

## Dictyocha sp. の培養及び養殖カンパチに対する影響

矢野浩一, 中島広樹,<sup>1</sup> 保科圭祐,<sup>2</sup> 村田圭助,<sup>3</sup> 西 広海

1 熊毛支庁農林水産部林務水産課, 2 商工労働水産部水産振興課, 3 大島支庁農林水産部林務水産課

珪質鞭毛藻類 *Dictyocha* 属の一種 *Dictyocha* sp. の有骨格細胞の魚毒性等に関しては知見が少ないことから, 当所で本種の室内培養を試み, その培養株の養殖カンパチ *Seriola dumerili* に対する影響を検討するため, 曝露試験を実施し致死細胞密度を調べた。その結果, 養殖カンパチ小型魚 (体重約 60 g) では, 24 時間以内の最低致死細胞密度の閾値が 4,900 cells/mL から 11,100 cells/mL の間に, 養殖カンパチ中型魚 (体重約 1,700–2,000 g) では, 8 時間以内の最低致死細胞密度の閾値が 1,090 cells/mL から 3,540 cells/mL の間にあることが示唆された。

*Dictyocha* 属は, 鹿児島県海域や国内外の多くの海域においてよく見られるプランクトンで, 種や個体によって異なるが, 概ね 4-8 角形の骨格とそれに付随する数本の放射棘を有する珪質鞭毛藻類である。通常, 海中に多くて数十 cells/mL 程度存在するが, これまで, 赤潮化したり漁業被害をもたらす事例はあまり多くは確認されていない。

しかし, 鹿児島湾においては, 1992 年 3 月に, *Dictyocha* 属のうち概ね 8 角形の骨格を持つ種の有骨格細胞が 5,000 cells/mL に達して赤潮化しており, その際, 付近の養殖ブリが約 90,000 尾へい死し 1 億円を超える被害が発生している。<sup>1)</sup> また, 2014 年には, 県内外で本種の無骨格細胞が赤潮化し, マグロ養殖に被害をもたらしたと推察される事例<sup>2)</sup> も発生し, さらに 2015 年 5-6 月にも鹿児島湾で有骨格細胞が近年になく増殖し, 一部赤潮化して, 養殖業関係者に大きな不安を与えている。このような状況において, 本種の魚毒性に関しては, サケ類に対する知見<sup>3)</sup> があるものの, 本県の有用養殖魚種であるブリ類に対する知見は確認できなかったことから, 当所において本種の有骨格細胞の室内培養を試み, 得られた培養株を一定量添加した海水に対する養殖カンパチ (小型魚及び中型魚) の曝露試験を実施して, 本種の最低致死細胞密度を調べた。

### 材料及び方法

#### 1 *Dictyocha* sp. の有骨格細胞の培養

2015 年 6 月 17 日に鹿児島市喜入沖で採取された *Dictyocha* sp. の有骨格細胞を, 当所で単離後培養した。なお, 本種は, 図 1 に示す培養株の写真のとおり, 骨格は概ね 8 角形を主体に 7-9 角形で骨格の各

角から放射棘が伸びており, その骨格の各辺中央部からさらに 8 本の枝骨が伸び, それらが少し小さいもう一つの 8 角形骨格につながった王冠状の立体形 (図 1e) を形作っている。骨格の長径は 15-25 $\mu$ m ほどで, 棘は 5 $\mu$ m 前後である。そして, その王冠状の骨格の内部に褐色の粒状の細胞質が入っており, そこから 1 本の鞭毛が伸びている。本種はこの鞭毛により滑るように遊泳する。当所で培養した本種 (DicKG2 株) は, 国立研究開発法人水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所による rDNA LSU D1-D2 領域の配列解析に基づく分子系統解析から *Dictyocha* cf. *octonaria* と同定された。<sup>4)</sup> 本稿では, 種小名が確定していないことから本種を *Dictyocha* sp. と表記する。

*Dictyocha* sp. の培養は, 当所の砂ろ過海水を孔径 3 $\mu$ m カートリッジフィルターでろ過し, オートクレーブ (テガ三洋工業株式会社製 MLS-3750) により滅菌処理 (120 °C, 3min) したものを使用して, 栄養強化培地である f/2 培地<sup>5,6)</sup> から Cu と Si を除き, Se と Tris を添加して成分組成を変更した改変 f/2 培地 (表 1) を作製し, この培地と, 同様に滅菌処理した海水を使用し Si を強化して作製した PES<sup>7)</sup> 培地 (表 2) とを 1:1 で混合したものを培地として用いた。また, 培養には, グロースチャンバー (三洋電機バイオディカル株式会社製 MLR-350) を用い, 培養条件として, 水温を 22-23 °C, 光強度を 50-100  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/sec, 14 時間明 10 時間暗の明暗周期に設定した。

この *Dictyocha* sp. 培養株を同様の条件で大量培養し, 所定の細胞密度に調製した海水中にカンパチを曝露して, その影響を調べた。この試験に供したカンパチは, 中型魚は 2014 年に, また, 小型魚は 2015

年に公益財団法人かごしま豊かな海づくり協会において生産されたカンパチ人工種苗を, 当所に搬入後育成し, 試験前に 3-6 日間絶食させた後, 目視によ

り健康な個体を選び使用した。

なお, 試験は 2015 年 10 月から 2016 年 7 月にかけて 4 回実施した。各試験の詳細は下記に示す。

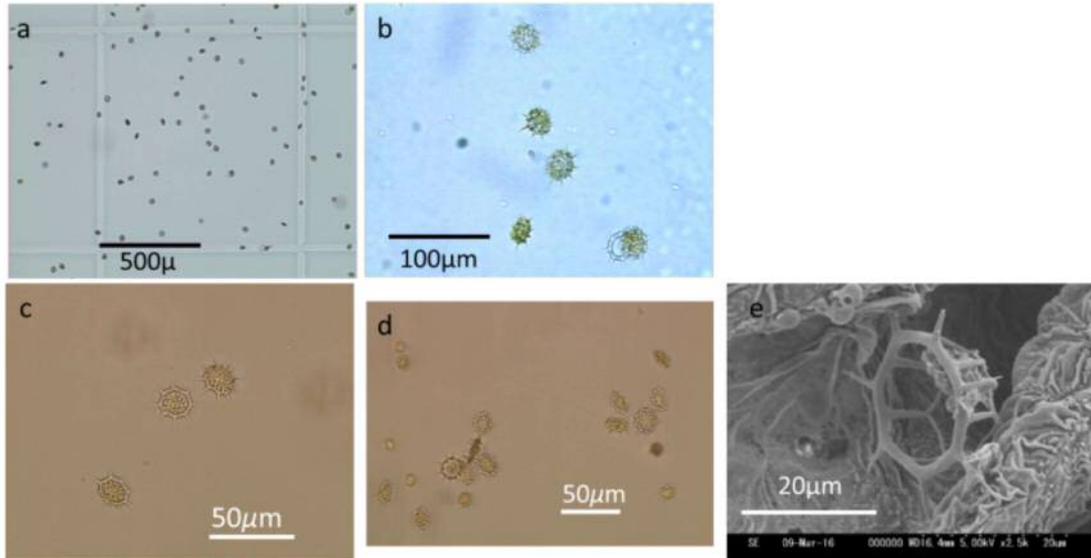


図1 *Dictyocha* sp. 有骨格 の培養株 (元種: 鹿児島市喜入沖産)

a-d 培養株の光学顕微鏡写真. e 鰓に挟まった培養株骨格の電子顕微鏡写真

表1 改変f/2培地組成

成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
NaNO <sub>3</sub>	1mL	75g/L	8.83 × 10 <sup>-4</sup> M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1mL	5g/L	3.63 × 10 <sup>-5</sup> M
Trace metal-1	1mL	別表 参照	
Trace metal-2	1mL	別表 参照	
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1mL	0.129mg/100mL	1 × 10 <sup>-10</sup> M
Vitamin mix	0.5mL	別表 参照	
Sea water	1000mL		

Trace metal-1			
成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1mL	0.63g/100mL	2.60 × 10 <sup>-8</sup> M
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1mL	2.2g/100mL	7.65 × 10 <sup>-8</sup> M
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1mL	1.0g/100mL	4.20 × 10 <sup>-8</sup> M
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1mL	18.0mg/100mL	9.10 × 10 <sup>-7</sup> M
Distilled water	up to 1000mL		

Trace metal-2			
成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.15g	—	1.17 × 10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	4.36g	—	1.17 × 10 <sup>-5</sup> M
Distilled water	up to 1000mL		

