

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

外丸裕司^{*1}・片野坂徳章^{*2, *3}・小谷祐一^{*4}・吉田吾郎^{*5}・山中 聡^{*2}・田辺博司^{*2}・
山口峰生^{*5}・長崎慶三^{*5}

Effects of viruses infecting harmful algae, HaV, HcV and HcRNAV on bivalves, zooplankton, seaweeds, fishes, and a mouse

Yuji TOMARU^{*1}, Noriaki KATANOZAKA^{*2, *3}, Yuichi KOTANI^{*4}, Goro YOSHIDA^{*5}, Satoshi
YAMANAKA^{*2}, Hiroshi TANABE^{*2}, Mineo YAMAGUCHI^{*5}, and Keizo NAGASAKI^{*5}

Abstract Harmful bloom-forming algae, *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada (Raphidophyceae) and *Heterocapsa circularisquama* Horiguchi (Dinophyceae) cause a mass mortality of cultured fish and bivalves, respectively. In recent years, a double-stranded DNA (dsDNA) virus HaV infectious to *H. akashiwo*, and a dsDNA virus HcV and a single-stranded RNA (ssRNA) virus HcRNAV, both infectious to *H. circularisquama* were isolated from natural seawaters in Japan. These viruses have some important characteristics suitable as microbiological algicidal agents. However, from the viewpoint of risk management, evaluation of their effects on various organisms is essential to assess the possibility of their use for eliminating the harmful algal blooms. In the present study, we have evaluated effects of the viruses on marine organisms (bivalves, zooplankton, seaweeds and fishes) and mammals (a mouse), and revealed that there was no significant acute toxicity against the tested organisms through the experiments. These results suggest that the algal viruses are safe for other organisms.

Key Words : Red tide, Algal virus, Acute toxicity, Safety

緒 言

ラフィド藻の一種である *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada は、亜熱帯、温帯から亜寒帯にかけての沿岸域に分布する。日本では春から秋にかけて沿岸で濃密な赤潮を形成し、カンパチ (*Seriola dumerili*) 等の養殖魚類の死亡を引き起こすことが知られて

いる。また、カナダ、ニュージーランド、チリ等でも、*H. akashiwo* 赤潮によるマスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*) 等の養殖魚類の死亡が報告されている (Honjo, 1993)。

二枚貝を特異的に殺す渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* Horiguchi は、1988年に高知県浦ノ内湾で初めて確認された新種赤潮プランクトンである (Hori-

2004年10月25日受理 (Received on October 25, 2004)

^{*1} NEDO 特別研究員, 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan)

^{*2} 株式会社エス・ディー・エスバイオテック つくば研究所 〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原2-1 (SDS Biotech K.K, Midorigahara 2-1, Tsukuba, Ibaraki 300-2646, Japan)

^{*3} 現所属: Hitech (株) 〒530-6025大阪府北区天満橋1-8-30 (Hitech Co. Ltd., 1-8-30 Tenmabashi, Kita, Osaka 530-6025, Japan)

^{*4} 中央水産研究所 〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-4 (National Research Institute of Fisheries Science, Hukuura 2-14-4, Kanazawa, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan)

^{*5} 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan)

guchi, 1995)。それ以来年々分布範囲を広げ、1990年代後半までには中部ならびに西日本各地で *H. circularisquama* 赤潮が確認されるようになった。大規模な *H. circularisquama* 赤潮によって、アコヤガイ (*Pinctada fucata martensii*)、ムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*)、アサリ (*Ruditapes philippinarum*)、カキ (*Crassostrea gigas*) などの二枚貝養殖産業は甚大な被害を受け、1992年から1998年間の *H. circularisquama* 赤潮による漁業被害金額は約100億円に達していることが明らかとなっている (松山, 2003)。

赤潮の被害から養殖魚介類を守るため、これまでに赤潮の海面回収、鉄粉吸収、超音波、海水循環、高分子凝集剤、オゾン、アクリノール、過酸化水素、硫酸アルミニウムなどを用いた、物理的、化学的赤潮防除法が試みられたが、いずれも海洋面積に対する経済性の問題 (コスト、施用規模) や、生態系への水質面からの悪影響 (安全性) などの問題から殆ど実用化には至っていない (代田, 1992; 今井, 1998)。唯一、韓国や九州南部で利用されているのが多孔質粘土を用いた赤潮駆除法である。多孔質粘土散布法は現場海域で赤潮駆除に効果をもたらしているものの、長期間に渡って粘土を投入した場合の底質生態系への影響が懸念されている (和田ら, 2002)。以上のような背景から、有効かつ安全な赤潮防除対策の確立が求められている。

こうした背景の下、生態系に対する負荷が少なく安全性の高い赤潮対策として、海洋環境中に存在している生物を利用する生物学的赤潮防除法が注目されている (石田, 1994; 今井, 1998)。これまでに、赤潮を形成する鞭毛藻類の栄養塩競合者である珪藻類を用いた防除法、殺藻バクテリアを用いた赤潮防除法が提案され、それらは現在開発途上にある (今井, 1998; 今井, 1999)。そして近年、*H. akashiwo* に感染するウイルス HaV (*Heterosigma akashiwo virus*) (Nagasaki and Yamaguchi, 1997; Nagasaki *et al.*, 1999)、*H. circularisquama* に感染するウイルス HcV (*Heterocapsa circularisquama virus*) (Tarutani *et al.*, 2001; Nagasaki *et al.*, 2003)、ならびに HcRNAV (*Heterocapsa circularisquama* RNA Virus) (Tomaru *et al.*, 2004a) が西日本沿岸域より分離された。これらのウイルスは、高い複製能を持つ点、低価格で生産可能である点、また防除作用の種特異性が高い点など、微生物学的赤潮防除剤として有利な性質を持つことから (長崎, 1998; Nagasaki *et al.*, 1999; Tarutani *et al.*, 2001; Tomaru *et al.*, 2004a)、生物学的赤潮防除ツールとしての有用性が期待されている。

