

大阪湾圏域の海域環境再生・創造に関する 研究助成制度（令和3年度実施）成果発表会

大阪湾広域臨海環境整備センター

事務局：特定非営利活動法人 瀬戸内海研究会議

令和4年4月27日（水） 13：30～16：30

三宮研修センター 8階 805号室

目 次

1. 流域圏の土地利用変遷および洪水流出を考慮した大阪湾への長期栄養塩流出量の推定（その3）	
齋藤 光代 岡山大学 学術研究院 環境生命科学学域	1
2. 都市系面源由来マイクロプラスチックの海域への負荷量推定（その2）	
中尾 賢志 大阪市立環境科学研究センター	5
3. 大阪湾における劣化指標に基づいた微小マイクロプラスチック生成ポテンシャル評価手法の開発	
雪岡 聖 京都大学大学院 地球環境学堂	9
4. 大阪湾から発見された寄生生物が麻痺性貝毒原因プランクトンのブルーム動態へ与える影響の解明（その2）	
西谷 豪 東北大学 農学部	13
5. 赤潮形成を促進する海洋細菌の単離同定と、赤潮動態予測法の開発（その3）	
植木 尚子 岡山大学 資源植物科学研究所	17
6. DNAメタバーコーディングによる大阪湾の動物プランクトンモニタリング手法の開発（その3）	
梅原 亮 広島大学 環境安全センター	21

流域圏の土地利用変遷および洪水流出を考慮した 大阪湾への長期栄養塩流出量の推定（その3）

代表研究者：齋藤光代（岡山大学学術研究院環境生命科学学域・准教授）

共同研究者：王 崑陽（広島大学大学院総合科学研究科・博士後期課程）

川口智弥（岡山大学環境理工学部・学部4回生）

〔研究目的〕

大阪湾に対する栄養塩流出量の長期変遷については、これまで原単位法¹⁾や公共用水域調査結果に基づく推定²⁾が行われてきたが、最も汚濁が顕著であったと考えられる1960～70年代に洪水時を含めてどの程度の栄養塩が大阪湾に流出したかは従来明らかにされておらず、また、土地利用の変化にともなう栄養塩負荷の起源や供給域の変化に関する解析も不十分である。そこで本研究では、大阪湾に流入する一級河川の一つである大和川流域を対象とし、準分布型水文水質モデル（SWAT）を用いて実測データの整備が不十分な1970年代以前の栄養塩流出量を復元し、過去50年間を超える長期的な変化を推定することを目的とし、最終年度の3年目は、（1）洪水時を含む高頻度の栄養塩実測濃度データを蓄積し、それらの結果を基に（2）大和川の支流域スケールでの水・栄養塩流出量とその空間的特性を明らかにし、さらに（3）大和川本流スケールでの大阪湾への水・栄養塩流出量を高時間分解能（週～時間単位）で推定した。

〔研究方法〕

1. **対象地域**：大和川は奈良盆地および大阪府南部を集水域とし、流域面積は1,077km²、本流の流下距離は68km、流域の年平均降水量は1,300mmである（図-1(a)）。大和川では1970年代に最も汚濁が深刻であったとされるが、近年は環境基準値を下回るまでに回復してきている。また、1970～2010年代にかけての

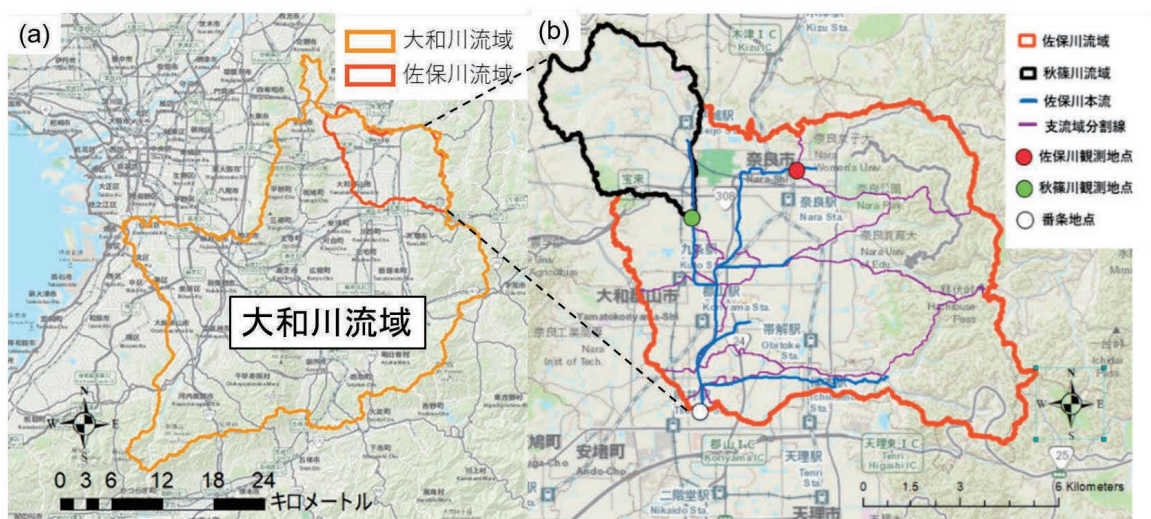


図-1 大和川流域と佐保川流域の位置(a)および佐保川における観測地点（佐保川観測地点、秋篠川観測地点、番条地点）の位置(b)

土地利用変化をみると、特に堺市および奈良市を中心に農地（主に水田）から都市への変化が最も著しい³⁾。一方で、主要な土地利用の一つは森林であり、流域の約 40%を占めている。また、特に洪水時の時間単位での水位、流量、および水質の変化を確認するため、調査対象として、大和川の支川の一つである佐保川を設定した（図-1(b)）。佐保川流域は大和川流域の北東部に位置し、流域面積は 129km²で大和川流域の約 12%を占め、流路延長は 19km である。また、土地利用は、水田が 15.6%、畑地が 1.4%、森林が 32.6%、市街地（建物用地、道路・鉄道、その他の用地の合計）が 45.5%であり、流域に占める土地利用の割合としては市街地が最も大きく、次いで森林、農地の順となっている。佐保川の支流域（佐保川観測地点流域および秋篠川流域）2 地点において（図-1(b)）、後述する現地観測を実施した。流域に占める土地利用の割合として、前者は森林、後者は市街地が最も大きくなっている。また、佐保川流域全体での下水道整備率は約 90%であるが、佐保川観測地点流域などでは、一部下水道が未整備の地域も含まれている。

2. 高頻度現地観測データの採取および試料分析：国交省による水質データを補完するため、大和川本流の堺、大和川の支流の佐保川および秋篠川の 3 地点において、週 1 回の頻度で採水を実施した。また、洪水時を含むモニタリングとして、佐保川観測地点（図-1(b)）において水圧センサーおよび濁度計を河床に設置し、河川の水位および濁度を 10 分間隔でモニターするとともに、水位の異なる時期に流量の計測を実施し、水位－流量関係式（H-Q 式）を作成した。また、2020 年 7 月から 2021 年 10 月にかけて発生した複数回の降雨イベント時に現地での集中観測を実施し、流量の計測に加えて数時間おきに採水を実施した。現地で採取した水試料については、栄養塩自動分析装置により溶存無機態窒素（硝酸態窒素：NO₃-N、亜硝酸態窒素：NO₂-N、アンモニア態窒素：NH₄-N）および溶存無機態リン（PO₄-P）の定量分析を行った。また、洪水時の水試料については、硝酸（NO₃⁻）の窒素安定同位体比（δ¹⁵N）、懸濁物質（Suspended Solids: SS）濃度、および懸濁態有機物（Particulate organic Matter: POM）の窒素・炭素量および窒素・炭素安定同位体比（δ¹⁵N、δ¹³C）の分析も行った。

3. 水文水質モデル解析：大和川流域から大阪湾への長期栄養塩流入量を推定するにあたり、準分布型流域水文水質モデルである SWAT（Soil and Water Assessment Tool）⁴⁾を使用した。大和川流域全体における水文応答単位（Hydrologic Response Units: HRU）は 3,300 個に、小流域は 51 個に設定した。佐保川流域については、HRU を 473 個、小流域を 11 個とした。各種パラメータのキャリブレーションは SWAT-CUP を使用して SUFI2 法によって行い、キャリブレーションの可否は Nash-Sutcliffe efficiency (NSE)、Percent bias (PBIAS)、および RMSE-observations standard deviation ratio (RSR)の指標を用いて評価した⁵⁾。なお、①支流域（佐保川）スケールでの解析は、佐保川観測地点および番条地点（図-1(b)）における日単位流量および NO₃-N 流出量変化、また、②佐保川流域の支流域単位での NO₃-N 流出量の空間分布について実施した。また、

大和川本流スケールでの解析は、①比較的大規模な降雨イベントが発生した2014年、2016年、および2018年を対象とした日単位および時間単位での流量変化の再現と比較、②大和川下流の国土交通省遠里小野橋観測所、および本研究における堺採水地点（遠里小野橋観測所のごく近傍）における栄養塩濃度データ（遠里小野橋観測所：月1回、堺観測地点：週1回の頻度）を用いた、2009年～2021年における日単位 $\text{NO}_3\text{-N}$ 流出量の推定と比較を行った。

〔結果と考察〕

(1) 洪水時を含む流量、栄養塩濃度および窒素安定同位体比の変化：本流下流部

（堺）、支川の佐保川および秋篠川における約1週間間隔での栄養塩濃度の変化に加え、佐保川において洪水時の集中観測を実施し、河川水位と流量の関係式（H-Q式）を構築するとともに、洪水イベント期間中の栄養塩濃度の数時間単位での変動を確認した（図-2）。以上の結果は、従来の月1回～数か月に1回の頻度の水質測定では捉えられないものであり、特に、洪水時の流量増加に対応する濃度変化の把握は、栄養塩流出量の推定精度向上に大きく貢献した。また、窒素安定同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ ）の結果から、平水時と降雨時とでは、河川への窒素供給源が変化していることが示唆された。