Vitamin mix			
成分	添加量	保存液濃度	最終濃度
Vitamin B12	1mL	0.1g/100mL	3.69 × 10 <sup>-10</sup> M
Biotin	10mL	0.01g/100mL	2.05 × 10 <sup>-9</sup> M
Thiamine·HCl	200mg	—	2.96 × 10 <sup>-7</sup> M
Distilled water	up to 1000mL		

註) M = mol/L

表2 PES(Si強化)培地組成

成分	添加量
10倍濃縮PES原液	2mL (別表参照)
けい酸ナトリウム溶液希釈液 <sup>※</sup>	1mL
Sea water	up to 1,000mL

※けい酸ナトリウム溶液 (Assay:(SiO<sub>2</sub>)35-38%, Assay:(Na<sub>2</sub>O)17-19%) を distilled water 1mLに20mg含む。

10倍濃縮PES原液作成	
成分	添加量
NaNO <sub>3</sub>	35g
グリセロリン酸ナトリウム	5g
Fe(as EDTA 1:モル)	250mg
Vitamin B <sub>12</sub>	1mg
Vitamin B <sub>1</sub>	50mg
Biotin	0.5mg
トリス緩衝液(アルカリ性)	50g
PII金属混液	250mL (別表参照)
Distilled water	up to 1,000mL

PII金属混液	
成分	添加量
Na <sub>2</sub> EDTA	2.5g
Fe(as Cl)	0.025g
B(as H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.5g
Mn(as Cl or SO <sub>4</sub> )	0.1g
Zn(as Cl or SO <sub>4</sub> )	12.5mg
Co(as Cl or SO <sub>4</sub> )	2.5mg
Distilled water	up to 250mL

## 2 *Dictyocha* sp. の有骨格細胞に対する小型魚の曝露試験

### 1) 試験①

当所で採水したろ過海水に, *Dictyocha* sp. の有骨格細胞の培養株を添加し, 細胞密度を約 15,000 cells/mL に調整した赤潮海水 14 L を, 30L ポリカーボネートタンクに収容したものを曝露区とし, 同型タンクに, ろ過海水のみ 14 L 収容したものを対照区とした。試験区毎に, 止水及びエアレーションの条件で平均体重 55g のカンパチ小型魚を各 3 尾収容し, 試験は午前 10:00 から翌日午前 10:00 までの 24 時間とし, 随時, 水質 (水温, 塩分, 溶存酸素量 (以下「DO」と記す。), pH) を多項目水質計 (JFE アドバンテック社製 AAQ-RINKO) で計測するとともに供試魚の様子を観察した。また, へい死した場合はその直後に, また, 生残した場合は 24 時間経過後に魚体測定を行うとともに, 鰓を採取し落射蛍光システム付き光学顕微鏡 (オリンパス株式会社製 BX53。以下「蛍光顕微鏡」という。) で観察した。さらに 0.1mol リン酸緩衝液 2 % グルタルアルデヒド溶液に鰓を浸漬保管し, 後日, 走査型電子顕微鏡 ((株) 日立ハイテクノロジーズ社製 S-3000N。以下「SEM」という。) による観察を行った。

### 2) 試験②

最低致死細胞密度を確認するため, 試験①よりさらに低い細胞密度で曝露試験を実施した (図 2)。試験①と同様の方法で細胞密度をそれぞれ約 16,500 cells/mL, 11,400 cells/mL 及び 6,000 cells/mL に調整した赤潮海水約 15L を 30L ポリカーボネートタンクに収容し, それぞれ曝露区①-③とした。また, 同型タンクにろ過海水のみ 15 L 収容し対照区とした。試験区毎に, 止水及びエアレーションの条件で平均体重 60g のカンパチ小型魚を各 3 尾収容した。曝露試験は午前 10:00 から翌日午前 10:00 までの 24 時間とし, 試験①と同様の計測及び観察を行った。



図2 試験②の状況

## 3 *Dictyocha* sp. の有骨格細胞に対する中型魚の曝露試験

### 1) 試験③

試験①及び②では, カンパチ小型魚に対して実施したが, 魚体の大きさにより最低致死細胞密度に違いがあるかを検討するため, それより大きいカンパチ中型魚の曝露試験を実施した。

試験①と同様の方法で細胞密度を約 5,000 cells/mL に調整した赤潮海水 360 L を 500L ポリカーボネートタンクに収容したものを曝露区とし, 同型タンクに, ろ過海水のみ 360 L 収容し対照区とした。試験区毎に, 止水及びエアレーションの条件で平均体重 1,728g のカンパチ中型魚を 3 尾収容した。曝露試験は午前 10:00 から翌日午前 10:00 までの 24 時間とし, 試験①と同様の計測及び観察を行った。

### 2) 試験④

最低致死細胞密度を確認するため, 試験③よりさらに低濃度の曝露区を 2 試験区設け曝露試験を行った (図 3)。試験①と同様の方法で細胞密度をそれぞれ約 3,500 cells/mL 及び 1,000 cells/mL に調整した赤潮海水 300-360L を 500L ポリカーボネートタンクに収容しそれぞれ曝露区①及び②とした。また, 同型タンクに, ろ過海水のみ 360 L 収容し対照区とした。止水及びエアレーションの条件で, 平均体重 2,048 g のカンパチ中型魚を曝露区に各 3 尾, 対照区に 2 尾収容した。試験は 7 月 7 日午前 10:17 から翌 8 日午前 10:17 までの 24 時間とし, 試験①と同様の計測及び観察を行った。

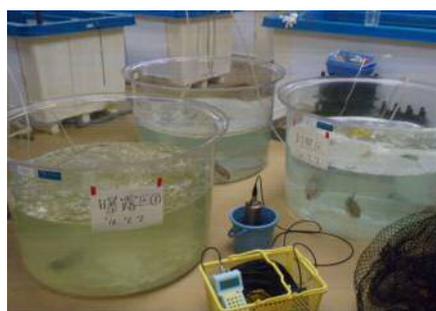


図3 試験④の状況

## 4 へい死状況の解析

試験①②の結果から小型魚について, 試験③④の結果から中型魚について, それぞれカプラン・マイヤー法により生存曲線を求め, 細胞密度の違いによるへい死状況の比較を行った。

## 結果

1 *Dictyocha* sp. の有骨格細胞の培養

今回の方法により本種の継代培養が可能になったことから、次に、培地 10L で大量培養したところ、細胞密度は最高 30,000 cells/mL 程度までの大量培養が十分可能となった。

なお、培養試験中、*Dictyocha* sp. の無骨格細胞が出現し、有骨格細胞と混在したことがあったが、再度、有骨格細胞を単離し、所定の条件をしっかりと保つことで、安定的にほぼ有骨格細胞だけを培養することができるようになった。さらに、無骨格細胞についても単離し、水温を 20℃として他の培養条件は

有骨格の場合と同じにすることで、ほぼ無骨格細胞だけの継代培養も可能となった。

2 *Dictyocha* sp. の有骨格細胞に対する小型魚の曝露試験

1) 試験①

曝露試験におけるへい死状況等を表 3 に示す。供試魚は、平均全長 165 mm, 平均体重 55g で、曝露区と対照区と全長及び体重の平均値の差はほとんどなかった。

表3 試験①における供試魚体組成及びへい死状況

試験区 (細胞密度)	供試魚	全長 (mm)	体重 (g)	へい死までの曝露時間(24時間内)			へい死: ● 生 〇 残	へい死 率
				6時間	12時間	18時間		
曝露区 (約15,000 cells/mL)	s-1	170	54		● (7時間)		100%	
	s-2	157	46		● (8時間)			
	s-3	171	62		● (11時間15分)			
	平均	166	54					
対照区	c-1	162	54			○	0%	
	c-2	163	57			○		
	c-3	166	58			○		
	平均	164	56					
全体平均		165	55					

曝露区では、7、8 時間後に 1 尾ずつ、11 時間 15 分後には 3 尾全てへい死したのに対し、対照区では、全て 24 時間後まで生残した。曝露区のカンパチは、試験開始時から対照区に比べ、口や鰓の開閉速度が速く(対照区: 48 回 / 30 秒, 曝露区: 73 回 / 30 秒), 時折口や鰓を大きく開け咳き込むような様子を示すとともに、へい死直前には、突然、狂奔し鼻上げや痙攣が見られ、最後は口と鰓を大きく開けて痙攣後へい死した(図 4)。へい死後、鰓を蛍光顕微鏡で観察したところ、鰓弁の間や鰓組織周辺に付着した粘液様物質に、*Dictyocha* sp. の骨格と葉緑素を含むため蛍光照射で赤色に光る細胞質が多数付着していた(図 5)。一方、対照区の生残魚の鰓には、粘液様物質や *Dictyocha* sp. の骨格及び細胞質は確認されなかった。また、SEM 観察の結果、へい死魚では、ひだ状の二次鰓弁表面が荒れ、一部が消失し付着物が多く、二次鰓弁の間などに *Dictyocha* sp. の骨格が多く挟まっていた(図 6a-d) のに対し、生残魚では、表面に付着物がなく二次鰓弁は規則正しくきれいに並んでおり(図 6i-l)、へい死魚の鰓弁と大きく異なっていた。



