

# 自然の自己修復機能を利用した赤潮防除新技術開発研究

畑直垂・西村昭史・山田浩且

## 目的

平成4年に英虞湾で発生した *Heterocapsa circularisquama* (以下ヘテロカプサ) 赤潮はアコヤガイを大量へい死させ、真珠養殖漁業に大打撃を与えた。以降英虞湾および周辺真珠養殖漁場では毎年のようにヘテロカプサ赤潮が発生し、アコヤガイのへい死のみならず養殖真珠の品質低下を引き起こしている。このため、赤潮発生予察技術開発に取り組むと共に漁業者を取り込んだモニタリング体制を構築し、赤潮の早期発見による被害軽減に努めている。しかし、毎年繰り返される赤潮に対し、漁業者から赤潮の発生自体を阻止する技術の開発が求められている。赤潮防除技術として薬剤による殺藻や粘土散布による凝集沈殿があるが、これらは閉鎖性の強い英虞湾では漁場環境への悪影響が懸念される。そこで、本研究では最近発見されたヘテロカプサのみ特異的に殺藻し他の生物に影響を与えず、赤潮の消長に関与する可能性のあるウイルス (Tomaru et al.2004) に着目し、殺藻ウイルスによる生態系の恒常性維持機能を利用した環境に優しいヘテロカプサ赤潮発生防止技術を開発する。今年度はヘテロカプサおよび殺藻ウイルスの出現状況をモニタリングすると共に、ヘテロカプサ現場個体群におけるウイルス感染率およびウイルス感受性タイプの変化、ウイルス接種効果、底泥中のウイルスの多様性などについて調査した。

## 方法

1. 野外におけるヘテロカプサおよび殺藻ウイルスの出現状況

### 1) 海況およびヘテロカプサ出現状況調査

毎年のようにヘテロカプサ赤潮が発生する立神浦の St.1 (図1) において、6月～10月の間は毎週1回、それ以外の期間は月2回、水温、塩分、pH、濁度、クロロフィルをクロロテック (アレック電子 AAQ1183) によって測定した。同時に St.1～St.3 の3定点において 0m, 2m, 5m, B-1m の4層から採水し、ヘテロカプサ密度の測定に供した。

### 2) ヘテロカプサ殺藻ウイルス出現動態調査

上記海況調査に合わせて、St.1 における水中および底泥中の殺藻ウイルス密度を、ウイルス感受性の異なるヘテロカプサ培養株4株、H18A2株 (CY)、H18A5株 (UA)、05HC06株 (06)、H20A23株 (A23) を宿主にバイオ

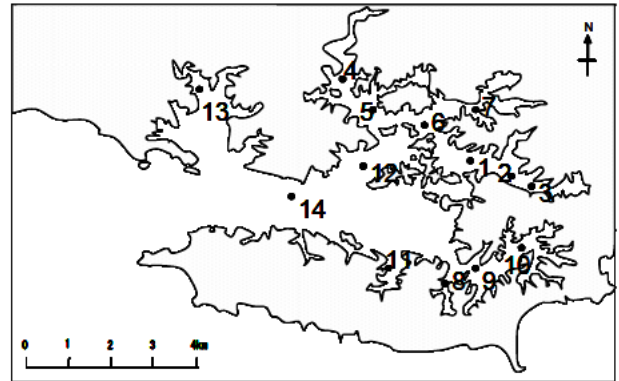


図1 調査地点図

アッセイによって測定した。すなわち、96穴ウェルプレートを用いて、SWM3培地で培養し対数増殖期にある4株のヘテロカプサ 150 $\mu$ l に 0.1 $\mu$ m でろ過した試水 100 $\mu$ l を添加し、殺藻の有無による MPN 法でウイルス密度を算定した。なお、底泥は横山式柱状採泥器を用いて表層 1cm から採泥し、SWM3 を添加して振盪抽出および遠心分離した上澄の濾液を供試し、湿泥 1g 当りのウイルス密度に換算した。なお、宿主株の HC18A2 株は CY タイプ、HC18A5 株は UA タイプ、05HC06 株と HC20A23 株は、1.4) 項によって UA タイプに近縁だが、それぞれウイルスに対する感受性が異なることが判った株である。

