

魚類養殖における寄生虫の新たな防除技術の開発 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

I ベこ病

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（農林水産省 2019）、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 2020）。

近年、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。

本事業では、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目指した。

2 方法

(1) サンプルング

2020 年 4 月から 2021 年 3 月にかけて、幡多郡大月町柏島地先で行った（図 1 A）。

4 月から 7 月は、午前 9 時と午後 3 時に採水器（リゴ- B 号透明採水器、離合社）を用いて 0-10m 層の海水を 1m 層ずつ採水した。8 月から 3 月は、午前 9 時に内径 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。

サンプル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の測定も行った。

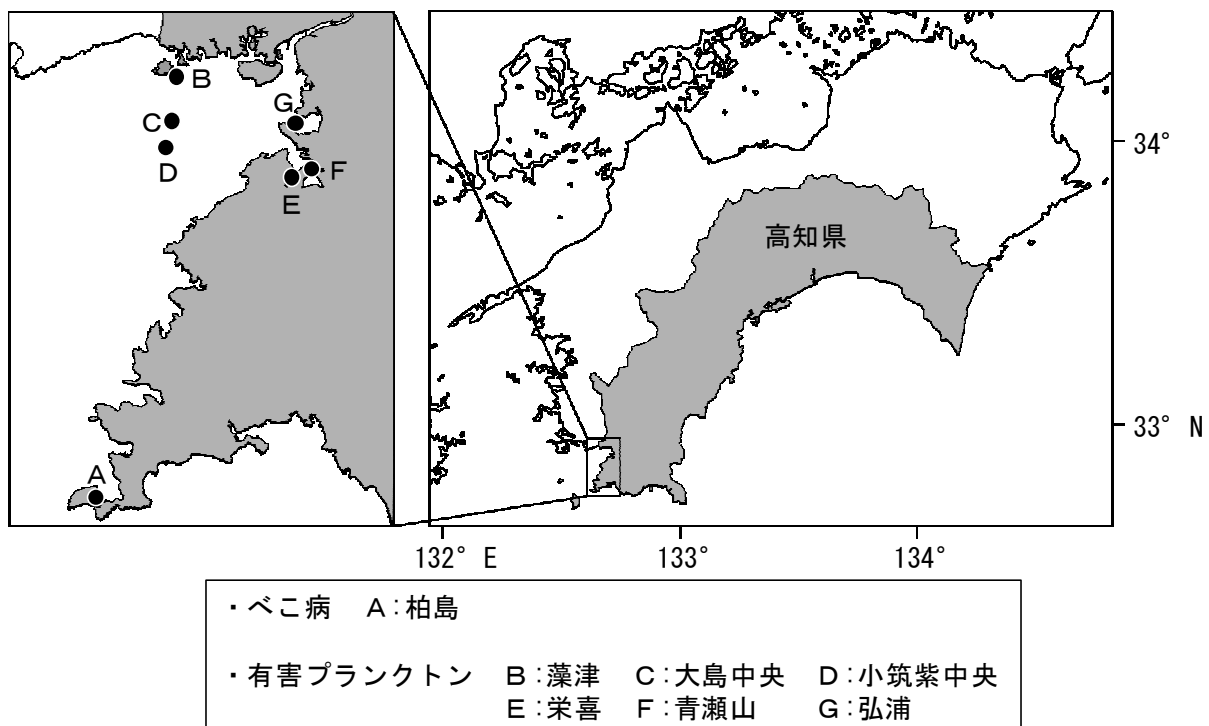


図 1 サンプルング地点

(2) 分析

1) 4月から7月

採取した海水から、①0-5m層の海水を等量ずつ混合、②6-10m層の海水を等量ずつ混合及び③0-10m層の海水を等量ずつ混合の3種類のサンプルを作成し、それぞれを孔径0.45 μ mのメンブレンフィルター (Omnipore JHWP04700, メルク) で吸引ろ過した。また、6月29日以降のサンプルに関しては、分析に悪影響を及ぼす可能性がある懸濁物質の除去を目的に、目合い45 μ mのナイロンメッシュフィルターで前ろ過を行い、その後、孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターで吸引ろ過した。ろ過量は4Lを上限にろ過できる限界量とした(表1)。

表1 海水のろ過量及び使用したDNA抽出キット

| 採水時刻 | サンプル | 採水層 (m) | ろ過量 (L) | 抽出キット |
|------|------|---------|---------|-----------------------------------|
| 午前9時 | ① | 0-5 | 1.8-4.0 | DNeasy Plant Mini Kit |
| | ② | 6-10 | 2.0-4.0 | DNeasy Plant Mini Kit |
| | ③ | 0-10 | 2.0-4.0 | Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit |
| 午後3時 | ① | 0-5 | 1.5-4.0 | DNeasy Plant Mini Kit |
| | ② | 6-10 | 1.6-3.6 | DNeasy Plant Mini Kit |
| | ③ | 0-10 | 1.6-3.3 | Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit |

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 $^{\circ}$ C、一晚) を行った。その後、サンプル①、②に関してはDNeasy Plant Mini Kit (キアゲン)、サンプル③に関してはQuick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit (ザイモリサーチ) を用いて、添付マニュアルに従って行った(表1)。

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解析システム (バイオ・ラッド ラボラトリーズ)、マスターミックスはSsoAdvanced Universal Probes Supermix (バイオ・ラッド ラボラトリーズ) を使用した。

2) 8月から3月

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

フィルターからのDNA抽出は、後述の試料中に含まれるPCR阻害物質の確認結果をふまえQuick-DNA Plant/Seed Miniprep Kitのみを使用した。