図4 試験①におけるへい死魚

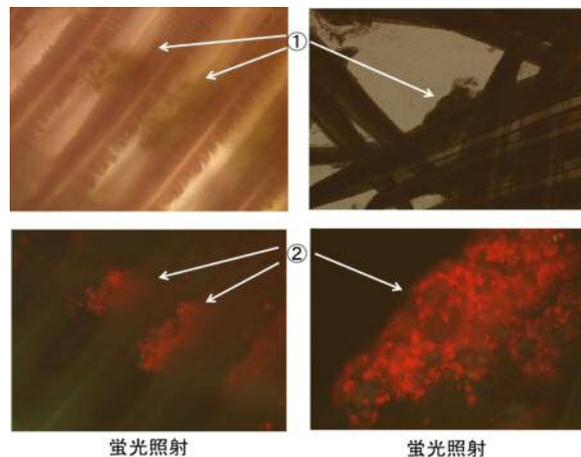


図5 へい死魚鰓の光学顕微鏡観察結果(試験①)

矢印①: 粘液様物質 矢印②: 赤色に光る細胞質

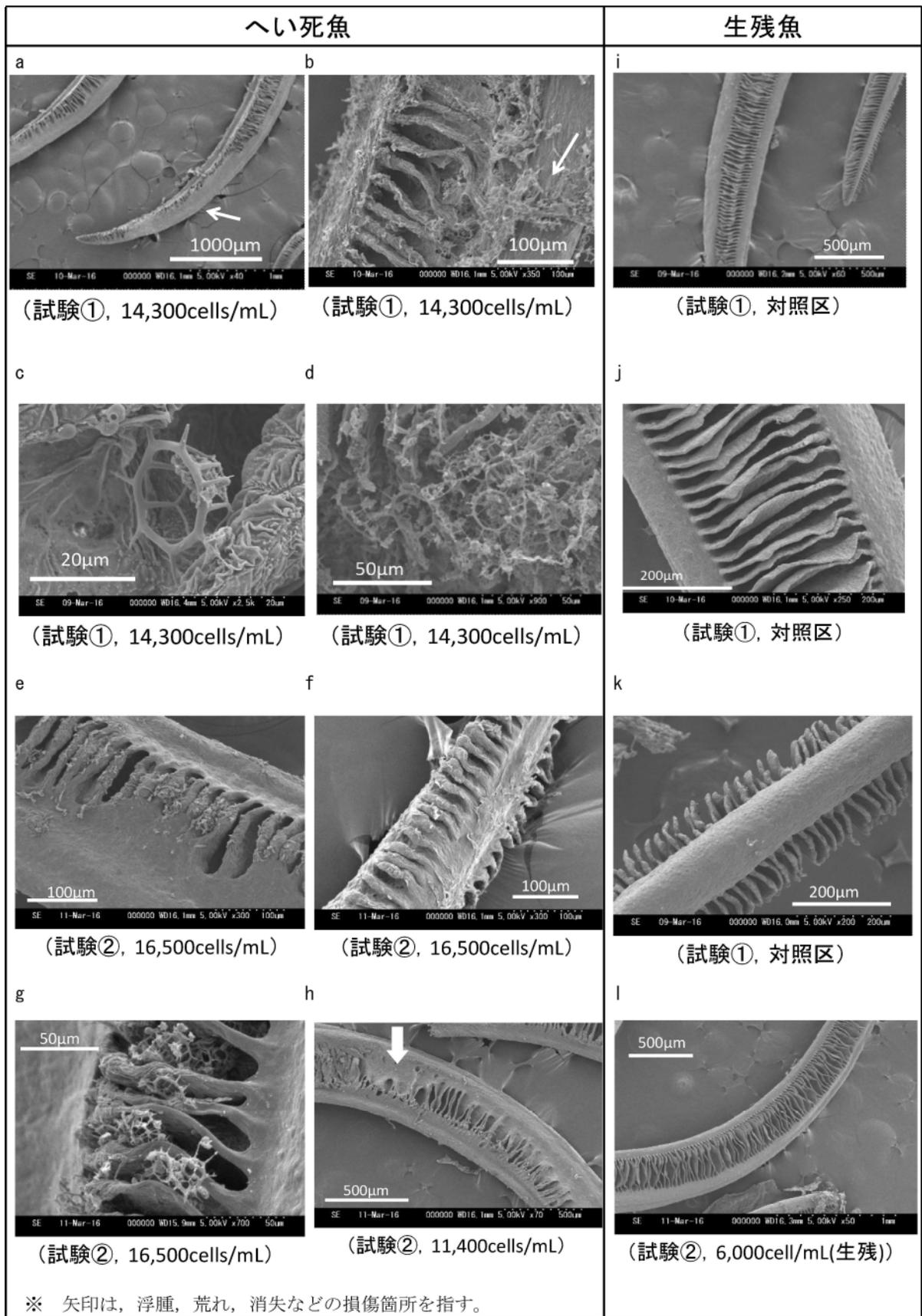


図6 試験①②におけるへい死魚及び生残魚の鰓組織のSEM観察結果

曝露試験中の *Dictyocha* sp. の細胞密度の推移を表 4 に示す。3 尾ともへい死した 11 時間 15 分後(表 3) までの間では, 概ね 13,000-15,000 cells/mL (平均 14,200 cells/mL) で推移した。

また, 試験中の水質の推移を表 5 に示す。水温は試験開始直後は対照区が 23.1 °C, 曝露区が 21.4 °C と 2 °C 弱の差があったが, 曝露区でへい死が見られた 7, 8 時間後には両区とも 22 °C 前後と差は見られなかった。塩分はともに 33 前後で差は少なく, DO は両区とも概ね 6 mg/L を超えていた。pH は, 当初, 曝露区が 8.6 と通常の天然海域の数値よりやや高かった

が, 時間の経過とともに両区とも低下し, 24 時間後には 7.6-7.8 前後となった。

表4 試験①の *Dictyocha* sp. の細胞密度の推移

経過時間	細胞密度(cells/mL)	
	曝露区	対照区
開始時	14,300	14,900
4時間	14,900	14,400
7時間15分	14,400	13,200
10時間30分	13,200	14,200
平均値*	14,200	16,100
23時間40分	16,100	

※ 平均値は, 10時間30分まで。23時間40分は参考

表5 試験①の水質の推移

時刻	経過時間 (時間:分)	試験区	水温(°C)	塩分	DO(mg/L)	pH
10:00	0:00	曝露区	21.4	33.1	8.8	8.6
		対照区	23.1	33.2	7.0	8.2
10:10	0:10	曝露区	21.4	33.0	7.1	8.5
		対照区	23.0	33.3	5.8	8.1
10:30	0:30	曝露区	21.5	33.0	5.8	8.4
		対照区	22.9	33.3	5.0	8.0
11:00	1:00	曝露区	21.5	32.9	6.5	8.4
		対照区	22.7	33.3	6.0	7.9
12:00	2:00	曝露区	21.5	32.9	6.7	8.2
		対照区	22.4	33.3	6.6	7.9
14:00	4:00	曝露区	21.7	32.9	6.7	8.0
		対照区	22.3	33.3	6.5	7.8
16:00	6:00	曝露区	22.0	32.9	6.7	7.8
		対照区	22.3	33.3	6.4	7.7
17:00	7:00	曝露区	22.2	32.9	6.6	7.8
		対照区	22.3	33.3	6.6	7.8
18:00	8:00	曝露区	22.3	32.9	6.7	7.8
		対照区	22.3	33.3	6.6	7.7
21:15	11:15	曝露区	22.4	32.9	6.9	7.8
		対照区	22.3	33.4	6.6	7.8
翌日 10:00	24:00	曝露区	-	-	-	-
		対照区	21.0	33.2	6.7	7.6
平均値		曝露区	21.8	33.0	6.8	8.1
		対照区	22.4	33.3	6.3	7.9
最低値-最高値		曝露区	21.4-22.4	32.9-33.1	5.8-8.8	7.8-8.6
		対照区	21.0-23.1	33.2-33.4	5.0-7.0	7.6-8.2