### 3) ヘテロカプサ殺藻ウイルス水平分布調査

図1に示す14測点において5月19日に採泥を行い、前項と同様の手法で底泥中のウイルス密度を測定した。宿主株には、H18A2株 (CY)、H18A5株 (UA)、05HC06株 (06)、HC20A34株 (A34) の4株を用いた。なお、HC20A34株は、1.4) 項によって 05HC06株と同じタイプであることが判った株である。

### 4) 底泥中のウイルスタイプの多様性調査

平成20年度に実施したヘテロカプサ株の感受性試験によって得られた CY および UA タイプ以外と判定された宿主株 11 株に、平成20年9月2日に図1に示す St.1 で採取した底泥の濾液を接種し、MPN 法によってウイルスの検出、定量を試みた。ここで陽性反応が認められたものについては、ウイルスを分離、クローニングしてウイルス株を作成した。作成したウイルス株と宿主株を用いてクロスアッセイによってタイプ判定を行った。ウイルス株が得られなかった宿主株については、平成21年7月28日に St.1 で採取した底泥の濾液を接種して、再度、ウイルス分離を試みると共に、最初のクロスアッ

セイでタイプを特定できなかったホスト株も含めて、クロスアッセイを行った。なお、ここでのクロスアッセイでは、ウイルス液を順次 10 倍希釈して接種することで、ホストの反応性を定量的に評価した。

## 2. 野外におけるヘテロカプサのウイルス感染状況

### 1) ヘテロカプサ株のウイルス感染率の推定

ヘテロカプサが出現した 6 月 15 日～12 月 7 日にかけて、各調査日にヘテロカプサを 20 細胞ずつ単離培養し、その後の増殖の状況を、増殖良好、増殖不良、増殖せず、の 3 つに区分して、その比率を調査した。また、増殖不良の原因を追究するため、増殖不良株の中からいくつかの株を選抜し、その培養液を異なるポアサイズのメンブレンフィルターで濾過してヘテロカプサ株に接種し、殺藻因子の検出およびサイズの推定を試みた。

### 2) ヘテロカプサ株のウイルス感受性試験

前項で増殖が良好であったヘテロカプサ株に、V644 株 (CY)、V34 株 (UA)、V20A06 株 (06) の 3 タイプのウイルスを接種してウイルスに対する感受性を調べた。

## 3. ヘテロカプサへのウイルス接種効果

### 1) ウイルス感染密度試験

ヘテロカプサ密度を 10,000 cells/ml, 1,000 cells/ml, 100 cells/ml, 10cells/ml, 1cells/ml, ウイルス接種濃度を 30,000titer/ml, 3,000titer/ml, 300titer/ml, 30titer/ml, 3titer/ml に設定し、各組み合わせにおけるヘテロカプサの増殖抑制効果を調査した。培養は 10ml の 3 本立てとし、温度 25°C、明暗周期は明期 12 時間、暗期 12 時間で行った。なお、増殖抑制効果は、それぞれのヘテロカプサ密度区に設定した対照区（ウイルス非接種）に対する細胞密度比 (%) で示した。