(2) 支流域スケールでの日単位流量・

栄養塩流出量の推定：佐保川流域を対象に、洪水時を含む高頻度かつ長期の実測データを用いて SWAT モデルの検証を行い、洪水の影響を考慮した日単位での流量および栄養塩（ $\text{NO}_3\text{-N}$ ）流出量評価が可能となった。特に、下水道で処理されずに直接河川へ流入する $\text{NO}_3\text{-N}$ のインプット量を考慮した結果、日単位 $\text{NO}_3\text{-N}$ 流出量を高い精度で再現することに成功し、未処理排水経由の $\text{NO}_3\text{-N}$ 負荷の存在が本解析結果からも裏付けられた（図-3）。

(3) 支流域スケールでの栄養塩流出量の空間的特性評価：佐保川流域をさらに11の支

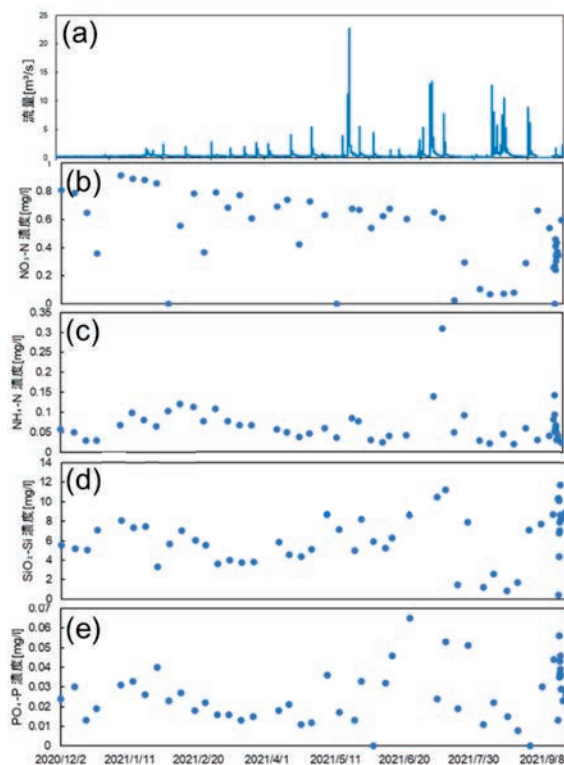


図-2 佐保川実測地点における河川流量 (a)、栄養塩濃度 (b: $\text{NO}_3\text{-N}$, c: $\text{NH}_4\text{-N}$, d: $\text{SiO}_2\text{-Si}$, e: $\text{PO}_4\text{-P}$) の変化

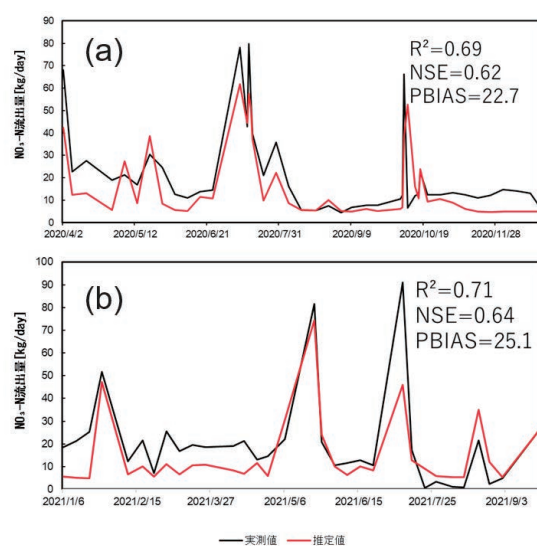


図-3 佐保川観測地点における日単位 $\text{NO}_3\text{-N}$ 流出量のキャリブレーション(a)およびバリデーション結果(b)

流域に分割して支流域ごとの $\text{NO}_3\text{-N}$ 流出量を推定し、その空間的な特性を把握した結果、特に農地（水田）の多い支流域で $\text{NO}_3\text{-N}$ 流出量が大きく、従来は脱窒による $\text{NO}_3\text{-N}$ の浄化に寄与すると認識されてきた水田が、下水道整備が進んだ地域では $\text{NO}_3\text{-N}$ の負荷源になっていることが明らかになった。また、前述した未処理の排水も、負荷の要因となっていることが空間的にも確認できた。

(4) 大和川本流スケールにおける流量の高時間分解推定および検証：SWAT を用いて、比較的大規模な降雨イベントが発生した 2014 年、2016 年、および 2018 年における日単位および時間単位での流量解析を実施した結果、時間単位の推定では、特に洪水時のピークの再現性が大幅に向上し、水収支の内訳では、降水量に対する河川流出量、特に表面流出量の割合が増加し、降雨後の流出をより精度良く推定できることが確認された。

(5) 大和川本流スケールにおける栄養塩流出量の高時間分解推定および検証：SWAT を用いて、2009～2021 年の期間を対象に従来の月単位および本研究による週単位での栄養塩濃度データを用いた $\text{NO}_3\text{-N}$ 流出量の推定を実施した結果、週単位での推定結果のほうが、月単位での結果を全体的に上回り、特に、日最大流出量については 2 倍以上の差があった（図-4）。これらの結果から、本研究で新たに取得した高頻度の栄養塩濃度を用いて構築したモデルにより、従来よりも高精度で大阪湾への $\text{NO}_3\text{-N}$ 流出量を推定することが可能となった。

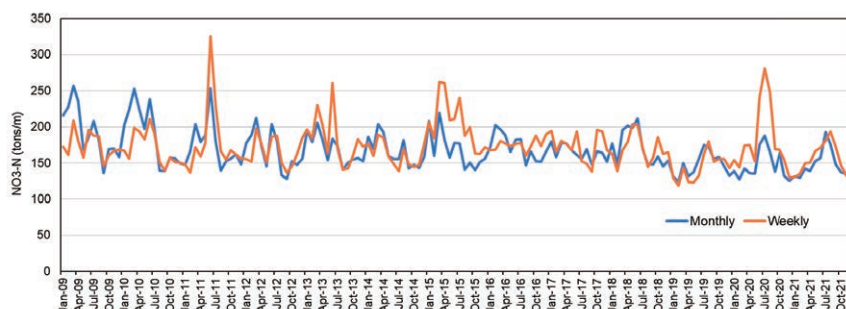


図-4 大和川下流における月単位および週単位の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を用いた流出量の推定結果

謝辞

本研究の実施にあたり、現地での高頻度採水には佐保川清掃対策委員会の皆様、秋篠川桜の会の皆様、および雑魚寝館の亀井館長と採水チームの皆様にご協力をいただき、SWAT モデルの解析に用いた流域下水道データについては、奈良県流域下水道センターおよび大阪府南部流域下水道事務所よりご提供をいただきました。以上を記し、深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 中辻啓二ほか（2003）大阪湾における汚濁負荷量の総量規制施策が水質保全に与えた効果の科学的評価．土木学会論文集，741，VII-28，69-87．
- 2) 中谷祐介ほか（2011）大阪湾に流入する陸域負荷の実態・変遷と海域環境の変化．土木学会論文集 B2（海岸工学），67(2)，I_886-I_890．
- 3) Wang, K., et al. (2022) Evaluation of nitrogen loading in the last 80 years in an urbanized Asian coastal catchment through the reconstruction of severe contamination period. Environmental Research Letters, 17, 014010, <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac3ced>.
- 4) SWAT (Soil & Water Assessment tool) (<https://swat.tamu.edu/>)（2021.3.13 閲覧）
- 5) Moriasi, D., et al. (2007) Model evaluation guidelines for systematic quantification of accuracy in watershed simulations. Transactions of the ASABE, 50, 3, 885-900.

都市系面源由来マイクロプラスチックの海域への負荷量推定（その2）

○中尾賢志¹⁾，秋田耕佑¹⁾，浅川大地¹⁾，尾崎麻子²⁾，榊元慶子³⁾，奥田哲士⁴⁾

1) 大阪市立環境科学研究センター

2) (地独) 大阪健康安全基盤研究所

3) 大阪公立大学

4) 龍谷大学

1. 本研究の目的

マイクロプラスチック（以下，MPs）は 5 mm 未満の微少なプラスチックのことで POPs（Persistent Organic Pollutants：残留性有機汚染物質）を吸着・吸収することから，その環境中の動態について多くの研究がなされている。これまで海域への MPs 供給は沿岸域で漂着ごみ中のプラスチックごみが紫外線や波浪といった物理的な力により微細化するという説明がなされてきたが，河川や下水から MPs が検出されることから陸域でも風雨や紫外線によって建物敷地や道路上等に放置されたプラスチック製品が微細化し，MPs 化することが指摘されている。MPs の海洋調査により海洋中の MPs（300 μm 以上）の総量は 51 兆個とされている。しかし，近年の全球的な調査によってこの総量は全体の 1%と言われており，残りの 99%は行方不明である「ミッシングプラスチック」と呼ばれている。この原因として，主として海洋での MPs 研究は海洋表層を対象としていること，および海洋表層での MPs の採取は 300～350 μm の目開きのプランクトンネットが用いられることが多く，それよりも小さい MPs の把握がなされていないことが考えられる。また，陸域起源の MPs がミッシングプラスチックにどの程度寄与しているかといったデータは今後の海洋中 MPs の総量予測に寄与すると考えられる。そこで本研究は比較的 MPs 負荷が高いであろう都市域からの 10 μm 以上の MPs の海域への負荷量を推定することを目的とする。

2. 実験材料および方法

2.1 調査フィールドの選定

調査フィールドは大阪市全域とした。北部には神崎川と新淀川が東から西へ流下し，南部の大和川も同様に東から西へ流下している。

2.2 試料採取

2.2.1 河川水

大阪市内河川上流域 3 地点，下流域 3 地点を選定（図 1）し，令和 3 年 8 月 12 日（降水量 54.0 mm），9 月 11 日（降水量 16.0 mm），10 月 9 日（降水なし），11 月 22 日（降水量 33.5 mm）に採水した。大阪市内河川は感潮河川であるので，海水の影響を最小限にするためにいずれ

の採水日も干潮になる前，つまり順流時に採水した。
また，晴天や雨天に関わらずに採水をおこなった。

2.2.2 降下ばいじん

大阪市内の3地点（1．出来島小学校（採取高度約3 m），2．聖賢小学校（採取高度約16 m），3．大阪市立環境科学研究センター（以下，当センター：採取高度30m））を選定（図2）して降下ばいじんを採取した。採取にはダストジャーを用いたそれぞれの採取場所での採取期間を（表1）に示す。