Microsporidium 属の検出・定量は前述の方法で行い、マスターミックスのみSsoAdvanced Universal Probes Supermixに加えProbe qPCR Mix (タカラバイオ) も使用した。

3) 試料中に含まれるPCR阻害物質の確認

高原ら (2016) を参考に、採取・抽出した試料におけるPCR阻害の影響を確認した。4月から7月に採取し、リアルタイムPCR分析の結果、*Microsporidium* 属が検出されなかった試料9 μ Lに(表2)、既知濃度の*Microsporidium* 属DNA試料1 μ Lを添加して分析を行い、回収率を求めた。*Microsporidium* 属の検出・定量は前述の方法で行った。

3 結果と考察

(1) サンプリング地点環境

期間中、水温は17.2-29.5 $^{\circ}$ C、塩分は33.6-34.9、溶存酸素量は5.52-7.72mg/Lの間で推移した(図2)。

(2) リアルタイムPCR分析結果

1) 4月から7月

採取・抽出した96サンプルを希釈なし及び10倍希釈の2段階で分析したが、*Microsporidium* 属は検出されなかった。

表2 PCR阻害物質確認試験に供した試料

| | 採水日 | 採水層 (m) | 希釈 | 抽出キット |
|---|-------|---------|-----|-----------------------------------|
| A | 4月6日 | 0-5 | なし | DNeasy Plant Mini Kit |
| B | 4月6日 | 6-10 | なし | DNeasy Plant Mini Kit |
| C | 5月13日 | 0-5 | なし | DNeasy Plant Mini Kit |
| D | 5月13日 | 6-10 | なし | DNeasy Plant Mini Kit |
| E | 6月1日 | 0-5 | なし | DNeasy Plant Mini Kit |
| F | 6月1日 | 6-10 | なし | DNeasy Plant Mini Kit |
| G | 7月7日 | 0-5 | なし | DNeasy Plant Mini Kit |
| H | 7月7日 | 6-10 | なし | DNeasy Plant Mini Kit |
| I | 4月6日 | 0-10 | なし | Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit |
| J | 5月13日 | 0-10 | なし | Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit |
| K | 6月1日 | 0-10 | なし | Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit |
| L | 7月7日 | 0-10 | なし | Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit |
| M | 4月6日 | 0-5 | 10倍 | DNeasy Plant Mini Kit |
| N | 4月6日 | 6-10 | 10倍 | DNeasy Plant Mini Kit |
| O | 5月13日 | 0-5 | 10倍 | DNeasy Plant Mini Kit |
| P | 5月13日 | 6-10 | 10倍 | DNeasy Plant Mini Kit |
| Q | 6月1日 | 0-5 | 10倍 | DNeasy Plant Mini Kit |
| R | 6月1日 | 6-10 | 10倍 | DNeasy Plant Mini Kit |
| S | 7月7日 | 0-5 | 10倍 | DNeasy Plant Mini Kit |
| T | 7月7日 | 6-10 | 10倍 | DNeasy Plant Mini Kit |
| U | 4月6日 | 0-10 | 10倍 | Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit |
| V | 5月13日 | 0-10 | 10倍 | Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit |
| W | 6月1日 | 0-10 | 10倍 | Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit |
| X | 7月7日 | 0-10 | 10倍 | Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit |

*採水時刻は午前9時

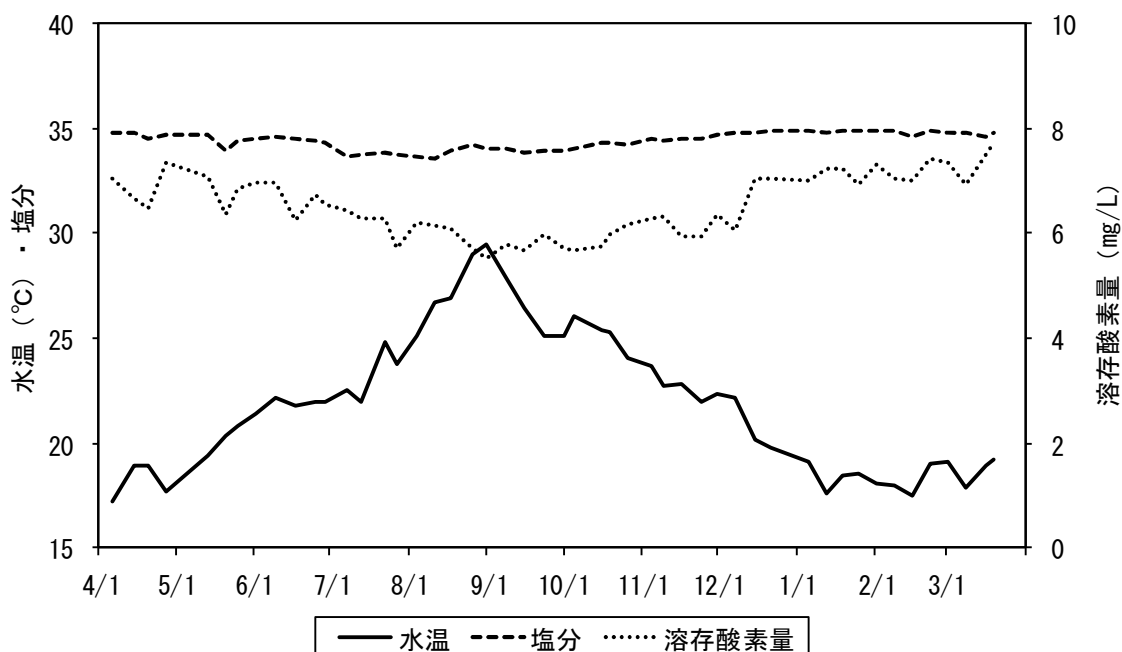


図2 サンプリング地点環境

2) 8月から3月

採取・抽出した96サンプルを10倍希釈、2連で分析したが、*Microsporidium*属は検出されなかった。

3) 試料中に含まれるPCR阻害物質の確認

希釈をしなかった場合、DNeasy Plant Mini Kitを用いて抽出した試料の回収率は0% (図3)

