

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

畑 直亜・山田浩且・西村昭史*¹・中山奈津子*²・外丸裕司*²・長崎慶三*²

Effect of Preservation Temperature on Infectivity titer of Algicidal Virus HcRNAV in Bottom Sediment.

Naotsugu HATA, Hirokatsu YAMADA, Akifumi NISHIMURA,

Natsuko NAKAYAMA, Yuji TOMARU, and Keizo NAGASAKI

キーワード：*Heterocapsa circularisquama*, 殺藻ウイルス, 凍結保存, 安定性

貝類を特異的に斃死させる渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* は、1988年に高知県浦ノ内湾で初めて確認された後、急速に分布を拡大し、1990年代後半には中部ならびに西日本の各地で赤潮を形成するようになった(松山 2003)。なかでも、三重県の英虞湾は、全国で最も *H. circularisquama* 赤潮の発生頻度が高い海域であり、1992年以來、ほぼ毎年赤潮が発生するとともに、本湾の基幹産業である真珠養殖業は甚大な漁業被害を被ってきた(松山 2003)。近年では、湾全域における嚴重な赤潮監視体制が整備されたことにより、漁業被害は軽減されてきてはいるものの(中西 2002)、漁業者からは毎年のように発生する赤潮に対して、より積極的な赤潮防除対策が求められている。

これまでに、赤潮防除対策として、いくつかの物理・化学的な赤潮防除法が検討されてきたが、海域という開放系ゆえの適用規模、コスト、安全性などの問題が障害となり、その殆どが実用化には至っていない(代田 1992, 今井 1998)。一方、海洋環境中に存在する微生物を利用した生物学的赤潮防除法は、生態系への負荷が少なく、安全性の高い赤潮防除対策として大きな期待が寄せられている(石田 1994, 今井 1998, 長崎 1998)。近年発見された *H. circularisquama* に感染するウイルス HcRNAV (*H. circularisquama* RNA Virus) (Nagasaki *et al.* 2004) は、高い自己複製能を有し、*H. circularisquama* のみの特異的に殺藻することから(Tomaru *et al.* 2004)、赤潮防除対策に必要なコスト、安全性、実現性などの問題を解決できる可能性があり、赤潮防除への利用が期待される。しかしながら、海域にウイルスを生物農薬的に散布する場合には、陸域での生物農薬使用に係る安全性基準やガイドラインに相

当するものが整備されていないことが実用化に向けての大きな障害となっている(外丸ら 2005)。

こうしたなか、英虞湾の底泥中には、*H. circularisquama* の赤潮発生期間中に増殖した HcRNAV が高密度に存在し、翌年の赤潮シーズンまで残存する状況が最近になって捉えられ(Tomaru *et al.* 2007)、底泥がウイルスの貯蔵庫的な役割を果たしている可能性が明らかになった(Nagasaki *et al.* 2004)。そこで、我々は、この底泥中に存在する天然のウイルスを赤潮防除に利用することを検討している。具体的には、底泥中のウイルスを海底耕耘的手法によって海水中に拡散させる、或いは、ウイルスが高濃度に含まれる底泥を保存しておき、必要時に散布する、などの手法により *H. circularisquama* へのウイルスの感染機会を高め、赤潮の発生を抑制しようというものである。つまり、天然のウイルスをそのまま利用し、環境中で自然に起こっているウイルスによる恒常性維持機能を人為的に促進することを意図している。このような手法であれば、人工培養したウイルスを生物農薬的に海域に散布するとは異なり、実用化への近道になるのではないかと考えている。

ウイルスが含まれる底泥の散布による赤潮防除法を実用化するには、底泥中の HcRNAV の感染価を長期間にわたり維持するための保存方法について検討する必要がある。一般にウイルスの感染価は、高い温度よりも低い温度で安定しているとされる(近藤 1973)。HcRNAV の場合には、10℃および4℃で約1年間は感染価が良く維持されたことが報告されているもの(Tomaru *et al.* 2005)、より感染価の維持に適していると考えられる凍結保存による長期安定性については検