### 2) 現場発生個体群に対するウイルス接種試験

7 月 7 日に図 1 に示す St.2 の 4m 層から採水した海水（ヘテロカプサ密度 3,920cells/ml）に濾過海水を加えて、試水のヘテロカプサ密度を 500cells/ml に調整した。その試水を三角フラスコに 200ml 入れ、SWM3 培地と同等の組成となるように栄養塩を添加した後、ウイルス混合液（CY と UA）およびウイルスを含む底泥濾液を接種して、ヘテロカプサに対する殺藻効果を調査した。対照区には、ウイルス液と同量のヘテロカプサの培養濾液を接種した。各区 2 本立てとし、培養温度は現場水温である 26.2°C、明暗周期は明期 12 時間、暗期 12 時間に設定して 7 日間培養し、ヘテロカプサの細胞密度の変化を調査すると共に、培養開始時と培養終了時にウイルス密度の変化を調査した。なお、ウイルス接種濃度は、ウイルス液接種区では CY タイプが 51,000titer/ml, UA タイプが 190 titer/ml, 底泥濾液接種区では CY タイプが 51titer/ml, UA タイプが 51titer/ml, 06 タイプが 23titer/ml であった。

## 4. ウイルス含有底泥の保存方法の検討

### 1) ウイルス含有底泥の保存試験

平成 20 年 9 月 2 日に採取した底泥を 10°C, 4°C, -30°C で保存し、保存前および保存 3 ヶ月後、6 ヶ月後、9 ヶ月後、12 ヶ月後に、それぞれ MPN 法によってウイルス力価を調査した。

## 結果および考察

### 1. 野外におけるヘテロカプサおよび殺藻ウイルスの出現状況

#### 1) 海況およびヘテロカプサ出現状況調査

ヘテロカプサは 6 月 1 日に St.2 で最初に確認され、その後増加して 7 月上旬～中旬に 100cells/ml 以上に達した。7 月 21 日には細胞密度が一旦低下したが、翌週 7 月 27 日には再び 100cells/ml 以上となった。8 月 10 日以降、一旦出現が確認されなくなったものの、9 月 7 日から再び確認されるようになり、12 月 7 日まで低密度ながら出現が継続した。ヘテロカプサが減少した 7 月下旬には *Prorocentrum dentatum*（以下プロロセントラム）が 1,000cells/ml を超える高密度となった。7 月中旬に湾奥部の底層において、水温の低下、塩分の上昇、溶存酸素の回復など、湾外水の底層への浸入によると考えられる変化が認められた。このことがヘテロカプサからプロロセントラムへの種交替の引き金になった可能性がある。8 月は珪藻の増殖や大規模な伊勢湾系の低塩分水の浸入などがあり、ヘテロカプサの増殖には不適な環境であったと考えられる。

#### 2) ヘテロカプサ殺藻ウイルス出現動態調査

St.1 における殺藻ウイルスは水中ではヘテロカプサ出現から 1 ヶ月遅れて 7 月上旬から検出された（図 2）。水中のウイルスは 7 月中旬に急激に増加し 10<sup>3</sup>titer/ml に達したものの、その後急激に減少し、9 月以降 10<sup>1</sup>titer/ml 以下で増減しながら 11 月以降検出されなくなった。今年度はウイルスを 4 タイプに区分して測定したが、全期間を通じて UA タイプが優占し、CY タイプと 06 タイプ（05HC06 ヘテロカプサ株を殺藻）の出現は少なく、昨年のような優占タイプの交替は見られなかった。A23（H20A23 ヘテロカプサ株を殺藻）タイプについては 7 月下旬以降測定を開始したが、水中からは全く検出されなかった。また、水中ウイルス密度は昨年同様全般に表層より底層で高い傾向にあった。一方、底泥中のウイルスは昨年度から引き続いて検出され、水中と同様 7 月中旬に著しく増加した。その後ウイルス密度は徐々に減少したものの、水中のウイルスが消滅した冬季においても出現し続けた。底泥中ウイルスのタイプは水中同様 UA タイプが優占し、次いで CY タイプ、06 タイプの順で出現し、UA および 06 タイプは冬季にも 10<sup>1</sup>～10<sup>0</sup>titer/w.g