2.3 MPsの検出

2.3.1 河川水試料

試料2 mLを300 mLのビーカーにとり，30%過酸化水素200 mLを加えた。過酸化水素と有機物の反応中はほこりの混入を防ぐためにビーカーにアルミ箔を被せ，反応が終了するまで放置した。反応終了後，反応液を直径8 mm，目開き10 μ mの円形ニッケル製フィルターを用いてアスピレーターにより吸引ろ過した。本ろ過システムによるフィルター上の捕捉範囲は直径4 mmの円形である。ろ過後のフィルター（写真1）はほこりの混入を防ぐため蓋付きシャーレ内に保管し，室温にて乾燥させた。ブランク（空試験）は河川採取時からのトラベルブランクで，抽出工程は蒸留水2 mLを用いて上記と同様の操作を行った。

2.3.2 降下ばいじん試料

今回採取した降下ばいじんは全て雨水を含んでいた。雨水とダストジャー洗浄水（ブランク）を目開き20 μ mの円形ニッケル製フィルターを用いてアスピレーターにより吸引ろ過した。ろ過作業以降は2.3.1と同様におこなった。

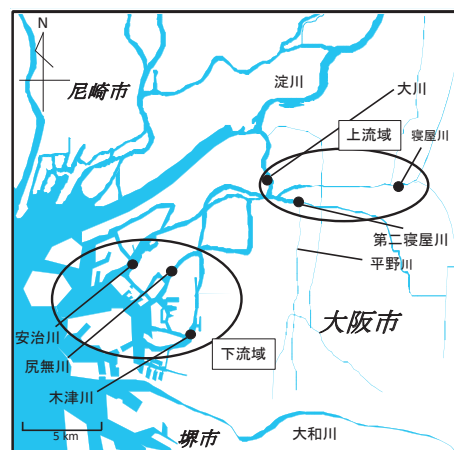


図1 大阪市内河川 採取地点（●）

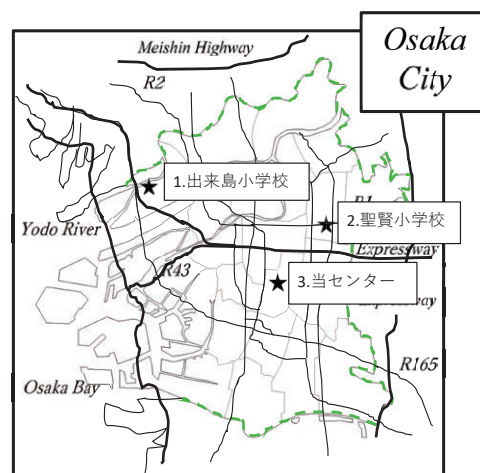


図2 降下ばいじん採取地点（★）



写真1 吸引ろ過後のニッケルフィルター

表1 降下ばいじん採取地点

	8月分	9月分	10月分
1. 出来島小学校	8月6日～9月1日	9月1日～10月1日	10月1日～11月4日
2. 聖賢小学校	8月6日～9月2日	9月2日～10月1日	10月1日～11月4日
3. 当センター	7月30日～9月1日	9月1日～10月1日	10月1日～11月4日

河川水試料では目開き 10 μm の円形ニッケル製フィルターを用いたが、降下ばいじん試料では目開き 20 μm の円形ニッケル製フィルターを用いた。前者は実験器具由来の MPs が認められたことから、降下ばいじん試料の分析では後者のフィルターを用いたところ実験器具由来の MPs はほぼ検出されなくなった。

2.4 MPs の同定

乾燥したフィルター上に捕捉した粒子（写真 2）を顕微 FTIR（Thermo Scientific 製 Nicolet iN10 MX）

（反射法）で観察し、粒子一つ一つがプラスチックかどうかを同定した。ライブラリのプラスチックのスペクトルとの一致率が 60%以上のものをプラスチックと同定し、長径と短径を測定し、観察画像とスペクトルを記録した。

2.5 河川水 MPs と降下ばいじん負荷量の推計

各月に得られた河川水と降下ばいじんの MPs 濃度の妥当性を検討し、比較的精度の良いデータ用いて MPs の負荷量を算出し、MPs の海域への負荷量を推計した。

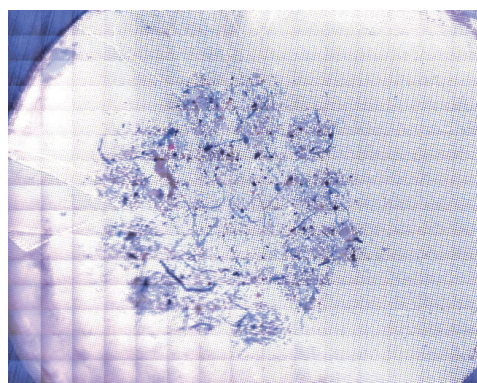


写真 2 目開き 10 μm フィルター上に捕捉した粒子

3. 結果および考察

3.1 試料分析および MPs 分析結果

表 2 に河川水質および MPs の分析結果（コンタミネーションの関係上 8 月分のみ）を示す。下流域の河川は海水の影響を受けていることから上流域の河川（河川 1～3）の pH および電気伝導度（EC）は下流域の河川（河川 4～6）に比べて低い傾向にある。

表 2 河川水分析結果

8月12日	pH[－]	EC[mS/m]	SS[mg/L]	MPs[個/L]
ブランク	-	-	-	9500
1. 寝屋川	6.82	21.9	32.8	29000
2. 第二寝屋川	6.88	30.8	52.4	11000
3. 大川	7.42	13.82	4.4	19000
4. 安治川	7.43	1588	6.8	16000
5. 尻無川	6.91	178.7	19.2	13000
6. 木津川	7.11	1220	18.4	17000

表 3 に降下ばいじん中 MPs の分析結果を示す。降水量が多い月ほど 1 m^2 あたりの MPs の個数は多くなる傾向にあった。これは大気中に舞い上がった道路塵埃中の MPs が降雨により浮遊粉塵中の MPs が地表に到達する個数が増加したためだと考えられる。なお、1. 出来島小学校は自動車排ガス測定局近傍にあり設置高度約 3 m であったことから、道路塵埃の巻き上げの影響を受けやすかったと考えられる。降水量がなしであった 10 月は 3 地点の間に際立った差が確認できなかった。本研究では大気由来の MPs の負荷量を算出することを目的として

表3 降下ばいじん中 MPs 分析結果

8月分	8月 降水量[mm]	試料全体量[mL]	分取量[mL]	MPs検出数[個]	全MPs採取数[個]	MPs[個/m ² ・日]
ブランク	314.5	500	50	0	0	—
1. 出来島小学校		1550	10	7	1100	5800
2. 聖賢小学校		1650	50	15	500	2600
3. 当センター		1640	50	11	360	1500
9月分	9月 降水量[mm]	試料全体量[mL]	分取量[mL]	MPs検出数[個]	全MPs採取数[個]	MPs[個/m ² ・日]
ブランク	192.0	500	25	0	0	—
1. 出来島小学校		600	2.5	3	720	3200
2. 聖賢小学校		500	25	2	40	190
3. 当センター		580	25	6	140	670
10月分	10月 降水量[mm]	試料全体量[mL]	分取量[mL]	MPs検出数[個]	全MPs採取数[個]	MPs[個/m ² ・日]
ブランク	68.5	500	15	2	67	—
1. 出来島小学校		200	5.0	4	160	390
2. 聖賢小学校		240	15	8	130	260
3. 当センター		230	15	9	140	300

※MPs[個/m²・日]の算出はブランク値を加味した。

いるが、本結果のみでは MPs 負荷量を推定することは困難である。少なくとも地表面のばいじんの影響を受けないさらに高度の高い地点における降下ばいじんや浮遊粉塵の採取が必要となる。よって本研究では、比較的地表面の影響を受けにくかった高度約 30 m の当センターの 1 m²あたりの MPs 個数を用いて降下ばいじんからの MPs 負荷量を算出することとした。

3.2 MPs 負荷量の推定

2021 年 8 月 12 日（降水量 54.0 mm）の雨天時の MPs 濃度をもちいて大阪市内河川の MPs 負荷量を推計した。その結果、雨天時（出水時）には上流域では 1 日あたり 220 兆個の MPs 負荷量であり、下流域では 160 兆個の MPs 負荷量であると推計された。ただ、昨年度の貴センター助成研究（その 1）では大阪市内の道路塵埃中の MPs 賦存量は 4.1 兆個であり、それら全てが下水処理場で処理されたと仮定すると排出負荷量が 1900 億個（排出期間は不明）であったことを勘案すると、今回の河川水中の MPs 負荷量推計は過大である可能性がある。

2021 年 8 月、9 月、10 月の大阪市内降下ばいじんの 1 日あたりの MP 負荷量はそれぞれ 3200 億個、1400 億個、630 億個であった。3 か月の負荷量を平均して年間に換算すると、降下ばいじんからの大阪市内への MPs 負荷量は年間 63 兆個と推計された。これを 1 日あたりに換算すると 1700 億個となった。

4. まとめ

1. 大阪市内河川から海域への雨天時の 1 日あたりの負荷量は 160 兆個と推計された。
2. 昨年度貴センター助成研究（その 1）では大阪市内の道路塵埃中の MPs 賦存量は 4.1 兆個であり、それら全てが下水処理場で処理されたとすると排出負荷量が 1900 億個であったことを勘案すると、今回の河川水中の MPs 負荷量推計は過大である可能性がある。
3. 大阪市内への降下ばいじん負荷量は 63 兆個／年となった。これを 1 日あたりに換算すると 1700 億個となった。

大阪湾における劣化指標に基づいた 微小マイクロプラスチック生成ポテンシャル評価手法の開発

雪岡 聖
京都大学大学院 地球環境学堂
研究員

【研究目的】

環境中に投棄されたプラスチックが紫外線や波力によって劣化・微小化し、マイクロプラスチック（MPs）を生成している。近年、粒径 300 μm 未満のより微小な MPs の前処理・分析方法の開発が進み、その存在が明らかとなってきた。その結果、粒径 300 μm 以上の MPs が環境中の作用により劣化した後、粒径 300 μm 未満の微小 MPs を生成していることが予想されるが、“環境中のマイクロプラスチックは、将来どのくらい増えるのか”という課題は明らかになっていない。そこで本研究では、MPs の劣化・生成に着目し、「大阪湾における劣化指標に基づいた微小 MPs の生成ポテンシャル評価手法の開発」を目的とし、調査を実施した。

