短

報

***Heterocapsa circularisquama* 感染性
ウイルスを含む現場海底泥を利用した
赤潮抑制に関する検討**

中山奈津子,^{1*} 近藤伸一,² 畑直亜,³
外丸裕司,¹ 樽谷賢治,^{1a} 長崎慶三,^{1b}
板倉茂¹

(2013年3月27日受付, 2013年6月23日受理)

¹ 鮎水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所,

² 新潟県水産海洋研究所佐渡水産技術センター,

³ 三重県水産研究所

Estimation of impacts of virus-containing bottom sediment on natural *Heterocapsa circularisquama* population

NATSUKO NAKAYAMA,^{1*} SHIN-ICHI KONDO,²
NAOTSUGU HATA,³ YUJI TOMARU,¹
KENJI TARUTANI,^{1a} KEIZO NAGASAKI^{1b}
AND SHIGERU ITAKURA¹

¹National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Fisheries Research Agency, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, ²Niigata Prefectural Fisheries and Marine Research Institute, Nishi, Niigata 952-0317, ³Mie Prefecture Fisheries research Institute, Shima, Mie 517-0404, Japan

キーワード: HcRNAV, 赤潮抑制, 加茂湖, 現場海底泥, 凍結保存

渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* は、二枚貝のへい死を引き起こす有害赤潮原因藻であり、1988年に高知県浦ノ内湾で初めて確認されて以来、西日本ならびに中部を中心に急速に分布を拡大した。¹⁾ 新潟県佐渡島加茂湖では、2009年秋に *H. circularisquama* による赤潮が初めて発生し、養殖マガキの大量へい死が起きた(推定被害額1.9億円)。²⁾ 以降毎年7~8月を中心に同種赤潮の発生が確認され、加茂湖への *H. circularisquama* の定着が危惧されている。³⁾

これまでに赤潮対策として、赤潮の海面回収や鉄粉吸収など物理的・化学的方法が主に検討されてきたが、対策規模が大きいことによるコストや生態系への負荷、安全面などの点で問題があり、実用化には至っていない。⁴⁾ 一方、海洋環境中に存在する生物を利用する赤潮防除法は生態系への負荷の少ない安全性の高い方法とし

て注目されており、⁴⁾ 著者らはとくに赤潮藻類に感染するウイルスの利用に着目した。

これまでの研究で、著者らは、*H. circularisquama* を特異的に死滅させるウイルス(HcRNAV)を発見し、そのウイルスが赤潮終息時期の海底泥(特に表層)に多く存在することを見出してきた。^{5,6)} その結果から、ウイルスを含む海底泥を赤潮発生海域に散布するという赤潮抑制法について検討した。ウイルスを用いる利点は、その高い特異性や自己複製能により、*H. circularisquama* のみを死滅させることや、少量の投与で広範囲への効果が期待できる点などである。しかしながら、人工的に培養して殖やしたウイルスの現場投与については、その安全性を危惧する声が高い上、散布規模があまりに広範囲であるため現実的でない。また、他の海域由来のウイルスを散布するとなると、目的とする抗 *H. circularisquama* ウイルス以外を移入する可能性も否定できないことから、現段階ではその実施は困難である。そこで、赤潮が発生した海域からウイルスを含む海底泥を採取し、それを同じ海域で(翌年以降の)赤潮発生時に散布するという、土着のウイルスを利用した赤潮防除法を考案した。

海底泥は、2010年赤潮発生後に加茂湖において *H. circularisquama* が高密度で出現した地点の表層0~3 cmを約10 kg採取し、-20℃で凍結した。これによって、ウイルスの力価を保持したまま、*H. circularisquama* を含む有害なプランクトンの種(シスト)を死滅させることができると考えた。⁷⁾

最初に、室内実験にて凍結泥接種による *H. circularisquama* への効果を予備的に検証した。SWM3培地⁸⁾で培養した400 mLの *H. circularisquama* (約1.0×10⁴ 細胞/mL)に対し、自然解凍した上述の底泥をそれぞれ0, 1, 5, および10 g接種した。その結果、底泥を接種した全試験区で3日目までに約2.0×10³ 細胞/mLまで細胞の減少がみられた。泥の接種量が多いと *H. circularisquama* 細胞密度の減少率が高くなる傾向が見られたため、現場でのボトル試験には400 mL当たり1 g接種区と10 g接種区を設けることとした。

2011年8月に加茂湖において海水1 mL当たり約8.0×10³ 細胞の *H. circularisquama* 赤潮が発生した際に、現地にて凍結泥接種によるボトル試験を行った。赤潮海水を40 L採取し、コンテナ内で十分に攪拌した後、

* Corresponding author: Natsuko NAKAYAMA

Tel : 81-829-55-3694. Fax : 81-829-54-1216. Email : nnakayama@affrc.go.jp

^a 現所属 : 鮎水産総合研究センター西海区水産研究所 (Seikai National Fisheries Research Institute, Taira-machi, Nagasaki 851-2213, Japan)