## 2) 試験②

曝露試験におけるへい死状況等を表 6 に示す。供試魚は, 平均全長 170 mm, 平均体重 60 g で, 曝露区③と対照区が曝露区①及び②に比べやや全長, 体重ともに小さかった。曝露区①では, 4 時間 10 分後から 6 時間 10 分後までの間に 3 尾全てがへい死した。曝露区②では, 3 時間 30 分後と 13 時間 20 分後に 1 尾ずつへい死したが, 残りの 1 尾は 24 時間生残した。曝露区③では, 23 時間経過後 1 尾が魚体を斜めに傾けることがあったが, 24 時間後まで 3 尾全て生残した。対照区は, 特に異状なく 24 時間後まで 3

尾全て生残した。曝露区のカンパチの口や鰓の開閉速度やへい死直前の様子は試験①と同様の状況を示し, 最後は口と鰓を大きく開け痙攣後へい死した。へい死魚の鰓の蛍光顕微鏡観察でも, 試験①と同様に *Dictyocha* sp. の有骨格細胞が多数付着している様子が確認された。また, SEM による観察でも, 試験①と同様な状況が確認され, 生残魚の鰓組織(図 6i-l) に比べ, 二次鰓弁が腫れて太くなり, 二次鰓弁の基部が腫れ上がって鰓弁の半分以上が消失したような鰓組織が数多く見られた(図 6e-h)。

表6 試験②における供試魚体組成及びへい死状況等

試験区 (細胞密度)	供試魚	全長(mm)	体重(g)	へい死までの曝露時間(24時間内)			へい死: 生 残 ○	へい死 率
				6時間	12時間	18時間		
曝露区① (約16,500 cells/mL)	s.①-1	172	65	■(4時間10分)			●	100%
	s.①-2	172	60	■(6時間00分)			●	
	s.①-3	173	59	■(6時間10分)			●	
	平均	172	61					
曝露区② (約11,400 cells/mL)	s.②-1	170	56	■(3時間30分)			●	67%
	s.②-2	175	71		■(13時間20分)		●	
	s.②-3	182	66				○	
	平均	176	64					
曝露区③ (約6,000 cells/mL)	s.③-1	170	62				○	0%
	s.③-2	159	51				○	
	s.③-3	171	59				○	
	平均	167	57					
対照区	c-1	162	58				○	0%
	c-2	176	67				○	
	c-3	166	52				○	
	平均	168	59					
全体平均		170	60					

曝露試験中の *Dictyocha* sp. の細胞密度の推移を表7に示す。曝露区①では、開始時が 16,500 cells/mL、供試魚全てがへい死した 6 時間 10 分後が 17,000 cells/mL と若干増加し、平均では 16,800 cells/mL であった。曝露区②では、開始時が 11,400 cells/mL、6 時間 10 分後には 12,700 cells/mL とやや増加したものの、11 時間 30 分後には開始時と同じ数値に減少後、24 時間後には 8,970 cells/mL まで減少し、平均では 11,100 cells/mL であった。曝露区③では、開始時が 6,000 cells/mL、その後 11 時間 30 分後までは 3-4 % 程度の増減があり、24 時間後には 1,700 cells/mL と開始時の 3 割程度まで減少し、平均では 4,900 cells/mL であった。

試験中の水質の推移を表8に示す。水温は試験開始直後は対照区が 19.4 °C、曝露区が約 19.6-20.3 °C であったが、時間の経過とともに差は縮まり 4 時間後には 4 試験区ともに 20 °C 台となり、その後徐々に上昇し 24 時間後には 21.7-21.8 °C と試験区間の差もほぼなくなった。塩分はともに 33 後半で差は少なく、DO は全試験区ともほぼ 6 mg/L を超え、供試魚の生存には十分な数値であった。pH は、試験当初、曝露区①-③が 8.2-8.5 で *Dictyocha* sp. の細胞密度が高い方が高かった。その後、時間の経過とともに全試験区ともに徐々に低下し、24 時間後には 7.6-7.8 前後となった。

表7 試験②の *Dictyocha* sp. の細胞密度の推移

経過時間	細胞密度(cells/mL)		
	曝露区①	曝露区②	曝露区③
開始時	16,500	11,400	6,000
6時間10分	17,000	12,700	6,230
11時間30分	-	11,400	5,760
24時間00分	-	8,970	1,700
平均値	16,800	11,100	4,900

表8 試験②の水質の推移

時刻	経過時間 (時間:分)	試験区	水温(°C)	塩分	DO(mg/L)	pH	Chl-a	備考
9:50	0:13前	曝露区①	20.3	33.9	8.8	8.5	64.2	
		曝露区②	20.0	33.7	7.8	8.4	43.9	
		曝露区③	19.7	33.6	7.2	8.2	22.5	
		対照区	19.4	33.6	7.0	8.1	0.6	
		曝露区①	20.3	33.9	7.8	8.5	66.5	
10:03	0:00	曝露区②	19.9	33.8	7.0	8.4	46.7	
		曝露区③	19.6	33.7	6.8	8.2	21.8	
		対照区	19.4	33.6	6.6	8.0	0.6	
		曝露区①	20.2	33.9	6.8	8.5	65.8	
		曝露区②	19.9	33.8	6.4	8.3	45.2	
10:13	0:10	曝露区③	19.6	33.7	6.9	8.1	21.9	
		対照区	19.4	33.6	6.1	7.9	0.7	
		曝露区①	20.2	33.9	5.7	8.4	68.5	
		曝露区②	19.9	33.8	6.0	8.2	46.9	
		曝露区③	19.7	33.7	6.1	8.1	22.5	
10:33	0:30	対照区	19.4	33.5	6.3	7.9	0.6	
		曝露区①	20.3	33.9	5.3	8.3	70.5	
		曝露区②	20.0	33.7	6.1	8.1	48.4	
		曝露区③	19.7	33.7	6.4	8.0	26.6	
		対照区	19.5	33.6	6.4	7.8	0.6	
11:03	1:00	曝露区①	20.4	33.9	5.4	8.9	81.4	
		曝露区②	20.1	33.7	6.3	8.0	51.5	
		曝露区③	19.9	33.7	6.6	7.9	26.2	
		対照区	19.7	33.5	6.7	7.8	0.8	
		曝露区①	20.4	33.9	6.5	7.9	56.6	曝露区② でへい死 時に計測
13:40	3:37	曝露区②	20.6	33.9	6.6	8.0	79.2	
		曝露区③	20.5	33.8	6.5	7.8	58.7	
		曝露区③	20.3	33.7	6.4	7.7	31.3	
		対照区	20.1	33.5	6.5	7.7	0.6	
		曝露区①	20.9	33.9	6.7	7.8	87.3	
14:03	4:00	曝露区②	20.8	33.7	6.5	7.7	59.0	
		曝露区③	20.6	33.7	6.3	7.7	32.1	
		対照区	20.4	33.5	6.5	7.7	0.7	
		曝露区①	21.2	33.8	6.4	7.7	61.0	曝露区① は3尾全て へい死の ため以後 計測せず
		曝露区②	21.0	33.7	6.3	7.6	32.3	
19:08	9:05	曝露区③	21.0	33.6	6.2	7.6	0.5	
		曝露区①	21.4	33.8	6.3	7.7	61.9	
		曝露区②	21.2	33.7	6.2	7.6	33.7	
		対照区	21.2	33.6	6.0	7.6	0.6	
		曝露区①	21.5	33.8	6.3	7.7	64.1	曝露区② で2尾目へ い死時に 計測
21:15	11:12	曝露区②	21.5	33.8	6.3	7.7	64.1	
		曝露区③	21.5	33.8	6.3	7.7	64.1	
		対照区	21.5	33.8	6.3	7.7	64.1	
		曝露区①	21.7	33.9	6.8	7.8	48.1	
		曝露区②	21.7	33.8	5.9	7.6	17.1	
23:26	13:23	曝露区③	21.8	33.6	6.1	7.7	0.6	
		曝露区①	20.4	33.9	6.6	8.4	72.9	
		曝露区②	20.6	33.7	6.5	8.0	53.2	
		曝露区③	20.3	33.7	6.5	7.9	26.2	
		対照区	20.1	33.6	6.4	7.8	0.6	
翌日 10:03	24:00	曝露区①	20.2-20.9	33.9-33.9	5.3-8.8	7.8-8.9	64.2-87.3	
		曝露区②	19.9-21.7	33.6-33.9	6.0-7.8	7.7-8.4	43.9-64.1	
		曝露区③	19.6-21.7	33.6-33.8	5.9-7.2	7.6-8.2	17.1-33.7	
		対照区	19.4-21.8	33.5-33.6	6.0-7.0	7.6-8.1	0.5-0.8	
		平均値						
最低値-最高値		曝露区①	20.2-20.9	33.9-33.9	5.3-8.8	7.8-8.9	64.2-87.3	
		曝露区②	19.9-21.7	33.6-33.9	6.0-7.8	7.7-8.4	43.9-64.1	
		曝露区③	19.6-21.7	33.6-33.8	5.9-7.2	7.6-8.2	17.1-33.7	
		対照区	19.4-21.8	33.5-33.6	6.0-7.0	7.6-8.1	0.5-0.8	

