

赤潮の早期検知と海水からの病原体の検出技術の開発 I 海水中の遺伝子量調査による赤潮早期検知

増養殖環境課 上村 海斗

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。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。

2 方法

(1) サンプルング及び遺伝子量解析

2017 (H29) 年度に作製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 *K. mikimotoi* とした。サンプルングは、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定点を設けて (図 1、2)、遊泳細胞の採取を目的とした 0-10 m により柱状採水を実施した。柱状採水は、既報 (谷口・齋田 2020) に準じて行った。

得られた海水サンプルのうち、1~2 L 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、比較のため同サンプルを濃縮・検鏡しプランクトン密度を測定した。

調査頻度は、例年の傾向からその年に検鏡で初めて対象プランクトンが確認される時期 (主に 4~8 月) は月に 2~4 回、その他の時期は月 1 回とした。

(2) 統計解析

K. mikimotoi の遺伝子量と冬季水温について、ピアソンの相関分析を実施し、有意水準は 0.05 とした。また、2019~2021 年度の各月における冬季水温の平均値について検定した。検定は各解析対象期間の水温データが正規分布に従い、等分散性が認められた場合には一元配置分散分析 (one-way ANOVA)、それ以外はクラスカルウォリス検定 (Kruskal-Wallis) を実施し、有意水準は 0.05 とした。さらに、有意な差が認められた月については、多重比較法であるステイールドワス法 (Steel-Dwass) 又はテューキーレーマー法 (TukeyHSD) により各群 (年) の

差を検定した。

なお、解析に使用した冬季水温は、前年12～3月までの水産試験場が平日に測定している水試地先の表層水温を用いた。

3 結果

(1) 浦ノ内湾

Chattonella spp. 及び *K. mikimotoi* の検鏡・遺伝子量解析の結果をそれぞれ図3、4に示す。*Chattonella* spp. の遺伝子は、2021年3月から両定点で継続して検出された。遺伝子量は5月に一度減少したものの、その後は増加傾向を示した。検鏡では、本種の栄養細胞が4月中旬に中学校前、6月中旬に光松で初めて確認された。6月上旬以降、遺伝子量及び検鏡による計数値はともに増加し、6月21日に赤潮を形成した。遺伝子量は、両定点で7月12日に最高値（中学校前；143.7 cells/mL，光松；427.2 cells/mL）を示し、検鏡による計数値においても、同日に最高値（中学校前；153 cells/mL，光松；610 cells/mL）を示した。7月下旬には遺伝子量、検鏡計数値ともに減少し、それぞれ1 cell/mLを下回った。その後、再び増加して100 cells/mLを上回り、今年度は2回目のピークが確認された。

K. mikimotoi の遺伝子は、2020年から継続して検出されており、検鏡においても遊泳細胞が確認されていた。3月中旬以降、遺伝子量及び検鏡による計数値は増加傾向を示し、7月2日に赤潮を形成した。遺伝子量は、両定点で7月12日に最高値（中学校前；58.9 cells/mL，光松；282.7 cells/mL）を示した。検鏡による計数値では、光松で7月12日に最高値の550 cells/mL、中学校前では7月19日に最高値の75 cells/mLを示した。8月中旬以降は、遺伝子量、検鏡計数値ともに1 cell/mLを下回った。その後、海水中における本種の遺伝子は、冬季においても検出された。

(2) 野見湾

C. polycrikoides 及び *K. mikimotoi* の検鏡・遺伝子量解析の結果をそれぞれ図5、6に示す。

C. polycrikoides の遺伝子は、2021年3月上旬から両定点で継続して検出されていた。検鏡では、本種の遊泳細胞が2021年3月下旬から継続して確認された。4月以降の遺伝子量は、おおよそ0.01～1cell/mLの範囲で推移し、6月16日に最高値（湾奥ブイ；1.2cells/mL，馬の背；16.7cells/mL）を示した。検鏡による計数値でも、同日に最高値（湾奥ブイ；20cells/mL，馬の背；18cells/mL）を示したが、湾奥ブイにおいては遺伝子量と検鏡計数値に大きな違いがみられた。