【研究方法】

(1) 調査方法

2021 年 11 月 12 日に、大阪湾において MPs の汚染実態の調査を実施した。西宮浜（O1）、鳴尾浜（O2）、淀川河口（O3）、芦屋浜（O4）、中心地点（O5）、夢洲（O6）、六甲アイランド（O7）、神戸沖埋立処分場（O8）、沖（O9）を対象とした。表層水中の MPs の採取には目開き 300 μm のプランクトンネットを用いて、粒径 300 μm ～5 mm の MPs を採取した。その通水量は 23.7～54.3 m^3 であった。さらに、粒径 10～300 μm の MPs を微小 MPs として定義づけ、調査を行った。海水用の投げ込み式水中ポンプを用いて、揚水した表層水を吐き出すホースの先に、目開き 10 μm のプランクトンネットを取り付け、直接通水させることで粒径 10～300 μm の微小 MPs を採取した。その通水量は 118～150 L であった。

(2) 前処理方法

粒径 300 μm ～5 mm の MPs に関して、各試料に過酸化水素水（30%）を加えた後、0.05 M の硫酸鉄（II）溶液を添加し、55℃の条件下で夾雑物分解を行った。その後、目開き 300 μm のプランクトンネットですり別し、残渣にヨウ化ナトリウム溶液（5.3 M）を加え 1 時間以上静置させた。取り出した粒子を目開き 300 μm のプランクトンネット上で乾燥させた後、分析を行った。また、粒径 10～300 μm の微小 MPs は、粒径 300 μm ～5 mm の MPs と同様の前処理を行った後、比重分離として遠心分離を 2 回繰り返して行った。取り出した粒子を目開き 10 μm のプランクトンネットですり別し、残渣をエタノールで置換した。その後、試料を分取し、目開き 0.2 μm の Anodisc フィルターに通水し、顕微 FTIR を用いて分析を行った。

(3) 分析方法

粒径 300 μm ～5 mm の MPs に関して、試料の観察には実体顕微鏡を用い、専用デジタルカメラを用いて撮影して MPs の長軸径、短軸径を計測した。成分の同定には FTIR-ATR を使用し、波数範囲は 4,000～650 cm^{-1} とした。MPs の定性には、既存ライブラリを使用した。また、粒径 10～300 μm の微小 MPs には顕微 FTIR を用い、IR スペクトルの測定には非接触型である透過法とした。分析の波数範囲は 4,000～1300 cm^{-1} とし、MPs の定性にはライブラリを用い、ヒットクオリティが最も低いかつ 1.20 以下の結果を採用した。

(4) ラマン分光法による現場分析法の検討

MPs 調査をより現場で効率的に行うために、海洋研究開発機構（JAMSTEC）で開発中の現場型浮遊 MPs・粒子分析法との比較検討を行い、その妥当性を評価した。本システムにより、セル内を浮遊する粒子に対してホログラフィック画像とラマンスペクトルを同時に取得することで、浮遊粒子の形状・化学情報から種別を特定した。

(5) マイクロプラスチックの劣化指標の検討

本研究では、劣化指標として、カルボニルインデックスおよびマルテンス硬度に着目した。劣化により赤外スペクトル強度が増加する C=O 伸縮ピーク（1,715 cm^{-1} ）と、影響を受けにくい C-H 変角振動のピーク（1,460 cm^{-1} ）の比によってその劣化度（カルボニルインデックス）を算出する。本劣化度は、環境中の酸素の作用を受けた分子化学構造的な変化を表す、いわゆる“酸化劣化”の指標となる。また本研究では、物理的劣化指標としてマルテンス硬度を検討した。本指標は、劣化を受けたプラスチックの、元の耐性強度からの“弱化の指標”となる。そのマルテンス硬度を測定には、ナノインデントを用いた。具体的には、2018 年 11 月に大阪湾の表層水から採取した人工芝と予想される緑色の PE の MPs を対象とした。また、2021 年に購入した製品の人工芝を対照サンプルとして、比較検討を行った。

(6) 微小マイクロプラスチック生成試験の検討

環境中で劣化した粒径 300 μm 以上の MPs は環境作用により微細化し、粒径 300 μm 未満の微小 MPs を生成すると予想されるため、劣化指標と微小 MPs の「生成」の関係を明らかにすることを目的として、粒径 10～300 μm の微小 MPs の生成試験を行った。各劣化指標を測定した人工芝試料（ $n=9$ ）を対象とした。各試料をガラス製遠沈管に入れ、ステンレスビーズ 3 粒とエタノール 1 mL を添加し、3 分間ボルテックスにより攪拌した。その後、クリーンベンチ内で、生成試験後のエタノール試料を 0.1 mL を分取し、専用の IR 反射型スライドガラスに滴下した。本研究では Laser Direct Infrared (LDIR, Agilent) を用いて、分析を行った。

[結果と考察]

(1)大阪湾の表層水中のマイクロプラスチックの存在実態

大阪湾における表層水中の MPs の個数密度を図 1 に示す。粒径 $300\text{ }\mu\text{m}\sim 5\text{ mm}$ の MPs の個数密度は、西宮浜 (O1) で $8.29\text{ 個}/\text{m}^3$ 、淀川河口 (O3) で $1.16\text{ 個}/\text{m}^3$ 、六甲アイランド (O7) で $0.19\text{ 個}/\text{m}^3$ 、沖 (O9) で $0.03\text{ 個}/\text{m}^3$ であった。粒径 $10\sim 300\text{ }\mu\text{m}$ の微小 MPs の個数密度は、中心地点 (O5) では $4,720\text{ 個}/\text{m}^3$ と最も高く、次いで西宮浜 (O1) で $2,410\text{ 個}/\text{m}^3$ 、鳴尾浜 (O2) で $1,710\text{ 個}/\text{m}^3$ であり、六甲アイランド (O7) において $211\text{ 個}/\text{m}^3$ と最も低かった。粒径 $300\text{ }\mu\text{m}\sim 5\text{ mm}$ の MPs は沖 (O9) が最も低く、陸側の地点程、個数密度が増加していた一方、粒径 $10\sim 300\text{ }\mu\text{m}$ の微小 MPs は、粒径 $300\text{ }\mu\text{m}\sim 5\text{ mm}$ 程、顕著な差は見られなかった。その理由として、粒径 $300\text{ }\mu\text{m}\sim 5\text{ mm}$ の MPs は比較的粒子の粒径が大きいため、MPs 自体の比重の影響から海水表層付近に存在し、水の流れの影響を受けやすく、水の流れが滞留している陸域側の地点で高濃度であった。一方、粒径 $10\sim 300\text{ }\mu\text{m}$ の微小 MPs は粒径が小さいため、海水中に浮遊し、一様に汚染が拡散していることが考えられる。

(2)ラマン分光法による現場分析法との比較検討

本研究では、PE および PP のレジンペレット、淀川河口にて採取した PE および PP の MPs、岩石片、プランクトンを対象とした。ホログラフィック画像では、プランクトンが明らかに生物様の特異な形状を示し、簡単にプランクトンの判別が可能であることが分かった。その他は形状の違いはわかるものの、ホログラフィック画像から種類の判断は困難であった。一方、ラマンスペクトルでは、レジンペレット以外は塗料や生物・岩石由来の有機物が発すると思われる蛍光が強く見られた。蛍光が観測されなかったレジンペレットは PP、PE 特有のピークがそれぞれ複数本鮮明に見られ、種類の特定が十分可能であるラマンスペクトルを示した。人工芝と想定される MPs からは安定的に 3 本の PE 由来ピークが検出され種類の判別が可能であった。

(1) 粒径 $300\text{ }\mu\text{m}\sim 5\text{ mm}$ の MPs



(2) 粒径 $10\sim 300\text{ }\mu\text{m}$ の微小 MPs

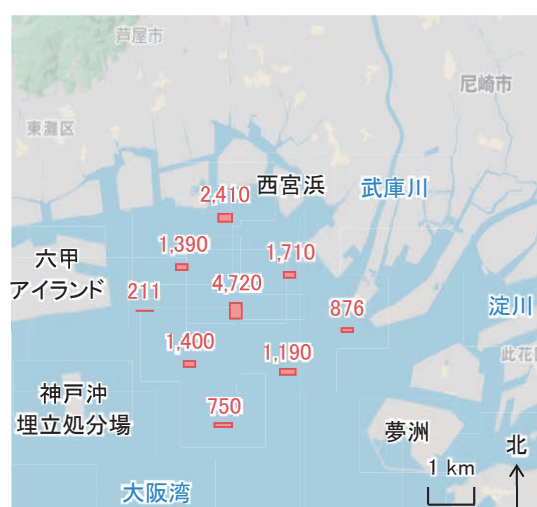


図1 大阪湾における表層水中のマイクロプラスチックの個数密度(個/ m^3)

(3) マイクロプラスチックの劣化指標の検討

大阪湾における表層水中から検出されたポリエチレン (PE) の MPs ($n=65$) に関して、約 93% の MPs のカルボニルインデックスは 0.46 未満であり、50% (中央値) は 0.34 であった。その形状別のカルボニルインデックス中央値は、フラグメントが 0.21, シートが 0.58 であった。マルテンス硬度に関して、購入した製品では 13~15 N/mm² であった一方、実環境試料では 30~92 N/mm² であった。製品と比較して、実環境試料では高いマルテンス硬度を示し、表面が劣化することで硬度が増加し、脆くなったと予想された。本結果から、マルテンス硬度は、MPs の物理的劣化指標として用いることができると考えられる。

