

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 山下 慶太郎

1 背景・目的

本県の養殖業はブリ類 9,409 トン（全国第 5 位）、マダイ 5,960 トン（全国第 4 位）、クロマグロ 2,116 トン（全国第 3 位）と全国有数の生産量を誇っている（農林水産省 令和 2 年海面漁業生産統計調査 https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen_gyosei/index.html）。県西部に位置する宿毛湾は県中央部の浦ノ内湾、野見湾と並び主要な養殖漁場であり、ブリ、カンパチ、マダイ、クロマグロ、シマアジ等が養殖されている。

宿毛湾では有害プランクトン等を原因とする赤潮によって、2013 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 1980-2021）。赤潮被害の軽減・予防、早期対策体制の構築等を目的に、リアルタイム PCR を用いた有害プランクトンのモニタリング及び関係機関への広報を行った。

また、西日本の養殖場では微孢子虫 *Microsporidium* 属を原因とするべこ病の発生が近年深刻な問題となっており、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。べこ病発生海域及び感染時期を把握して被害の軽減・予防を図ることを目的に、リアルタイム PCR を用いて海水中に存在する *Microsporidium* 属を検出・定量するための技術開発を行った。

I ベコ病

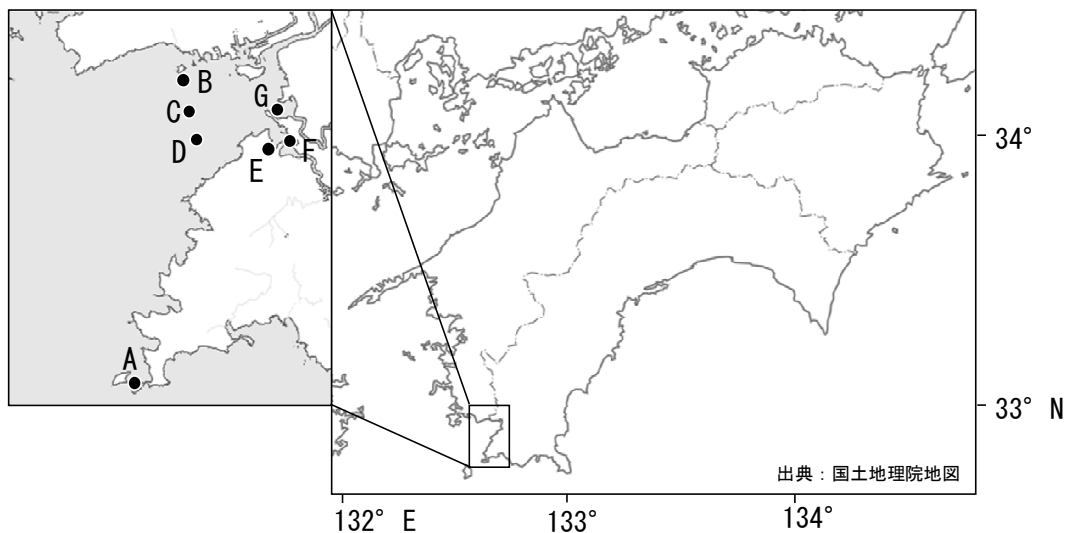
2 方法

(1) 採水

採水は、2021 年 4 月から 5 月は幡多郡大月町柏島地先（図 1 A）、2021 年 6 月から 12 月は宿毛湾内の弘浦（図 1 H）で行った。

内径 30mm、長さ 12m のホースを用いて、0-10m 層の海水を柱状採水した。

サンプリング時にはハンディー水質計（YSI Pro2030, ザイレムジャパン）を用いて、採水層の水温、塩分及び溶存酸素量を測定した。



・ベコ病	A: 柏島	G: 弘浦	
・有害プランクトン	B: 藻津	C: 大島中央	D: 小筑紫中央
	E: 栄喜	F: 青瀬山	G: 弘浦

図 1 サンプリング地点

(2) 分析

採取した海水 2 L を孔径 10 μ m、5 μ m、0.45 μ m のメンブレンフィルター (Omnipore JCWP04700, JMWP04700, JHWP04700, メルク) を用いて連続吸引ろ過した。

フィルターからの DNA 抽出は、抽出バッファーを入れた 2.0 mL マイクロチューブ又は付属のチューブ内でフィルターを細断し、ジルコニアボール及びボルテックスミキサー (VORTEX3, IKA) を用いた破碎処理 (20 分)、プロテイナーゼ K (キアゲン) を用いたタンパク質分解処理 (56°C、1 時間) を行った後、Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit (ザイモリサーチ) を用い、添付マニュアルに従って行った。