K. mikimotoi の遺伝子は、昨年度から両定点で検出されており、検鏡では本種の栄養細胞が4月下旬に初めて確認された。遺伝子量は、4～5月におおよそ0.001～1cell/mLの範囲で推移し、5～6月には0.01～10cells/mLで推移した。湾奥ブイでは6月16日に最高値の2.9cells/mL、馬の背では7月1日に最高値の9.3cells/mLを示した。検鏡による計数値では、湾奥ブイで6月16日に最高値の22cells/mL、馬の背では7月1日に最高値の38cells/mLを示した。7月中旬以降は遺伝子量が徐々に減少し、検鏡においては遊泳細胞が確認されなくなった。

4 考察

2020～2022年の浦ノ内湾において、*Chattonella* spp. の遺伝子及び遊泳細胞は、1～3月にほとんど検出されず、低い値で推移している。本種は水温などの条件が悪化するとシストを形成し、休眠状態となって底泥に堆積することが知られている（今井 2012）。このため、低水温期である冬季には、遊泳細胞が海水中に存在しないことが示唆されており、このことが浦ノ内湾における検鏡及び遺伝子量調査で冬季に本種が検出されない原因と考えられた。これまでの調査結果より、遺伝子量解析は海水 100mL を用いた濃縮検鏡でも確認できない低密度細胞を検出できており、非常に感度の高い手法であると考えられる。また、占部（2021）は検鏡の検出限界以上においても遺伝子調査で密度推移を捉えることが可能と報告しており、今回の調査でもそれと同様の結果となった。

浦ノ内湾及び野見湾における *K. mikimotoi* の遺伝子量は、秋から冬にかけて値が低下するものの、周年にわたり検出された。本種は、シストを形成しないと考えられており（Honjo et al. 1991）、これまでの調査においても海水中の遺伝子は周年検出されていることから、本海域では年中、遊泳細胞として存在していると考えられる。また、Honjo et al.（1991）は冬季（12～3月の水温が高いほど、本種の細胞は早くから観察されると報告している。つまり、冬季水温が高いほど増殖速度が速く、海水中の細胞数及び遺伝子量も高くなると推定される。しかし、2019～2021年度の浦ノ内湾における冬季（12～3月）の本種の遺伝子量と表層水温について、ピアソンの相関分析を実施したところ、有意な相関はみられなかった（ $r=0.45$, $p>0.05$ ）。また、2019～2021年度における各年の冬季の表層水温（平均）について比較したところ、12月、1月及び12～3月に有意な差が確認され（ $p<0.01$ ）、2021年度は2019年度及び2020年度に比べて表層水温が低かった（表1）。しかしながら、12～3月の遺伝子量（平均）は2021年が最も多く、2020年が最も少なくなり、表層水温が増殖に関与している傾向はみられなかった。

浦ノ内湾では、連続した水温データが表層のものに限られたためこれを用いた。しかし、表層水温は気温や降水による温度変化の影響を大きく受けるため、中層で増殖するとされる（宮村 2016）*K. mikimotoi* の遺伝子量との相関がみられなかった可能性がある。また、先述の *Chattonella* spp. のシスト発芽には、底層の水温が関係することが分かっている（今井 2012）。浦ノ内湾において、これら有害プランクトンの初期増殖過程を明らかにするためには、表層に加えて中層及び底層の連続水温データの取得が必要であると考えられる。

5 引用文献

- 今井 一郎（2012）．シャットネラ赤潮の生物学．株式会社 生物研究社、東京．
- 宮村 和良（2016）．有害有毒プランクトンの科学．3-3 *Karenia mikimotoi* の赤潮動態と発生予察・対策．株式会社 恒星厚生閣．東京．P191～200．
- 谷口 越則、齋田 尚希（2020）．令和元年度高知県水産試験場事業報告書「赤潮の早期検知と海水からの病原体の検出技術の開発」．P86～97
- Tsuneo Honjo, Mineo Yamaguti, Osamu Nakamura, Shigeya Yamamoto, Akira Ouchi, Kouichi Ohwada（1991）．A Relationship between Winter Water Temperature and the Timing of Summer *Gymnodinium nagasakiense* Red Tides in Gokasho Bay. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(9), 1679-1682.
- 占部 敦史（2021）．令和2年度高知県水産試験場事業報告書「赤潮の早期検知と海水からの病原体の検出技術の開発」．P86～90