(4) 各劣化指標と微小マイクロプラスチック生成量の関係

各劣化指標 (カルボニルインデックス、マルテンス硬度) と粒径 10~300 μm 微小 MPs の生成ポテンシャルの関係を評価した。本試験では、製品 ($n=2$) および大阪で採取した試料 ($n=7$) を対象とした。その結果、購入した製品からはほとんど微小 MPs の生成は確認されなかった (N.D.~20 個/mL (個/1 試料)) 一方、実環境試料からは 230~610 個/mL (個/1 試料) 検出された。次に、製品および大阪で採取した試料 (人工芝) における各劣化指標 (カルボニルインデックス、マルテンス硬度) と MPs 生成量の関係を図 2 に示す。各々の劣化指標を横軸に、微小 MPs 生成量として、「生成した MPs の投影面積の総和/生成試験前の MPs の投影面積」を「生成試験前の MPs の投影面積」を除した値を縦軸に示した。この縦軸は、微小 MPs 生成ポテンシャルの評価軸として考えることができる。その結果、C.I.と MPs 生成量の相関係数は 0.72、マルテンス硬度と MPs 生成量の相関係数は 0.75 であった。C.I.およびマルテンス硬度が、微小 MPs 生成ポテンシャルを評価するひとつの指標として、適用可能であることが示された。

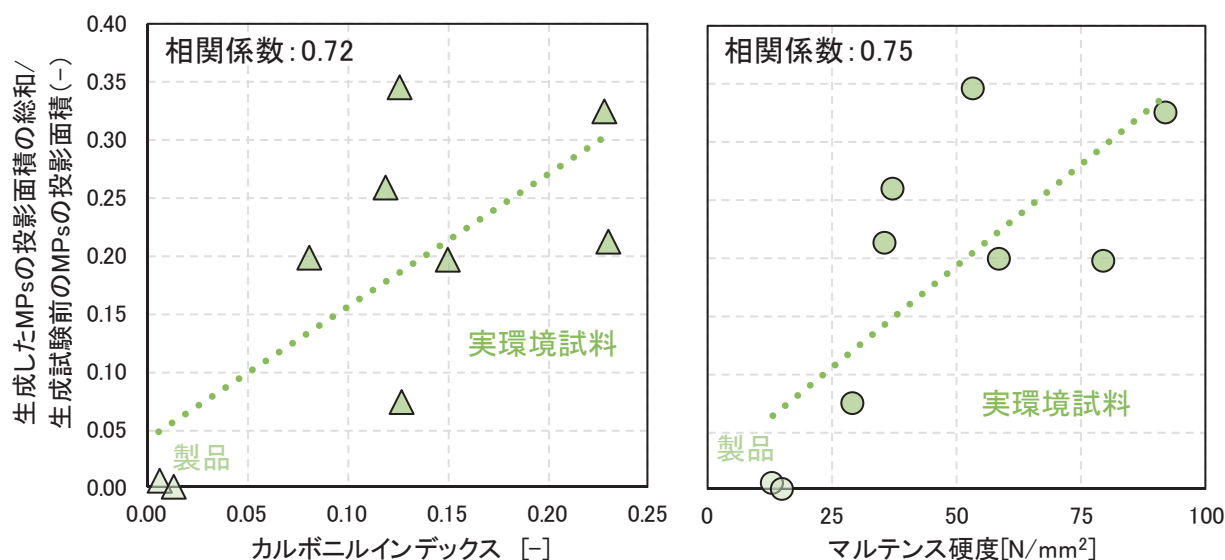


図2 製品および大阪湾で採取した実環境試料(人工芝)における各劣化指標(左:カルボニルインデックス、右:マルテンス硬度)のMPsの生成量の関係

大阪湾から発見された寄生生物が 麻痺性貝毒原因プランクトンのブルーム動態へ与える影響の解明 (その 2)

西谷 豪
東北大学 農学部 准教授

[研究目的]

麻痺性毒は、有毒プランクトンを原因とする自然毒の一種で、それらを摂食して毒化した貝を人が食べると、手足や口のしびれ・呼吸困難などを起こし、最悪の場合死に至る。大阪湾では 2002 年に初めて麻痺性貝毒が確認されて以降、毎年のように麻痺性貝毒が発生しており、特に 2018 年には大阪湾を含めた東部瀬戸内海で大規模に発生し、長期にわたる二枚貝の出荷自主規制のため、大阪府の漁業に大きな被害を与えた。大阪湾での麻痺性貝毒の原因種は、アレキサンドリウム (*Alexandrium catenella*, group1) という渦鞭毛藻であるが、その発生や収束を予測あるいは制御する手段は、未だ得られていない。

申請者らは、アレキサンドリウム（以下、宿主と記す）に寄生して細胞を破壊するアメーボフリヤ (*Amoebophrya*) 属という生物（以下、寄生生物と記す）を、2019 年に大阪湾から発見し、単離培養することに成功した。この発見は、世界では 3 例目で、日本では初である。アメーボフリヤに関する研究は、日本では行われておらず、培養株を所持しているのは、日本国内で我々の研究グループのみである。実施の初年度である 2020 年度（その 1）では、現場海域において宿主が出現する時期に、実際にどの程度の割合で寄生が発生しているのかを調査した。その結果、最大 74% の宿主が寄生されていることが判明し、実際の現場海域においても、寄生生物の存在が宿主の発生量に大きな影響を与えていることが示された。また、この寄生生物が寄生できる宿主の範囲を、室内培養実験にて調べたところ、有毒プランクトンであるアレキサンドリウム属には寄生するが、他の珪藻などの無害なプランクトンには寄生しないことが明らかとなった。つまり、この寄生生物を有毒プランクトンの天敵（微生物農薬）として利用できる可能性が示された。

1 年目の結果を踏まえ、実施 2 年目となる 2021 年度の研究では、前年度と同様に大阪湾における現場調査を実施すると同時に、室内培養実験において、宿主と寄生生物を培養する際の水温と塩分を変え、寄生率がどう変化するかを調べた。

[研究方法]

下記の 2 項目について調査・解析を行なった。

① 大阪湾海水中の宿主発生密度と寄生率の関係

これまでの大阪環農水研による調査で高頻度に宿主が出現することが明らかにさ

れている大阪湾内の2定点（St.17と19）において、大阪環農水研が有する調査船「おおさか」により柱状採水を実施し、水温や塩分等の環境項目を測定した。また、採取した試水中の宿主細胞数密度を顕微鏡により計数した。採取した海水は、東北大学まで輸送し、倒立型蛍光顕微鏡による特殊な励起光を用いて、宿主の細胞内を観察した。寄生生物が感染済みの宿主は細胞内に強い緑色自家蛍光を発するため、容易に識別・計数することが可能である。

② 宿主と寄生生物の二者培養実験

宿主と寄生生物を共培養する際、温度を12、14、16度で培養し、宿主（アレキサンドリウム）に対する寄生生物の寄生率を調査した。また、塩分20、25、30における寄生率も同様に調査した。

[結果と考察]

① 現場調査

図1には参考として、2013年から2021年までの両地点におけるアレキサンドリウム発生量の年間最大値の推移を示した。これを見ると、3,000 cells/mlを超えていた2019年と比較して、この2年間はアレキサンドリウム発生量が低密度で推移していることが分かる。その要因は不明であるが、1つの可能性として、大阪湾では2020年以降、寄生生物の増加・定着によって、アレキサンドリウムの発生量が抑制されたことが考えられる。もしその仮説が正しいとすると、今後は大阪湾では常に寄生生物による抑制効果が発揮される可能性があり、貝毒による被害が減少していくことが予想される。

調査を行った2021年では、両地点ともに麻痺性貝毒原因プランクトンのアレキサンドリウムの最高発生密度は、St.17で9 cells/ml、St.19で119 cells/mlであった。寄生生物による感染率は、St.17で最大16%、St.19で最大30%であった。

図2は、アレキサンドリウムのシスト（ブルーム収束時に種となって海底に沈み、翌年のシードとなる）が、寄生生物による感染を受けている様子を示した写真である。これは2021年4月の現場海水サンプルであり、シスト（赤色はアレキサンドリウムの葉緑体蛍光）の中に寄生生物（緑色蛍光）が存在していることが分かる。このような写真を提示した報告例は過去になく、世界で初めてである。このことは、宿主がシストとなって海底に沈むと同時に、寄生生物もまた、海底へと沈んでいく可能性を示している。これまで、宿主がいない時期に、どのようにして寄生生物が過ごしているのか、全く不明であったが、その生活史の一端を明らかにした。寄生生物の生活史の全容解明は、アレキサンドリウムの発生予測に貢献するものと思われる。

② 室内培養実験

図3に宿主（アレキサンドリウム）と寄生生物（アメーボフリア）の共培養試験の結果を示した。その結果、実施したいずれの温度帯においても、寄生生物は宿主

に感染することができ、宿主の細胞密度を大きく減らす（抑制する）ことが明らかとなった。一方、塩分を変えた実験では、各区画で異なる結果が得られた。通常、海水中の塩分は 30 ほどであるが、河川に近い海域では 20 近くになる。培養実験において、塩分を 20、25、30 として試験した結果、塩分 25 と 30 では寄生生物による高い感染が見られ（感染率 80%以上）、宿主の細胞密度を大きく減らす様子が観察された。しかし、塩分 20 の条件下では、宿主への寄生が大幅に抑制され、感染率が 20%を超えることはなく、宿主の細胞密度も大きく減少することはいなかった。この結果は、同じ大阪湾においても、河川に近い海域ほど、寄生生物による感染が起こりにくいことを示唆している。大阪沿岸部では、湾内だけでなく、淀川河口域においても有毒プランクトンのアレキサンドリウムが大量に発生するため、今後は淀川での寄生率調査も必要であると思われる。

[結論]

- ・この 2 年間のアレキサンドリウム低密度は、寄生生物の関与が一因かもしれない。
- ・宿主が海水中に存在しない時期、寄生生物は宿主のシスト中に潜み、宿主と同じく海底に存在して、翌年まで生存している可能性がある。
- ・河川に近い場所（低塩分）では、寄生生物が寄与しないかもしれない。

[今後の展望]

我々は、底泥中から寄生生物アメーボフリア属の DNA を検出する手法を確立しており、過去に採取・保存されている大阪湾内の底泥サンプルを解析することによって、いつの頃から大阪湾に寄生生物が存在していたのかを明らかにしたい。また、日本沿岸の他海域からも底泥を採取し、大阪湾以外にもこの寄生生物が存在しているのかどうかを調査する予定である。