赤潮防除を目的としたウイルスの微生物農薬の利用を実現するには、ウイルスが実際の赤潮動態にどのように影響しているかを十分に解明するとともに、自然環境中に存在する標的外生物に対するウイルスの影響を把握し十分な安全性評価を行う必要がある。前者については、現場環境中における赤潮の終息時にウイルス密度の特異的増加がみられる複数の事例が観察されており (Tarutani *et al.*, 2000; Nagasaki *et al.*, 2004; Tomaru and Nagasaki, 2004; Tomaru *et al.*, 2004b)、ウイルスと宿主赤潮原因生物との相互関係が徐々に解明されつつある。しかし、後者については、海洋環境中に散布する微生物農薬に関する安全性基準は整備されていない。例えば陸上生物農薬に係るガイドライン (農林水産省農産園芸局植物防疫課, 1995) の場合、哺乳類、淡水魚、淡水無脊椎動物、鳥類、昆虫、土壤微生物、食用作物等の生物種に対する急性毒性試験等が必須試験項目として掲げられているが、現状では海域での使用を目的とした生物資材に関するガイドラインに相当するものは存在しない。そのことが、海洋環境で微生物農薬を使用する際の大きな支障となっている。今後、赤潮防除、汚染除去等を目的とした海域での有用微生物利用の提案が増えてくることが予測されることから、ガイドライン策定に向けた使用生物の安全性評価に関する基礎的データの蓄積は急務である。このような背景から本研究では、各ウイルスの他生物に対する安全性を評価するため、まず水産業上重要種である二枚貝類、大型海藻、魚類ならびに動物プランクトンに対する短期的なウイルス HaV, HcV ならびに HcRNAV の影響を検討した。また、微生物農薬安全性ガイドラインを参考にしたマウスに対する急性毒性試験 (経口投与) を実施し、哺乳類に対する藻類ウイルスの安全性を評価した。

試料と方法

ウイルス宿主株の培養

ウイルスの宿主培養液には、SWM-3 改変培地 (Chen *et al.*, 1969; 伊藤, 今井, 1987) に 2 nM の Na_2SeO_3 を添加した培地を用いた (Imai *et al.*, 1996)。

HaV の調整

H. akashiwo (H93616株) を宿主とし、本株に特異的に感染するウイルス HaV (HaV01株) を実験に用いた。対数増殖期にある *H. akashiwo* に予備培養していた HaV01培養液を接種し、光強度 $140 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 12 h: 12 h 明暗周期下、培養温度 20°C で 48 時間培養し、ウイルス感染によって *H. akashiwo* を

溶藻させた。培養終了後、遠心処理 (2,000 rpm, 10 分間, 4℃) を行った *H. akashiwo* 溶藻液の上清を採取し、これを HaV 培養液として以下の実験に用いた。また HaV の感染単位は、終点希釈法 (MPN) を用いて測定した (Suttle, 1993; Nagasaki and Yamaguchi, 1997)。

HcV, HcRNAV の調整

H. circularisquama HU9433-P 株を宿主とし、本株に特異的に感染するウイルス HcV (HcV01, HcV03, HcV08 または HcV10株) ならびに HcRNAV (HcRNAV34), および *H. circularisquama* HCLG-1 株を宿主とし、本株に特異的に感染するウイルス HcRNAV (HcRNAV109) を実験に用いた。対数増殖期にある *H. circularisquama* に予備培養していた HcV または HcRNAV 培養液を接種し、光強度 $140 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 12h : 12h 明暗周期下、培養温度 20℃ で 72 時間培養し、ウイルス感染によって *H. circularisquama* を溶藻させた。培養終了後、遠心処理 (2,000rpm, 10分間, 4℃) を行った *H. circularisquama* 溶藻液の上清を採取し、さらに $0.8 \mu\text{m}$ スクレポアフィルターまたは GF/F フィルターで濾過した濾液を HcV または HcRNAV 培養液として以下の実験に用いた。HcV ならびに HcRNAV の感染単位は、終点希釈法 (MPN) を用いて測定した (Suttle, 1993; Nagasaki and Yamaguchi, 1997)。

各種生物に対するウイルスの安全性評価

二枚貝

実験にはアコヤガイ、ムラサキイガイ、アサリ、カキを用い、それらの摂食活動に対するウイルスの影響を評価するため、各二枚貝のウイルス存在下における濾過速度を検討した。実験は2000年6月から11月の間に行った。実験開始4日前から $0.2 \mu\text{m}$ 濾過海水を満たした30L ポリカーボネートタンクで実験供試貝を水温20℃、*Pavlova lutheri* (1.0×10^8 cells/ind/day) の給餌条件下で飼育した。換水は毎日一回行い、実験24時間前からは実験供試貝を絶食条件下に置いた。

Provasoli の改変強化培地 (西澤, 千原, 1979) で培養していた対数増殖期にある *P. lutheri* を $0.2 \mu\text{m}$ 濾過海水で希釈し、 $2.0 \times 10^4 - 5.0 \times 10^4$ cells/mL になるように調整した。そこにウイルス培養液を添加した試水、SWM-3 を添加した試水をそれぞれ実験区培養液、対照区培養液とした。また、HcV 添加試験時には比較実験区として、*P. lutheri* を含む培養液に対し HcV の宿主である *H. circularisquama* を単独で添加した試験区も用意した。ウイルスは、HaV01ならびに

HcV03を用いた。各試験区5連で実験を行った。ウイルスならびに *H. circularisquama* の最終添加密度は、Table 1ならびに Table 2に示した。各培養液330mL を5つの500mL トールビーカーに分注して緩やかなエアレーションを行い、各ビーカー内に供試貝を一つずつ静かに入れた。供試貝が開口してから実験を開始し、実験開始時、10, 20, 30分後に培養液を3mL ずつ採取してクロロフィル自家蛍光強度を蛍光光度計 (Turner Designs model 110) により測定した。実験終了後、貝肉を採取し -20℃ で保管し、後日凍結乾燥および60℃, 12時間の乾燥処理を行い、貝肉乾燥重量を測定した。また実験に用いた *P. lutheri* の密度と蛍光強度の関係を用い、各測定時間に測定した蛍光強度から培養液中の *P. lutheri* 密度を推定した。そしてその値を用いて、各試験区における供試貝の *P. lutheri* に対する乾燥肉重量当たりの濾過速度 (L/gdw/h) を次式により算出した。

$$C = ((\ln N_0 - \ln N_1) \times V) / \text{gdw} / (t_1 - t_0)$$

C : 濾過速度 (L/gdw/h)

t : 時間 (h)

gdw : 貝肉乾燥重量 (g)