3) 細胞密度の違いによるへい死状況

試験①②で実施した曝露試験の小型魚のへい死状況を図7の生存曲線(カプラン・マイヤー法)に示す。

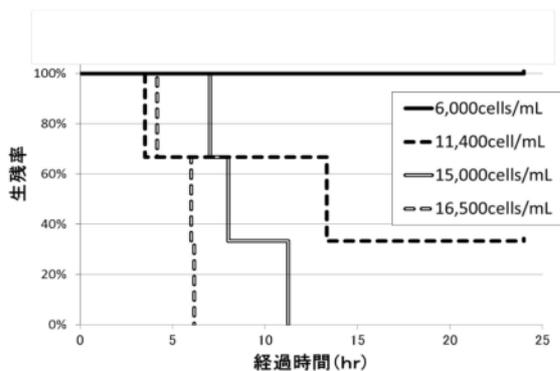


図7 *Dicytyocha* sp.の細胞密度別の小型魚生存曲線

す。*Dicytyocha* sp. の細胞密度 16,500 cells/mL (平均 16,775 cells/mL) では約 6 時間以内に 100 %へい死し, 細胞密度 15,000 cells/mL (平均 14,179 cells/mL) では, 12 時間以内に供試魚 100 %がへい死したが, 細胞密度 11,400 cells/mL (平均 11,138 cells/mL) では, 14 時間以内に 2 尾がへい死し, 残る 1 尾は 24 時間生残した。また, 細胞密度 6,000 cells/mL (平均 4,919 cells/mL) ではへい死はなかった。

3 *Dicytyocha* sp. の有骨格細胞に対する中型魚の曝露試験

1) 試験③

曝露試験におけるへい死状況等を表9に示す。供試魚は, 平均全長 486 mm, 平均体重 1,728 g と 2 の

小型魚の試験時よりかなり大型であった。対照区は曝露区に比べやや大きさにばらつきがあったが、平均の全長と体重の差は 2 %以内であった。曝露区では、2 時間 10 分後から 3 時間 34 分後までの間に 3 尾全てがへい死したのに対し、対照区は特に異状なく 24 時間後まで全て生残した。曝露区のカンパチは、試験①②同様、対照区に比べ口や鰓の開閉速度が速

く時々咳き込むような行動が見られ、試験開始後 13 分過ぎから遊泳速度が早くなり、最も小型のカンパチは 22 分後からやや暴れるような遊泳がしばしば見られるようになった。約 1 時間 30 分後から、曝露区の 3 尾は頭部や魚体の数カ所に黒い斑紋が浮き出し(対照区では見られない。)始め、3 尾とも狂奔することが多くなった。

表9 試験③における供試魚体組成及びへい死状況等

試験区 (細胞密度)	供試魚	全長(mm)	体重(g)	へい死までの曝露時間(24時間内)			へい死: ● 生残: ○	へい死 率
				6時間	12時間	18時間		
曝露区 (約5,000 cells/mL)	s①-1	521	2,010	●			100%	
	s①-2	482	1,600	●				
	s①-3	460	1,480	●				
	平均	488	1,697					
対照区	c-1	458	1,780	○			0%	
	c-2	488	1,680	○				
	c-3	508	1,820	○				
	平均	485	1,760					
全体平均		486	1,728					

1 時間 50 分後からは狂奔と横転を繰り返すようになり、1 尾は横転しながら時々細かく痙攣し始め、2 時間 10 分後にはへい死した。他の 2 尾も同様に狂奔、横転、痙攣を繰り返しながら 2 時間 30 分後及び 3 時間 34 分後にへい死した。ただ、試験①②のように、へい死直前に大きく鰓や口を開けて痙攣することはなく死後も口は閉じていた。へい死魚の鰓の蛍光顕微鏡観察の結果、鰓弁の間や鰓組織周辺に付着した粘液様物質と思われるものに *Dictyocha* sp. が数多く付着している様子が観察された。また、SEM による観察では、図 8a-c のとおり、へい死魚の場合、表面が荒れて付着物が多く、二次鰓弁は生残魚(図 8h-j)に比べ少し腫れたように厚くなっており、二次鰓弁の間に *Dictyocha* sp. の骨格が挟まっていた。

曝露試験中の *Dictyocha* sp. の細胞密度の推移を表 10 に示す。曝露区では、開始時が 5,480 cells/mL で、その後、曝露区の供試魚が全てへい死した直後の約 3 時間 35 分後まで若干減少し、概ね 5,000 cells/mL 前後、平均 5,030 cells/mL で推移した。

また、曝露試験中の水質の推移を表 11 に示す。水温は、18.8-19.5 °C (開始時は対照区が曝露区より 0.6 °C ほど低かった。), DO は 7.0-7.7 mg/L, pH は 7.4-8.0 で、対照区と曝露区の差も特になかった。

2) 試験④

曝露試験におけるへい死状況等を表 12 に示す。供試魚は、平均全長 527mm, 平均体重 2,048g と試験

③よりやや大型化した。また、平均全長、体重は、対照区の 1 尾のみが平均より全長で 22 %, 体重で 43 % 小さく、その他は全長で 8 % 以内、体重で 18 % 以内の差を示し、試験③に比べ個体差がやや大きかった。

24 時間の曝露試験の結果、曝露区①で、開始後 1 時間 30-46 分の間に 3 尾全てがへい死し、曝露区②と対照区は、24 時間中 3 尾全てが生残した。

表10 試験③の *Dictyocha* sp. の細胞密度の推移

経過時間	細胞密度(cells/mL)	
	対照区	曝露区
開始時	5,480	5,480
1時間00分	5,250	5,250
2時間00分	4,450	4,450
3時間35分	4,930	4,930
平均値	5,030	5,030

表11 試験③の水質の推移

時刻	経過時間 (時間:分)	試験区	水温 (°C)	塩分	DO (mg/L)	pH	Chl-a	備考
10:00	0:00	曝露区	19.4	34.1	7.6	8.0	29.1	
		対照区	18.8	33.8	7.6	7.7	0.3	
10:10	0:10	曝露区	19.4	34.1	7.0	7.9	30.1	
		対照区	18.8	33.9	7.2	7.6	0.4	
10:30	0:30	曝露区	19.5	34.1	7.1	7.9	28.9	
		対照区	19.0	34.1	7.5	7.6	0.4	
11:00	1:00	曝露区	19.4	34.1	7.3	7.9	28.8	
		対照区	19.0	34.3	7.6	7.6	1.3	
12:00	2:00	曝露区	19.4	34.1	7.5	7.8	28.1	
		対照区	19.0	34.2	7.6	7.6	0.8	
13:34	3:34	曝露区	19.5	34.1	7.7	7.8	29.0	13:34に1尾
		対照区	19.0	34.2	7.6	7.7	0.9	へい死
15:00	5:00	曝露区	-	-	-	-	-	曝露区は3
		対照区	19.1	34.2	7.7	7.7	3.0	尾全てへい
16:50	6:50	曝露区	-	-	-	-	-	死のためへい
		対照区	19.1	34.2	7.5	7.6	3.8	後計測無し
18:52	8:52	曝露区	-	-	-	-	-	
		対照区	19.2	34.2	7.5	7.6	4.8	
10:00	24:00	曝露区	19.4	34.2	7.3	7.4	-	
		対照区	19.4	34.1	7.4	7.9	29.0	
平均		曝露区	19.4	34.1	7.4	7.9	29.0	
		対照区	19.0	34.1	7.5	7.6	1.7	
最低値-最高値		曝露区	10.4-19.5	34.1	7.0-7.7	7.8-8.0	28.1-30.1	
		対照区	18.8-19.4	33.8-34.3	7.2-7.7	7.4-7.7	0.3-4.8	