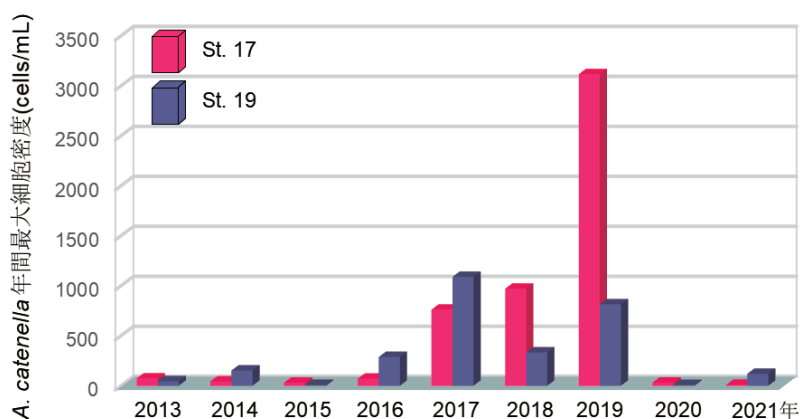


図 1. 大阪湾 2 地点における 2013 年から 2021 年までのアレキサンドリウムの年間最大細胞密度の推移

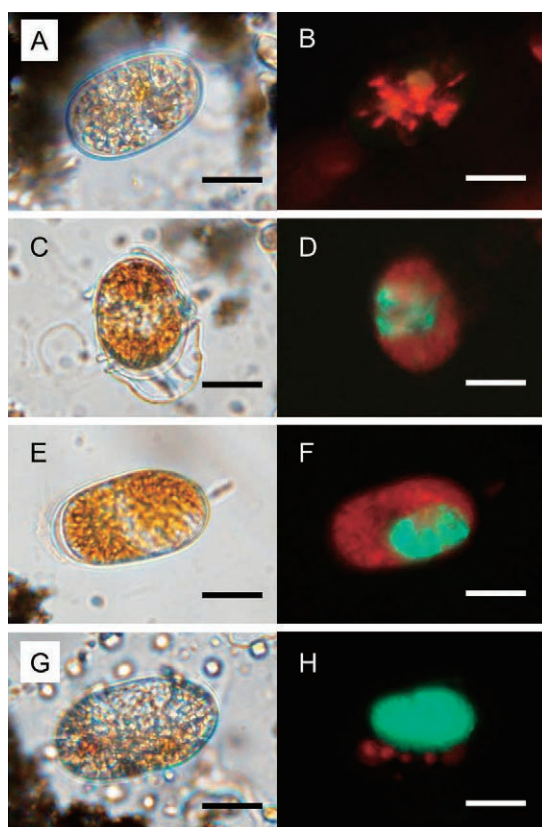


図 2. 2021 年 4 月、大阪湾現場海水中に観察されたアレキサンドリウムのシスト、およびそのシスト内に存在する寄生生物（アメーボフリア）。左側が通常光による顕微鏡写真。右側が同視野の蛍光顕微鏡写真。A～B：シスト内に寄生生物なし（赤はアレキサンドリウムの葉緑体）。C～H：シスト内に寄生生物あり（緑色蛍光）。緑色蛍光は 1 つの大きな塊に見えるが、例えば H では、寄生生物（小さな緑色蛍光）が 200-300 細胞ほど凝集した様子を示している。今後、シスト内に存在する寄生生物が、一定期間保存後に、再度寄生する能力があるかを実験する予定。

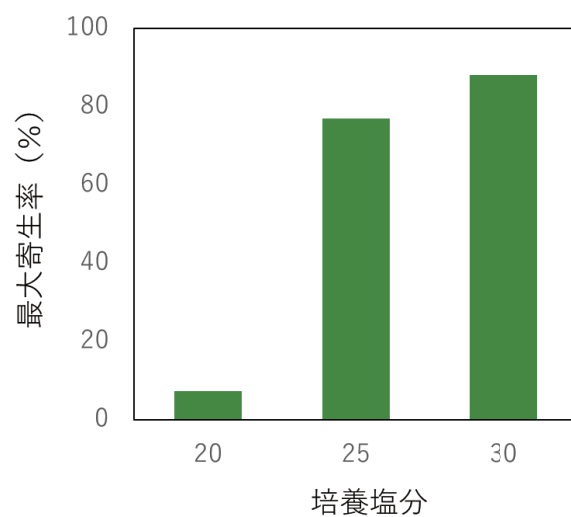
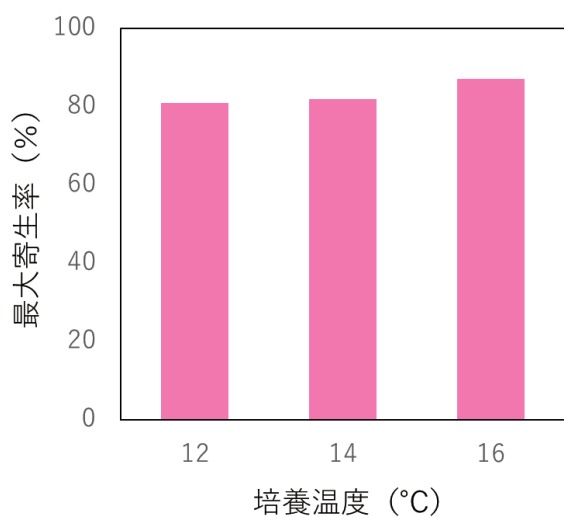


図 3. 培養期間内における寄生生物の宿主（アレキサンドリウム）への最大寄生率。現場海域で宿主が最も多く出現する温度帯（12-16 度）では、寄生率に大きな違いはない（左図）。一方、寄生率は、塩分の影響を強く受けることが判明し、低塩分では寄生率がかなり低下する（右図）。

赤潮形成を促進する海洋細菌の単離同定と、赤潮動態予測法の開発 (その3)

植木 尚子

岡山大学 資源植物科学研究所 准教授

[研究目的]

赤潮は今でも大阪湾でアサリ毒化や畜養ハマチの大量斃死など、水産業への多くの被害を引き起こしており、赤潮発生機序の理解は喫緊の課題である。赤潮は原因となる植物プランクトンの異常増殖によって起こる。赤潮発生には、海水の富栄養化や水温上昇が関与するとされるが、依然として不明な点も多く残される。申請者は、海洋細菌が、共生的な気候を介して赤潮原因藻の増殖を促進する可能性に着目し、R01 年度より本助成を受けて、赤潮形成を促進する海洋細菌の単離同定し、それらの存在を診断材料とすることで、赤潮動態予測法の開発の端緒とすることを目的とした本研究を開始した。R01・02 年度は、特に貧鉄 (Fe) 条件、あるいはビタミン B₁₂ (VB₁₂) 欠損条件にて赤潮原因藻増殖を促進する細菌を見出した。赤潮原因藻増殖は、栄養塩濃度に大きく影響を受けるが、海水中の溶存栄養素だけではなく、海底泥に含まれる含窒素・リン化合物にも依存するとされてきた。そこで、本年度は、赤潮が頻繁に報告される大阪湾や播磨灘などの海域より底泥を採取し、その中に生息する細菌より、特にリン欠損下にて赤潮原因藻増殖を促進するものを単離・同定を試みた。

[研究方法]

1 細菌単離方法

大阪湾より大阪府立環境農林水産総合研究所の協力により採泥した。当初の予定では、ヘテロシグマおよびアレキサンドリウムの増殖が顕著な時期に採水・採泥を行うつもりであったが、2019～2022 の間にアレキサンドリウムが顕著に増殖する事態には至らなかったため、ヘテロシグマが水域に数百細胞程度みられた際の底泥を主に実験に供した。

底泥 0.1 g を滅菌海水 1 mL に懸濁し、その懸濁液を 1/10, 1/100, 1/1000 希釈し、100 μ l ずつ x1/5 Marine Broth 2216 プレートに添付し、微好気性および好気性条件下で数日培養した。得られたコロニーをさらに数回移植培養を繰り返し、シングルコロニーにし、16S 配列を解読し、簡易的に種同定を行った。

2 共培養実験

培地は、市販の人工海水をフィルター滅菌したものに、微量元素・栄養素を添加するために、基本的に IMK を規定量の 1/10 添加した。リン欠損培地は、IMK よりリンを除いた組成のものを用いた。

ヘテロシグマは当研究室で確立した株を、アレキサンドリウムおよびヘテロカプサは国立環境研究所より株を取得して実験に供した。シャトネラ、スケルトネマ、キートセロスは広島大学小池研究室より供与された。共培養に先立って、藻類はリン欠損培地に5倍希釈し、4日間培養したものを用いた。また、細菌は、まず Marine Broth 2216 にて $OD_{600} > 2$ に到達するまで培養し、その後培地を添加物なしの人工海水に換え、2日間培養した。2日後に遠心で細菌を回収し、人工海水に $OD_{600} = 0.02$ に懸濁し、藻類に対して体積の 1/20 量の細菌懸濁液を添加し、共培養した。藻類細胞数は Moxi-Z Cell Counter にて計数した。

3 ヘテロシグマによる *V. comitans* 食食能の評価

V. comitans を生細胞を染色する色素 Cell Tracker で蛍光染色し、リン欠損培地で4日間培養したヘテロシグマに添加し、蛍光顕微鏡下でヘテロシグマへの *V. comitans* の取り込み・蓄積が起こるか精査した。

[結果と考察]

1 ヘテロシグマ増殖を促進する細菌の単離

底泥より細菌株を複数単離し、これらの株それぞれとヘテロシグマを共培養実験したところ、顕著なヘテロシグマ増殖促進が2株に観察された。種同定により、これらの株は *V. comitans* と *Photobacterium marinum* であることが明らかとなった。特に増殖促進能が高い *V. comitans* の藻類促進能についてより詳細な検討を重ねた。

V. comitans の藻類促進能について、他の *Vibrio* 属細菌と比較した結果を示す (Fig 2)。今回の実験では、*V. comitans* 以外に顕著に増殖促進作用を示す *Vibrio* は見出されなかった。概要では図は省略するが、*V. comitans* によるヘテロシグマへの増殖促進作用は、L:D = 12h:12h の明暗条件下ではみられる

が、一方、24h 暗条件ではみられなかった。これは、ヘテロシグマが *V. comitans* より取り込んだリンを光合成によって同化する必要があることを示している。