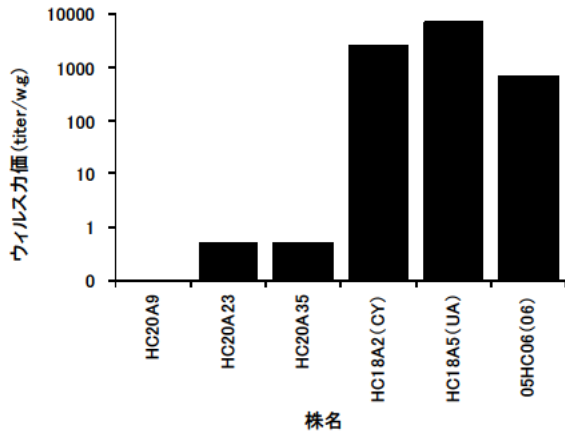


図4 平成21年に採取した底泥からのウイルス検出結果

表3 平成21年の底泥から分離したウイルス株を用いたクロスアッセイ結果

宿主	ウイルス	V644 (CY)	V34 (UA)	V20HC06	V20A23	V20A35
HC18A2 (CY)		100,000	-	-	-	-
HC20A9		1	-	-	-	-
HC18A5 (UA)		-	100,000	10,000	100,000	10,000
HC20A31		-	10	100,000	100,000	10,000
HC20A43		-	10,000	100,000	1	10,000
05HC06 (06)		-	-	100,000	1	1
HC20A23		-	-	-	100,000	10,000
HC20A35		-	-	-	100,000	10,000

表中の数値は、感染が成立したウイルス液の希釈倍率を示す

きた。新たに得られたウイルス株を加えて定量的にクロスアッセイを行った結果、HC20A9株はCYタイプだがCYタイプの宿主代表株(HC18A2株)に比べてウイルス感受性が著しく低い株、HC20A31株およびHC20A43株はUAタイプだがUAタイプの宿主代表株(HC18A5株)に比べてウイルス感受性が低い株であることが判った(表3)。そして、宿主株は、ウイルス株に対する反応性から、既知のCYタイプ、UAタイプ、06タイプおよびこれら以外のHC20A23株などを含むタイプ(A23タイプ)の4つのグループに分類された。一方、ウイルス株は、既知のCYタイプ、UAタイプのほか、UAタイプと06タイプの2つの宿主タイプに感染できるタイプ、UAタイプ、06タイプおよびA23タイプの3つの宿主タイプに感染できるタイプの4つのグループに分類された。また、UA、06、A23の3つの宿主タイプは、ウイルスに対する反応性から、お互いに近縁なグループであると推察された。底泥中には4タイプの宿主に対応した4タイプのウイルスが堆積していたことが明らかとなり、底泥を赤潮防除に利用するメリットが確認できた。

## 2. 野外におけるヘテロカプサのウイルス感染状況

### 1) ヘテロカプサ株のウイルス感染率の推定

ヘテロカプサ出現密度およびヘテロカプサ単離株の状

態の変化を図5に示した。ヘテロカプサ増殖初期の6月15日および22日に単離した株は、100%が良好な増殖を示したが、ヘテロカプサの増殖ピークの7月6日~13日にかけては増殖しない株の比率が急激に増加した。海水中のウイルスは7月6日から検出され始め、7月13日に最高濃度に達したことから、この時の増殖しない単離株の増加は、現場海域におけるウイルス感染細胞の増加を反映している可能性が考えられた。一方、7月21日にはヘテロカプサ密度が1cells/mlにまで低下したにも関わらず、単離した株は再び100%が良好な増殖を示した。培養実験によって、ヘテロカプサはウイルスによる顕著な殺藻を受けた後、ウイルス耐性を備えたと考えられる細胞が再び増殖することが確認されている。したがって、この時の増殖が良好な株の増加は、ウイルス耐性を備えた個体群の増加を反映している可能性が考えられた。7月27日以降は、増殖不良株の割合が増加した。増殖不良の原因を追究することを目的として実施した殺藻因子の検出結果を表4に示した。増殖不良株の培養液からは、0.8μmは通過し、0.1μmは通過しない、CY、UA、06の各ホストタイプに無関係な殺藻を示す殺藻因子が高頻度

