

養殖ワカメに被害を及ぼす *Ephelota gigantea* の環境 DNA による発生予測

小林俊将*1・川島拓也*2・阿部陽*3

Prediction of the occurrence of *Ephelota gigantea* damaging cultured wakame seaweed by environmental DNA analysis

Toshimasa Kobayashi*1, Takuya Kawashima*2 and Akira Abe*3

Abstract

To mitigate the damage caused by *Ephelota gigantea* parasitism on cultivated wakame seaweed, *Undaria pinnatifida*, we attempted to predict the occurrence of *E. gigantea* infestation. At three wakame seaweed cultivation sites, seawater samples were collected approximately once a week during the harvest season from February to March, and *E. gigantea* DNA was detected from the seawater. The results showed that *E. gigantea* DNA had been detected in seawater from the aquaculture sites from 12 to 19 days before the actual occurrence of *E. gigantea* parasitism on the cultivated wakame was confirmed. This suggests that the occurrence of *E. gigantea* parasitism can be predicted using environmental DNA analysis.

Key words : *Ephelota gigantea*, *Undaria pinnatifida*, environmental DNA

キーワード : スイクダムシ, ワカメ, 環境 DNA

はじめに

ワカメ *Undaria pinnatifida* は岩手県の水産業において重要な養殖対象種となっている。岩手県沿岸のワカメ養殖では、夏にメカブを用いて採苗し、芽が出た後にはえ縄式の養殖ロープに巻き込んで成長させ、主に2月~4月に収穫している。しかし、この収穫時期にハリヤマスイクダムシ属の絨毛虫の1種である *Ephelota gigantea* が養殖ワカメに大量に付着することがあり、問題となっている¹⁻²⁾。*E. gigantea* は岩手県のワカメ養殖業者の間では通称スイクダムシと呼ばれており、長い柄と扁平な虫体からなり、柄の長さは200~1000 μ m, 虫体幅は200~700 μ m程度で、ハリヤマスイクダムシ属では最大の種である。

E. gigantea はワカメの生育には影響を及ぼさないものの、大量に付着するとワカメの光沢が失われ、収

穫後に *E. gigantea* 由来の褐色の液体が染み出して異臭を放つことから、商品価値が大幅に低下する。岩手県の養殖ワカメの多くはボイル加工されるが、ボイル加工後も *E. gigantea* の柄や付着痕が残るため、加工しても商品価値の低下は避けられない。

発生年が不定期なうえに発生漁場が岩手県中北部及び北海道南部のワカメ養殖漁場に限られることから、研究事例が少なく、培養技術が確立されていないことから生態に不明な点が多い。岩手県沿岸のワカメ養殖漁場では3月~5月に出現するが、それ以外の時期は生息場所も不明である。

再生産は無性生殖である外生出芽により行われ、遊走細胞により増殖する。岩手県沿岸では遊走細胞が基質に付着してから成長して出芽するまで約5日、出芽した遊走細胞が放出されて基質に付着するまでが1日以内であり、一世代に要する期間は6日前後と推察さ

*1 岩手県内水面水産技術センター(Iwate Inland Fisheries Technology Center)

*2 岩手県水産技術センター(Iwate Fisheries Technology Center)

*3 公益財団法人岩手生物工学研究センター(Iwate Biotechnology Research Center)

れている¹⁾。1回に4~5個の遊走細胞を放出することから、ワカメ養殖漁場で発生すると短期間に付着数が増加して被害が拡大することが多い。長年にわたり対策が求められているが、今のところ付着を防ぐ方法はなく、早期発見、早期収穫以外に有効な対策が無いのが現状である。しかし、前述のとおり発生が確認されてから短期間に付着数が増加するため、付着が確認される前に発生を予測する技術の開発が求められている。

近年、環境水中に含まれる微量のDNAを検出することにより、周囲に生息する生物の種類や量を把握する環境DNAの技術が発達し、魚病研究の分野では環境水中から病原体を検出する手法として利用され始めている³⁻⁵⁾。ワカメ養殖漁場で*E. gigantea*が増殖する際には、遊走細胞が海水中に浮遊すると考えられる。そこで、本研究では環境DNAの技術を用いて、海水サンプルから*E. gigantea*のDNAを検出することにより、*E. gigantea*の発生を事前に予測することを試みた。