A-H)、Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit を用いて抽出した試料の回収率は 0-31.6% (図 3 I-J) であり、共に強い PCR 阻害の影響が見られた。

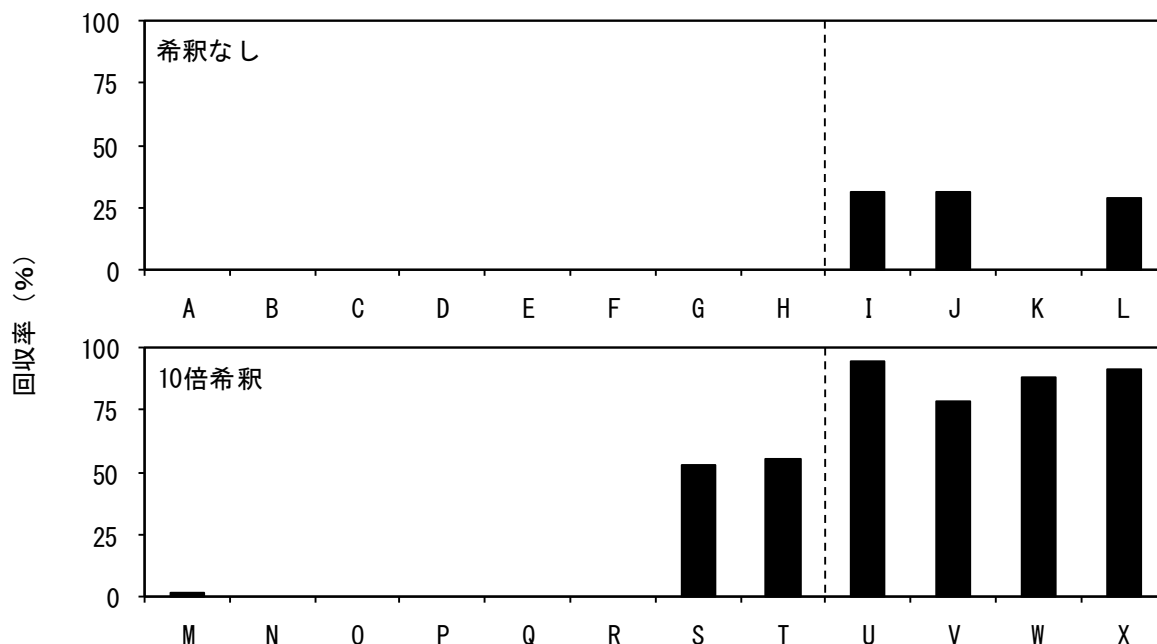


図 3 PCR 阻害物質の確認結果

10 倍希釈を行った場合、DNeasy Plant Mini Kit を用いて抽出した試料の回収率は 0-55.2% であり (図 3 M-T)、ナイロンメッシュフィルターを用いた前処理で改善が見られたものの (図 3 S-T)、依然として PCR 阻害の影響が見られた。Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit で抽出した試料に関しては回収率 78.7-94.9% となり、PCR 阻害の影響は小さかった (図 3 U-X)。

(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ながらモニタリングを継続し、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

1 背景・目的

近年、宿毛湾では有害プランクトン等による赤潮が頻発しており、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, 図 4)。

本事業では、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。

2 方法

(1) サンプリング

2020 年 4 月から 2021 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 1 B-G) で行き、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