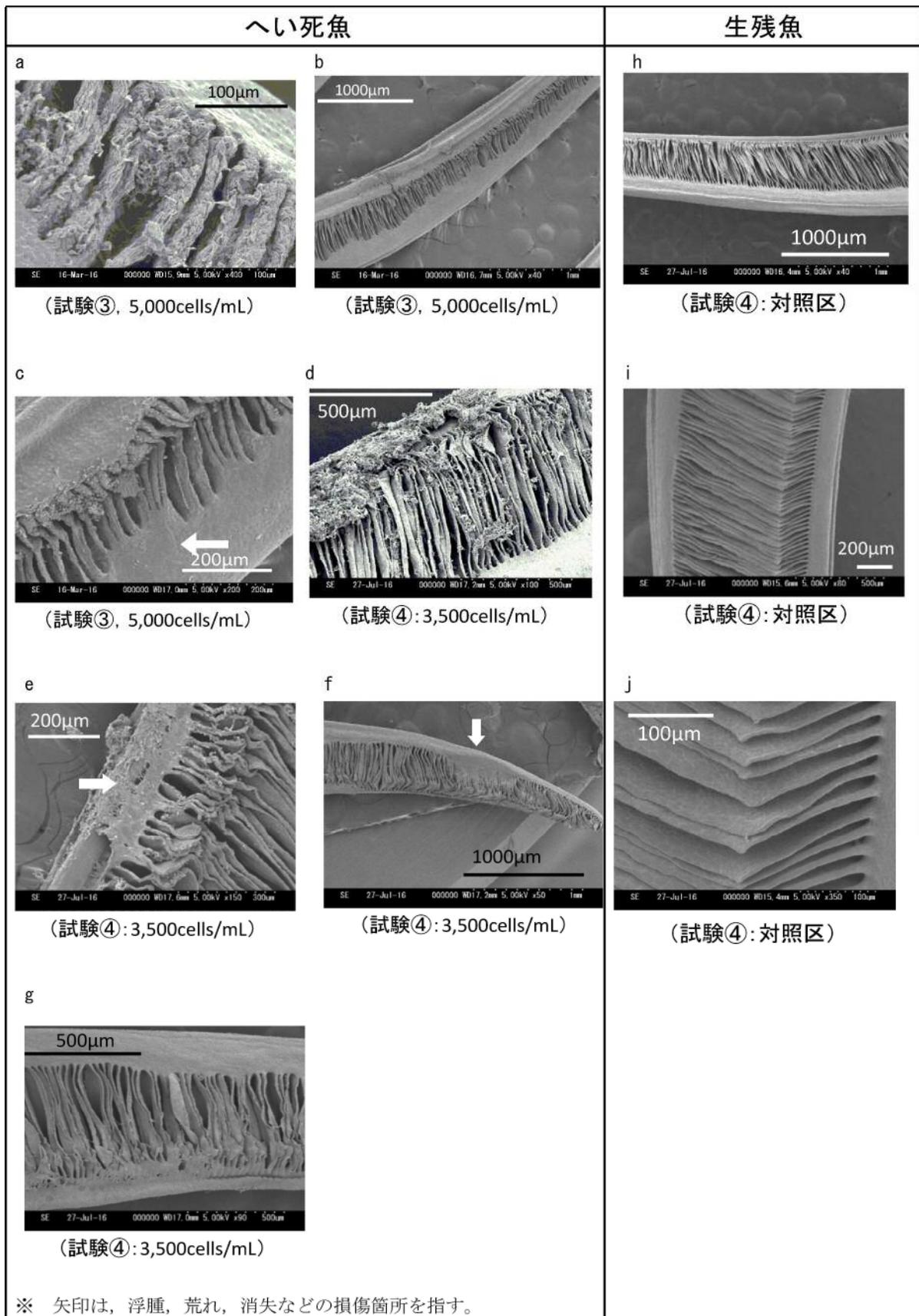


図8 試験③④におけるへい死魚及び生残魚の鰓組織のSEM観察結果

表12 試験④における供試魚体組成及びへい死状況等

試験区 (細胞密度)	供試魚	全長(mm)	体重(g)	へい死までの曝露時間(24時間内)			へい死: 生残:●:○	へい死 率
				:6	:12	:18時間		
曝露区① (約3,500 cells/mL)	s①-1	545	2,260	(1時間30分)			●	100%
	s①-2	560	2,260	(1時間43分)			●	
	s①-3	567	2,160	(1時間46分)			●	
	平均	557	2,227					
曝露区② (約1,000 cells/mL)	s②-1	530	1,860				○	0%
	s②-2	500	1,860				○	
	s②-3	563	2,380				○	
	平均	531	2,033					
対照区	c-1	552	2,400				○	0%
	c-2	410	1,160				○	
	平均	481	1,780					
全体平均		527	2,048					

曝露区①のカンパチのへい死までの行動状況を観察したところ、曝露開始数分後から、3尾とも対照区より体色が黒ずみ、前頭部が赤みを帯びて黒ずんできた。また、これまでの一連の試験でへい死した供試魚に見られたように、対照区に比べ口や鰓の開閉速度が速く、時々咳き込むような行動が見られ、曝露開始10分過ぎから、1尾は度々横転するようになった(図9)。40分ほど経過すると、残りの2尾も



図9 試験④において横転する中型魚

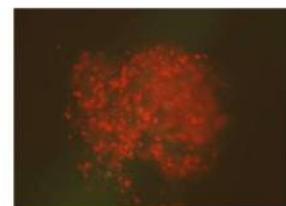
含め横転と突然の早い泳ぎを繰り返すようになり、最初に横転した1尾は腹部が黒ずみ、腹を上に向けたり痙攣や狂奔をを繰り返すようになり、1時間30分後には、呼吸(鰓蓋の開閉)が停止しへい死した。残りの2尾も、急激に弱り最初へい死した1尾と同様な状態をくり返し、その後の16分間に相次いでへい死した。なお、へい死直前は、小型魚のように鰓や口を大きく開けて痙攣することはなく、若干あえぐように少し口と鰓を開けることがあったが、へい死後は口は閉じていた。曝露区②は、当初、3尾とも対照区に比べやや体色が黒ずみ1尾の前頭部は曝露区①と同様赤黒くなった。また、尾部を水面上に上げるような態勢になったり腹部を水槽の底につけたまま泳がなくなることがあったが、8時間を過ぎた頃から体色や泳ぎも良くなり、最終的には3尾と

も生残した。今回もへい死後、鰓を採取し蛍光顕微鏡で確認したところ、図10のとおり、鰓弁の間や鰓組織周辺に付着した粘液様物質に *Dictyocha* sp. が多く絡み付いている様子が観察された。特に肉眼で鰓を観察した際に一部に黒ずんだ部分が帯状にあったが、これを顕微鏡観察すると、かなり多くの *Dictyocha* sp. が絡み付いている様子が観察された。また、SEMによる観察では、図8d-gのとおり、試験③の場合と同様の状態であった。

曝露試験中の水質の推移を表13に示す。水温は24.0-25.1℃、DOは5.1-7.0mg/L、pHは7.4-8.2程と対照区と曝露区の差も特になかった。



鰓に黒ずんだ物質が付着



蛍光照射

図10 へい死魚鰓の光学顕微鏡観察結果(試験④)

表13 試験④の水質の推移

時刻	経過時間 (時間/分)	試験区	水温 (°C)	塩分	DO (mg/L)	pH	Chl-a	備考
10:17	0:00	曝露区①	24.9	32.5	6.6	8.2	17.2	
		曝露区②	25.0	32.2	6.2	8.0	4.3	
		対照区	25.1	32.2	6.6	7.9	0.5	
10:27	0:10	曝露区①	24.9	32.5	5.5	8.1	17.5	
		曝露区②	25.0	32.2	5.2	7.8	4.2	
		対照区	25.1	32.2	6.4	7.7	0.4	
10:47	0:30	曝露区①	24.9	32.5	5.1	7.9	16.2	
		曝露区②	25.0	32.2	5.4	7.6	5.0	
		対照区	25.1	32.2	6.6	7.7	0.6	
11:17	1:00	曝露区①	24.9	32.5	6.0	7.8	16.3	
		曝露区②	24.9	32.2	5.4	7.4	4.5	
		対照区	25.0	32.2	6.7	7.6	0.3	
11:47	1:30	曝露区①	24.9	32.5	6.3	7.7	17.1	曝露区①
		曝露区②	24.9	32.2	5.6	7.4	5.2	で経けて3
		対照区	25.0	32.1	6.7	7.5	0.5	尾へい死
12:17	2:00	曝露区①	—	—	—	—	—	
		曝露区②	24.9	32.2	5.8	7.3	4.9	
		対照区	24.9	32.1	6.8	7.5	0.5	
14:17	4:00	曝露区①	—	—	—	—	—	
		曝露区②	24.8	32.2	5.9	7.4	4.5	曝露区①
		対照区	24.8	32.2	6.8	7.6	0.5	は3尾全て
16:17	6:00	曝露区①	—	—	—	—	—	
		曝露区②	24.7	32.2	6.1	7.4	4.7	へい死した
		対照区	24.6	32.2	6.9	7.5	0.5	ため、以後
18:17	8:00	曝露区①	—	—	—	—	—	水質測定
		曝露区②	24.6	32.3	6.2	7.4	4.8	無し
		対照区	24.5	32.2	7.0	7.6	5.7	
10:17 (空白)	24:00	曝露区①	—	—	—	—	—	
		曝露区②	24.0	32.3	6.3	7.5	2.1	
		対照区	24.0	32.2	7.0	7.5	2.2	
平均		曝露区①	24.9	32.5	5.9	7.9	16.9	
		曝露区②	24.8	32.2	5.8	7.5	4.4	
		対照区	24.8	32.2	6.7	7.6	1.2	
最低値-最高値		曝露区①	24.0-24.9	32.5-32.5	5.1-6.6	7.7-8.2	16.2-17.5	
		曝露区②	24.0-25.0	32.2-32.3	5.2-6.3	7.3-8.0	2.1-5.2	
		対照区	24.0-25.1	32.1-32.2	6.4-7.0	7.5-7.9	0.3-0.7	