Microsporidium 属の検出・定量は、国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所 養殖部門 病理部 (旧増養殖研究所) が開発した方法で行った。リアルタイム PCR は CFX96 Touch リアルタイム PCR 分析システム (バイオ・ラッド ラボシリーズ)、マスターミックスは Probe qPCR Mix (タカラバイオ) を使用した。

3 結果

(1) サンプル地点環境

1) 柏島 (2021 年 4-5 月)

調査期間中、水温は 18.5-21.9°C、塩分は 34.6-34.9、溶存酸素量は 7.12-7.89 mg/L の間で推移した (図 2)。

2) 弘浦 (2021 年 6-12 月)

調査期間中、水温は 19.2-28.1°C、塩分は 29.9-34.2、溶存酸素量は 5.24-6.93 mg/L の間で推移した (図 3)。

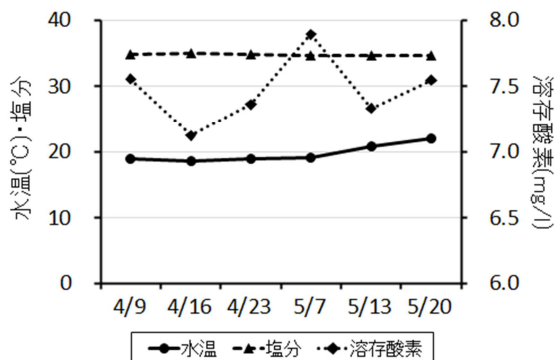


図 2 柏島の水温・塩分・溶存酸素

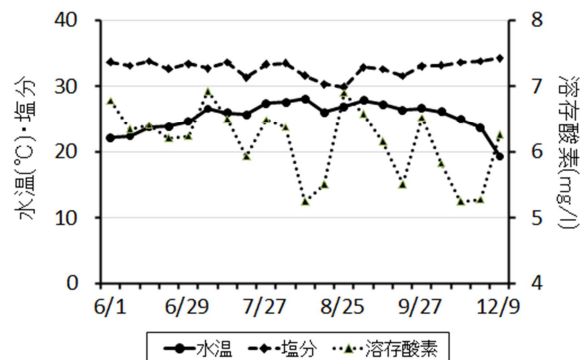


図 3 弘浦の水温・塩分・溶存酸素

(2) リアルタイム PCR 分析結果

採取・抽出したサンプルを 10 倍希釈で分析したが、全サンプルで *Microsporidium* 属は検出されなかった。

(3) まとめ

前年度と同様、本年度も海水中から *Microsporidium* 属を検出することはできなかった。今後もサンプリング及び分析手法を見直し、海水中の *Microsporidium* 属の検出・定量技術の開発に努めたい。

II 有害プランクトン

2 方法

(1) サンプリング

2021 年 4 月から 2022 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、図 1C-H) で行い、表中層 (0-10m 層柱状、内径 30mm、長さ 12m 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) を用いた 1-10m 層の水温、塩分、溶存酸素量及びクロロフィル a 量の測定及びポータブル測深機 (HONDEX PS-7, 本多電子) を用いた測深も行った。

(2) 分析

採取した海水は孔径 $5.0\mu\text{m}$ のメンブレンフィルター (Omnipore JMWP04700) で吸引ろ過した。ろ過量は、表中層サンプルは 5L を上限にろ過できる限界量 (1.3-5L)、底層サンプルは 1.3L とした。また、表中層サンプルに関しては 0.5L 濃縮検鏡も行い、有害種を計数した。

フィルターからの DNA 抽出は、抽出バッファーを入れた 2.0mL マイクロチューブ内でフィルターを細断し、ジルコニアボール及びボルテックスミキサーを用いた破碎処理 (4分) を行った後、DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン) を用いて、添付マニュアルに従って行った。

有害プランクトンの検出・定量は、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。分析対象は *Cochlodinium polykrikoides* (以下「*C. polykrikoides*」)、*Chattonella* 属及び *Karenia mikimotoi* (以下「*K. mikimotoi*」) の 3 種、検出限界値はスタンダードサンプルの最小値とした。リアルタイム PCR は CFX96 Touch リアルタイム PCR 解析システム、マスターミックスは SsoAdvanced Universal Probes Supermix を使用した。

3 結果

(1) サンプル地点環境 (0-10m 層平均)

1) 水温 (図 4)