*¹ 現所属：(財)三重県水産振興事業団伊勢湾北部中間育成場

*² (独)水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

討が行なわれていない。そこで、本研究では底泥中に含まれる HcRNAV の感染価の維持に及ぼす温度の影響を調査し、保存に適した温度条件について検討した。また、底泥中には植物プランクトンのシストが含まれ、その中には有害赤潮種のシストも含まれている可能性があるため、英虞湾の底泥からのシスト発芽状況を調べるとともに、凍結保存によるシストの発芽抑制効果の有無を調べ、底泥散布の安全性についても検討した。これらにより、ウイルス堆積底泥の赤潮防除への利用の可能性について検討することを目的とした。

方 法

1 保存温度の違いによる底泥中のウイルス感染価の変化

凍結保存では、超低温冷凍庫 (-80℃) や液体窒素 (-180℃ 以下) による保存も考えられたが、ここでは赤潮防除に利用する底泥を大量に保存しなければならない場面を想定し、より保存容量の制限を受け難い -30℃ を採用するとともに、Tomal *et al.* (2005) によりウイルス感染価が約 1 年間は維持されていたとされる 10℃ および 4℃ と比較した。実験に用いた底泥は、2008 年 9 月 2 日に英虞湾の St.1 (水深約 10m) (Fig.1) において、エクマン・バージ採泥器にて採泥した。採取した底泥の表面約 1cm 分を試料とし、採泥した当日にウイルス感染価を測定するとともに、残りは 10℃、4℃ および -30℃ の各温度に保存して 1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、9 ヶ月後、12 ヶ月後および 24 ヶ月後にウイルス感染価を測定した。底泥の保存は、15ml 容量のポリプロピレン製試験管に底泥約 4g を入れ、アルミホイルにて遮光後、各温度に設定した恒温庫、または冷凍庫に必要な本数を収容して行なった。ウイルス感染価の測定は、既報の終末希釈法 (MPN 法) に従った (Nagasaki *et al.* 2004)。つまり、約 4g の底泥に対し、最終濃度が 2nM となるように亜セレン酸ナトリウムを添加した改変 SWM3 培地 (Chen *et al.* 1969) を 4ml 加え、400rpm で 30 分間振盪した後、653 × g で 10 分間、4℃ で遠心した。遠心後の上清は、ポアサイズ 0.2 μm のフィルター (Dismic-25cs, アドバンテック社製) で濾過し、バクテリア等の大型の粒子を除去した後、改変 SWM3 培地で 10 倍階段希釈してウイルス希釈液とした。HcRNAV には、*H. circularisquama* への感染性が異なる少なくとも 2 つのタイプ (CY タイプ, UA タイプ)

が存在することが報告されているため (Nagasaki *et al.* 2004)、ウイルス検出のための宿主株には、CY タイプに感受性を示す HC18A2 株と、UA タイプに感受性を示す HC18A5 株の 2 種類の *H. circularisquama* 株を用いた。これら *H. circularisquama* 株の対数増殖期の細胞浮遊液を 96well の丸底マイクロプレートの各 well に 150 μl ずつ入れ、これに上記の希釈倍率が異なるウイルス希釈液をそれぞれ 100 μl ずつ 8well に加えた後、温度 25℃、光強度 165 μmol/m²/sec、1 日の明暗周期 12hL : 12hD の条件下で 10 日間培養した。培養期間中の各 well の殺藻状況を光学顕微鏡下で 1 日おきに観察し、ウイルス希釈液毎に殺藻が起こった well 数を調べ、西原ら (1986) のコンピュータープログラムを用いてウイルス感染価の最確数を計算した。