2 ヘテロシグマは *V. comitans* を食食する

蛍光標識した *V. comitans* とヘテロシグマを共培養すると、ヘテロシグマへの *V. comitans* 取り込みが観察された (Fig 3)。本実験にて *V. comitans* 標識に用いた Cell Tracker は、生細胞を標識することから、取り込まれた *V. comitans* は、破壊されることなくヘテロシグマに取り込まれる、つまり生細胞として食食されることを示す。

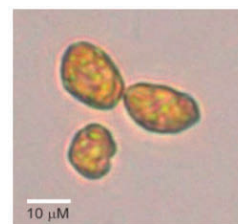


図1 ヘテロシグマ

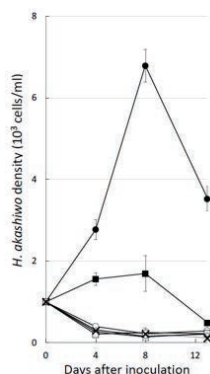


Fig. 2 *H. akashiwo* propagation with *Vibrio* genus bacteria under the orthophosphate-depleted condition. The cell numbers of *H. akashiwo* cultured with (solid lines) or without (broken line) bacteria pre-cultured in MB (A) under orthophosphate-depleted condition were measured. *V. comitans*, closed circle; *V. rotiferianus*, open rhombus; *V. owensii*, open circle; *V. alginolyticus*, open triangle; *V. campbellii*, open square; a *Vibrio* genus strain isolated from Chilean coastal water, closed square. The data are presented as mean $\pm$ standard deviation (S. D.) of triplicate cultures measured twice. The experiments were repeated three times, and the representative results were presented.

近年、多くの研究により、藻類の細菌食食あるいは粒状物質(死細胞など)食食能が示されている。細菌食食は、特にリン欠乏条件下で多く観察されてきたが、特異的な細菌種による藻類の増殖状態の変化は報告された例はなく、本研究は新しい知見を提供するものと言える。

3 *V. comitans* は多様な藻類の増殖を促進する

現在までに、珪藻であるスケルトネマとキートセロス、渦鞭毛藻であるヘテロカプサ、アレキサンドリウム、ラフィド藻であるヘテロシグマとシャトネラに対するリン欠乏下での *V. comitans* の影響を検討した。その結果、*V. comitans* をリン欠乏下のシャトネラとアレキサンドリウムに添加しても藻類の増殖はほぼ促進されないが、この2種以外の藻類については、全て増殖が促進された。

ヘテロシグマ以外の藻類が、本細菌を食食するか否かについてはいまだに不明であるが、同じ細菌でも、増殖を促進する藻類としない藻類があるという点は非常に興味深い。

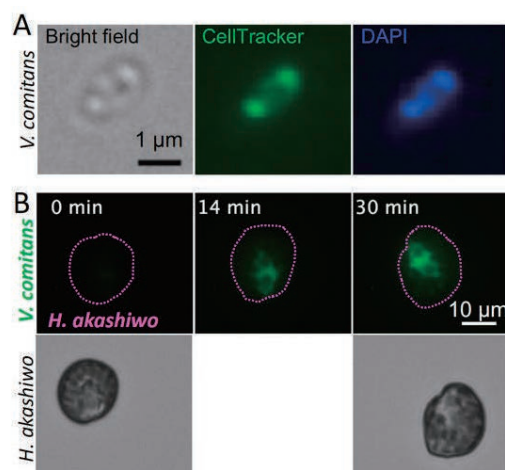


Fig 3 Bacterivory of *H. akashiwo*. *V. comitans* was stained with Cell Tracker (green fluorescence), and the *H. akashiwo* cultured with stained *V. comitans* for indicated periods were visualized.

4 増殖促進能に関係する遺伝子の同定による遺伝子マーカー選定の可能性の探究

ヘテロシグマやヘテロカプサなどが、*V. comitans* を食食することによって、どのようなリン源を摂取しているのかについては、未だ検討中であるが、特に、細菌中に蓄積されたポリリン酸（オルトリン酸のポリマー）を有力な候補として考えている。ポリリン酸は、オルトリン酸単位間の高エネルギー結合によりエネルギー蓄積性が高いとされ、また、加水分解されればオルトリン酸として、光合成に利用され得る。多くの細菌がポリリン酸蓄積能をもつとされ、*Vibrio* 属細菌も、ポリリン酸合成に必要とされるポリリン酸キナーゼ (polyphosphate kinase, PPK) を有する。図2に示したように、複数の *Vibrio* 属細菌のうち、顕著な藻類増殖能を示したのは *V. comitans* のみであった。そこで、

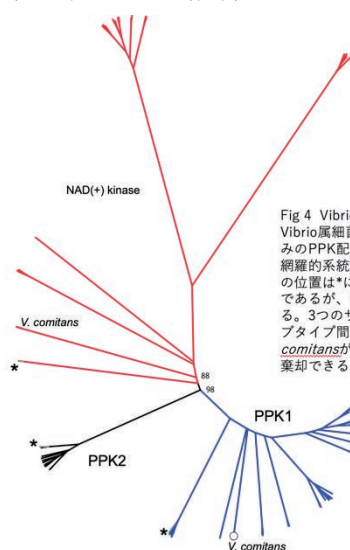


Fig 4 *Vibrio*属PPK系統樹 R03年10月にNCBIより入手できる全 *Vibrio*属細菌ゲノム配列を入手し、*Vibrio*属および他属にて同定済みのPPK配列への相同性 (e-value = 1e-10) を元にPPKを同定し、網羅的系統解析を行った。他属細菌より同定された3タイプのPPKの位置は*にて示した。*Vibrio*属PPKは3つのサブタイプに分類可能であるが、特に *V. comitans* はNAD(+)kinaseとPPK1タイプを有する。3つのサブタイプ間のBootstrap値は88, 98と高いものの、各サブタイプ間の分岐はそれほど支持されるものではなく、*V. comitans* が有する藻類増殖能が特異なPPKを持ったためという仮説は棄却できると見られる。

V. comitans が保有するPPKが他の *Vibrio* 属細菌が有するPPKとは異なる性質を持つ可能性を検討するために、*Vibrio* 属細菌の有するPPKについて網羅的な系統解析を行

った (Fig. 4)。結果として、*V. comitans* が保有する PPK 配列は、ヘテロシグマへの増殖促進作用を示さない他の *Vibrio* 属細菌の PPK 配列より顕著な違いは見られなかった。以上より、*V. comitans* PPK をマーカーとする戦略は（例え予想どおりにポリリン酸がヘテロシグマ増殖の原因物質だとしても）無効と判断した。

【結論】

藻類の増殖は、窒素 (N)、P、Fe などに制限される。また、赤潮原因藻の多くは VB_{12} 類を要求性である。そのため、海水中のこれらの物質の濃度は、水域の赤潮原因藻増殖キャパシティを決定すると考えられる。特に、N、P はマクロ必須栄養素として、赤潮原因藻増殖を大きく左右するとされ、溶存無機 N や溶存無機 P として、各地の水産研究所などの公的機関で継続的にモニタリングされている。一方で、底泥も含めた環境中には、有機型や不溶型の N・P も多く含まれ、有機 P や有機 N などを利用可能な藻種も存在する。以上の点に加え、近年、多くの緑藻が細菌類を食食することが明らかにされつつある。以上の点を鑑みて、本年は、赤潮原因藻が細菌を食食し、細菌中の有機 P 化合物を利用する可能性に着目して、底泥中の細菌類が P 欠乏条件下で赤潮原因藻増殖を促進する可能性を追求した。その結果、本年度は、P 欠乏条件にて赤潮原因藻増殖を促進する細菌を見出した。

特に N・P は赤潮発生の可能性を規定する上で重要な栄養素であるとされ、細菌が蓄積したと見られる P を赤潮原因藻が利用可能であるという知見は斬新なものである。一方で、私たちは、3 年間にわたり、N 欠乏条件下で赤潮原因藻増殖を促進する細菌の探索を続けてきたが、結局見出すことができずに終わった。私たちは、特に、赤潮原因藻に随伴して、ガス態 N_2 をアンモニアに変換する N_2 固定細菌に特化したスクリーニングを行ってきた。 N_2 固定細菌は、空气中に膨大な量存在するガス態 N_2 を植物プランクトンなどの光合成作用を介して食物連鎖に取り込むという意味で非常に重要な存在である。一方、すでに化成肥料や産業排水などによりある程度以上の窒素化合物が環境中に存在する大阪湾などの環境では、 N_2 固定細菌よりもむしろ、有機 N を赤潮原因藻が利用可能な形に変換する代謝能を持つ細菌類を探索するべきであると考えている。

本研究を行った 3 年間の間、大阪湾において継続的に赤潮発生状態のモニタリングを行なっている大阪府立環境農林水産総合研究所の協力を仰ぎ、サンプルの収集に努めたが、赤潮原因藻が特筆すべき密度まで増殖した状態には遭遇できなかった。このため、環境中の細菌叢構成の変動に着目した解析は行うことができなかった。一方で、私たちが同定した *V. comitans* は、数多く知られる *Vibrio* 属細菌のうち、例外的に P 欠乏条件下にて赤潮原因藻増殖促進能をもつ可能性がある。今後は、より多くの *Vibrio* 属細菌の赤潮原因藻増殖への影響を探るとともに、*Vibrio* 属細菌のゲノム配列の比較解析により、P 欠乏条件下における赤潮原因藻増殖の原因物質の特定と、その配列を利用した環境評価マーカーの作成の可能性の探索を継続する。

DNA メタバーコーディングによる 大阪湾の動物プランクトンモニタリング手法の開発（その3）

梅原亮¹⁾ 西嶋渉²⁾ 中嶋昌紀³⁾

1) 広島大学環境安全センター 助教

2) 広島大学環境安全センター 教授

3) （地独）大阪府立環境農林水産総合研究所水産技術センター 総括研究員

[研究目的]

総量規制により水質改善が進む大阪湾において、低次生態系構造解明の鍵を握る動物プランクトンについて、分子生物学的手法を用いた群集評価を試みた。昨年度までの成果により、検出種のカバー率向上については、これまでに DNA メタバーコーディングにおいて未検出であった種について、異なるプライマーを用いることで検出することに成功した。しかしながら、大阪湾における主要種である *Microsetella norvegica* や *Calanus sinicus* は DNA 分析において検出できておらず、それらを検出できるプライマーの探索が必須であった。そのため今年度は、検出種の網羅性向上のために様々なバーコード領域を用いた検討を行った。