材料と方法

検体の採取

2023年の養殖ワカメ漁期に合わせて、2023年2月1日~3月30日に岩手県北部のワカメ養殖漁場内でモニタリング調査を実施した。調査地点は同一のワカメ養殖漁場内の岸側、中央、沖側の3点で、海岸線からの距離は、岸側が約0.4km、中央が約1.6km、沖側が約2.7kmだった。

調査日は概ね1週間間隔で、2023年2月1日、2月8日、2月17日、2月24日、3月1日、3月8日、3月20日、3月30日の計8回実施した。

各調査定点で海水1Lを採水瓶に採取した。海水中のDNAの劣化を防止するために、海水1Lあたり1mlの10%塩化ベンザルコニウム液を採水直後に添加した。採取した検体は冷蔵のうえ、その日のうちに岩手県水産技術センターに持ち帰り、分析に供した。

各調査定点では海水のサンプリングと併せて、周辺の養殖桁から各調査定点3本ずつのワカメを採取した。採取したワカメは基部、中央部、先端部の3カ所に分け、更に各部の葉の先端部、中央部、中肋付近の3カ所、1本につき計9カ所の葉体を約2cm²ずつ切り取り、99%エタノールが入ったサンプル瓶に入れて固定した。

エタノール固定したワカメの葉体はろ過海水で置換した後に実体顕微鏡で検鏡し、*E. gigantea*の付着の有無を確認し、付着密度を計測した。各調査定点のワカメ3本の

3部位、計9カ所の計測結果の平均値を各調査定点での*E. gigantea*の付着密度(個/cm²)とした。

なお、2023年2月8日は中央、沖側の定点は波浪により欠測とした。また、2023年3月30日の中央の調査定点は養殖ワカメの収穫が終了していたため、海水のみサンプリングした。

*E. gigantea*に特異的なリアルタイムPCR用プライマーの設計

岩手県内のワカメ養殖漁場で採取し、99%エタノールで固定した*E. gigantea*からDNAを抽出してプライマーの設計に用いた。東北大学から*E. gigantea*のプライマー(西谷:未発表)の情報提供を受け、同プライマーで増幅させたPCR産物の配列をシーケンスし、NCBI BLASTでの検索で*Ephelota gemmipara*のrRNA遺伝子配列がトップヒットしたことから、*E. gemmipara*と多型がある箇所をプライマーを設計した。設計したリアルタイムPCR用プライマーの配列は以下のとおり。

Egi-qPCR-1-F 5'-ATCCGATCGCAGAACTTAGTTGA-3'

Egi-qPCR-1-R 5'-ATCCAAGAAGCTCGACTCTGT-3'

これらのプライマーについて、*E. gigantea*から抽出したDNAでの増幅を確認したうえで、本研究に用いた。

海水サンプルからの*E. gigantea*のDNAの検出

真空アスピレーターを用いて、各検体の海水1Lを0.22µmのメンブレンフィルター(メルク社製 Millipore Express PLUS)でろ過した。その後、DNeasy Power Water Kit(QIAGEN社製)を用いてフィルターからDNAを抽出した(最終容量100mL)。抽出したDNAサンプルはStepOne Plus™ Real-Time PCR system(Applied Biosystems社製)によりリアルタイムPCRを行った。リアルタイムPCRの試薬にはKAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Kit(KAPA BIOSYSTEMS社製)を使用した。試薬組成はqPCR Master Mix10µL、Egi-qPCR-1-F(10pmol)0.4µL、Egi-qPCR-1-R(10pmol)0.4µL、DNA template 1.0 µL、超純水 8.2 µLで総量が20 µLになるように調整した。

リアルタイムPCRの反応は、98°Cで10秒、52°Cで20秒、60°Cで20秒を40サイクルの条件で実施した。

*E. gigantea*由来のDNA量は以下の手順で定量した。まず、99%エタノール固定された*E. gigantea*30個体をマイクロチューブに集め、DNeasy Blood and Tissue