2 植物プランクトンのシスト発芽状況と凍結保存によるシスト発芽抑制効果

実験に用いた底泥は、2008 年 8 月 7 日に英虞湾の St.2 (水深 8.7m) (Fig. 1) において、エクマン・バージ採泥器の内部にコア (内径 36mm) を取り付けた改良型コアラー (Yokoyama and Ueda 1997) にて採泥した。コア内の底泥のうち表層 3cm 分を試料とし、10℃ の暗条件下で 2 日間保存した後、シスト発芽試験に供した。残りの底泥は、-30℃ の暗条件下で 4 ヶ月間保存した後、同様の試験に供した。発芽試験の培養液には、1) St.2 の底上 1m 層から採水した海水をグラスファイバーフィルター (Whatman GF/C) で濾過後、高圧蒸気滅菌 (121℃、2 気圧、5 分間) した滅菌濾過海水、2) 1) の濾過海水をベースに調製した改変 SWM3 培地、3) 2) の改変 SWM3 培地に二酸化ゲルマニウム (GeO₂) を最終濃度 1mg/L となるように添加した培地、の 3 種類を用いた。これら 3 種類の培養液は、採泥時の英虞湾の水質条件、植物プランクトン全般の増殖を促進した条件、ならびに珪藻の増殖を抑制して主要な有害赤潮種が含まれる渦鞭毛藻やラフィド藻などの増殖を促進した条件、をそれぞれ想定したものであり、3 種類の培養液を用いることで多様な種のプランクトンの増殖の有無を確認するように努めた。各培養液に底泥を湿重量で 0.02g/ml となるように懸濁させ、10 秒間の超音波処理後、観察に必要な本数 (各培養液につき 3 本) のガラス製試験管に泥懸濁液を 10ml ずつ接種し、温度 25℃、光強度 165 μmol/m²/sec、1 日の明暗周期 12hL : 12hD の条件下で 12 日間培養した。培養開始か

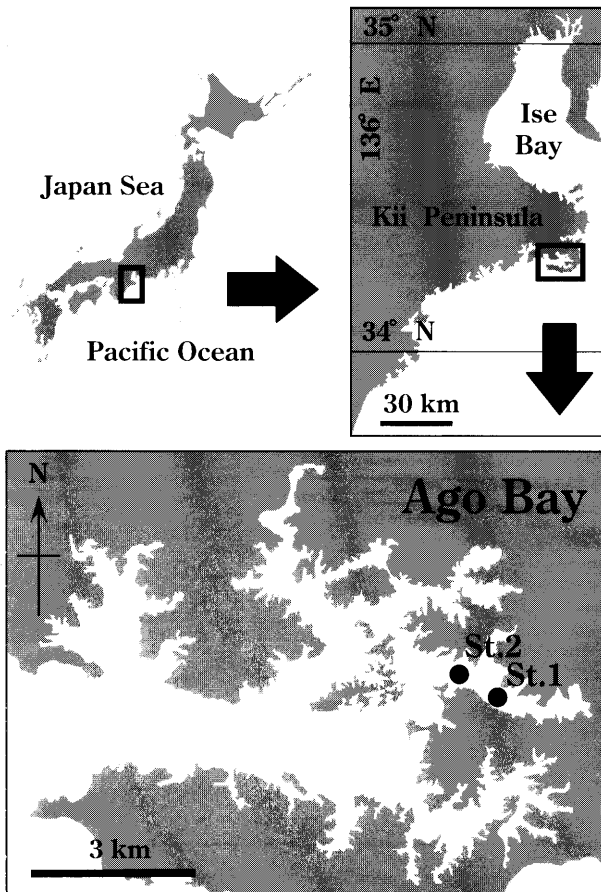


Fig.1. Location of the sampling stations (St.1 and St.2) in Ago Bay.

ら 3 日後, 6 日後および 12 日後に試験管から培養液を 1ml ずつ取り出し, 光学顕微鏡下で培養液中に含まれる植物プランクトンを同定し, 計数するとともに, 残りの培養液 (9ml) に関しては, 最終濃度が 1% となるようにグルタルアルデヒドを添加して固定した後, 653

× g で 10 分間遠心して培養液中の植物プランクトンを沈殿濃縮した。濃縮試料は, 光学顕微鏡下で全量を観察し, 濃縮前の培養液 1ml 中では観察されなかったプランクトンの種類を記録した。プランクトンの計数結果は 3 日後, 6 日後および 12 日後の観察結果のうちの最高密度 (cells/ml) を示し, 濃縮試料からのみ観察された種については検出の有無のみを結果に示した。