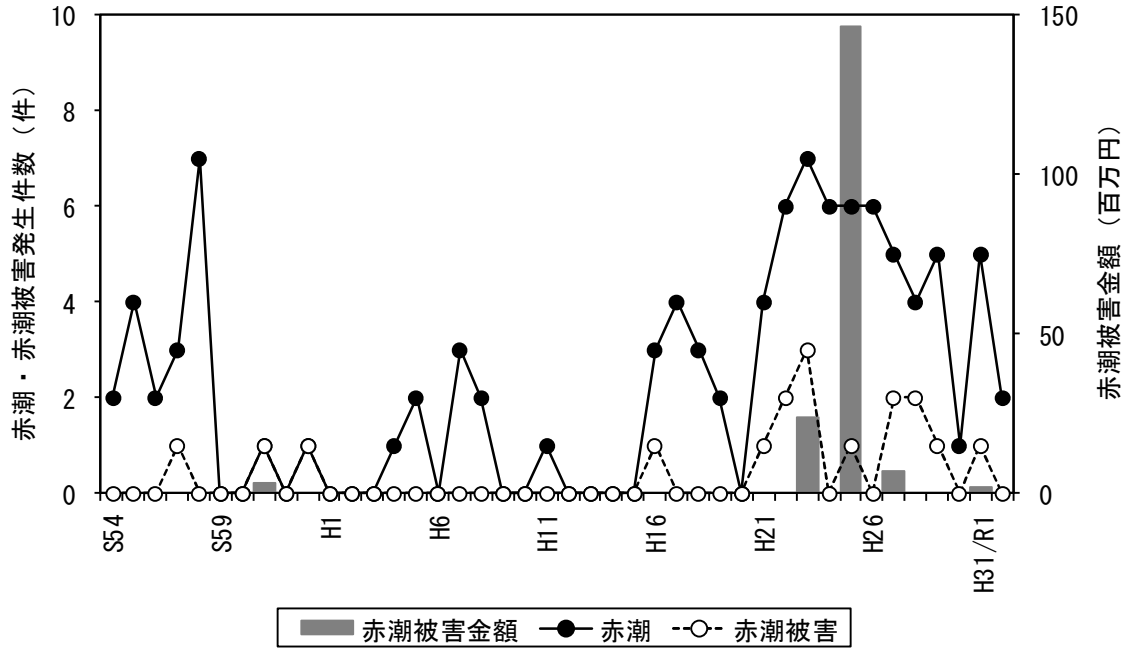


図4 宿毛湾（高知県海域）における赤潮・赤潮被害発生件数及び赤潮被害金額

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、溶存酸素量並びにクロロフィル a 量の測定、及びポータブル測深機（HONDEX PS-7, 本多電子）を用いた測深を行った。

(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 0.5-1L 濃縮検鏡も行い、有害種を計数した。

フィルターからの DNA 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 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*、*Chattonella* 属及び *Karenia 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 結果と考察

(1) サンプルング地点環境（0-10m 層平均）

期間中、水温は $16.0-29.7^{\circ}\text{C}$ 、塩分は $29.7-34.7$ 、溶存酸素量は $4.37-8.00\text{mg/L}$ 、クロロフィル a 量は $0.22-3.79 \mu\text{g/L}$ の間で推移した。各地点の詳細については図 5 に示した。また、調査時の各地点の水深は表 2 のとおりであった。

(2) リアルタイム PCR 分析結果

1) *Cochlodinium polykrikoides* (図 6)

リアルタイム PCR 分析と濃縮検鏡を比較すると、低密度時はリアルタイム PCR 分析の方が高感度で検出され、ある程度細胞数が増加してくるとほぼ一致する結果となった。

本年度（2020 年度）初めて *Cochlodinium polykrikoides* が検出されたのは、4 月 2 日の栄喜であった。その後、4 月 23 日には青瀬山及び弘浦、4 月 28 日には藻津及び大島中央でも検出され、5 月 7 日には湾全域で検出された。前年度（2019 年度）は前々年度（2018 年度）の 2 月中旬から湾全域で検出されており（鈴木 2020）、本年度の出現は 2、3 か月程度遅かった。リアル