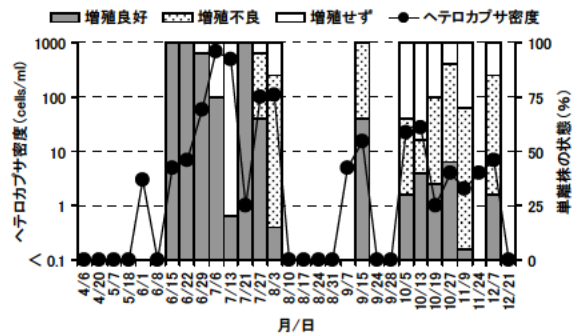


図5 ヘテロカプサ出現密度と単離株の増殖状態の変化

表4 増殖不良および増殖良好な単離株からの殺藻因子の検出結果 (陽性株数/供試株数)

単離日	増殖状態	0.8 μm 濾過			0.1 μm 濾過		
		CY*	UA*	06*	CY*	UA*	06*
7/27	不良	4/5	4/5	4/5	0/5	0/5	0/5
	良好	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
8/3	不良	5/6	5/6	5/6	0/6	0/6	0/6
	良好	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
9/15	不良	5/7	5/7	5/7	0/7	0/7	0/7
	良好	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
10/5	不良	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2
	良好	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
10/19	不良	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
	良好	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
11/9	不良	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
	良好	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

\*:ホスト株

表5 不明殺藻因子のサイズの推定

殺藻因子株名	フィルターサイズ			
	0.8 $\mu\text{m}$	0.45 $\mu\text{m}$	0.2 $\mu\text{m}$	0.1 $\mu\text{m}$
UK21A143	+(6/6)	±(2/6)	-(0/6)	-(0/6)
UK21A149	+(6/6)	+(6/6)	-(0/6)	-(0/6)
UK21A151	+(6/6)	+(6/6)	-(0/6)	-(0/6)
UK21A157	+(6/6)	±(4/6)	-(0/6)	-(0/6)
UK21A183	+(6/6)	+(6/6)	-(0/6)	-(0/6)
UK21A265	+(6/6)	+(6/6)	-(0/6)	-(0/6)
UK21A273	+(6/6)	±(2/6)	-(0/6)	-(0/6)

( )内は、陽性well数/試験well数

に検出された。さらに、殺藻因子のサイズを詳しく調査した結果、この殺藻因子は0.45 $\mu\text{m}$ は通過するが、0.2 $\mu\text{m}$ は通過しないことがわかった(表5)。粒子サイズが大きいことやホストタイプに特異的な感染がみられないことなどから、増殖不良株の増加はウイルスによるものではなく、殺藻細菌などの殺藻因子による可能性が考えられた。以上のことから、ヘテロカプサ個体群は、7月上旬～中旬にかけてはウイルスによる攻撃を、7月下旬以降は殺藻細菌様の殺藻因子の攻撃を受けていたことが推察された。

2) ヘテロカプサ株のウイルス感受性試験

ヘテロカプサのウイルス感受性タイプは、全期間を通じてUAタイプが優占し、CYタイプと06タイプの出現は少なく、顕著な優占タイプの交替は見られなかった(図6)。

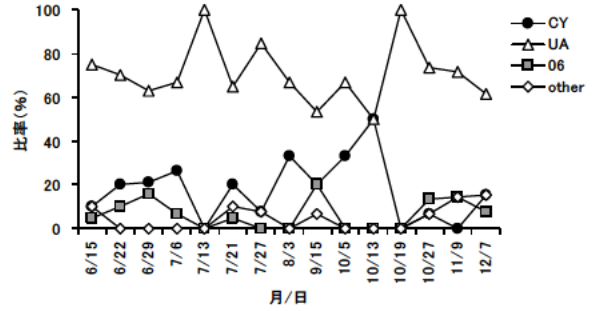


図6 ヘテロカプサ単離株のウイルス感受性タイプ組成の変化

3. ヘテロカプサへのウイルス接種効果

1) ウィルス感染密度試験

顕著な殺藻(増殖抑制)が起こるまでの日数は、ウイルス接種濃度が濃いほど、また、ヘテロカプサ密度が高いほど、短い傾向が認められた(図7)。また、増殖抑制率(対照区との細胞密度比の低下率)は、ウイルス接種濃度が濃いほど、また、ヘテロカプサ密度が低いほど、大きくなる傾向が認められた。