N_0, N_1 : 時間 t_0, t_1 における *P. lutheri* 密度 (cells/L)

V : 培養液量 (L)

ムラサキイガイ、アサリおよびカキの濾過速度については *P. lutheri* 密度が5,000cells/mL 以上、アコヤガイに関しては1,000cells/mL 以上における10分間の最大値を求めた。実験期間中に開口しなかった個体に関しては、データから取り除いた。統計解析は t-test で行った (Stat View 2.0.2)。

動物プランクトン

小型甲殻類として、アルテミア (*Artemia salina*) を用い、その孵化効率ならびに幼生の生残に及ぼすウイルスの影響を検討した。実験は2001年3月に行った。100 μm メッシュ上で洗浄した乾燥卵0.1g (約2,000粒) を15mL 遠沈管に移し、滅菌濾過海水に約1時間浸漬後、1,800rpm, 5分間遠心して上清を捨てた。この操作を2回反復後、沈降卵だけを選別し、以下の試験に用いた。ウイルスは、HaV01ならびに HcV01 を用いた。HaV, *H. akashiwo*, HcV ならびに *H. circularisquama* の最終添加密度は、各試験区でそれぞれ 6.9×10^5 感染単位/mL, 1.2×10^5 cells/mL, ならびに 2.6×10^6 感染単位/mL, 2.9×10^4 cells/mL とした。

SWM-3 改変培地2.5mL にウイルス培養液2.5mL を接種した実験区、SWM-3 培養液2.5mL に宿主培養液2.5mL を接種した実験区、宿主培養液2.5mL にウイ

ルス培養液2.5mLを接種した実験区、そしてSWM-3改変培地5mLを入れた対照区を6穴マイクロプレートに作製した。各試験区のウェルに30粒程度の沈降卵を接種した。各ウェルの卵数を計数した後、20℃、12h:12h明暗周期の条件下で培養を行った。培養期間中、孵化後の卵殻と死亡した幼生は培養液から除去した。培養3日目以降は餌料として *Nannochloropsis* sp. を給餌した。孵化率は各ウェルの総卵数に対して孵化した卵の割合とし、生残率は測定日までに孵化した総アルテミア数に対して、死亡した積算個体数を総孵化個体数から差し引いた個体数の割合とした。統計解析はANOVAで行った (Origin 7J)。

大型海藻

大型海藻類として、褐藻類2種 (アカモク *Sargassum horneri*, ワカメ *Undaria pinnatifida* の配偶体), 紅藻類2種 (カバノリ *Gracilaria textorii*, マルバアマノリ *Porphyra suborbiculata*), 緑藻類1種 (アナアオサ *Ulva pertusa*) を用い、ウイルスの影響を検討した。ウイルスは, HaV01ならびに HcV01を用いた。実験は2000年11月から2001年1月の間に行った。各藻類試験区でのウイルス感染単位は, アカモク, ワカメ, カバノリでは HaV ならびに HcV でそれぞれ 1.6×10^6 感染単位 /mL, 5.1×10^5 感染単位 /mL で, マルバアマノリ, アナアオサではそれぞれ 7.2×10^4 感染単位 /mL, 1.4×10^6 感染単位 /mL とした。

アカモクは, 2000年4月採苗の冷蔵幼胚 (吉田ら, 2000) (Fig. 3A) を使用し, 培養期間中の形態形成過程, 形成された葉の枚数および最大長, 仮根長を測定した。ワカメは, 培養中の配偶体の細胞の形状 (Fig. 3C, E) を観察し, コロニーの長径を測定した。カバノリは, 2000年7月に採苗した培養藻体の盤状付着器を均等の大きさに細断し, 再生直立体の数, 最大長を測定した。マルバアマノリは, 天然藻体から得られた単胞子体 (Fig. 3G) を用い, 培養期間中の藻体全高, ならびに全幅を測定した。アナアオサは, 母藻細断法 (Hiraoka and Enomoto, 1998) により得られた遊走子 (Fig. 3J) を用い, 培養期間中の発芽体全長を測定した。各藻類はそれぞれ, 8mLのウイルス培養液 (ウイルス培養液区), 100℃で5分間熱処理を行ったウイルス培養液 (熱処理ウイルス培養液区), SWM-3培地 (対照区) において, 20℃, $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 12h:12h明暗周期の条件下で培養を行った。培養期間はマルバアマノリ, アナアオサで2週間, カバノリ, ワカメ, アカモクで4週間とした。各培養液には, PESI原液 (Tatewaki, 1966) をあらかじめ2%濃度で添加し, 栄養塩, 微量元素を補充した。各試験区においてアカモク, カバノ

リはそれぞれ10個体ならびに4個体を供試し, ワカメについては雌雄の配偶体のコロニーを3つずつ供試した。また, マルバアマノリ, アナアオサについては培養液中に単胞子または遊走子を散布し, 発芽・成長した個体の中からランダムに選んだ10個体を測定した。

海産魚類

1. マミチヨグ

孵化後48時間以内のマミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*) 孵化稚魚を被検体として用い, 生残率に対するウイルスの影響を検討した。ウイルスには HcV08を用いた。実験は2001年7月から9月の間に行った。 *H. circularisquama* 培養液の遠沈処理 (2,000rpm, 10分間, 4℃) 後上清を $0.8 \mu\text{m}$ スクレポアフィルターで濾過した濾液 (ヘテロカプサ培養濾液), ウイルス培養液, ならびにウイルス培養液を100℃で5分間熱処理したもの (熱処理ウイルス培養液) を作製し, 下記に示す3回の実験に供した。