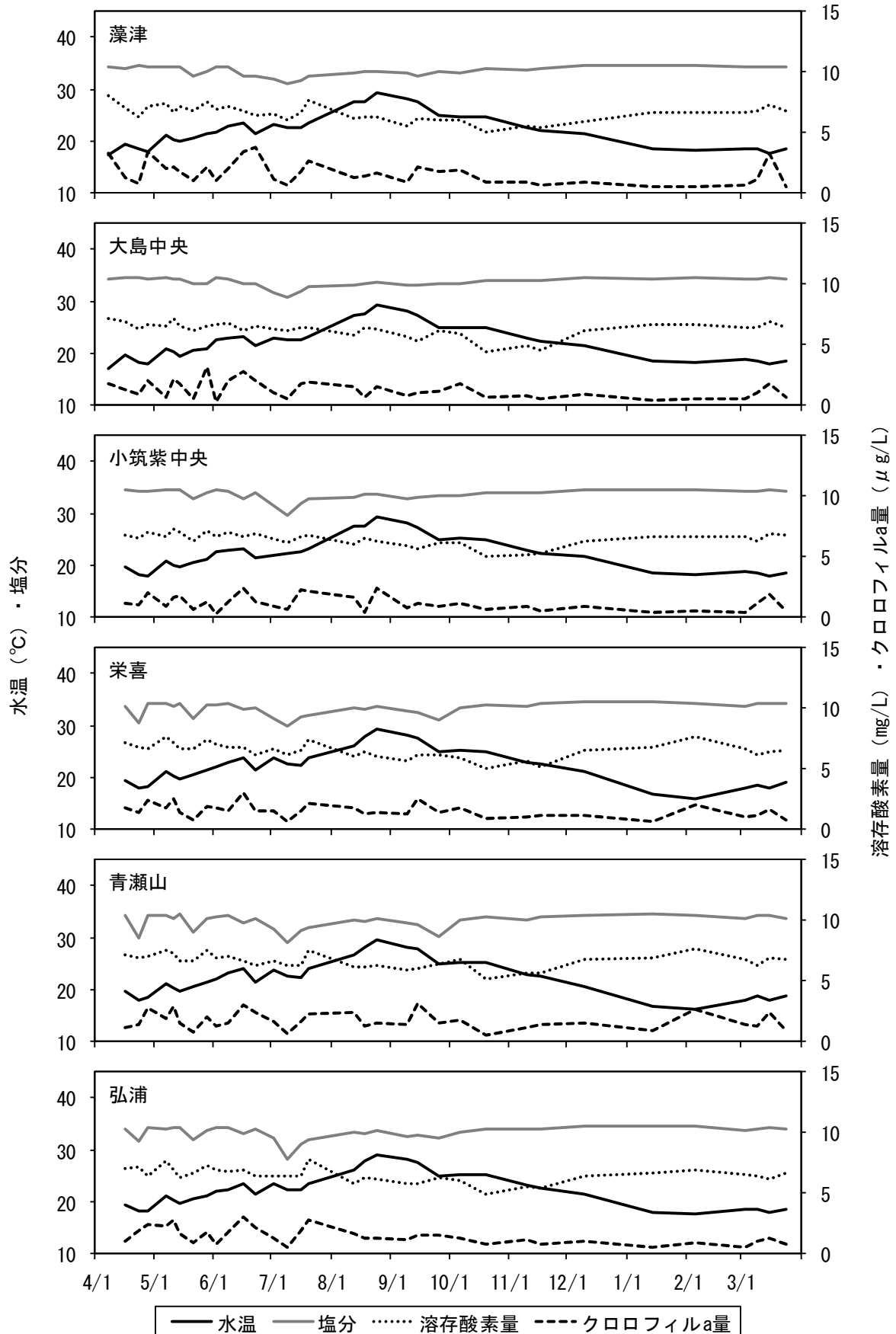


図5 サンプルング地点環境

表2 サンプリング地点の水深

| 地点 | 水深 (m) | | |
|-------|--------|--------|----------|
| | 平均 | (最小 | - 最大) |
| 藻津 | 36.2 | (35.0 | - 37.6) |
| 大島中央 | 38.2 | (36.8 | - 40.9) |
| 小筑紫中央 | 49.1 | (47.9 | - 51.3) |
| 栄喜 | 11.8 | (10.1 | - 13.5) |
| 青瀬山 | 16.2 | (15.1 | - 17.2) |
| 弘浦 | 25.0 | (23.9 | - 26.2) |

タイム PCR 分析による各地点の最高細胞数は 5 月下旬から 6 月上旬に確認され、藻津 (3.2285cells/mL)、大島中央 (2.3696cells/mL)、小筑紫中央 (0.7506cell/mL)、栄喜 (10.3222 cells/mL)、青瀬山 (10.4027cells/mL) 及び弘浦 (3.1248cells/mL) であった。これをピークに細胞数は減少に転じ、6 月中旬から 11 月にかけては 0.1cell/mL 未満で推移、12 月以降は栄喜及び青瀬山を除いて検出されなくなった。3 月に入ると再び増加し始め、3 月 3 日には湾全域で検出された。特に、冬季に検出が続いていた栄喜及び青瀬山における細胞数が高かった。しかし、3 月 9 日から競合種であるケイ藻類が増殖して優占し、*C. polykrikoides* は急激に減少した。

本年度は、4 月下旬から 5 月上旬にかけて *C. polykrikoides* の急激な増殖が見られたものの、前年度とは異なり赤潮形成には至らなかった。冬季の出現状況を見ると、前年度は前述のとおりその前の年度の 2 月時点で湾全域で検出されていたが、本年度は検出されていなかった。*Karenia mikimotoi* に関しては、冬季の遊泳細胞数 (シードポピュレーション) とそれに続く夏季の赤潮規模との間に関連性が指摘されている (宮川ら 2018)。*C. polykrikoides* についても同様の関連性が存在し、本年度はシードポピュレーションが少なかったため赤潮形成に至らなかった可能性が示唆された。また、4 月下旬から 5 月上旬に急激な増殖が見られたことから、5 月 12 日に弘浦で入来モンモリの早期散布を行ったが、散布直後は細胞数の減少が認められたものの (高知県宿毛漁業指導所による調査)、その後の増殖傾向は、散布を行っていない地点と差があまりなかった。

宿毛湾における *C. polykrikoides* 赤潮の発生時期に関しては、3 月中旬から 4 月中旬にかけての水温との関連性が示唆されており、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 (鈴木ら 2015)。前年度、細胞数がピークに達したのは 5 月上旬 (鈴木 2020)、本年度は 5 月下旬から 6 月上旬にかけてであり、本年度の方が 1 か月程度遅かった。3 月中旬から 4 月中旬の水温を見ると (リアルタイム海洋情報収集解析システムホームページ、図 7)、前年度は平年並み、本年度は低めで推移しており、鈴木ら (2015) が報告した傾向と同様の結果であった。

前年度の調査で、湾奥南東部 (栄喜、青瀬山及び弘浦) に加え、藻津も *C. polykrikoides* 赤潮の初期発生源となっている可能性が示唆されたが (鈴木 2020)、本年度も藻津周辺で増殖した *C. polykrikoides* が大島中央及び小筑紫中央に拡散していた。前年度は藻津に近い愛媛県御荘湾で同時期に赤潮が発生していたことから、藻津が初期発生源であるか不明瞭であったが、本年度は周辺海域で赤潮が発生していなかったことから (沿岸海域水質・赤潮観測情報ホームページ)、藻津も初期発生源である可能性が高いと考えられた。また、湾奥南東部が *C. polykrikoides* 赤潮の初期発生源となっている要因の一つとして、本年度の結果から越冬細胞が多く分布していることが影響していると考えられた。

2) *Chattonella* 属 (図 8)

リアルタイム PCR 分析と濃縮検鏡を比較すると、低密度時はリアルタイム PCR 分析の方が高感度で検出され、ある程度細胞数が増加してくるとほぼ一致する結果となった。

本年度初めて *Chattonella* 属が検出されたのは、4 月 2 日の藻津及び小筑紫中央であり、その後、4 月 23 日には湾全体で検出された。*Chattonella* 属のシストは水温 20℃ 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 16 日に約 20℃ に達したことから (図 5)、このタイミングで活発な発芽が開始したと考えられた。