^b 現所属 : 鮎水産総合研究センター (Fisheries Research Agency, Yokohama, Kanagawa 220-6115, Japan)

500 mL 容の透明ボトルに 400 mL ずつ分注した。これらに対し、以下の条件で底泥を接種した。対照区は、泥非接種区ならびに泥をオートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分) した滅菌処理区 (1 g および 10 g), 試験区は泥 1 g 接種区および 10 g 接種区の計 5 試験区 (それぞれ 2 連) とした。底泥接種後 0 日目のボトルからすぐに試料を採取した後、他のボトルを網に入れ、沿岸の約 50 cm 深に 1 週間置いた。底泥接種後 0, 3, 6 日目に各ボトルの試水中の *H. circularisquama* 細胞密度, ウイルス力価, および栄養塩濃度をそれぞれ測定した。*H. circularisquama* 細胞密度は直接検鏡法にて計数した。ウイルス力価は、種内特異性の異なる *H. circularisquama* 4 株 (HU9433-P, HCLG-1, 05HC06, 10Kamo10:¹¹⁻¹³) を用いて MPN 法^{10,11}) により算定した。栄養塩濃度は溶存態無機窒素, 溶存態無機リン, 溶存態ケイ素について栄養塩自動分析装置 (プランルーベ社製 TRAACS 2000) を用いて定法により分析した。

その結果, 0 日目に $7.1 \sim 7.6 \times 10^3$ 細胞/mL であった *H. circularisquama* 細胞密度は, 6 日目までに, 泥 1 g 接種区では 1.0×10^2 細胞/mL まで, 10 g 接種区では 4.0×10^1 細胞/mL までそれぞれ減少した (Fig. 1)。このとき, ボトル中のウイルス密度は, 実験開始時の 7.0×10^1 感染単位/mL (泥 1 g 接種区), 9.5×10^1 感染単位/mL (泥 10 g 接種区) からそれぞれ 5.8×10^4 感染単位/mL, 7.2×10^4 感染単位/mL まで増加したこと

から, *H. circularisquama* 個体数の減少には底泥中のウイルスが関わっている可能性が示唆された (Fig. 1)。なお, 海底泥を接種しなかった対照区においても *H. circularisquama* 細胞密度の減少とウイルス密度の増加が認められた。これらは, 現場の天然赤潮海水中に既に存在していたウイルスによるものと考えられるが, 底泥接種区と比較すると *H. circularisquama* 減少率およびウイルス増加率ともに対照区の方が低かったことから, 底泥接種が *H. circularisquama* 個体数の減少を促進したものと推定された。また, ボトル内には天然海水起源と底泥起源のウイルスが存在するが 0 日目のウイルス力価に差が見られなかった理由として, 0 日目は底泥接種後すぐに試料を採取したので, 底泥粒子に吸着しているウイルスのほとんどが遊離しなかったと考えられた。

ボトル内の栄養塩濃度は, 溶存態無機窒素と溶存態ケイ素において, 滅菌処理底泥 10 g 区と底泥 10 g 接種区で 3 日目に上昇傾向を示したが, 6 日目までには全栄養塩濃度が低下した (Fig. 2)。3 日目の濃度上昇は, 底泥の接種による可能性が高いが, それが *H. circularisquama* の増殖促進に及ぼした影響は本実験からは不明である。今後, 底泥散布による赤潮防除を現場に適用するためには, *H. circularisquama* やそれ以外の生物への影響も複合的に捉え, より適切な評価方法を考える必要があろう。

2009 年に加茂湖で発生した *H. circularisquama* 赤潮は 1 ヶ月間に亘る大規模なものであった。翌 2010 年以

Fig. 1 Changes in abundance of *Heterocapsa circularisquama* cells and infectious units in the bottles after inoculation with each untreated or treated sediment. Bar chart: The number of *Heterocapsa circularisquama*; five experimental plots of non-sediment ($\square$), AS sediment 1 g ($\square$), AS sediment 10 g ($\square$), sediment 1 g ($\blacksquare$), sediment 10 g ($\blacksquare$). Error bars indicate the 95% confidence intervals. Line graph: The infectious units per mL of viruses; five experimental plots of non-sediment ($\circ$), AS sediment 1 g ($\square$), AS sediment 10 g ($\square$), sediment 1 g ($\blacktriangle$), sediment 10 g ($\blacktriangle$). AS, autoclave-sterilized sediment.

Fig. 2 Fluctuation of (a) dissolved inorganic nitrogen (DIN), (b) dissolved inorganic phosphorus (DIP), (c) dissolved silica (DSi) in the bottles: five experimental plots of non-sediment ($\square$), AS sediment 1 g ($\square$), AS sediment 10 g ($\square$), sediment 1 g ($\blacksquare$), sediment 10 g ($\blacksquare$). AS, autoclave-sterilized.