期間中 (2021 年 4 月-2022 年 3 月) の水温 (月平均) は、過去 2 年と同様に 4-8 月に上昇し、9-2 月に低下した。過去 2 年と比較して、7 月及び 11 月が $1-3^{\circ}\text{C}$ 高く、2 月が $2-4^{\circ}\text{C}$ 低かった。日別の最低水温は 2 月 24 日の青瀬山の 14.0°C 、最高水温は 8 月 11 日の藻津の 28.2°C であった。

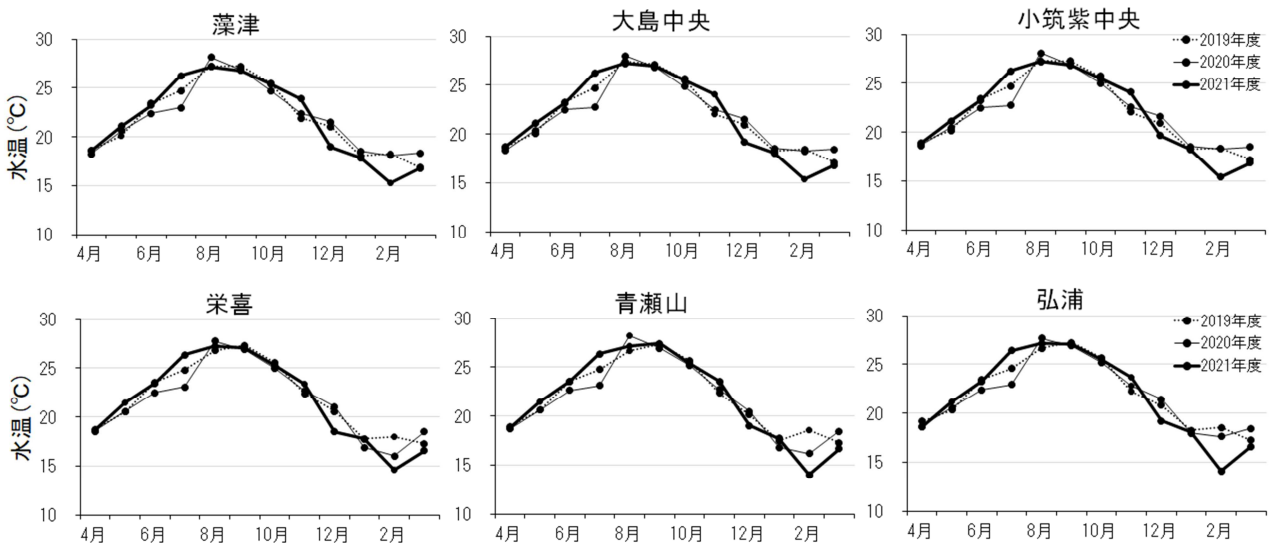


図 4 2019-21 年度の各定点の水温

2) 塩分 (図 5)

期間中の塩分 (月平均) は、降水量が増える春-夏季に低下し、降水量が減る冬季に上昇した。前年度 (2020 年度) は全定点で 7 月に大きく低下し、湾奥部 (栄喜・青瀬山・弘浦) では 9 月も低下したが、本年度は概ね 8 月に大きく低下した。