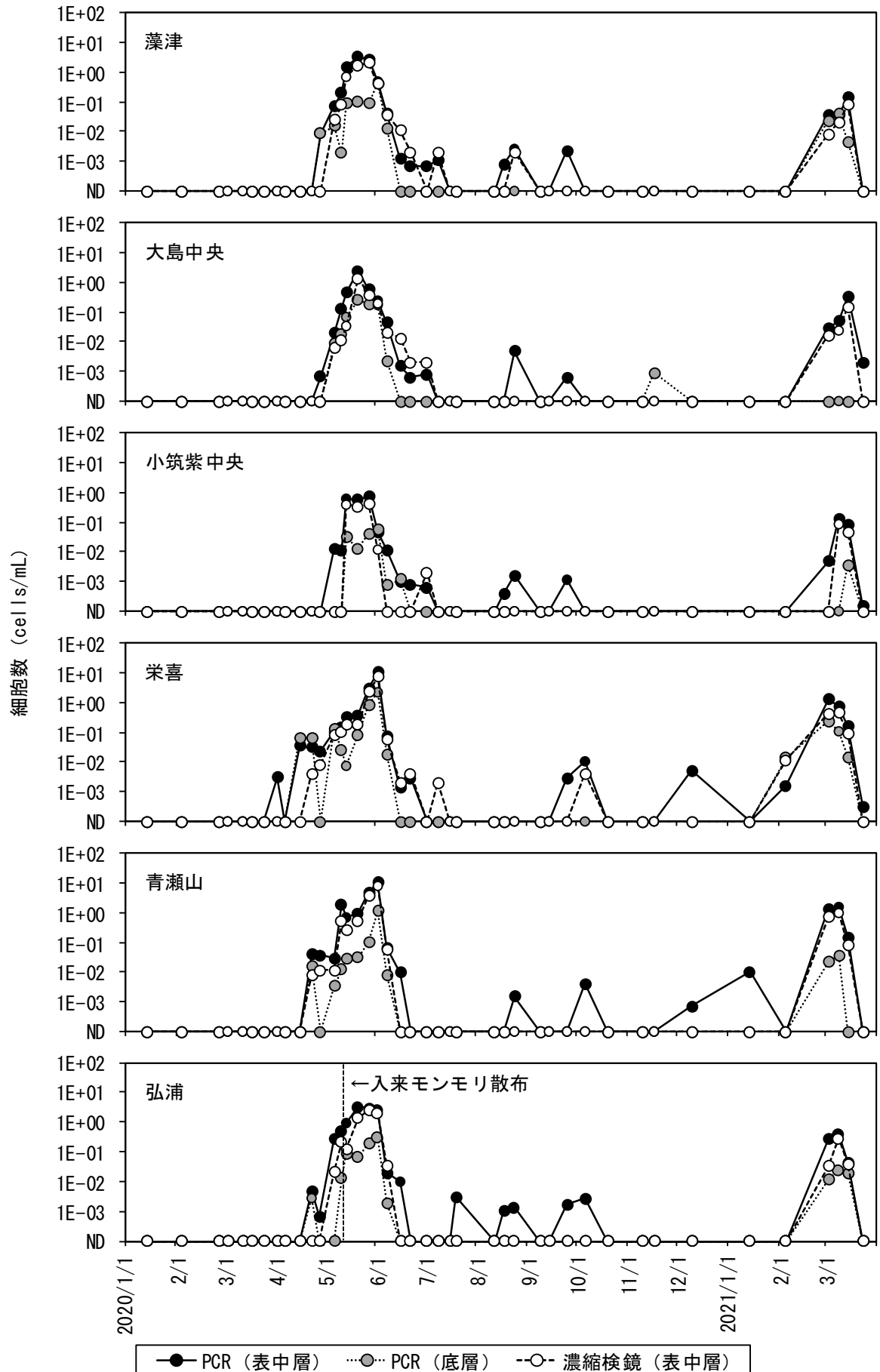


図6 *Cochlodinium polykrikoides* 分析結果 [2020年1-3月のデータは鈴木(2020)より]