結果

1 保存温度の違いによるウイルス感染価の変化

ウイルスが含まれる底泥を 10℃, 4℃ および -30℃ の 3 種類の保存温度で 24 ヶ月間保存した場合の CY タイプと UA タイプのウイルス感染価の変化を Fig.2 に示した。ウイルス感染価は, CY タイプおよび UA タイプのいずれの場合にも, 期間を通して -30℃, 4℃, 10℃ の順に高い傾向が認められた。期間中の -30℃ におけるウイルス感染価は, CY タイプでは増大傾向, UA タイプでは横這い傾向であった。4℃ におけるウイルス感染価は, CY タイプでは横這い傾向, UA タイプでは低下傾向, 10℃ におけるウイルス感染価は, CY タイプおよび UA タイプともに低下傾向であった。

2 植物プランクトンのシスト発芽状況と凍結保存によるシスト発芽抑制効果

凍結保存前と凍結保存後の底泥によるシスト発芽試験の結果を Table 1 に示した。凍結保存前の底泥では, 滅菌濾過海水, 改変 SWM3 培地および GeO₂ を添加した改変 SWM3 培地のいずれの培養液においても何らか

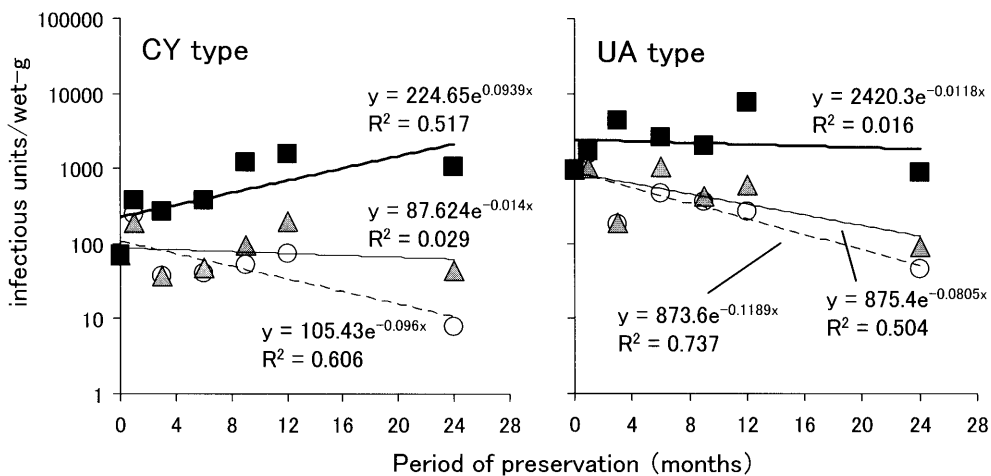


Fig.2. Temporal changes in infectivity titer of HcRNAV in sediment preserved at temperatures of 10℃ (○), 4℃ (▲) and -30℃ (■). Lines indicate regression expressions by exponential function. In the present study, the strains HC18A2 and HC18A5 of *Heterocapsa circularisquama* were used as host strains sensitive to the CY type and UA type of HcRNAV, respectively.

Table 1. Cyst germination of phytoplankton in sediment before and after cryopreservation