Kits (QIAGEN社製) により DNA を抽出し、スタンダードとした (最終容量 200 μ L)。スタンダードを 6 段階に希釈してリアルタイム PCR を行い、検量線を作成した。希釈前のスタンダードの DNA 濃度 (8.27 ng/mL) は Qubit4 Fluorometer (ThermoFisher SCIENTIFIC 社製) で測定した。検量線から各サンプルの DNA 濃度を算出し、海水 1L あたりの *E. gigantea* の DNA 濃度を推定した。

結 果

各調査日、調査定点での海水中の *E. gigantea* の DNA 濃度と *E. gigantea* のワカメへの付着密度を Table 1 に示した。2023 年 2 月 1 日及び 2 月 8 日の調査ではいずれの調査定点でも *E. gigantea* の DNA は検出されず、養殖ワカメへの付着も確認されなかった。2023 年 2 月 17 日の調査では 3 定点で 51~197 ng/L の *E. gigantea* の DNA が検出されたが、ワカメへの付着は確認されなかった。2023

年 2 月 24 日の調査でも 3 定点で 18~35 ng/L の DNA が検出されたが、ワカメへの付着は確認されなかった。2023 年 3 月 1 日の調査では 3 定点で 18~112 ng/L の DNA が検出され、中央の定点のワカメで 3.33 個/cm² の *E. gigantea* の付着が確認された。一方で、沖側、岸側の定点では *E. gigantea* の付着は確認されなかった。2023 年 3 月 8 日の調査では 3 定点で 190~308 ng/L の DNA が検出された。中央の定点でのワカメへの付着密度は 4.93 個/cm² に増加し、沖側及び岸側の定点でも 0.04 個/cm² 及び 0.08 個/cm² と低密度ながら *E. gigantea* の付着が確認された。2023 年 3 月 20 日の調査では各調査定点の DNA 濃度、付着密度とも急増し、3 定点で 453~12,010 ng/L の DNA が検出され、28.33~262.22 個/cm² の付着が確認された。2023 年 3 月 30 日の調査では DNA 濃度は 3 定点で 405~1,363 ng/L と減少したが、沖側と岸側の定点での付着密度はそれぞれ 292.44 個/cm² 及び 200.78 個/cm² まで増加した (中央定点は欠測)。

Table 1. Changes in *E. gigantea* DNA concentration in seawater and *E. gigantea* parasite density on wakame seaweed at three collection sites.

Collection site	Items	Collection date							
		2023/2/1	2023/2/8	2023/2/17	2023/2/24	2023/3/1	2023/3/8	2023/3/20	2023/3/30
Offshore site	DNA concentration (ng/L)	0	—	197	18	18	308	453	405
	Parasite density (number/cm ²)	0.00±0.00	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.04±0.05	28.33±15.76	292.44±206.49
Central site	DNA concentration (ng/L)	0	—	51	25	112	190	12,010	1,363
	Parasite density (number/cm ²)	0.00±0.00	—	0.00±0.00	0.00±0.00	3.33±4.02	4.93±11.23	226.22±146.38	—
Nearshore site	DNA concentration (ng/L)	0	—	53	35	33	258	1,039	289
	Parasite density (number/cm ²)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.08±0.08	48.78±45.15	200.78±74.24

考 察

本研究において、いずれの定点においても周辺の海水から初めて *E. gigantea* の DNA が検出されたのは 2023 年 2 月 17 日であった。一方で、顕微鏡観察により養殖ワカメへの *E. gigantea* の付着が初めて確認されたのは中央定点で 2023 年 3 月 1 日、沖側定点及び岸側定点で 3 月 8 日であり、各調査定点で *E. gigantea* の付着が確認される 12~19 日前に周辺の海水から *E. gigantea* の DNA が検出されたことになる。また、今回の事例では、*E. gigantea* の付着が初めて確認された際の付着密度は 0.04~3.33 個/cm² であり、顕微鏡観察では確認できるものの、肉眼では付着は認識できない程度であった。実際に養殖ワカメの商品価値に影響が出たのは、付着密度が 28.33~226.22 個/cm² まで

急増した 2023 年 3 月 20 日前後であり、初めて海水から *E. gigantea* の DNA が検出された 2 月 17 日からは約 1 カ月の期間があったことになる。これらの結果から、いわゆる環境 DNA の手法を利用することにより *E. gigantea* の発生を事前に予測し、早期収穫等の対策に利用できることが示唆された。