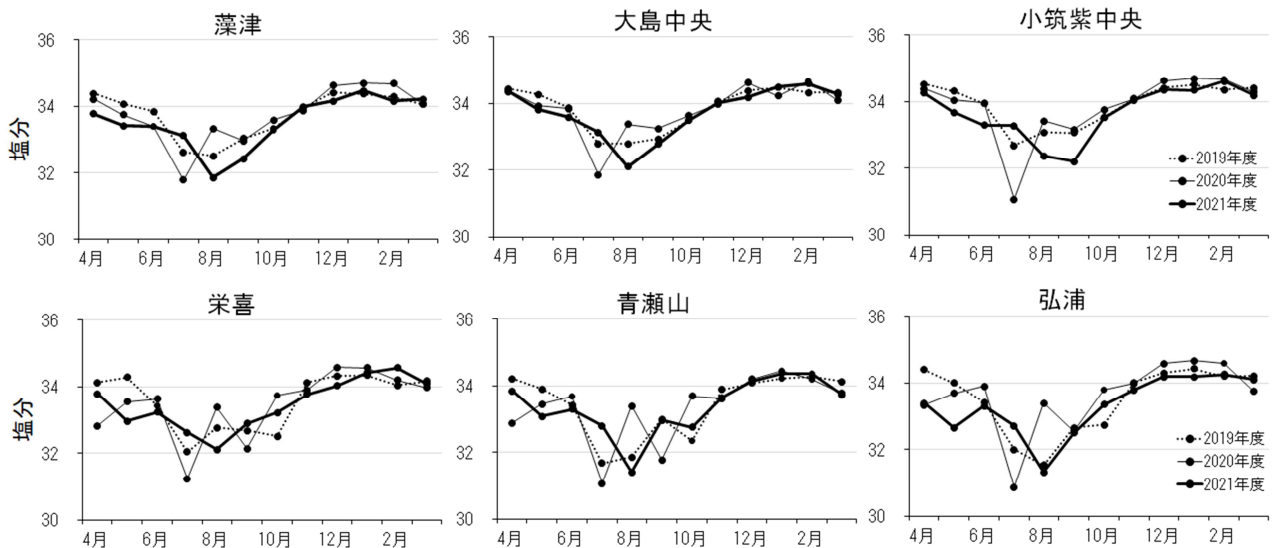


図5 2019-21年度の各定点の塩分濃度

3) 溶存酸素 (図6)

期間中の溶存酸素(月平均)は、過去2年と同様、春-秋季に低下し、秋-冬季に上昇した。前年度(2020年度)は11月に大島中央で5.0mg/l以下まで低下したが、本年度は顕著な低下は見られなかった。

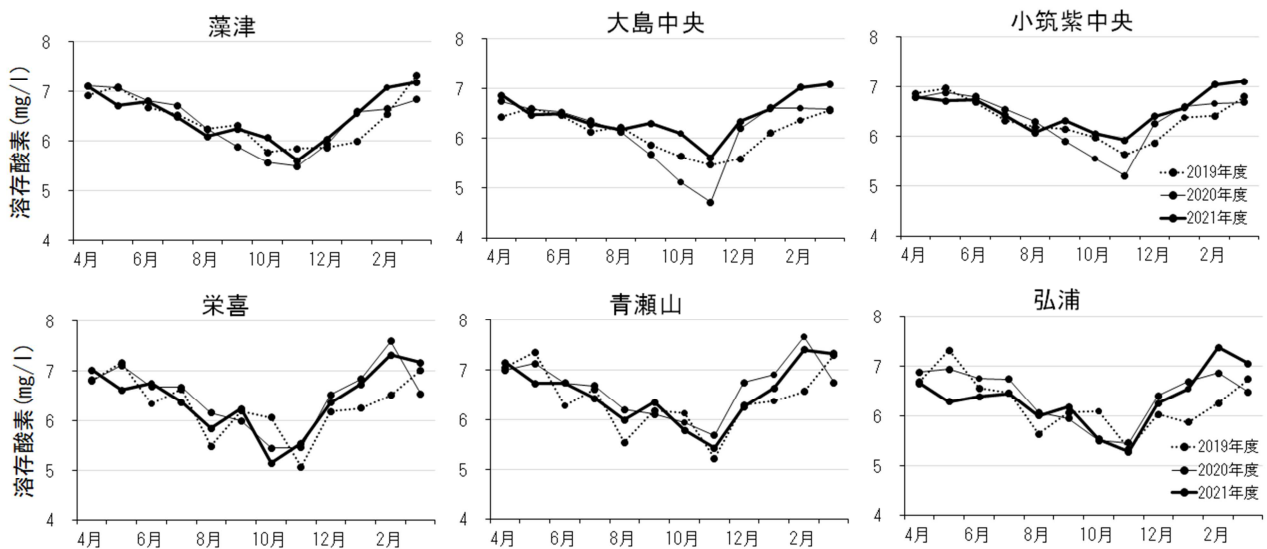


図6 2019-21年度の各定点の溶存酸素

4) 水深 (表1)

調査地点の各水深は表1のとおりであった。

表1 サンプルング地点水深

地点	水深 (m)			
	平均	最小	—	最大
藻津	36.1	34.9	—	37.8
大島中央	34.2	28.7	—	38.0
小筑紫中央	48.9	47.8	—	50.0
栄喜	11.7	11.0	—	12.9
青瀬山	16.0	15.3	—	17.0
弘浦	24.9	23.6	—	25.7

(2) リアルタイム PCR 分析結果

1) *C. polykrikoides* (図 7)

本年度初めて *C. polykrikoides* が検出されたのは 4 月 6 日で、6 点中 4 点で検出された。その後、0.001cells/mL 以下で推移したが、5 月下旬から上昇し、6 月 16 日に弘浦で最高細胞数 0.1389cells/mL まで増加した。細胞数の増加を受けて、すくも湾漁業協同組合は 6 月 17 日に弘浦定点付近で赤潮防除剤（入来モンモリ）を散布した。