1回目

活性炭濾過海水450mLに各実験供試液50mLを添加して十分混合した培養液中に, マミチヨグ孵化稚魚10個体を入れた。対照区では実験供試液として SWM-3培地を添加し, 同様にマミチヨグ孵化稚魚10個体を入れた。水温を22–24℃に保ち, 実験開始後4日目まで pH, 溶存酸素濃度, 生残率を測定した。また, 死亡個体が確認された場合は, その個体を培養液中から取り除いた。実験開始時のウイルス添加区におけるウイルス感染単位は 1.9×10^2 感染単位 /mL とした。実験は各試験区とも3連で行った。統計解析は Fisher's PLSD Method で行った (Stat View 2.0.2)。

2回目

活性炭濾過海水400mLに対し, ウイルス培養液1mLとSWM-3培養液99mLを添加した培養液 (実験区A), ウイルス培養液ならびにSWM-3培地をそれぞれ50mLずつ添加した培養液 (実験区B), ウイルス培養液を100mL添加した培養液 (実験区C), およびSWM-3培地を100mL添加した培養液 (対照区) をそれぞれ用意した。各実験区における実験開始時のウイルス感染単位は実験区A, B, Cでそれぞれ 8.9×10^2 , 4.5×10^2 , 8.9×10^4 感染単位 /mL とした。マミチヨグ孵化稚魚10個体を入れ, 水温を23–25℃に保ち, 上記と同様の操作を行った。

3回目

ウイルス培養液500mLにマミチヨグ孵化稚魚10個体を入れ, 水温を24–26℃に保ち, 実験開始後4日目まで毎日ウイルス感染単位, pH, 溶存酸素濃度, 生残率を測定した。対照区には培養液としてSWM-3を

用い、同様の操作を行った。実験開始時における培養液のウイルス感染単位は 7.0×10^5 感染単位/mLとした。

2. トラフグ, ヒラメ, マダイ

実験には平均体長2.8cmのトラフグ (*Takifugu rubripes*) 稚魚, 平均体長7.4cmのヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 稚魚, ならびに平均体長1.3cmのマダイ (*Pagrus major*) 稚魚を用い, それらの生残に及ぼすウイルスの影響を検討した。ウイルスには HcV10 ならびに HcRNAV109 を用いた。実験は2002年8月に行った。曝露したウイルスの感染単位はトラフグ, ヒラメ, マダイ試験区で, HcV がそれぞれ 2.2×10^6 , 3.0×10^5 ならびに 3.0×10^5 感染単位/mL, ならびに HcRNAV がそれぞれ 3.7×10^6 , 5.1×10^5 ならびに 5.1×10^5 感染単位/mL とした。0.2 μ m 濾過海水800mL にウイルス培養液200mL を加えた培養液中に稚魚を入れた。稚魚に対する HcV ならびに HcRNAV 培養液曝露時間は, トラフグとマダイでは10分間, ヒラメでは8分間とした。ウイルス曝露後の稚魚を0.2 μ m 濾過海水を満した30L 水槽に移し, 毎日定時に半量ずつサイフォンで下層の海水を除去して, あらかじめ室温に放置しておいた濾過海水を添加した。ウイルスに曝露しなかった稚魚を用いた実験系を対照区とした。1 実験区には10個体以上を供し, 96時間後の死亡率ならびに魚体の状態を対照区と比較した。

マウス

マウスの成長ならびに内臓組織に及ぼすウイルスの影響を, 微生物農薬の安全性評価に関する基準 (農林水産省農産園芸局植物防疫課, 1995) を参考にして検討を行った。実験は2000年12月に行った。マウスは, SPF 動物マウス (クローズドコロニー Slc. ddy 4 週齢 (雄), 日本 SLC 社) を, 実験環境に1週間馴化飼育した後に実験に用いた。試験区は, ウイルス培養液投与区, 不活化ウイルス培養液投与区, 海水培養液投与区 (対照区) および蒸留水投与区 (無処理区) の4区を設定し, それぞれ供試マウス3頭ずつを処理した。ウイルス投与には HcV10 を用いた。HcV 濃縮溶液ならびに不活化処理した HcV の感染単位はそれぞれ, 1.1×10^{10} 感染単位/mL ならびに5.5 感染単位/mL とした。

ウイルス培養液投与区は, 中空糸膜を用いて濃縮した HcV を投与試料として用いた。不活化ウイルス培養液投与区は, 濃縮した HcV 20mL をガラスシャーレに入れ, 光強度20,000lux の条件に24時間曝露したものを使用した。海水培養液投与区 (対照区) の投与試料には, SWM-3 改変培地10L をウイルスの濃縮と

同様の方法で濃縮処理したものを用いた。蒸留水は, 滅菌蒸留水を用い, これを無処理区とした。各供試液投与24時間前からマウスを絶食・絶水状態とし, 投与直前に体重を計測した。投与量は, 各試験区のマウス1個体に対し投与試料0.3mL をマウス一頭にゾンデ針を使用して経口投与した。投与約3時間後に給餌, 給水を再開し。その後, 3, 7, 14, 21日後に各個体の体重を計測した。また, 21日後に解剖を実施し, 内臓組織の状態を観察した。

結果と考察

二枚貝

二枚貝類の摂食に対する HaV の影響評価試験の結果を Table 1 に示した。アコヤガイ, ムラサキイガイ, アサリおよびカキの各試験区において蛍光強度は, 実験開始直後から徐々に減少していった (データ非表示)。貝肉乾燥重量当たりの濾過速度は, イガイおよびアコヤガイにおいて対照区と HaV 添加区との間に有意差は見られなかった (*t*-test, $p > 0.05$) (Table 1)。アサリおよびカキの対照区および HaV 添加区におけるそれぞれの濾過速度もほぼ等しかった (Table 1)。このことから, HaV の存在は短時間に二枚貝の濾過摂食活動に影響を与えることはないと推察された。

二枚貝類の摂食に対する HcV の影響評価試験の結果を, Fig. 1 および Table 2 に示した。アコヤガイ, ムラサキイガイおよびカキの *H. circularisquama* 添加区において, それぞれの貝は開口しても直ぐに閉じる, 殻の開閉を激しく繰り返す, 擬糞を放出するなどして, 実験期間中に正常な摂食活動は見られず, 蛍光強度もほとんど減少しなかった (Fig. 1)。一方, 対照区および HcV 添加区において各貝は *H. circularisquama* 添加区で見られたような行動は示さず開口後は安定して殻を開けており, 蛍光強度も徐々に減少していった (Fig. 1)。また貝肉乾燥重量当たりの濾過速度は, イガイおよびアコヤガイにおいて対照区と HcV 添加区との間に有意差は見られなかった (*t*-test, $p > 0.05$) (Table 2)。カキの対照区および HcV 添加区におけるそれぞれの濾過速度にも著しい差は見られなかった (Table 2)。

