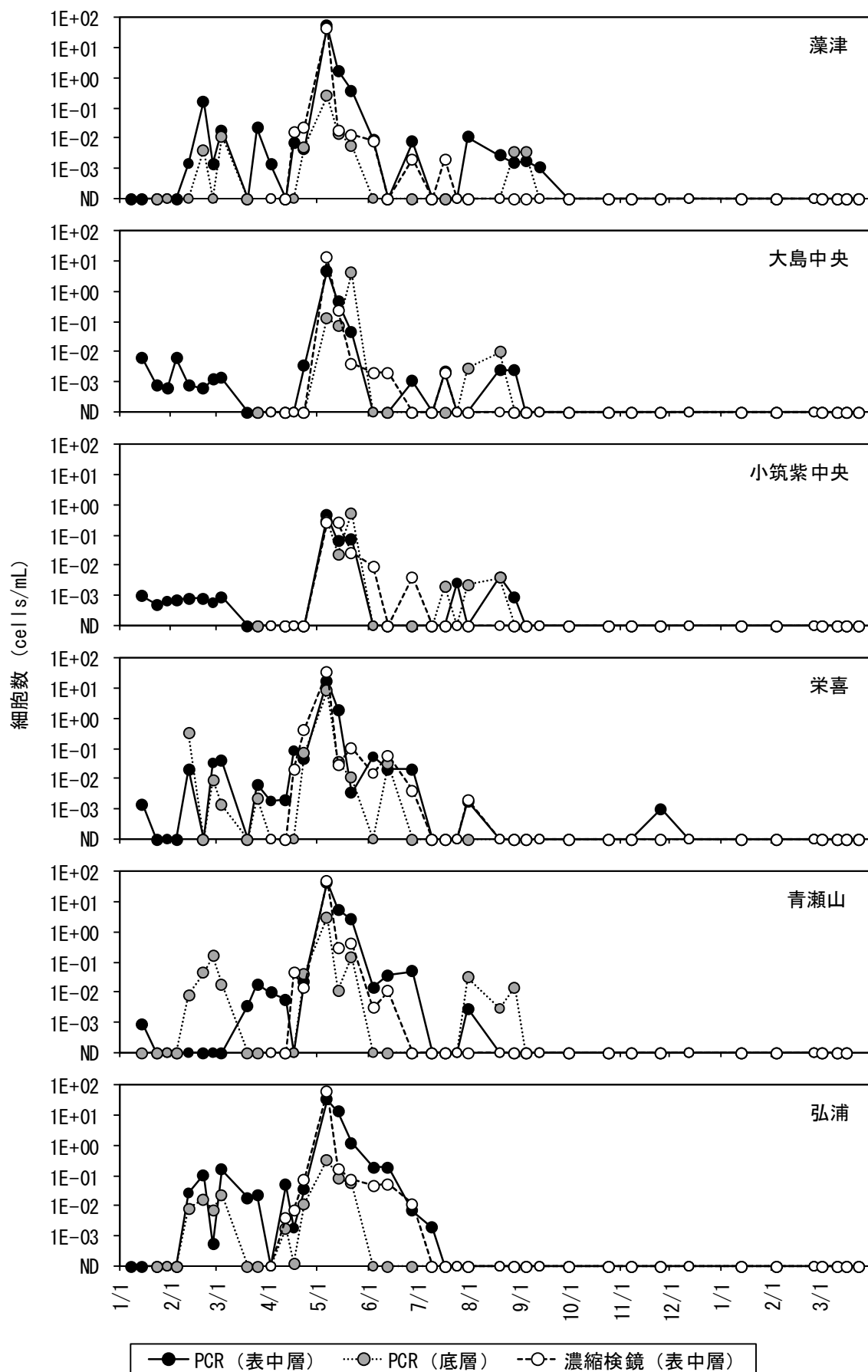


図6 *Cochlodinium polykrikoides* 分析結果 (1-3月のデータは齋田・谷口 2019より)



の関連性が存在し、予察を行ううえでの材料となる可能性がある。また、宿毛湾では *C. polykrikoides* 赤潮対策として入来モンモリの散布を行っているが、現在はある程度細胞数が増加してから散布している。しかし、リアルタイム PCR を用いたモニタリングでは赤潮発生前にその予兆を捉えられたことから、増殖の初期段階で散布することで赤潮発生を未然に防止できる可能性も考えられた。