E. gigantea は発生後に急激に増殖して被害が拡大することが知られているが、これまでに実際の養殖漁場での増殖の速さを定量的に把握した事例はない。本研究において、沖合定点では 2023 年 3 月 20 日に 28.33 個/cm² だった付着密度が 3 月 30 日には 292.44 個/cm² と 10 日間で約 10 倍に急増している。同様に中央定点では 2023 年 3 月 8 日に 4.93 個/cm² だった付着密度が 3 月 20 日には 226.22 個/cm² と 12 日間で約 45 倍に急増している。今回の事例で養殖業者が肉眼での観察で

養殖ワカメへの *E. gigantea* の付着を認識してから、養殖ワカメの商品価値が大幅に低下する約 200 個/cm² のレベルまで付着が増加するのに要した日数は 10 日程度の短期間であったと考えられる。養殖ワカメの観察や収穫作業は波浪条件により制約されることを考慮すると、環境 DNA 技術を使わずに、これまでの養殖管理の中で *E. gigantea* の発生を確認してから早期収穫により対応しようとしても、収穫前に蔓延してしまう可能性が高いと考えられる。

本研究において養殖ワカメへの *E. gigantea* の付着密度の増加に伴い海水中から検出される DNA 量も増加した。しかし、2023 年 3 月 20 日から 3 月 30 日にかけては付着密度が増加しているにもかかわらず、いずれの調査定点でも DNA 濃度は減少した。これは、調査定点周辺での養殖ワカメの収穫が進んだこと、及び *E. gigantea* の発生により収穫を中止したワカメの廃棄作業が進んだことで、漁場全体での *E. gigantea* の現存量が減少したためと推察される。

E. gigantea はハリヤマスイクダムシ属の繊毛虫の中でも最も大型の種であり、大きさと形状により種を特定し、検体を収集することが可能であったが、その他のハリヤマスイクダムシ属の繊毛虫は種を特定しうえで研究用の検体を採集することは容易ではなく、本研究において使用したプライマーセットの *E. gigantea* に対する種特異性は十分に検証できていない。しかし、本研究において、*E. gigantea* の付着密度の増加に同調して周辺海域から検出される DNA 量の顕著な増加が認められたことから、今後、データを蓄積しながら精度を検証していく必要はあるものの、今回用いた手法はワカメ養殖の現場における *E. gigantea* の発生予測に利用可能であると考えられる。

and Ecological Characteristics of the Suctorian Ciliate *Ephelota gigantea* (Ciliophora, Phyllopharyngea, Ephelotidae) Found on Cultured Wakame Seaweed in Northeastern Japan. *Acta Protozool*, 54, 295-303 (2015).

- 3) 今城雅之・森光一幸・助田将樹・梅崎拓也・門野真弥・合田暉・久保栄作・大嶋俊一郎：高知県野見湾における *Cryptocaryon irritans* の TaqMan リアルタイム PCR 検出と分子系統解析. *魚病研究*, 51(3), 103-111 (2016).
- 4) H. Tenma, K. Tsunekawa, R. Fujiyoshi, H. Takai, M. Hirose, N. Masai, K. Sumi, Y. Takihana, S. Yanagisawa, K. Tsuchida, K. Ohara, T. Jo, M. Takagi, A. Ota, H. Iwate, Y. Yaoi and T. Minamoto: Spatiotemporal distribution of *Flavobacterium psychrophilum* and ayu *Plecoglossus altivelis* in rivers revealed by environmental DNA analysis. *Fisheries science*, 87(3), 321-330 (2021).
- 5) 中村永介：ニジマス養魚場の飼育水における細菌性冷水病原菌の定期的モニタリング. *静岡水技研研報*, 55, 11-16 (2022).

文 献

- 1) T. Kobayashi, N. Nakano, T. Muto and Y. Endo: Growth Characteristics of *Ephelota gigantea*: Pest to Seaweed Culture along the Northeastern Coast of Japan. *Acta Protozool*, 50, 339-343 (2011).
- 2) Y. Sato, T. Muto, Y. Endo, T. Kobayashi, N. Nakano, H. Sato, G. Nishitani and W. Sato-Okoshi: Morphological, Developmental,