イガイやアコヤガイなどの二枚貝は *H. circularisquama* 存在下では, 擬糞を排出するなどして通常の濾過摂食活動では見られない忌避活動を行うことが知られている (Matsuyama *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 2000)。また長時間にわたって二枚貝に *H. circularisquama* を曝露し続けることによって, それらの二枚貝は死に至ることが確認されている (Mat-

Table 1. Filtration rate of bivalves on *Pavlova lutheri* suspension when HaV was added in cultures

Bivalve	Experimental treatment	Dry weight	HaV01	Filtration rate	n=
		(g) ^{*1}	(infectious units/mL) ^{*2}	(L/gdw/h) ^{*1*4}	
<i>Pinctada fucata martensii</i>	Control	1.28±0.25	— ^{*3}	2.95±1.85	5
	+ HaV	1.12±0.31	4.64 × 10 ³	2.53±0.36	4
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Control	0.10±0.01	— ^{*3}	14.37±1.54	5
	+ HaV	0.10±0.02	0.65 × 10 ³	16.70±5.60	5
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Control	0.25 - 0.28	— ^{*3}	5.72 - 8.59	2
	+ HaV	0.30±0.02	9.36 × 10 ⁵	4.78±1.13	4
<i>Crassostrea gigas</i>	Control	0.05±0.01	— ^{*3}	17.8±6.4	3
	+ HaV	0.03 - 0.06	9.36 × 10 ⁵	15.8 - 15.9	2

*1 Mean value±standard deviation (n>2) or minimum and maximum value (n=2).

*2 HaV infectious units in culture medium.

*3 HaV was not added.

*4 Filtration rates (C) were calculated as follows, $C = ((\ln N_0 - \ln N_1) \times V) / \text{gdw} / (t_1 - t_0)$; t: hour; gdw: dry weight of bivalve meat; N₀, N₁: *P. lutheri* concentration at t₀ and t₁, respectively; V: culture volume.

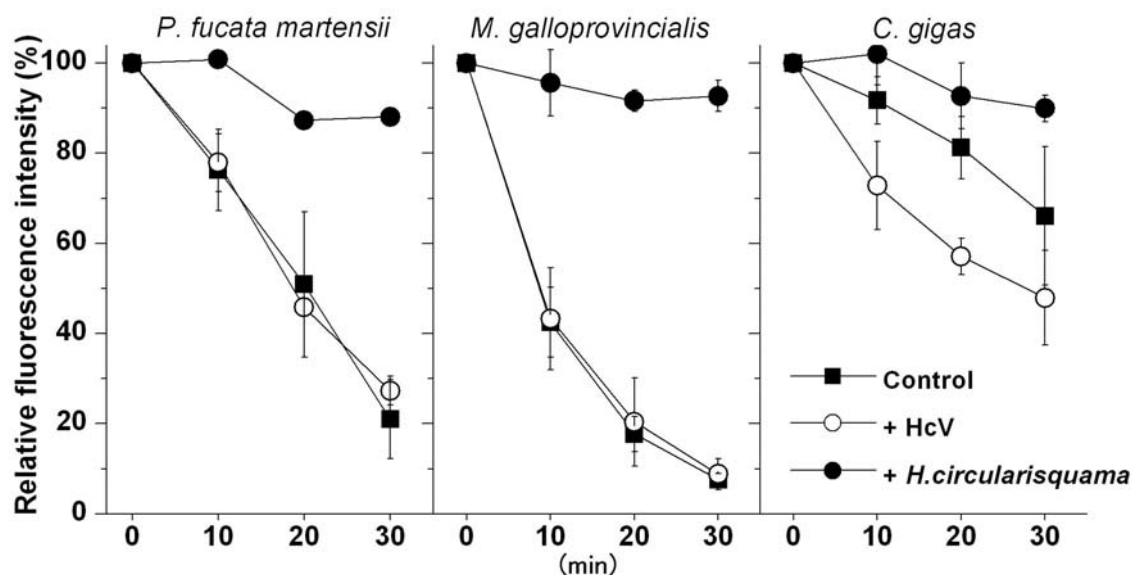


Fig. 1. Temporal changes of relative fluorescence intensity during a feeding experiment of bivalves, *Pinctada fucata martensii*, *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas* in cultures of *Pavlova lutheri* suspension diluted in a filtered seawater passed through a 0.2 μm pore-size filter. ■ (control) : with addition of SWM-3 medium; ○ : with addition of HcV culture; ● : with addition of *Heterocapsa circularisquama* culture. Final concentrations of HcV and *H. circularisquama* in each experiment were shown in Table 2. Filtration rates of bivalves were calculated from the changes of fluorescence intensity representing an algal concentration.

Table 2. Filtration rate of bivalves on *Pavlova lutheri* suspension when HcV or *Heterocapsa circularisquama* were added in cultures.

Bivalve	Experimental treatment	Dry weight (g) ^{*1}	HcV03	<i>H. circularisquama</i>	Filtration rate (L/gdw/h) ^{*1*6}	n=
			(infectious units/mL) ^{*3}	(cells/mL) ^{*4}		
<i>Pinctada fucata martensii</i>	Control	0.26±0.04	— ^{*5}	— ^{*5}	4.81±2.17	4
	+ HcV	0.29±0.05	3.35×10 ⁵	— ^{*5}	3.69±1.17	3
	+ <i>H. circularisquama</i>	0.38	— ^{*5}	8.8×10 ³	^{*2} ND	1
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Control	0.11±0.04	— ^{*5}	— ^{*5}	18.1±6.7	5
	+ HcV	0.11±0.02	0.89×10 ⁵	— ^{*5}	15.3±3.7	5
	+ <i>H. circularisquama</i>	0.10±0.02	— ^{*5}	7.0×10 ³	^{*2} ND	5
<i>Crassostrea gigas</i>	Control	0.053±0.027	— ^{*5}	— ^{*5}	11.8±8.3	3
	+ HcV	0.065-0.073	4.6×10 ⁵	— ^{*5}	7.5-12.9	2
	+ <i>H. circularisquama</i>	0.083±0.033	— ^{*5}	7.0×10 ³	^{*2} ND	3

*1 Mean value±standard deviation (n>2) or minimum and maximum value (n=2).