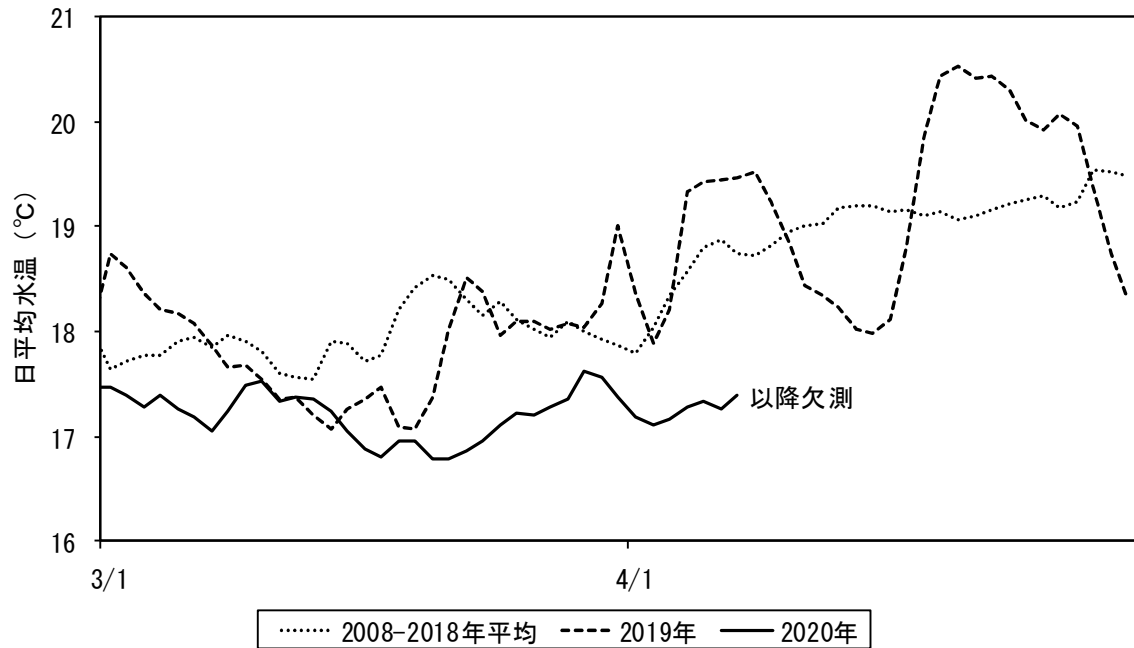


図7 宿毛湾における3-4月の水温変動（5m層）

Chattonella 属は4月から10月にかけて0.1cell/mL未満の低密度で頻りに検出され、11月以降も時折低密度で検出された。*Chattonella* 属は水温15°Cあれば増殖可能であると報告されており（山口ら 1991）、本年の宿毛湾の水温は、最も低い地点でも16°Cを下回ることはなかったことから（図5）、栄養細胞で越冬していた可能性が示唆された。リアルタイムPCR分析による各地点の最高細胞数は5月中旬から6月中旬に確認され、藻津（0.0707cell/mL）、大島中央（0.0175cell/mL）、小筑紫中央（0.0164cell/mL）、栄喜（0.0287cell/mL）、青瀬山（0.0249cell/mL）及び弘浦（0.0386cell/mL）であった。

3) *Karenia mikimotoi* (図9)

リアルタイムPCR分析と濃縮検鏡を比較すると、低密度時はリアルタイムPCR分析の方が高感度で検出され、ある程度細胞数が増加してくるとほぼ一致する結果となった。

本年度、*Karenia mikimotoi* は年間を通して1cell/mL未満の低密度で検出された。リアルタイムPCR分析による各地点の最高細胞数は6月中旬から7月中旬に確認され、藻津（0.1582cell/mL）、大島中央（0.2141cell/mL）、小筑紫中央（0.2454cell/mL）、栄喜（0.1289cell/mL）、青瀬山（0.1400cell/mL）及び弘浦（0.1721cell/mL）であった。*C. polykrikoides* とは異なり、湾口側に位置する大島中央及び小筑紫中央における細胞数が高く、豊後水道から流入している可能性も示唆された。

(3) まとめ

リアルタイムPCRを用いた有害プランクトンのモニタリングは、特に低密度時の動態を把握するのに有効であった。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。

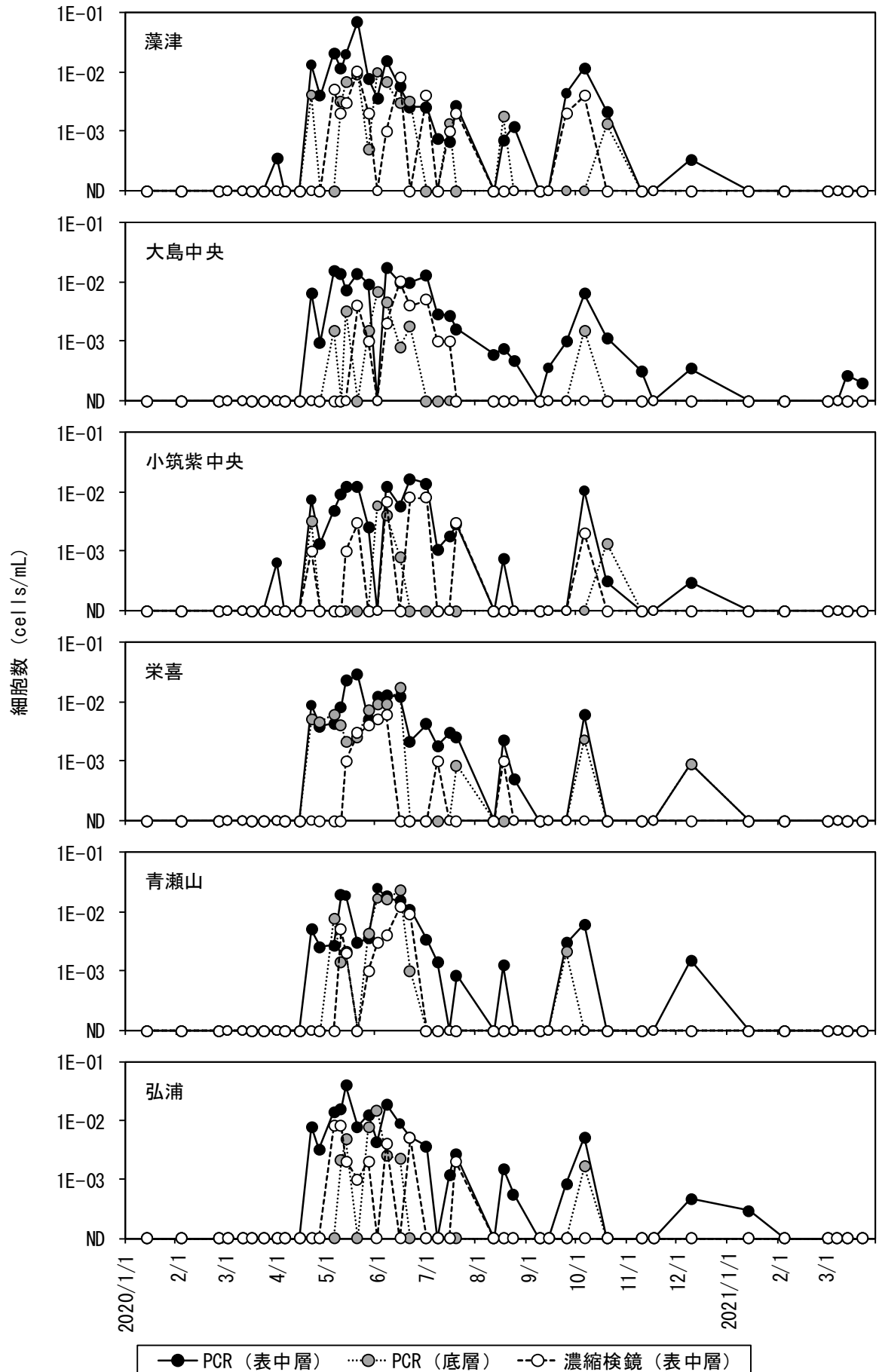


図8 *Chattonella* 属分析結果 [2020年1-3月のデータは鈴木(2020)より]