曝露試験中の曝露区①の *Dictyocha* sp. 細胞密度の推移を表 14 に示す。曝露開始直前から最初に供試魚がへい死するまでの約 1 時間 30 分間に、若干減少傾向も見られたが、概ね 3,500 cells/mL 前後、平均 3,540 cells/mL で推移した。曝露区②も減少傾向を示し、8 時間後には開始時の 6-7 割ほどの 798 cells/mL、24 時間後には極端に減少し 19 cells/mL となり、8 時間までの平均は 1,090 cells/mL であった。なお、曝露区①については、供試魚が全てへい死した 1 時間 45 分後以降曝露を止め止水状態となっていたが、約 7 割程度は残っていた。

表14 試験④の *Dictyocha* sp.の細胞密度の推移

経過時間	細胞密度 (cells/mL)	
	曝露区①	曝露区②
開始時	3,670	1,280
1時間30分	3,410	1,190
8時間00分	—	798
24時間00分	—	19
平均値*	3,540	1,090

※ 平均値は8時間以内の数値の平均

### 3) 細胞密度の違いによるへい死状況

試験③④で実施した曝露試験の中型魚のへい死状況を図 11 の生存曲線(カプラン・マイヤー法)に示す。*Dictyocha* sp. の細胞密度 5,000 cells/mL (平均 5,025 cells/mL) で、供試魚 3 尾全てが 2-3.5 時間ほどでへい死し、細胞密度 3,500 cells/mL (平均 3,540 cells/mL) では 2 時間以内に 3 尾全てがへい死したが、細胞密度 1,000 cells/mL (平均 1,090 cells/mL) では 24 時間 100 % 生残した。

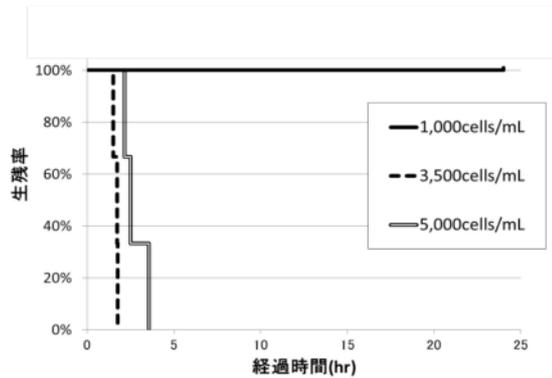


図11 *Dictyocha* sp. の細胞密度別の中型魚生存曲線

### 4 へい死状況の解析 (魚体とへい死状況の関係)

試験①-④の結果から、小型魚及び中型魚のへい死までの時間と細胞密度及び魚体重の関係を調べたところ、図 12 に示すとおり、小型魚より魚体重の重い中型魚の方が、より低い細胞密度でより短時間にへい死する傾向が見られた。また、中型魚における魚体重とへい死までの時間の関係については、図 13 に示すとおり、魚体重が重いほど短時間でへい死する傾向が見られた。

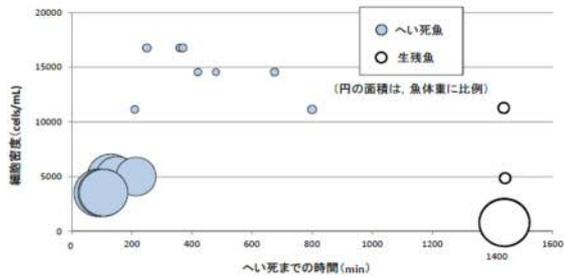


図12 魚体重別の細胞密度とへい死までの時間の関係

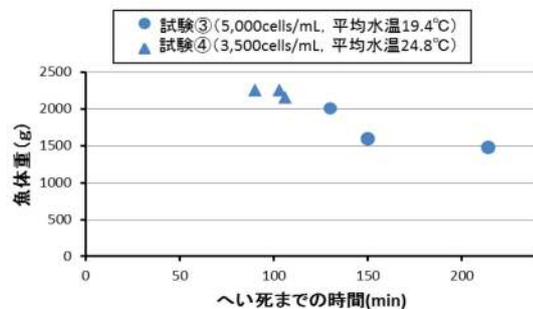


図13 魚体重とへい死時間との関係(試験③④)

## 考 察

## 1 Dictyocha sp. の有骨格細胞の培養

本研究の結果、本種の継代培養及び一定規模(20,000-30,000 cells/mL程度)までの大量培養は可能になった。その要因の一つとして、培地を、改変 f2 培地と Si 強化 PES 培地とを 1:1 で混合したものにしたことが考えられるが、混合前の両培地の成分や量(表 1)は類似した部分が多いものの互いに欠く元素もある。改変 f2 培地にのみある元素は、Se ( $H_2SeO_3$  中)及び Mo ( $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$  中)であり、Si 強化 PES 培地にのみ含まれる元素は、Si(けい酸ナトリウム溶液希釈液中)及び B ( $H_3BO_3$  中)であることから、これらの 4 元素が一定量混在することが必要である可能性が考えられた。その他、培養条件が変わると、無骨格細胞が出現する場合があることから、有骨格細胞のみ培養する際は、培養条件の安定化に努めるとともに、本種の増殖条件をさらに詳細に調べることでより効率的で確実な培養方法を確立する必要がある。また、無骨格細胞の出現に関しては、今後、これまでの試験内容を精査するとともに、さらに試験を重ねることで、有骨格及び無骨格細胞それぞれ単独の安定的な培養方法確立へつながらと考える。なお、本種の同定に関しては、*Dictyocha* sp. としているが、今後、さらに種小名まで特定されることが望まれる。

## 2 最低致死細胞密度

曝露試験中の水質は、いずれの試験区においても、供試魚の生存に影響ない範囲で推移し、対照区と曝露区で大きな違いは見られなかったことや、供試魚の健康状態についても問題はなかったことから、*Dictyocha* sp. の有骨格細胞の他に供試魚のへい死に関与したと考えられる要因は見当たらない。よって、以下に、*Dictyocha* sp. の有骨格細胞の養殖カンパチに対する最低致死細胞密度について考察する。

### 1) 小型魚の場合

試験①②の結果から、細胞密度が高いほどへい死までの時間が短く、魚毒性が強かったことが示され、平均細胞密度 11,100 cells/mL ではへい死が見られたが 4,920 cells/mL ではへい死は見られなかったことから、24 時間以内の最低致死細胞密度の閾値は、4,920 cells/mL から 11,140 cells/mL の間にあると推察される。また、今後、より精密に最低致死細胞密度を求めるためには、細胞密度約 5,000 から 11,000 cells/mL の間の細胞密度による曝露試験が必要である。

### 2) 中型魚の場合

試験③④の結果から、平均細胞密度 3,540 cells/mL で 2 時間以内に 3 尾全てがへい死し、平均細胞密度 1,090 cells/mL では 24 時間で 100% 生残したが、試験④では、曝露開始後 8 時間までは 1,000 cells/mL 前後を維持したものの、8 時間以降は細胞密度が著しく低下したことから、供試魚のダメージが回復した可能性も考えられた。以上の結果から、中型魚に対しては、*Dictyocha* sp. の最低致死細胞密度の閾値は、8 時間以内において 1,090 から 3,540 cells/mL の間にあると推察される。なお、試験④での細胞密度の低下の原因については、約 1 時間経過した時点で当該試験区の曝露海水の DO が 5 mg/L を下回ったことから、他の試験区より微細な気泡が発生するエアーストーンを用いたエアレーションを強めたが、*Chattonella antiqua* など本種とは分類の異なるラフィド藻綱の細胞は、細胞壁等の外皮構造を持たないため壊れやすく<sup>8)</sup>、通気による刺激で *C. antiqua* の細胞の変形、破壊等が発生する可能性を考慮し、通気量を制限した報告<sup>9)</sup>もあることから、微細な気泡による *Dictyocha* sp. 細胞の活力低下の可能性も考えられた。