*2 ND means not detected.

*3 HcV infectious units in culture medium.

*4 *H. circularisquama* concentration in culture medium.

*5 Experimental additives indicated on the head of a column were not added.

*6 Filtration rates (C) were calculated as follows, $C = ((\ln N_0 - \ln N_1) \times V) / \text{gdw} / (t_1 - t_0)$; t: hour; gdw: dry weight of bivalve meat; N_0 , N_1 : *P. lutheri* concentration at t_0 and t_1 , respectively; V: culture volume.

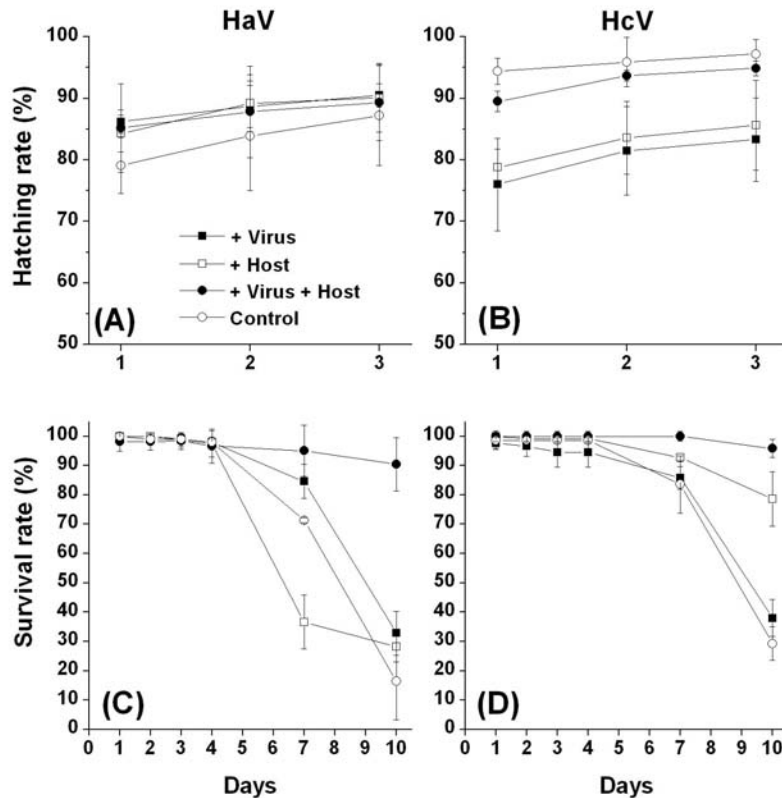


Fig. 2. Temporal changes of *Artemia salina* egg hatching rate and its larvae survival rate in a culture including HaV and/or *Heterosigma akashiwo* (A (hatching rate), C (survival rate)), and HcV and/or *Heterocapsa circularisquama* (B (hatching rate), D (survival rate)). ■: cultures including virus culture and SWM-3 medium; □: cultures including host algal culture and SWM-3 medium; ●: cultures including virus culture and host algal culture; ○: control (SWM-3 medium). Error bars indicate standard deviation (n=3).

suayama *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 2000)。本研究においても *H. circularisquama* を添加した試験海水中において実験中に二枚貝は死には至らなかったものの、殻の激しい開閉運動や擬糞の放出などがあり蛍光強度もほとんど減少しなかったことから、アコヤガイ、ムラサキガイそしてカキの摂食行動に対し *H. circularisquama* は阻害的な影響を及ぼすことが確認された。一方、HcV 添加区において二枚貝は *H. circularisquama* を与えたときのような忌避反応を示さず、対照区と同様な濾過活動を行っていた (Table 2)。このことは HcV の存在および HcV によって溶藻された *H. circularisquama* の溶藻液は、二枚貝の濾過摂食活動に対し阻害的な影響を与えていないことを示唆している。

動物プランクトン

アルテミア卵の孵化率の経時変化を Fig. 2A, 2B に示した。HaV 添加区, *H. akashiwo* 添加区, ならびに *H. akashiwo* + HaV 添加区のアルテミア卵孵化率は対照区と有意な差は無かった (ANOVA, $p < 0.05$)。このことは HaV がアルテミア卵の孵化に短期的には影響を与えない事を示唆している。*H. circularisquama* 添加区ならびに HcV 添加区における孵化率は対照区よりも低かったが (ANOVA, $p < 0.05$)、*H. circularisquama* + HcV 添加区では対照区とほぼ同等であった (ANOVA, $p < 0.05$)。*H. circularisquama* 培養液に HcV を感染多重度64で添加した場合、約10%のウイルスは溶液中に懸濁している (Nagasaki *et al.*, 2003)。HcV + *H. circularisquama* 添加区において、HcV の初期添加量は 2.6×10^6 感染単位 / mL で、感染多重度は約90であったため、培養液中には約 10^5 感染単位 / mL 程度の HcV 粒子は懸濁していたと推察される。*H. circularisquama* または HcV をそれぞれ単独でアルテミア卵に曝露した場合の孵化率についてはさらなる検討が必要であるが、少なくとも *H. circularisquama* ならびに HcV が混在している場合には、HcV はアルテミア卵に影響を与えないことが推察された。

アルテミア幼生の生残率の経時変化を Fig. 2C, 2D に示した。孵化後4日目までには、HaV ならびに HcV 実験系のいずれの試験区においても生残率は90%以上を維持していたが、7日目以降には各区で生残率の低下が見られた。HaV 添加区ならびに HcV 添加区の子残率は、実験10日目においてそれぞれ対照区よりも高かったことから、HcV ならびに HaV の存在はアルテミア幼生の生残に対して悪影響を与えないものと推察された。