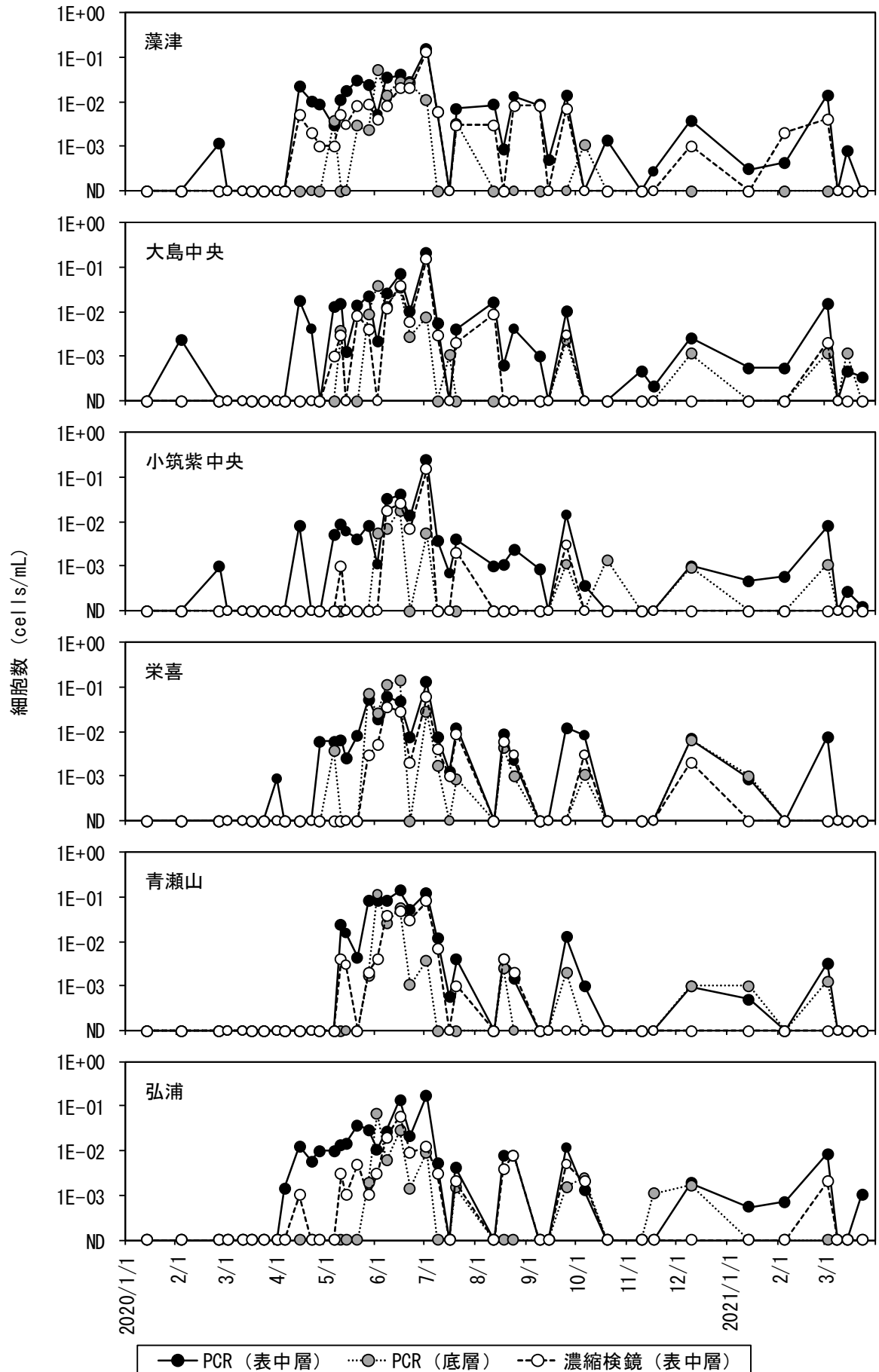


図9 *Karenia mikimotoi* 分析結果 [1-3月のデータは鈴木 (2020) より]

5 引用文献

- 沿岸海域水質・赤潮観測情報ホームページ (<https://akashiwo.jp/>)
- 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)
- 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)
- リアルタイム海洋情報収集解析システムホームページ (<https://buoy.nrifs.affrc.go.jp/>)
- 水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 (1980-2021) 昭和 54-令和 2 年瀬戸内海の赤潮. (<https://www.jfa.maff.go.jp/setouti/akasio/index.html>)
- 鈴木 怜 (2020) 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). 令和元年度高知県水産試験場事業報告書, 117, 124-135.
- 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.
- 高原輝彦・山中裕樹・源 利文・土居秀幸・内井喜美子 (2016) 環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心に～. 日本生態学会誌, 66, 583-599.
- 山口峰生・今井一郎・本城凡夫 (1991) 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* と *C. marina* の増殖速度に及ぼす水温、塩分および光強度の影響. 日本水産学会誌, 57(7), 1277-1284.