その後、細胞数は低下し、7 月上旬には全定点で 0.001cells/mL 以下まで減少した。7 月後半から 10 月にかけては細胞数の増加が数回見られたが、概ね 0.01cells/mL 以下の低密度であった。2 月以降、湾奥部の栄喜及び青瀬山で再び上昇傾向を示し、3 月 2 日に 0.05cells/mL まで増加した。

なお、本種による赤潮は前年に引き続き確認されなかった。

2) *Chattonella* 属 (図 8)

本年度初めて *Chattonella* 属が検出されたのは 4 月 6 日の藻津及び栄喜で、その後、5 月下旬までは 0.001cells/mL 以下で推移した。6 月から 10 月にかけて頻繁に検出されたが、総じて 0.1cell/mL 未満の低密度であった。

3) *K. mikimotoi* (図 9)

K. mikimotoi は主に 1-4 月と 9-10 月に検出されたが、総じて 0.01cell/mL 未満の低密度であった。

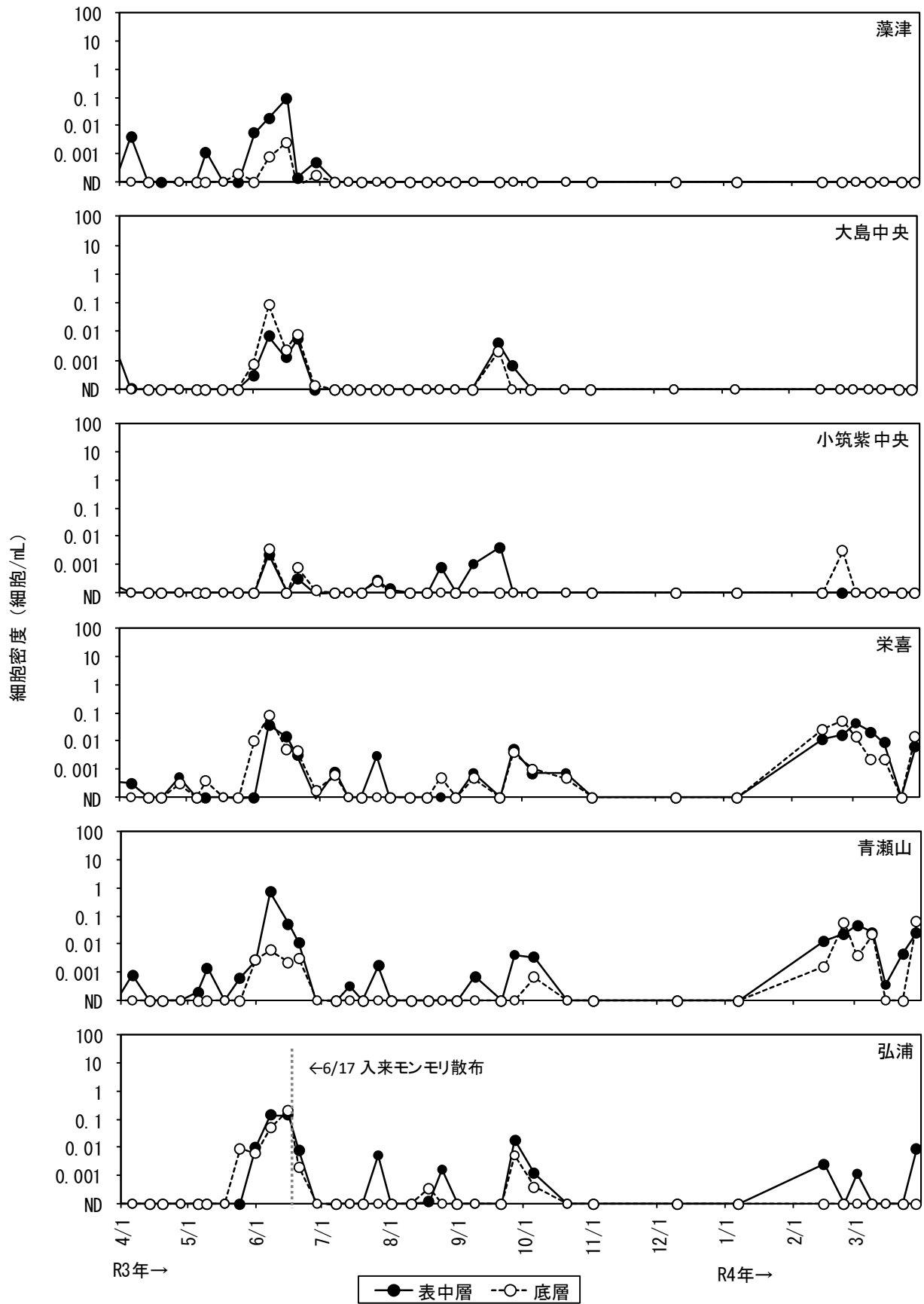


図7 *C. polykrikoides* の細胞密度の推移

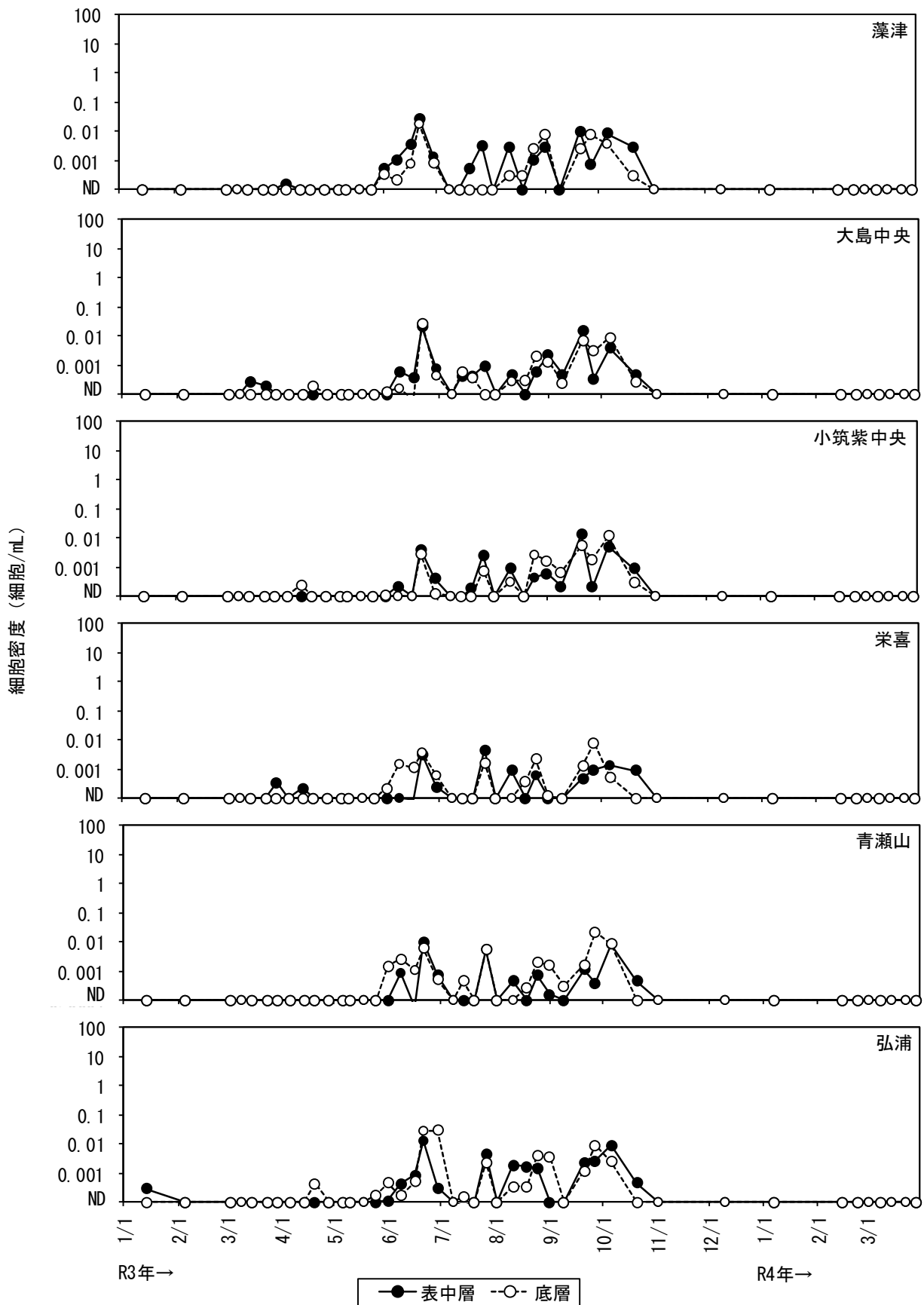


図8 *Chattonella*属の細胞密度の推移

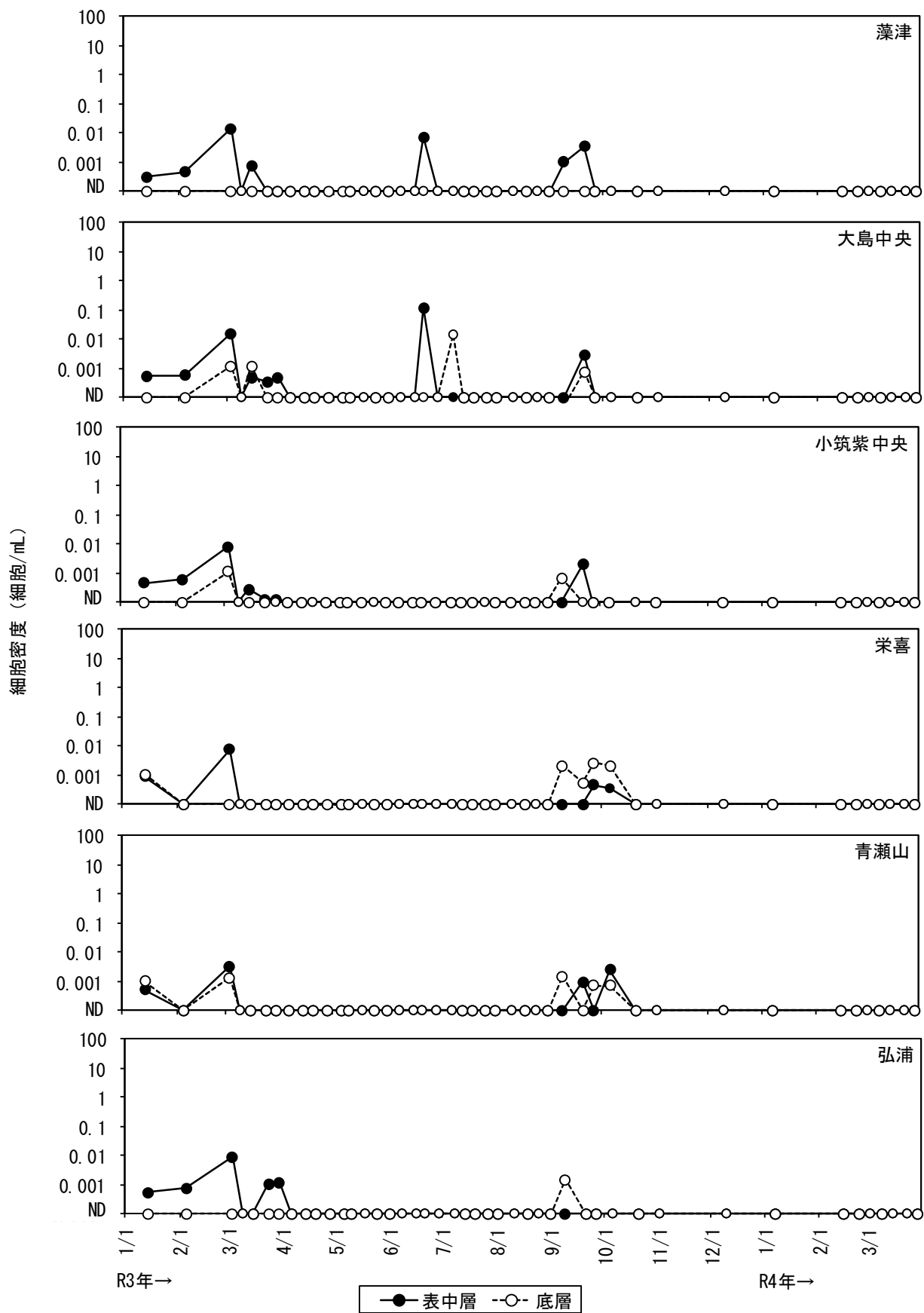


図9 *K. mikimotoi* の細胞密度の推移

4 考察

過去に宿毛湾で漁業被害をもたらした *C. polykrikoides* を原因とする赤潮は前年に引き続き発生しなかった。宿毛湾における本種による赤潮の発生時期に関しては、3月中旬から4月中旬の水温との関連性が示唆されており（鈴木ら 2015）、この時期の水温が高いと、発生が早く、低いと遅くなる傾向がある。柏島の定地水温データによると（図 10）、前年（2020年）3-4月の水温は平年（2011-2020年の10か年平均）より低めで推移し、細胞数がピークに達したのは5月下旬から6月上旬で2019年より1か月程遅かった（鈴木 2021）。2021年は概ね平年より高めで推移したことから、早期の赤潮発生が懸念されたが、細胞数のピークを迎えたのは前年より遅い6月中旬だった。