大型海藻

実験に供試したアカモク、ワカメ、カバノリ、アナアオサの写真を Fig. 3に示した。

アカモクについては、いずれの実験区でも正常な形態形成が見られ、HaV, HcV ともウイルス培養液区、熱処理ウイルス培養液区間で葉上部ならびに仮根部 (Fig. 3B) の成長に差は見られなかった (Fig. 4A)。HcV ならびに HaV によるアカモクの形態形成異常の誘発、ならびに成長の阻害といった現象は観察されなかった。

ワカメ配偶体の各試験区における相対成長量を Fig. 4B に示した。配偶体コロニーの成長は、雄性配偶体の成長が対照区よりもウイルス培養液区で若干低かったものの、ウイルス培養液区と熱処理ウイルス培養液区との間ではほぼ等しかった。雌性配偶体では1ヶ月以内に全ての試験区で成熟が起こり (データ非表示)、卵の形成 (Fig. 3D) が見られた。形成された卵からは、受精あるいは単為発生による胞子体の発芽が見られた。一方、雄性配偶体ではウイルス培養液区ならびに熱処理ウイルス培養液区のみで成熟 (Fig. 3F) が見られたが、対照区では見られなかった (データ非表示)。これらの観察結果から HaV ならびに HcV によるワカメ配偶体への成長および成熟の抑制的影響はないものと推察された。

カバノリでは、全ての試験区において付着器切片からの再生 (Fig. 3H, I) が確認された。Fig. 4C に示すとおり、HaV, HcV ともウイルス培養液区では対照区に比べ直立体の成長が悪かったものの、ウイルス培養液区と熱処理ウイルス培養液区間ではほぼ同等の成長が見られた。このことから、直立体の成長阻害要因はウイルスの活性とは無関係であり、むしろ培養液に含まれる宿主細胞由来の成分等他の要因によるものと推察された。また、HcV 区では、他の区に比べて直立体の成長は低調であったが、1つの付着器切片から再生した直立体の数は多かった (データ非表示)。

マルバアマノリの葉状体全高ならびに全幅を Fig. 4D に示した。葉状体の全高と全幅は HaV, HcV とも、対照区よりもウイルス培養液区ならびに熱処理ウイルス培養液区で低くなった。しかしながらウイルス培養液区ならびに熱処理ウイルス培養液区間では、葉状体の全高と全幅はほぼ等しかった。このことから、対照区と比較してウイルス培養液区で葉状体の全高と全幅が低くなったのは、ウイルスその物の影響ではなく、カバノリにおける結果と同様、培養液に含まれるウイルス以外の要因が影響しているためと推察された。