### B *Chattonella* 属 (図 7)

*Chattonella* 属は 4 月 23 日に栄喜で検出され、その後、5 月 22 日に藻津、6 月にはすべての地点で検出された。*Chattonella* 属のシストは水温 20°C から活発に発芽すると報告されており (今井 1990)、宿毛湾では 4 月 17 日から 23 日にかけて水温が約 3°C 上昇して 20°C を超えたことから、このタイミングで発芽が始まったと考えられた。検鏡で検出され始めたのは 5 月下旬以降であったことから、低密度時の検出にはリアルタイム PCR が有効と考えられた。

*Chattonella* 属は 4 月 23 日から 10 月 25 日にかけて 1cell/mL 未満の低密度で推移し、11 月 8 日以降検出されなくなった。検出され始めた時期は栄喜が早く、検出された頻度及び細胞数は藻津が高かった。また、各地点の最高細胞数は、7 月 25 日及び 8 月 1 日に検出され、藻津 (0.1361cell/mL)、大島中央 (0.0534cell/mL)、小筑紫中央 (0.0294cell/mL)、栄喜 (0.0238cell/mL)、青瀬山 (0.0724cell/mL)、弘浦 (0.0800cell/mL) であった。

### C *Karenia mikimotoi* (図 8)

*Karenia mikimotoi* は年間を通して 0.1cell/mL 未満の低密度で推移し、9 月 5 日には全ての地点で検出された。年間を通して低密度であったことから検鏡ではほとんど検出されず、リアルタイム PCR が有効であった。

### 3) まとめ

リアルタイム PCR を用いた有害プランクトンの検出は、低密度時の動態を把握するのに非常に有効であった。赤潮被害の軽減・防止を図るため、今後もモニタリングを継続してデータを蓄積し、赤潮発生シナリオの構築及び赤潮予察技術の開発に努めたい。

## 4 謝辞

本研究を行うにあたり、すくも湾漁業協同組合、株式会社山崎技研及び高知県宿毛漁業指導所の皆様に多大なるご協力をいただいた。記して、感謝の意を表します。

## 5 引用文献

愛南町水域情報ポータル (<http://www.ainan-gyoshoku.jp/ainanict/portal/index.aspx>)

今井一郎 (1990) 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella* のシストに関する生理生態学的研究. 南西水研報, 23, 63-166.

宮川博妃・茅野昌大・和西昭仁・馬場俊典・俵積田貴彦・恵崎 撰・井口大輝, 大竹周作・岩野英樹・木村聡一郎・菅沼倫美・山田英俊・久米 洋・村田憲一・黒田麻美・東谷福太郎・吉江直樹・郭 新宇・清水園子・武岡英隆・松原孝博・鬼塚 剛 (2018) 魚介類の斃死原因となる有害赤潮等分布拡大防止のための発生モニタリングと発生シナリオの構築 ②瀬戸内