春以降の赤潮発生は同年2-3月の細胞密度との関連も示唆されている（鈴木 2021）。図 11 に2019-2021年1-8月のリアルタイムPCR分析による *C. polykrikoides* 細胞密度の推移を示した。2019年は2-3月に値が検出され、5月に急激に上昇し赤潮が発生した。2020年は2-3月に検出されず、5月以降に上昇したものの赤潮形成には至らなかった。2021年は3月上旬に検出されたため赤潮発生が懸念されたが、細胞密度はピーク時でも前年を下回り赤潮は発生しなかった。冬季細胞数と赤潮発生との関連を明らかにするため、1-2月の調査回数を増やし細胞数の動向をより詳細に把握する必要がある。

細胞密度の上昇を受けて、すくも湾漁業協同組合が2021年6月17日に、弘浦定点付近で赤潮防除剤（入来モンモリ）を散布した。宿毛湾では2014年以降、主に5-6月の細胞密度上昇時に赤潮防除剤を散布している（北峰 2017）。散布前後には細胞密度の低下が確認され、一定の効果が確認されている（北峰 2017・北峰 2018）。2021年も同様に、赤潮防除剤散布後に細胞密度は低下し、その後、本種による赤潮は発生しなかった。宿毛湾での赤潮防除剤の散布は、本種による赤潮の発生防止に有効であると考えられる。ただし、散布しなかった海域でも細胞数は減少したことから、赤潮防除剤以外の細胞数増減に影響を与える要因を解明することも今後の課題である。

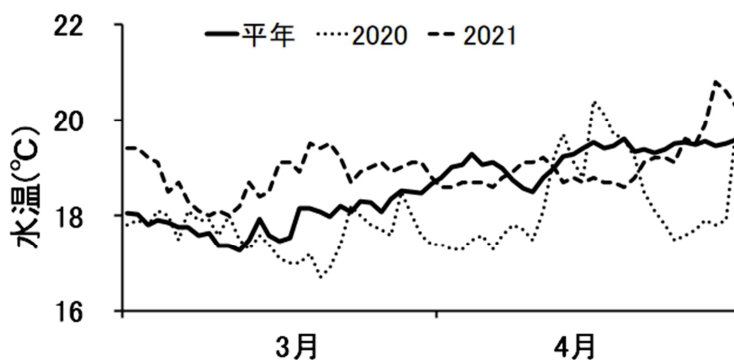


図 10 3-4月の柏島定地水温

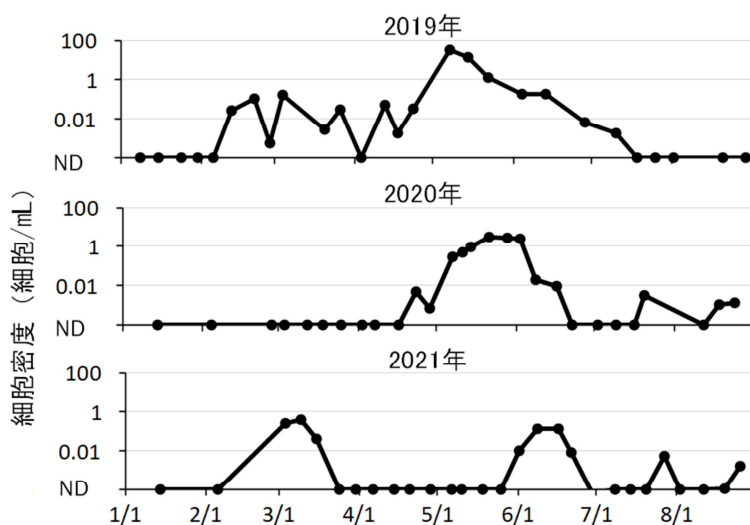


図 11 2019-21年1-8月の *C. polykrikoides* 細胞密度

5 謝辞

本研究を行うにあたり、すくも湾漁業協同組合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。

6 引用文献

北峯 知沙 (2017) 養殖管理指導. 平成 28 年度高知県水産業改良普及事業報告書, 39-46.

北峯 知沙 (2018) 養殖管理指導. 平成 29 年度高知県水産業改良普及事業報告書, 25-31.

鈴木 怜 (2021) 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). 令和 2 年度高知県水産試験場事業報告書, 118, 122-133.

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, 101-111.