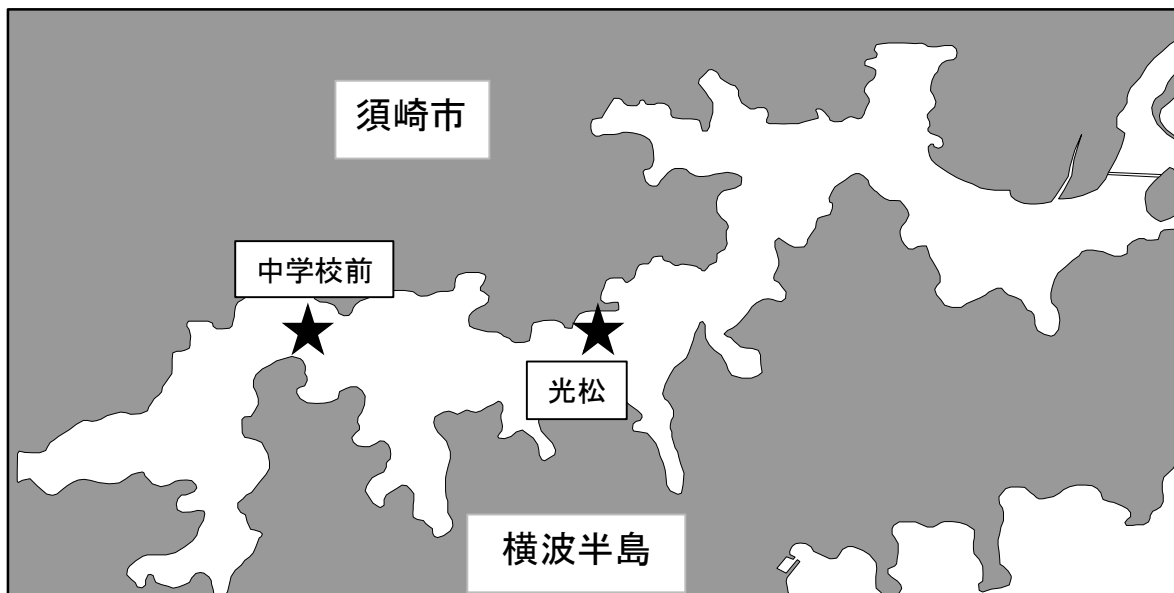


図1 浦ノ内湾における調査定点



図2 野見湾における調査定点

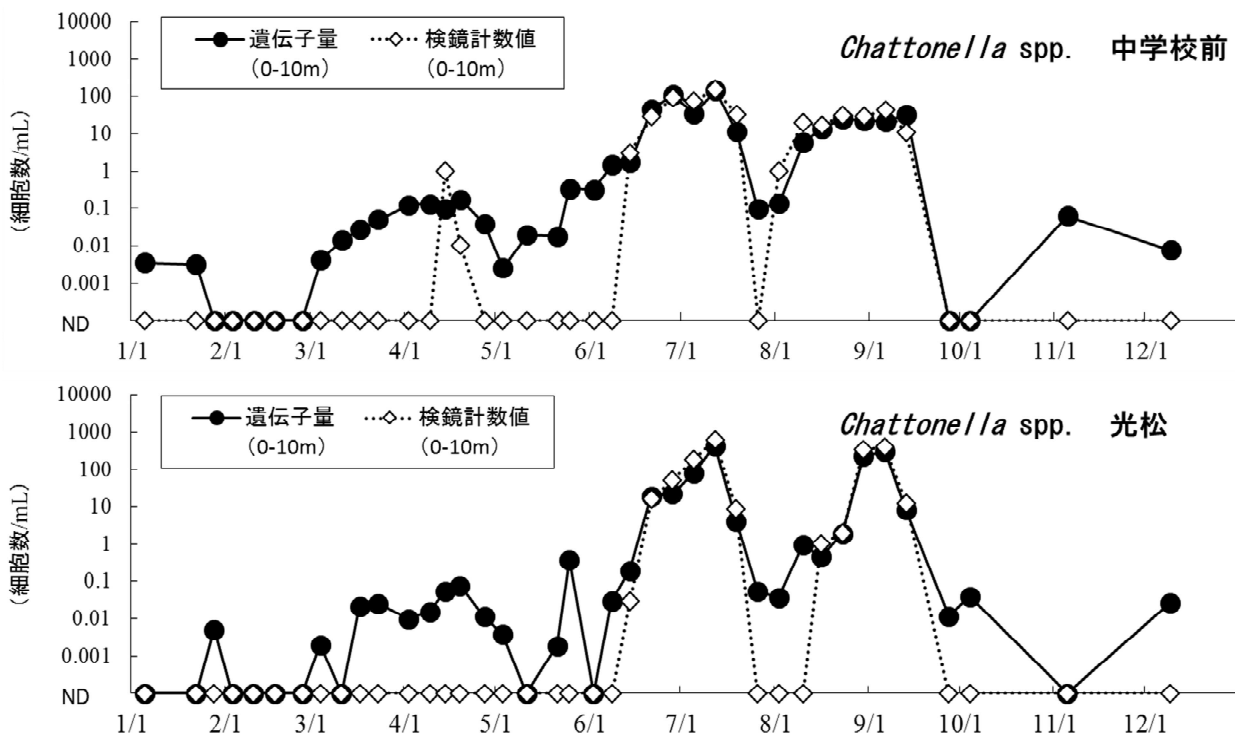


図3 2021年における浦ノ内湾の *Chattonella* spp. の遺伝子検出状況

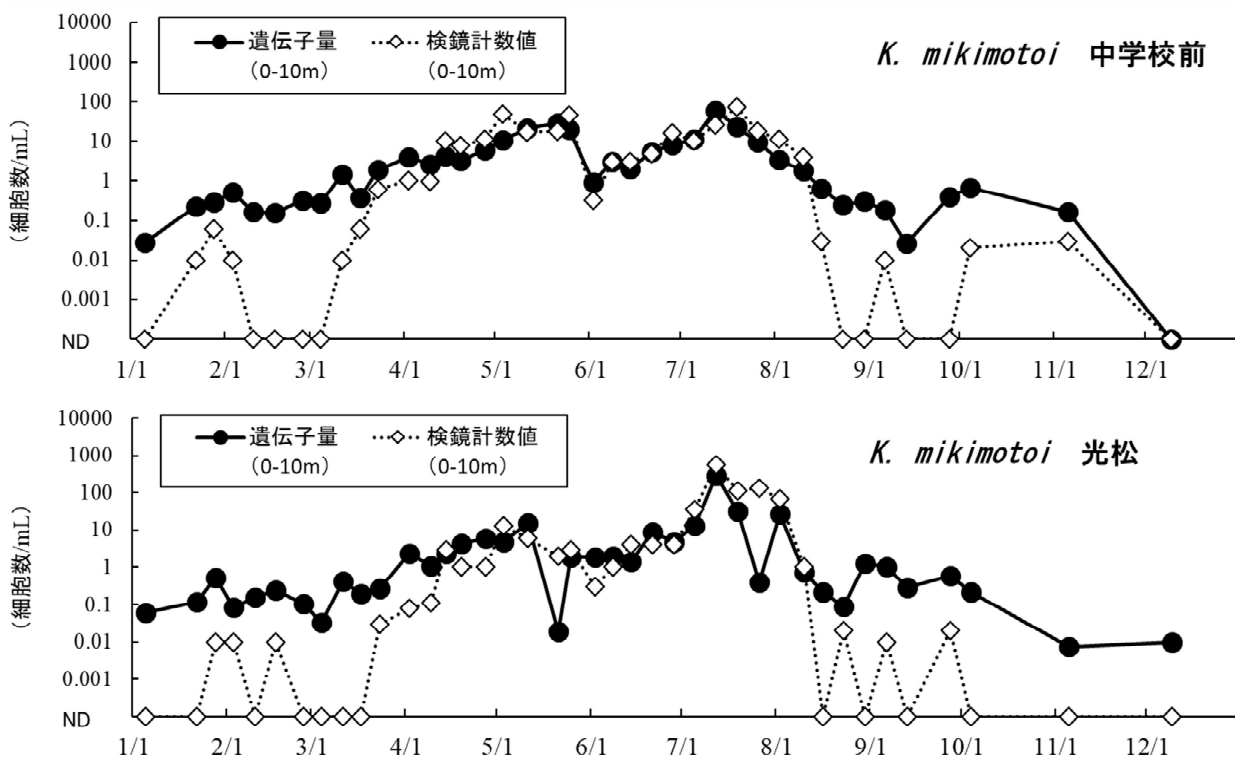


図4 2021年における浦ノ内湾の *K. mikimotoi* の遺伝子検出状況