降, 加茂湖において毎年 *H. circularisquama* は発生するものの, 比較的短期間に終息し大きな被害には至っていない。これは, 抗 *H. circularisquama* 因子であるウイルスが定着し, *H. circularisquama* 赤潮の終息に関わっているものと考えられる。しかし, *H. circularisquama* 非発生年には現場でのウイルス複製が起こりにくいため, 翌年の赤潮が長期化する可能性が危惧される。⁵⁾ そのような場合, 海底泥を凍結保存して利用することのできる本法の適用は有用であると考えられる。また *H. circularisquama* については, 同一種内にウイルス感受性の異なる少なくとも 3 つのタイプが存在し,^{11,13)} 加茂湖からもこれらすべてのタイプの存在が確認されている。³⁾ 現場の底泥中にはそれら個体群に感染可能なウイルス群が存在するため, 現場の底泥を用いることは感染特異性の問題をクリアする (偏りなく様々なタイプの *H. circularisquama* をウイルス感染に導きうる) という点でも期待できる。

本試験のように, 天然環境中に存在する抗赤潮作用を利用する方法は, 安全かつ生態系への影響がきわめて少ない, 環境に優しい赤潮対策と考えられる。著者らは現在, 比較的小規模の水槽内で赤潮海水に底泥を接種することによって一旦ウイルスを増殖させた後, それを赤潮海水中に散布するといった方法や効果的な接種時期などを検証しており, 少量の底泥で広範な赤潮に適用可能な方法を検討している。

謝 辞

本研究の実施にあたり, 赤潮に関する情報提供および現場調査にご協力いただいた加茂湖漁協組合員および職員の方々, 新潟県水産海洋研究所佐渡水産技術研究センター職員の方々, 佐渡市農林水産課職員の方々, 新潟県佐渡地域振興局水産庁舎の方々に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 松山幸彦. 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* に関する生理生態学的研究—I: *H. circularisquama* 赤潮の発生および分布拡大機構に影響する環境要因等の解明. 水研センター研報 2003; **7**: 24–105.
- 2) 近藤伸一, 中尾令子, 岩滝光儀, 坂本節子, 板倉 茂, 松山幸彦, 長崎慶三. 有害赤潮藻ヘテロカプサの分布域北上現象—佐渡島加茂湖での赤潮によるマガキの大量死—. 日水誌 2012; **78**: 719–725.
- 3) Fujimoto A, Kondo S, Nakao R, Tomaru Y, Nagasaki K. Co-occurrence of *Heterocapsa circularisquama* bloom and its lytic viruses in Lake Kamo, Japan. *Jpn. Agr. Res. Quart.* 2013; **47**: 329–338.
- 4) 今井一郎. 赤潮の生物学的防除の可能性. 日本海水学会誌 1998; **52**: 216–227.
- 5) Tomaru Y, Hata N, Masuda T, Tsuji M, Igata K, Masuda Y, Yamatogi T, Sakaguchi M, Nagasaki K. Ecological dynamics of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and its infectious viruses in different locations of western Japan. *Environ. Microbiol.* 2007; **9**: 1376–1383.
- 6) Nagasaki K, Tomaru Y, Nakanishi K, Hata N, Katanozaka N, Yamaguchi M. Dynamics of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its viruses in Ago Bay, Japan. *Aquat. Microb. Ecol.* 2004; **34**: 216–219.
- 7) 畑 直亜, 山田浩且, 西村昭史, 中山奈津子, 外丸裕司, 長崎慶三. 底泥中に存在する殺藻ウイルス HcRNAV の感染価の維持に及ぼす保存温度の影響. 三重水研報 2012; **21**: 21–26.
- 8) Chen LCM, Edelstein T, McLachlan J. *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.* 1969; **5**: 211–220.
- 9) Itoh K, Imai I. Rafido so (Raphidophyceae). In: Japan Fisheries Resource Conservation Association (ed). *A Guide for Studies of Red Tide Organisms*. Shuwa, Tokyo. 1987; 122–130.
- 10) Suttle CA. Enumeration and isolation of viruses. In: Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Kemp PF, Sherr E, Cole JJ (eds). Boca Raton, Lewis Publishers, FL, USA. 1993; 121–137.
- 11) Tomaru Y, Katanozaka N, Nishida K, Shirai Y, Tarutani K, Yamaguchi M, Nagasaki K. Isolation and characterization of 2 distinct types of HcRNAV, a single-stranded RNA virus infecting the bivalve-killing microalga *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat. Microb. Ecol.* 2004; **34**: 207–218.
- 12) Mizumoto H, Tomaru Y, Takao Y, Shirai Y, Nagasaki K. Diverse responses of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to infection by a single-stranded RNA virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; **74**: 3105–3111.
- 13) Nakayama N, Fujimoto A, Kawami H, Tomaru Y, Hata N, Nagasaki K. Intraspecies diversity within a dinoflagellate host-virus system. *Microbes Environ.* 2013; **28**: 112–119.