Phytoplankton	Before cryopreservation			After cryopreservation		
	Filtered seawater	Modified SWM3 medium	Modified SWM3 medium + GeO ₂	Filtered seawater	Modified SWM3 medium	Modified SWM3 medium + GeO ₂
Dinophyceae						
<i>Gymnodinium impudicum</i>	6	ND	ND	ND	ND	ND
Armored Dinoflagellates (unknown)	15	15	200	ND	ND	ND
Unarmored Dinoflagellates (unknown)	10	20	140	ND	ND	ND
Bacillariophyceae						
<i>Asterionella glacialis</i>	ND	+	ND	ND	ND	ND
<i>Chaetoceros</i> spp.	120	285	ND	ND	ND	ND
<i>Nitzschia</i> spp.	ND	20	ND	ND	ND	ND
<i>Pleurosigma</i> spp.	ND	+	ND	ND	ND	ND
<i>Skeletonema</i> spp.	120	22,700	ND	ND	ND	ND
<i>Thalassiosira</i> spp.	ND	1,250	ND	ND	ND	ND
Centrales (unknown)	ND	600	ND	ND	ND	ND
Pennales (unknown)	10	945	ND	ND	ND	ND
Microdiatoms (unknown)	ND	≥ 100,000	ND	ND	ND	ND
Raphidophyceae						
<i>Heterosigma akashiwo</i>	1	1	1	ND	ND	ND
Cryptophyceae (unknown)						
	ND	ND	115	ND	ND	ND
Euglenophyceae (unknown)						
	ND	ND	+	ND	ND	ND
Microflagellates (unknown)						
	5	≥ 10,000	400	ND	ND	ND

Numbers indicate cell density of phytoplankton in the unfixed samples (cells/ml).

+: detected in the fixed and condensed samples

ND: not detected both in the unfixed and fixed samples

の種のシストの発芽が確認された。滅菌濾過海水では、渦鞭毛藻、珪藻、ラフィド藻、微細鞭毛藻（綱は不明）などが増殖した。改変 SWM3 培地では、渦鞭毛藻、珪藻、ラフィド藻、微細鞭毛藻（綱は不明）などが増殖し、特に珪藻および微細鞭毛藻（綱は不明）の増殖が顕著であった。GeO₂ を添加した改変 SWM3 培地では、珪藻は増殖せず、渦鞭毛藻、ラフィド藻、クリプト藻、ユーグレナ藻、微細鞭毛藻（綱は不明）などが増殖した。有害赤潮種としては、ラフィド藻の *Heterosigma akashiwo* が、いずれの培養液においても低密度ながら確認された。一方、凍結保存後の底泥では、いずれの培養液においてもシストの発芽は確認されなかった。

考 察

ウイルスの感染価の維持に適した底泥の保存条件

10℃、4℃および-30℃の各保存温度における底泥中の HcRNAV の感染価の月変化には、感染価の上下のぶれが認められたものの、CY タイプおよび UA タイプのいずれの場合にも、期間を通して-30℃、4℃、10℃の順に感染価が高い傾向が明らかであった (Fig.2)。したがって、今回の研究によって、HcRNAV を含んだ底泥を-30℃で凍結保存することで、4℃および10℃保存よりも高いレベルで HcRNAV の感染価を維持できることが明らかになった。Tomaru *et al.* (2005) は、20℃保存における HcRNAV 懸濁液の感染価が約1年間で保

存前の 0.0001% 以下にまで低下したのに対し、4℃ および 10℃ 保存における感染価は 10 ~ 1000% の範囲で維持されたことを報告している。今回の 4℃ および 10℃ 保存における底泥中の HcRNAV の感染価の変動範囲は Tomaru *et al.* (2005) の報告と同程度であり、これらの保存温度における感染価の保持状況は概ね一致していたといえる。

保存されている HcRNAV の感染価に及ぼす温度以外の要因として、Tomaru *et al.* (2005) は光条件を挙げている。つまり、Tomaru *et al.* (2005) は、保存温度 20℃ の明条件下で HcRNAV を保存した場合には、暗条件下で保存した場合に比べて、ウイルス感染価の低下が顕著であったことを報告している。このことから、底泥を暗条件下で保存することも、ウイルスの感染価を低下させないための重要な条件であると考えられる。