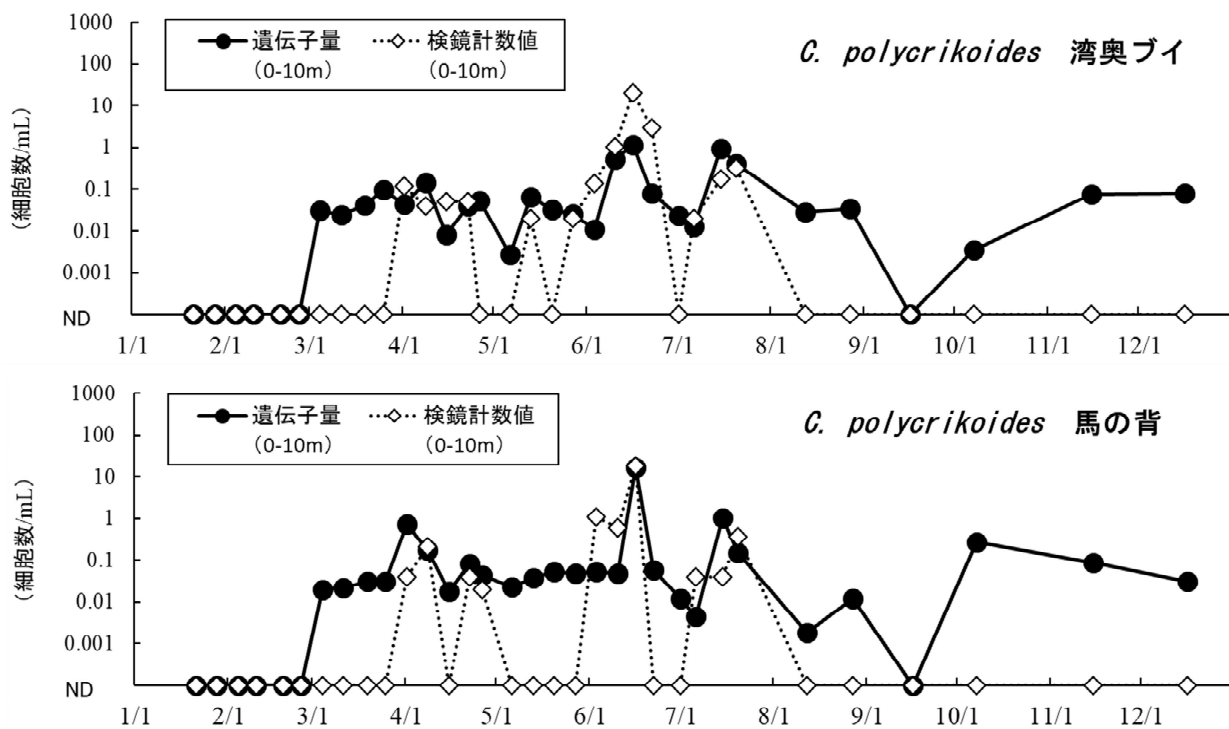


図5 2021年における野見湾の *C. polycrikoides* の遺伝子検出状況

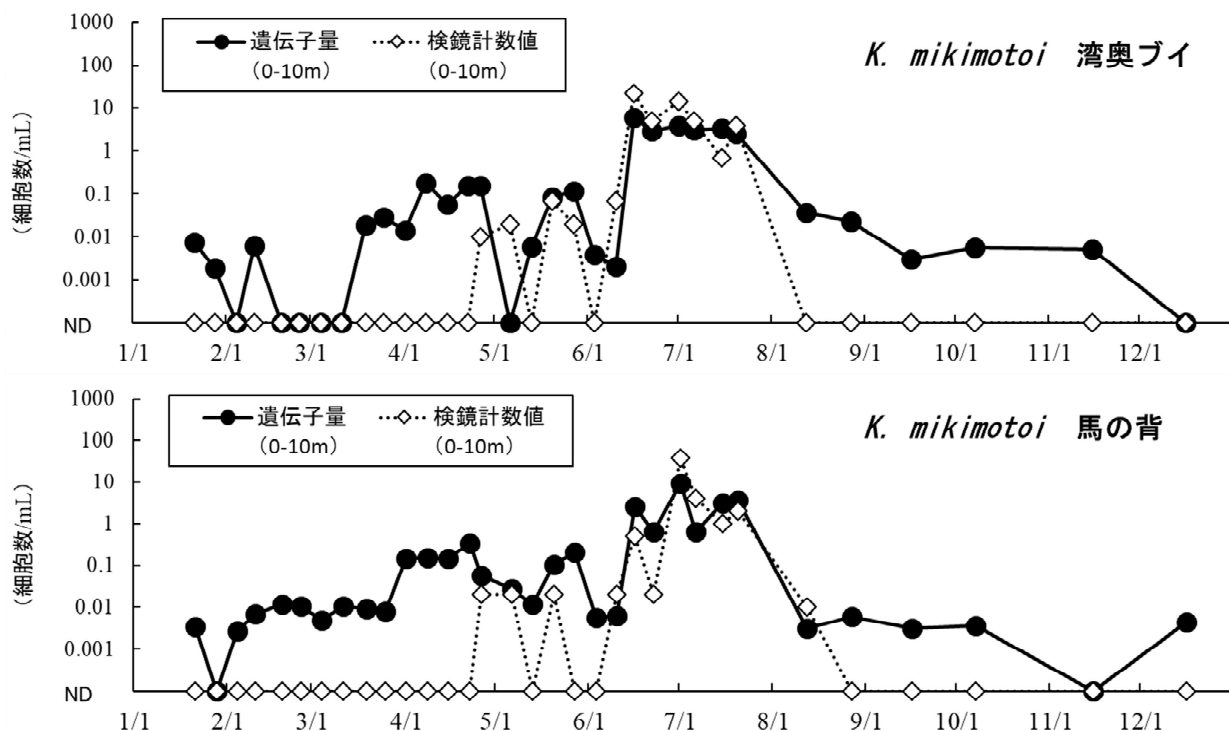


図6 2021年における野見湾の *K. mikimotoi* の遺伝子検出状況

表 1 2020～2022 年度における浦ノ内湾の冬季の平均表層水温の比較

対象期間	年度			one-way ANOVA	Kruskal-Wallis	TukeyHSD	Steel.Dwass		
	2019	2020	2021				2019	2020	2021
12月	17.2 ± 0.5	17.4 ± 1.3	16.3 ± 1.1		*		<u>2019</u>	<u>2020</u>	2021
1月	15.2 ± 0.6	14.8 ± 0.7	14.1 ± 0.7	*		<u>2019</u>	<u>2020</u>	2021	
2月	14.6 ± 1.2	14.5 ± 0.6	14.2 ± 0.6		n.s				
3月	15.9 ± 0.9	16.1 ± 1.0	15.6 ± 1.1		n.s				
12～3月	15.8 ± 1.3	15.8 ± 1.5	15.1 ± 1.3		*		<u>2019</u>	<u>2020</u>	2021

表中の one-way ANOVA 及び Kruskal-Wallis における n. s は有意差無し、*は有意差有り（有意水準； $p < 0.05$ ）、TukeyHSD 及び Steel.Dwass における下線は、線上の年に有意差無し（有意水準； $p < 0.05$ ）をそれぞれ示す