2) 現場発生個体群に対するウイルス接種試験

ウイルス接種後のヘテロカプサ密度の変化を図8に示した。培養3日後までは、各試験区共にヘテロカプサ密度は同様に増加した。培養4日後からは試験区の違いよりもフラスコ毎の細胞密度のばらつきが大きくなり、試験区間の差は明らかではなかった。培養5日後～7日後

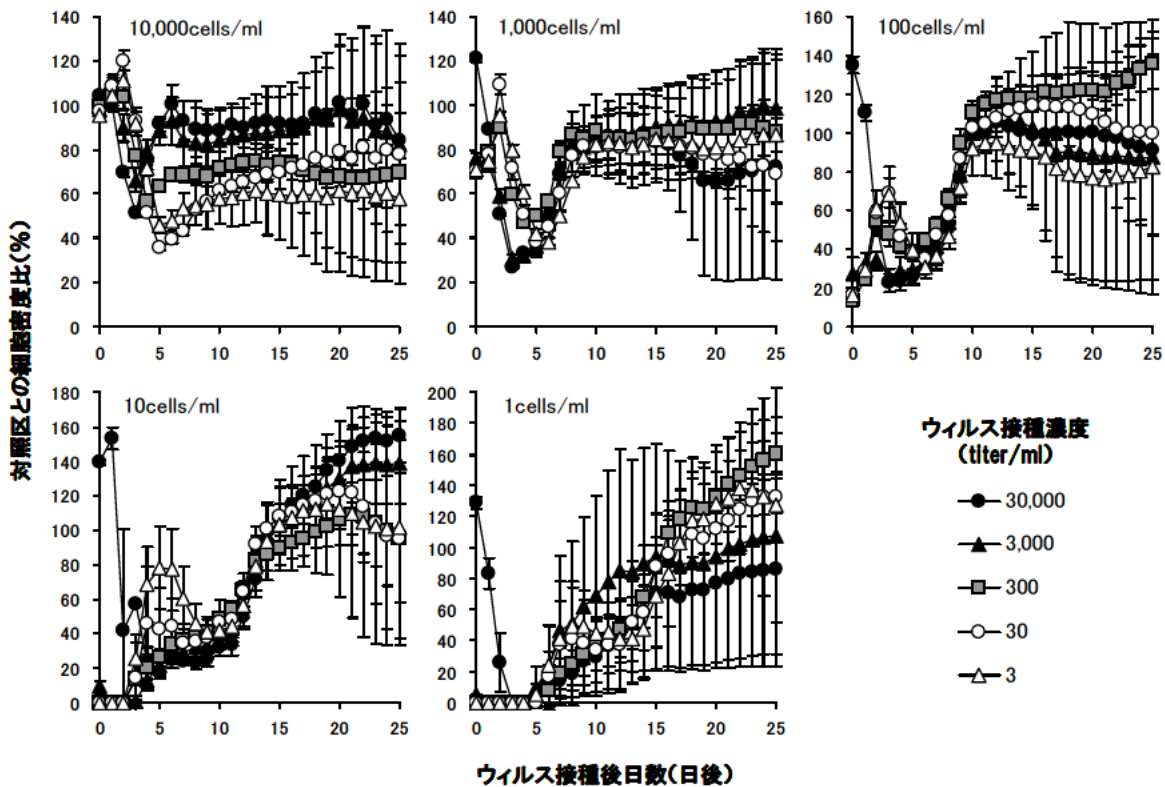


図7 異なるヘテロカプサ密度およびウイルス接種密度における増殖抑制効果

にかけてはウイルス液接種区と底泥濾液接種区の細胞密度が対照区よりも低めに推移しているようにも見えるが、統計的な有意差はなかった (repeated measure ANOVA)。培養開始時と培養終了時のウイルス定量結果を図9に示した。培養開始時から培養終了時にかけてUAおよび06タイプのウイルス量の増加が認められ、これらタイプのウイルスによる殺藻が起きていたことが推察された。しかし、対照区でも同様の変化が認められるため、ウイルス接種の効果というよりも、現場海水に既に含まれていたウイルスによる影響が大きかったものと推察された。そのため、図8で示した各試験区のヘテロカプサ密度にも顕著な差が現れなかったものと考えられた。