### 3) 魚体の大きさと最低致死細胞密度の関係

小型魚の曝露試験では、*Dictyocha* sp. の最低致死細胞密度の閾値は、4,920 cells/mL から 11,140 cells/mL の間にあると推定されたのに対し、体重は小型魚の約 30 倍であった中型魚の試験では、1,090 cells/mL から 3,540 cells/mL の間にあると推察されたことや、中型魚の試験でへい死した供試魚は、体重の重い方から順にへい死(図 12)し、さらに、試験③では平均体重 1,728g の供試魚が、細胞密度約 5,000 cells/mL で 2-3.5 時間ほどで供試魚 3 尾全てがへい死したのに対し、試験④では、さらに大きい平均体重 2,048 g の中型魚が、細胞密度約 3,500 cells/mL と試験③より低密度であったにもかかわらず、さらに早い 2 時間以内に 3 尾全てがへい死したことから、カンパチ人工種苗の場合、魚体が大きくなるにつれて *Dictyocha* sp. 赤潮に対する耐性が低くなる傾向が示された。ただし、図 13 に示すとおり、試験④の場合、試験③の場合と比べ、試験区の水温が約 5-6℃高かったことから、その影響も考えられるため、今後、水温条件を同一にして確認する必要がある。また、漁業者が現場で本種赤潮への対策を講じるためには、今後、さらに大型の出荷サイズの魚体に対する最低致死細胞密度も確認する必要がある。

### 3 本種赤潮によるへい死機構

折田ら<sup>10)</sup>は, 細胞密度を 2,200cells/mL とした *C. antiqua* 培養株の赤潮海水に対する養殖ブリの当歳魚 (平均体重 800g) の曝露試験を実施した際, ブリのへい死までの行動を観察した結果, 鰓蓋の開閉運動が速くなったり, 狂奔遊泳や横転と痙攣を繰り返す状況を確認しているが, 本研究においても, いくつか共通する行動状況が確認された。

また, 鰓の蛍光顕微鏡観察で, へい死魚の鰓には, 鰓弁の間や鰓組織周辺に付着した粘液様物質に, *Dictyocha* sp. の骨格や細胞質が多数付着しているのが観察 (図 5) されたのに対し, 対照区の生残魚の鰓には, 粘性様物質や *Dictyocha* sp. は確認されなかったことや, SEM 観察 (図 6, 8) でも, へい死魚の鰓には, 付着物が多く二次鰓弁の隙間などに *Dictyocha* sp. の骨格が多く挟まっていたのに対し, 生残魚の鰓組織には, 付着物や *Dictyocha* sp. の骨格が認められなかったことから, 鰓に付着した *Dictyocha* sp. が, 鰓の機能に何らかの影響をきたし粘液等の過剰な分泌を促進した可能性が示唆された。

さらに, SEM によるへい死魚の観察 (図 6, 8) から, 一次鰓弁や二次鰓弁の表面が損傷を受け, 一次鰓弁の上皮細胞が伸長し二次鰓弁の半分以上あるいは一部が消失するとともに, 二次鰓弁は, 正常なものより厚く肥大した様子が多数見られたのに対し, 生残魚の場合, 二次鰓弁は薄く規則正しくきれいに並び, 両側の縁の上皮細胞まで十分に切れ込んでおり, 海水のろ過面積は十分確保されていたと考えられ, へい死魚の鰓弁と大きく異なっていた。折田ら<sup>11)</sup>は, 有害ディクチオカ藻 *Pseudochattonella verruculosa* 赤潮のブリに与える影響について曝露試験を実施した際に, へい死魚の鰓組織を SEM により観察したところ, 一次鰓弁の上皮細胞の伸長や二次鰓弁の肥大によるその隙間の閉塞などがみられたことを報告しているが, 本試験においても同様の状況が確認された。

以上のことから, へい死の主な要因は, 鰓組織の損傷やガス交換を担う組織である二次鰓弁の面積の減少などで, 鰓弁の機能が低下し呼吸不全に至った窒息死であると推察される。

なお, 曝露試験中の水質や供試魚の健康状態は, 供試魚の鰓に対し問題はないものと考えられ, その他にも供試魚の鰓組織の損傷に関与したと思われる要因は考えられないことから, これらの鰓組織の損傷は, *Dictyocha* sp. の有骨格細胞の存在が主要因と考えられる。

赤潮生物による鰓組織の損傷機構については, ショットネラ (*Chattonella*) が大量に生産する活性酸素が魚類の鰓組織を損傷し, 粘液様物質を大量に生産させて死に導くという証拠を蓄積しつつあるとの報告<sup>12-15)</sup>がある。本種においても同様の損傷機構を有するのか, 今後さらなる研究が必要である。

今後は, 本種の無骨格細胞により養殖クロマグロがへい死したと推察される事例があることから, 無骨格細胞の魚毒性も確認する必要がある。また, 本種の培養株と天然株との毒性の違いや, 対象魚が人工種苗か天然種苗かによる本種赤潮に対する耐性の違いの検討も今後の課題として残されている。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり, 使用した *Dictyocha* sp. の培養株の同定や改変 f2 培地の組成情報の提供と作製に関して, 国立研究開発法人水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所の坂本節子博士にご指導, ご助言をいただいた。また, 公益財団法人かごしま豊かな海づくり協会の役職員の皆様には, 曝露試験に供したカンパチ稚魚をご提供いただいた。これらの方々には多大なるご協力をいただき, 心から感謝の意を表す。

## 文 献

- 1) 平成 4 年 九州海域の赤潮. 水産庁九州漁業調整事務所, 福岡, 1993.
- 2) 平成 27 年 九州海域の赤潮. 水産庁九州漁業調整事務所, 福岡, 2015.
- 3) 品田晃良, 川尻敏文. 2004 年に能取湖で大増殖した珪質渦鞭毛藻について (短報). 北海道立水産試験場研究報告 2005; 69: 159-161.
- 4) 坂本節子, 外丸裕司. ①カレニア属等有害赤潮鞭毛藻の簡易検出, 同定・定量法の開発. 平成 28 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, 2017; 137-148.
- 5) Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husttedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 1962; 8: 229-239.
- 6) Guillard, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding

- marine invertebrates. pp In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York. 1975; 26- 60.
- 7) 有賀祐勝, 井上 勲, 田中次郎, 横濱康繼, 吉田忠生. 藻類学実験・実習. 株式会社 講談社, 東京. 2000; 170-171.
  - 8) 今井一郎. ラフィド藻類における分類と同定の問題点—生態研究の立場から—. 日本プランクトン学会報 2000; 47(1): 55-64.
  - 9) 西 広海, 田原義雄, 徳永成光, 久保 満, 吉満 敏, 中村章彦. 短報 *Chattonella antiqua* 赤潮の養殖ブリに対する影響—養殖ブリに対する暴露試験—. 鹿児島県水産技術開発センター研究報告. 2013; **3**: 34-36.
  - 10) 折田和三, 西 広海, 田原義雄, 中村章彦. 赤潮総合対策調査事業—V (赤潮被害防止緊急対策事業). 平成 23 年度鹿児島県水産技術開発センター事業報告書 2012; 110-123.
  - 11) 折田和三, 西 広海, 田原芳雄, 徳永成光, 中村章彦. 2012 年 2 月山川湾で発生した有毒ダイクチオカ藻 *Pseudochattonella verruculosa* 赤潮の発生とブリに与える影響. 鹿児島県水産技術開発センター研究報告. 2013; **4**: 17-23.
  - 12) 今井一郎. 「シャットネラ赤潮の生物学」生物研究社, 東京. 2012; 31-34.
  - 13) Tanaka, K., Muto,Y. and Shimada, M. Generation of superoxide anion radicals by the marine phytoplankton organism,*Chattonella antiqua*. *J.Plankton Res.*, 1994; **16**: 161- 169
  - 14) Ishimatsu, A., Sameshima, M., Tamura, A. and Oda, T. Histological analysis of the mechanisms of *Chattonella*-induced hypoxemia in yellowtail. *Fish. Sci.*, 1996; **62**: 50-58.
  - 15) Marshall, J. A., M. de Salas, T. Oda and G. M. Hallegraeff Superoxide production by marine microalgae. I. Survey of 37 species from 6 classes. *Mar. Biol.*, 2005; **147**: 533- 540.