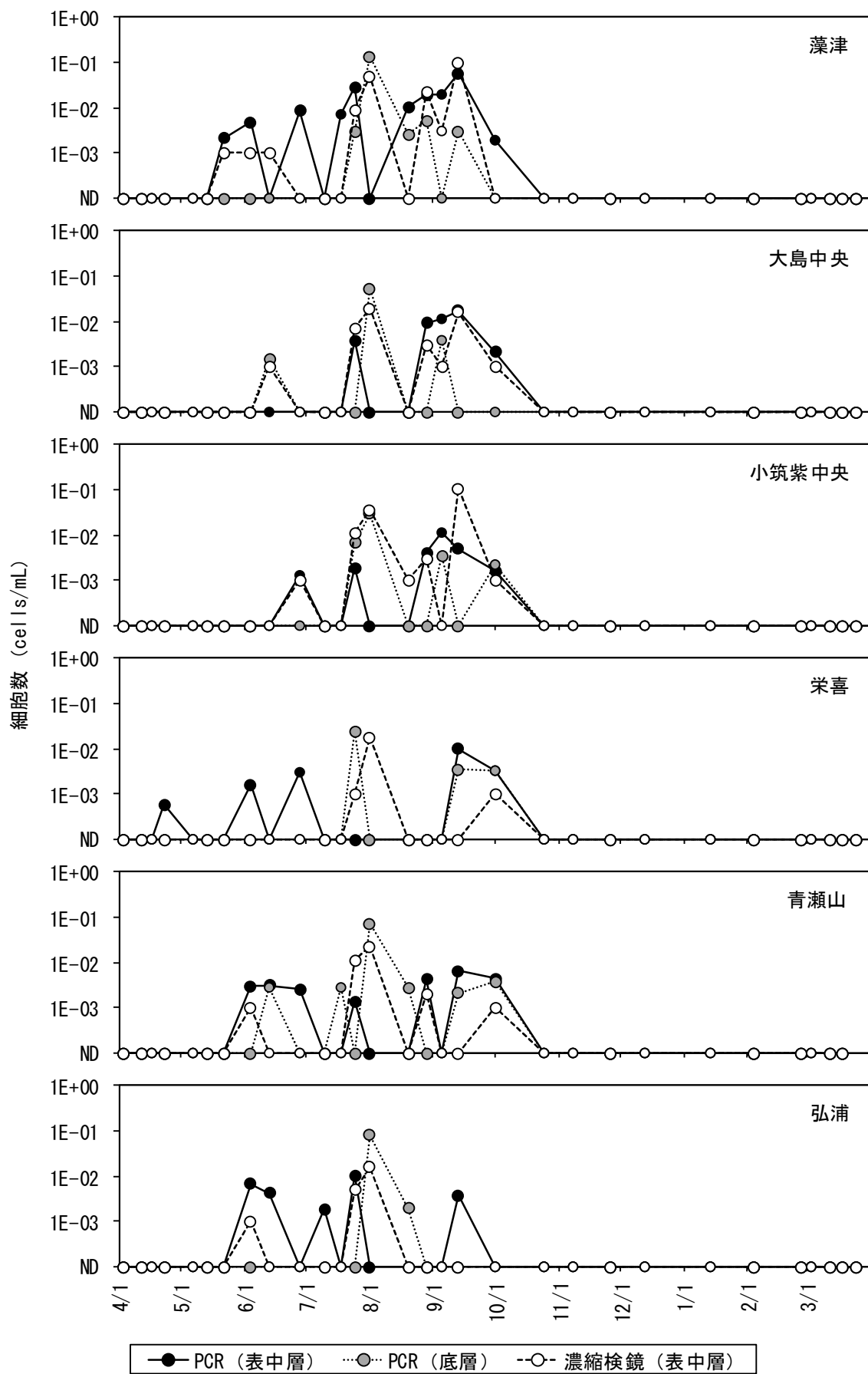


図7 *Chattonella*属分析結果

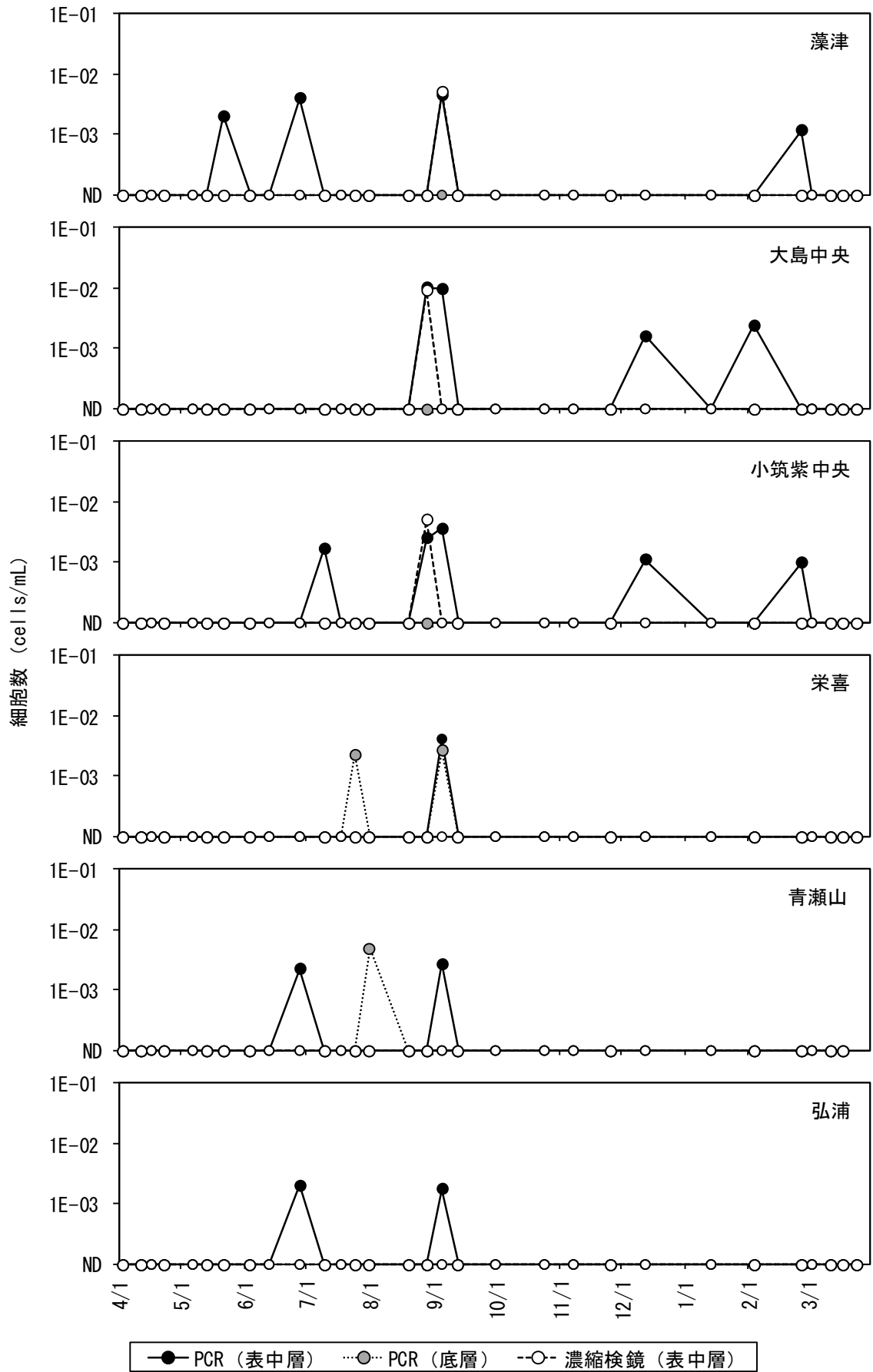


図8 *Karenia mikimotoi* 分析結果

- 海西部・豊後水道海域.「平成 29 年度赤潮・貧酸素水塊対策推進事業 瀬戸内海等での有害赤潮発生機構解明と予察・被害防止等技術開発 報告書」(瀬戸内海赤潮共同研究機関編)水産庁, 東京, 39-97.
- 農林水産省 (2019) 平成 30 年海面漁業生産統計調査. ([https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen\\_gyosei/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen_gyosei/index.html))
- 農林水産省 (2020) 平成 30 年海面漁業生産統計調査 (市町村別データ). ([https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen\\_gyosei/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen_gyosei/index.html))