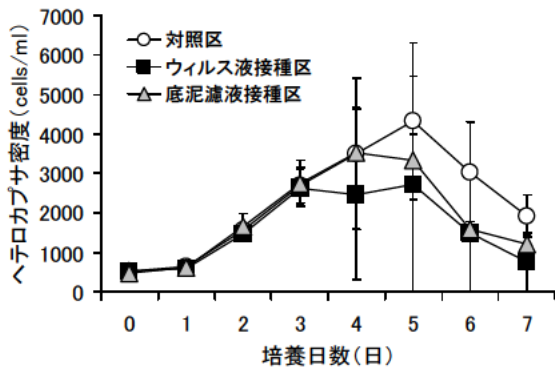


図8 ウィルス接種後のヘテロカプサ密度の変化

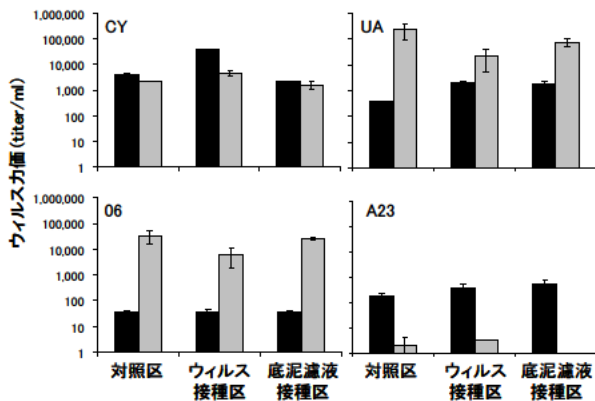


図9 培養開始時(■)と培養終了時(■)におけるウイルスカ価の変化

#### 4. ウィルス含有底泥の保存方法の検討

##### 1) ウィルス含有底泥の保存試験

CY および UA タイプ共に、いずれの保存温度でもウイルスカ価は12ヶ月後まで維持されていたが、保存温度が低いほどウイルスカ価が低下しにくい傾向が認められた(図10)。すなわち、今回検討した保存温度の中では、-30℃保存がウイルスカ価の維持に最も適していると考えられた。

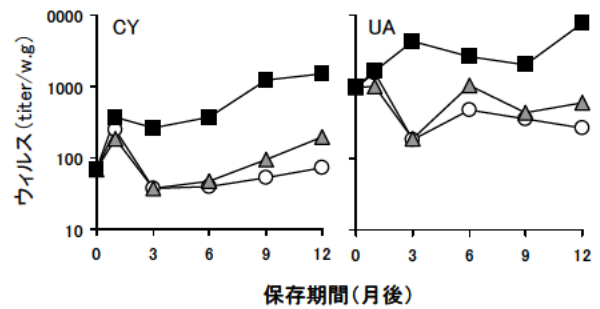


図10 10℃(○), 4℃(△), -30℃(■)の各保存温度におけるウイルスカ価の変化

##### 関連論文

Yuji Tomaru et al (2004) : Aquatic Microbial Ecology. 34,207-218.

西村昭史・他(2009) : 平成20年度三重科技セ水産研究部事業報告. 44-46.