定量性の向上については、PCR 以降の補正（サンプル間補正）および DNA 量からのバイオマス換算における種間補正により定量性が向上したが、検鏡および DNA から推定されたバイオマスは未だにばらつきが大きかった。そこで今年度は、さらなる定量性向上のために、標準生物を用いた DNA 抽出効率の補正により内部標準法を改良した。

モニタリングへの適用に関しては、DNA 分析を用いた代表種のバイオマスの季節変動の把握により、過去の生態学的知見と良い対応を示すことがわかり、検鏡による季節変動との比較では、いずれの種においても暖季および寒季というレベルではほぼ確実に変動傾向を捉えることができ、種によっては四季レベルで精度良く変動傾向を表現できた。しかしながら、四季レベルではまだ実用化は難しいと考えられたため、さらなる DNA 分析精度の向上により、月レベルでの出現傾向を捉えることを目的とした。また、実用化に向けた最終段階として、大阪湾における代表月において空間的に高解像度な調査を実施し、DNA 分析を用いて主要動物プランクトンの空間分布を明らかにした。

[研究方法]

播磨灘 3 地点において 2020 年 4 月～2021 年 3 月の毎月、および大阪湾 11 地点の 2021 年 5, 8, 11, 2022 年 2 月に動物プランクトンを採集し、サンプルを等量に分割して、それぞれ DNA メタバーコーディング用と検鏡用とした。検鏡サンプルは同定計数を実施して各分類群のバイオマスを推定した。DNA メタバーコーディング用サンプルについては、昨年度開発した方法（PCR 前に内部標準物質として既知量の淡水プラ

ンクトン由来 DNA を添加し PCR 以降の増幅率の差を補正) に新たに DNA 抽出効率の補正 (DNA 抽出前に内部標準として既知量の淡水プランクトン由来生物体を添加) を追加し、DNA 抽出、PCR 増幅、および次世代シーケンス解析を実施し、季節変動の把握およびバイオマス推定を試みた。

また、昨年度の課題であった検出種のカバー率向上のために、新たに COI 遺伝子 Zplank 領域および 18S rRNA 遺伝子 Hirai 領域の 2 つのバーコード領域を対象に DNA メタバーコーディングを実施した。また、定量性向上のためには、標準生物を用いた DNA 抽出効率の補正により内部標準法を改良した。現場モニタリングへの適用のために、DNA 分析精度の向上により、播磨灘において月レベルでの出現傾向を捉えることを目的とし、検証を行った。また、大阪湾における代表種の分布を DNA 分析のみで推定した。

[結果と考察]

検出種のカバー率向上

今年度新たに選ばれた 2 つのバーコード領域について検出の可否を検討した結果、大阪湾および播磨灘サンプルの主要 10 種中 9 種が検出された。また、検鏡バイオマス基準でも 95% の検出率となり、複数バーコード領域の併用により大幅に検出率を改善することができた。特に、大阪湾および播磨灘においてバイオマスが優占する *Microsetella norvegica* は 18S rRNA 遺伝子 Hirai 領域で、*Calanus sinicus* は COI 遺伝子 Zplank 領域で検出することができたことの意義は大きい。主要種検出の網羅性の向上により、実際のモニタリングへの適用が現実的となった。現時点では生物種名を決定する際の参照用データベースが不足する遺伝子領域があることから、それらの遺伝子領域におけるデータベースの拡充が必須であり、複数の遺伝子領域を用いた同時定量評価は将来的に検討すべき事項となるが、理論的には本研究の方法に準じて各プライマーに対して定量的メタバーコーディングを行うことで、プライマー間で比較可能な定量化手法量が確立できると考えられる。

定量性の向上

COI 遺伝子 Leray 領域を用いた従来補正法 (PCR 以降の補正) および新規補正法 (DNA 抽出以降の補正) における代表 4 種の補正済 DNA 量と検鏡バイオマスの関係を明らかにした。DNA 抽出効率の補正を新たに取り入れることで、*Oithona similis* では明確な変化は見られなかったが 4 種中 3 種においては決定係数が大幅に上昇した。それら 3 種については、95% 信頼区間の幅も小さくなり、ばらつきを抑えることができた。

種が既知で DNA 検出 (COI 遺伝子 Leray 領域) 可能なモデル生物であるアルテミアの添加量を変えた実験によって、補正済リード数とアルテミアバイオマスの関係を見た。アルテミア添加量を増やすことで補正済リード数も増加し、両者の間には線形の関係が得られた ($r^2=0.91$)。モデル生物を用いた場合、本研究における DNA 分析

手法により正確にバイオマスを推定できることがわかった。

野外から採集した5種のカイアシ類における補正済リード数とバイオマスの関係を明らかにした。*Acartia pacifica*、*Acartia omorii*、および *Paracalanus parvus* では COI 遺伝子 Leray 領域で、*Canthocalanus pauper* および *Calanus sinicus* では COI 遺伝子 Zplank 領域にて回帰式が作成できた。原点を通る回帰式を用いた場合、5 種すべてにおいて有意 ($p < 0.05$) な正の相関関係が得られた。決定係数 (r^2) は 0.61~0.98 の範囲であった。各種の回帰式の傾きを補正済リード数あたりのバイオマスの補正係数とした。今回、残念ながら十分量のバイオマスが確保できず解析ができなかった種についても、今後十分量の種既知サンプルが入手できれば種ごとの補正係数を大幅に増やすことは可能である。

モニタリングへの適用

DNA メタバーコーディングを用いた動物プランクトンのモニタリング手法を現場適用可能とするために、今年度はさらなる DNA 分析精度の向上により月レベルでの出現傾向を捉えられるのか播磨灘において検証を行った。補正済 DNA リード数と検鏡推定バイオマスの季節変動を比較した場合、*Microsetella norvegica*、*Paracalanus parvus*、*Oithona similis*、*Acartia pacifica*、*Acartia omorii*、*Centropages tenuiremis*、および *Centropages abdominalis* の7種については月レベルで詳細な季節変動を捉えられることがわかった（下図に一例を示す）。一方、*Calanus sinicus* では月レベルの変動は捉えられておらず、春に増加し夏に低下するという四季変動の評価にどどまった。*Pseudodiaptomus marinus* に関しては、検鏡にて観察された個体数が少なくバイオマスが著しく低く、また地点間の違いも大きかったため DNA 分析にて季節的消長を捉えることができなかった。DNA 分析にてバイオマス推定可能な4種（*Calanus sinicus*、*Paracalanus parvus*、*Acartia pacifica*、および *Acartia omorii*）については、*Calanus sinicus* を除く3種において月レベルでのバイオマスの変動を把握することが可能であったが、*Calanus sinicus* については四季変動の評価にどどまった。今回、種間補正において絶対値として定量が可能となった種は *Acartia omorii* のみであるため、*Paracalanus parvus* および *Acartia pacifica* の2種については、現状は補正済リード数による相対評価が良いと考えられる。ここでは成体を用いた評価であったため、さらに幼体を含めた季節変動解析およびその他の季節の DNA 分析が必要であるため引き続き行っていく。

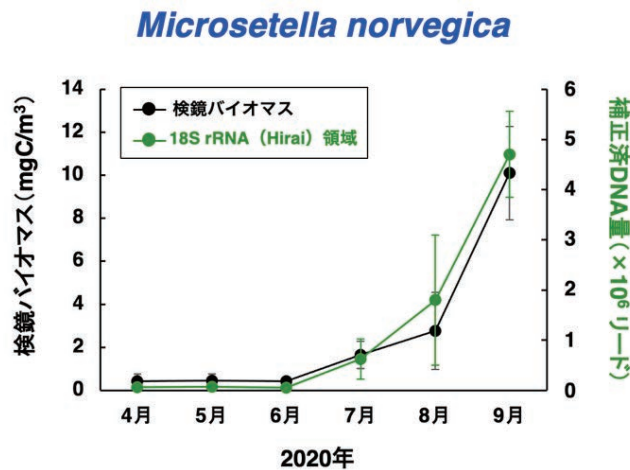


図. 播磨灘における

Microsetella norvegica の検鏡推定バイオマスおよび DNA 分析結果（補正済みリード数）の月変動。図中のプロットは播磨灘 3 地点の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

上記の播磨灘における結果より、DNA 分析によりカイアシ類 8 種のバイオマスの変動を捉えることに成功したため、さらに空間的に高解像度なネット動物プランクトンサンプリングを行い、大阪湾にて出現した 6 種を対象に DNA 分析に基づいた動物プランクトン群集の評価を行った。これまでに 2021 年 5 月の 11 地点における分布調査の DNA 分析が終了した。今回の分析においては外洋性種の *Canthocalanus pauper* 等は検鏡および DNA 分析において検出されなかった。*Microsetella norvegica* および *Acartia omorii* は明石海峡付近の湾西側にて比較的高密度に分布しており、*Oithona sumilis* は湾西側に多く分布していた。*Paracalanus parvus* について紀淡海峡付近および湾央部に多く分布しており、*Centropages abdominalis* は湾央部に分布していた。*Centropages tenuiremis* については湾東部に特徴的に分布しており、湾内における各種の分布の違いが詳細に把握できた。

[結論]

本研究では、総量規制により水質改善が進む大阪湾において、低次生態系構造解明の鍵を握る動物プランクトンについて、分子生物学的手法を用いた群集評価を試みた。検出種のカバー率向上については、これまでに DNA メタバーコーディングにおいて未検出であった主要カイアシ類について、複数の遺伝子領域を用いた分析により網羅性を向上することができ、検鏡バイオマス基準でも 95%の検出率となった。今年度は標準生物を用いた DNA 抽出効率の補正を新たに加え、2 段階の内部標準法に改良することで定量性を向上させることができ、代表カイアシ類 7 種について月レベルでの季節変動を DNA リード数の形で正確に捉えられ、3 種においては DNA 推定バイオマスの形で示すことができた。その中でも *Acartia omorii* については、DNA および検鏡推定バイオマスの絶対値がほとんど一致しており定量化に成功した。今年度の成果により、モニタリングへの適用がさらに現実味を増した。