以上のことから、必要な時に、より高いウイルス感染価を有する底泥を赤潮防除に利用するためには、底泥を -30℃、暗条件下で保存しておくことが必要と考えられた。

植物プランクトンのシスト発芽状況と凍結保存によるシスト発芽抑制効果

凍結保存前の底泥からは、渦鞭毛藻、珪藻、ラフィド藻など多種の植物プランクトンの発芽が確認され、その中には魚介類を斃死させる有害赤潮種である *H. akashiwo* も含まれていた (Table 1)。このことから、海底耕耘的手法によって底泥中のウイルスを巻き上げる、或いは底泥を凍結保存せずに散布する場合には、有害赤潮の発生を誘発する危険性を否定することはできない。一方、-30℃ で凍結保存した底泥からは、シストの発芽は確認されなかった。以上のことから、ウイルスが含まれる底泥を -30℃ で凍結保存することで、より安全に赤潮防除に利用できる可能性が明らかになった。

ウイルス堆積底泥を活用した赤潮防除の可能性

Tomaru *et al.* (2005) は、HcRNAV、HcV (*H. circularisquama* Virus) ならびに HaV (*Heterosigma akashiwo* Virus) の 3 種類のウイルスの保存性を調べた結果、4℃、暗条件下における HcV と HaV の感染価は約 1 週間で顕著に低下したのに対し、HcRNAV の感染価は 1 年以上安定していたことを報告している。こうした HcRNAV の保存性の高さは、赤潮防除への利用

を考えた場合、有利な性質と言える。また、HcRNAV は、*H. circularisquama* 以外の植物プランクトンには感染性を示さないことが確認されており (Tomaru *et al.* 2004)、感染の宿主特異性が高いことは、他生物への安全性を保障する一つの根拠となる。しかし一方で、*H. circularisquama* と、それに感染する HcRNAV には、それぞれ 2 つのタイプが存在し、*H. circularisquama* と HcRNAV のタイプが一致した場合でなければ、殺藻が起こらないことが報告されている (Tomaru *et al.* 2004)。このことは、赤潮防除への利用を考えた場合には、不利な性質と言えるかもしれない。例えば、HcRNAV を人工培養して散布する場合には、海域で発生している *H. circularisquama* 個体群のタイプに対応しないタイプのウイルスを散布すると、殺藻の効果が発揮されないということが起こり得る。しかし、著者らは、英虞湾にはウイルス感受性が異なる 4 つのタイプの *H. circularisquama* 個体群が存在し、さらに、英虞湾の底泥中には、これら 4 つの宿主タイプに感染可能なウイルスのタイプが全て含まれていたことを最近になって確認している (三重県水産研究所 2010)。このため、その時々が発生する *H. circularisquama* 個体群のタイプがいずれのものであっても、底泥中にすべてのタイプのウイルスが存在することで、発生した *H. circularisquama* 個体群に必ずウイルスが作用することが期待できる可能性がある。これは底泥中の天然ウイルスを赤潮防除に利用するメリットの一つと言えよう。

今回、底泥を -30℃ で凍結保存することで、植物プランクトンのシストの発芽が抑制され、より安全に底泥中のウイルスを利用できることが明らかになった。しかし、今回は限られた条件での試験結果であり、底泥中には植物プランクトンのシスト以外にも多くの生物が含まれていると考えられるので、凍結保存によって、すべての生物の発生が防止できるとは言い切れない。つまり、今回の研究において凍結保存した底泥中で HcRNAV の感染性が維持されていたことを考えると、その他のウイルスや細菌などの感染性も保存されている可能性は高い。したがって、異なる海域間における生物の移送や伝搬の危険性を考えれば、英虞湾の底泥を利用するのは英虞湾内、或いは、英虞湾と海水の交流や人為的な生物の交流が既にある海域に留めておくことが望ましいだろう。

今後は、HcRNAV による赤潮防除の可能性について、

さらに検討を進めるために、HcRNAVによる赤潮制御機構や抑制効果に関する知見を収集していく必要がある。また、HcRNAVの感染性と*H. circularisquama*の感受性に複数のタイプが存在することに関して、海域におけるタイプ別の出現動態の把握や、*H. circularisquama*のタイプと二枚貝への毒性との関係の把握なども今後の課題である。