- 齋田尚希・谷口越則 (2019) 赤潮の早期検知と海水からの病原体の検出技術の開発. 平成 30 年度高知県水産試験場事業報告書, 116, 69-74.
- 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 (1980-2020) 昭和 54-平成 31 年瀬戸内海の赤潮. (<https://www.jfa.maff.go.jp/setouti/akasio/index.html>)
- 鈴木 怜 (2019) 魚類養殖における寄生虫の新たな防除技術開発・赤潮の早期検知と海水からの病原体の検出技術の開発 (古満目分場). 平成 30 年度高知県水産試験場事業報告書, 116, 121-127.
- 鈴木 怜・杉本昌彦・長岩理央・大山隼人 (2012) 赤潮・貧酸素水塊漁業被害防止対策事業 (概要). 平成 22 年度高知県水産試験場事業報告書, 108, 75-78.
- 鈴木 怜・黒原健朗・長岩理央・大山隼人 (2013) 赤潮・貧酸素水塊漁業被害防止対策事業 (概要). 平成 23 年度高知県水産試験場事業報告書, 109, 71-76.
- 鈴木 怜・渡辺 貢・大山隼人・占部敦史 (2014) 赤潮・貧酸素水塊漁業被害防止対策事業 (概要). 平成 24 年度高知県水産試験場事業報告書, 110, 79-90.
- 鈴木 怜・渡辺 貢・占部敦史 (2015) 赤潮・貧酸素水塊漁業被害防止対策事業 (概要). 平成 25 年度高知県水産試験場事業報告書, 111, 101-111.