要 約

殺藻ウイルスHcRNAVが含まれる底泥を赤潮防除に利用することを目的として、底泥中のウイルス感染価の維持に適した保存温度について検討したところ、設定した10℃、4℃、-30℃の3条件の中では、-30℃でウイルス感染価が最も良く維持されていた。また、ウイルスが含まれる底泥利用の安全性について検討するため、底泥からの植物プランクトンのシスト発芽状況、ならびに凍結保存によるシスト発芽抑制効果について調べたところ、凍結保存前の底泥からは、多種の植物プランクトンのシストの発芽が確認されたが、底泥を-30℃で凍結保存することでシストの発芽が抑制された。以上のことから、ウイルスを含む底泥を-30℃で凍結保存することにより、必要な時に、高いウイルス感染価を有する底泥を、より安全に赤潮防除に利用できる可能性が明らかになった。

文 献

- Chen, LCM., Edelstein, T., and McLachlan, J. (1969) : *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.*, **5** (3) , 211-220.
- 今井一郎 1998 : 赤潮の生物学的防除の可能性. 日本海水学会誌, **52**, 216-227.
- 石田祐三郎 (1994) : “赤潮藻の微生物学的防除に関する現状と将来”. 赤潮と微生物 (石田祐三郎・菅原 庸編). 恒星社厚生閣, 東京, 9-21.
- 近藤 昭 (1973) : “保存法”ウイルス実験学 総論 改訂二版 (国立予防衛生研究所学友会 編). 丸善, 東京, 48-59.
- 松山幸彦 (2003) : 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, **7**, 24-105.
- 三重県水産研究所 (2010) : 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. 平成 21 年度 三重県水産研究所事業報告, 平成 22 年 10 月, 40-45.
- 長崎慶三 (1998) : 殺藻性ウイルスによる赤潮防除の可能性. *Microbes and Environments*, **13** (2) , 109-113.
- Nagasaki, K., Tomaru, Y., Nakanishi, K., Hata, N., Katanozaka, N., and Yamaguchi, M. 2004 : Dynamics of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its viruses in Ago Bay, Japan. *Aquat. Microb. Ecol.*, **34**, 219-226.
- 中西克之 (2002) : 英虞湾におけるヘテロカプサ赤潮監視体制の現状と課題. 養殖, 2002.4, 緑書房, 東京, 61-64.
- 西原 力・蔵野憲秀・篠田純男 (1986) : マイクロコンピュターによる最確数の計算. 衛生科学, **32** (3), 226-228.
- 代田昭彦 (1992) : 赤潮の対策研究と技術開発試験の経緯と展望. 月刊海洋, **24**, 3-16.
- Tomaru, Y., Katanozaka, N., Nishida, K., Shirai, Y., Tarutani, K., Yamaguchi, M., and Nagasaki, K. 2004 : Isolation and characterization of two distinct types of HcRNAV, a single-stranded RNA virus infecting the bivalve-killing microalga *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **34**, 207-218.
- 外丸裕司・片野坂徳章・小谷祐一・吉田吾郎・山中 聡・田辺博司・山口峰生・長崎慶三 (2005) : 有害赤潮原因藻に感染する 2 本鎖 DNA ウイルス (HaV, HcV) ならびに 1 本鎖 RNA ウイルス (HcRNAV) の各種生物に対する安全性評価試験. 水研センター研報, **14**, 7-20.
- Tomaru Y., Tanabe, H., Yamanaka, S., and Nagasaki K. (2005) : Effects of temperature and light on stability of microalgal viruses, HaV, HcV and HcRNAV. *Plankton Biol. Ecol.*, **52** (1) , 1-6.
- Tomaru, Y., Hata, N., Masuda, T., Tsuji, M., Igata, K., Masuda, Y., Yamatogi, T., Sakaguchi, M., and Nagasaki, K. (2007) : Ecological dynamics of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and its infectious viruses in different locations of western Japan. *Environmental Microbiology*, **9** (6) , 1376-1383.
- Yokoyama, H., and Ueda, H. (1997) : A simple corer set inside an Ekman grab to sample intact sediments with the overlying water. *Benthos Research*, **52** (2) , 119-122.