アナアオサでは、Fig. 4E に示すとおり HaV, HcV とも、発芽体 (Fig. 3K) の成長は対照区および熱処

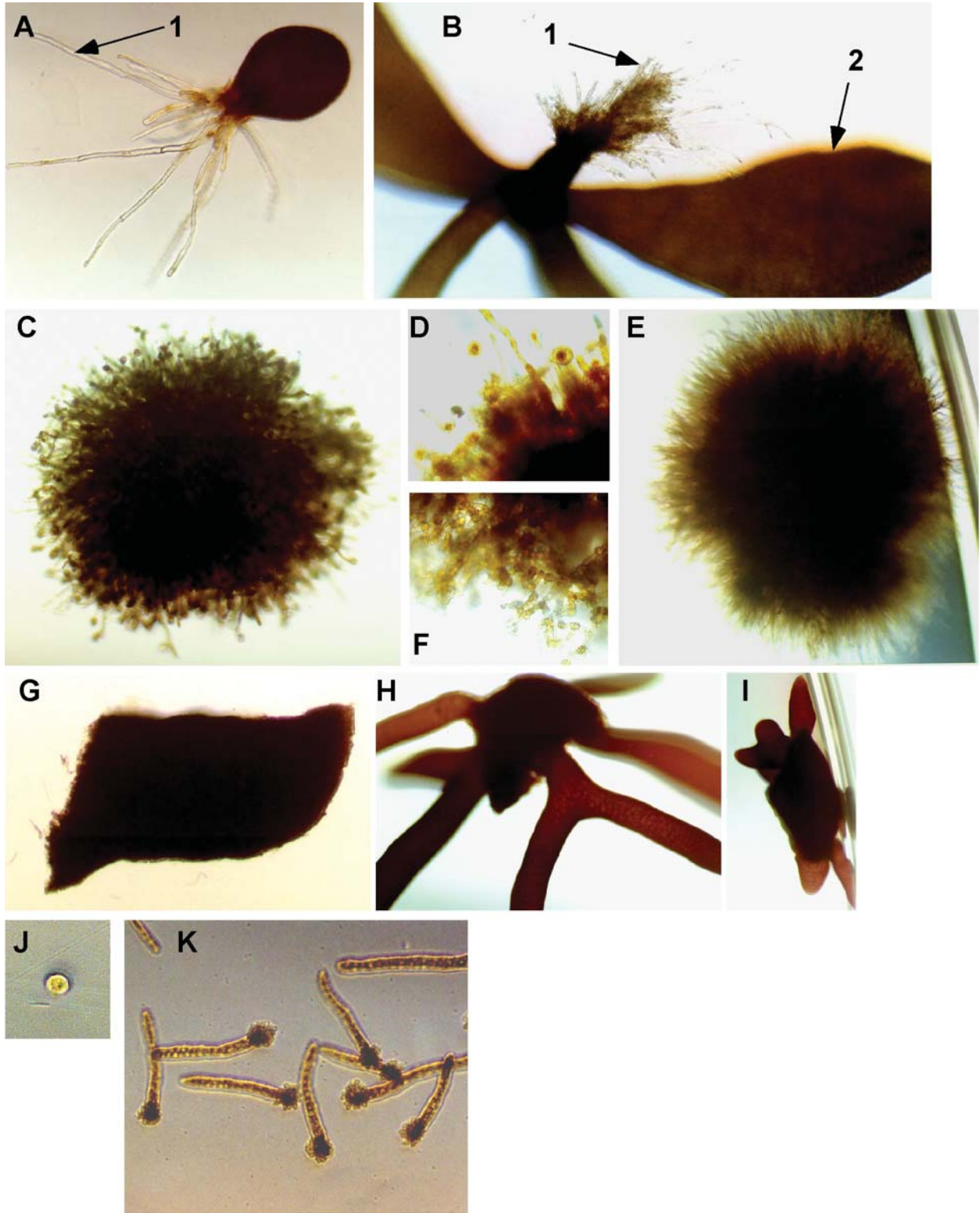


Fig. 3. Light microscopic photographs of seaweeds used in this study (except *Porphyra suborbiculata*). (A-B) *Sargassum horneri*, A, An embryo at the start of the experiment (arrow 1= rhizoid); B, an plant at the finish of the experiment (arrow 1= rhizoid, arrow 2= an leaf). (C-F) Gametophytes of *Undaria pinnatifida*, C, female gametophyte; D, higher magnification of oogonium at the finish of the experiment; E, male gametophyte; F, higher magnification of antheridium. (G-I) A pieced discoid tissue and regenerated thalli of *Gracilaria textorii*. G, a pieced discoid; H, regenerated thalli from discoid cultured in SWM-3 medium; I, regenerated thalli from discoid cultured under + heated HcV medium. (J-K) *Ulva pertusa*, J, germling; K, spore.

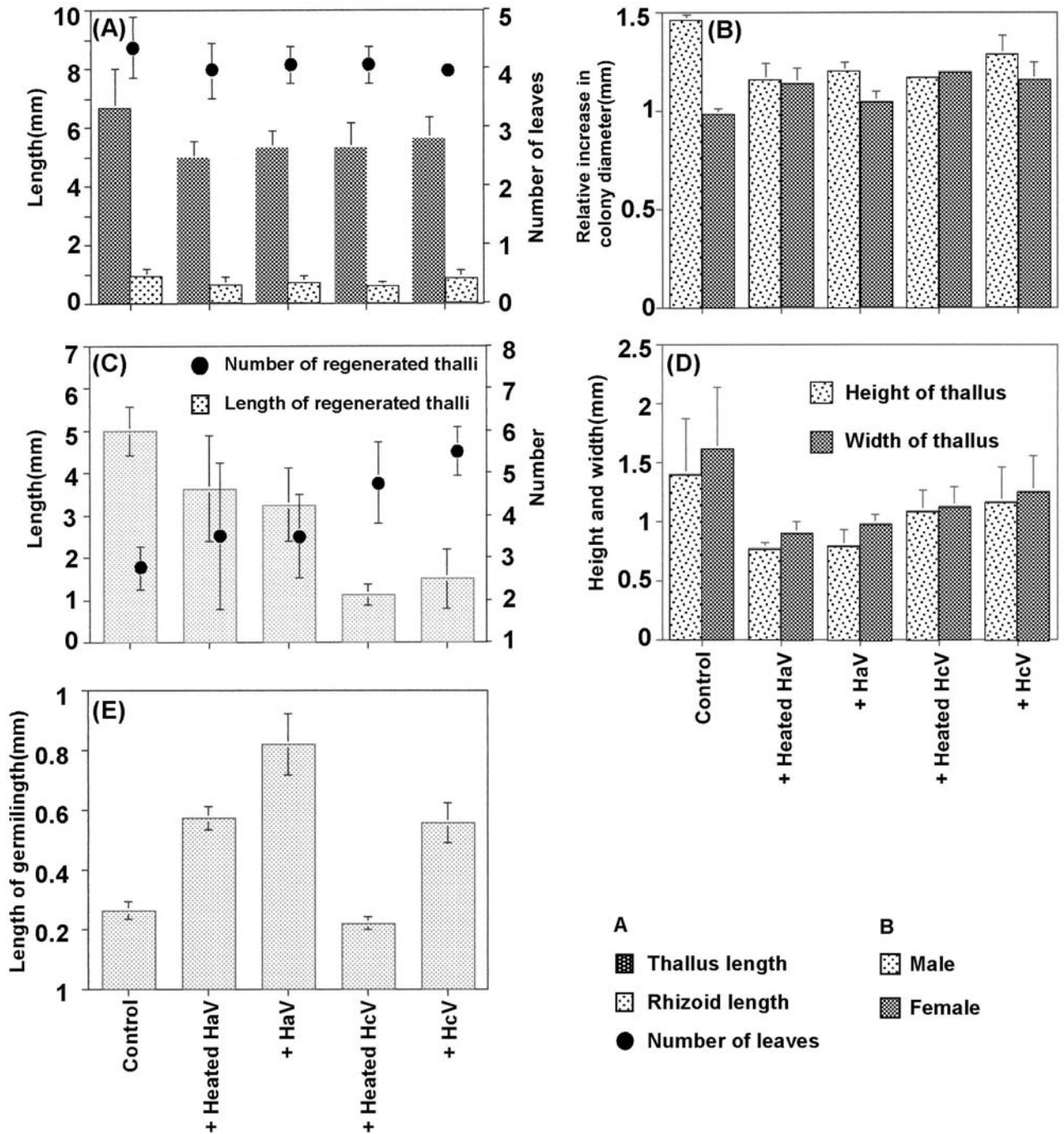


Fig. 4. Growth of 5 seaweeds after 2 (*Porphyra suborbiculata* and *Ulva pinnatifida*) and 4 (*Sargassum horneri*, *Undaria pinnatifida* and *Gracilaria textorii*) weeks of culture with or without vital HaV or HcV in medium. Seaweeds were incubated under following experimental treatments, control: SWM-3 medium; +Heated HaV: heat treated HaV culture (100 °C for 5 minute) ; +HaV: HaV culture; +Heated HcV: heat treated HcV culture (100 °C for 5 minute) ; +HcV: HcV culture. Concentration of HaV and HcV were 1.6×10^6 and 5.1×10^5 infectious units/mL, respectively, in experiments for *S. horneri*, *U. pinnatifida* and *G. textorii*, and 7.2×10^4 and 1.4×10^6 infectious units/mL, respectively, in experiments for *P. suborbiculata* and *U. pinnatifida*. Each of the cultures were added PESI solution at final concentration of 2% v/v. (A) Thallus length, rhizoid length and number of leaves of *S. horneri*, (B) relative increase of gametophyte colony diameter of *U. pinnatifida*, (C) number and length of regenerated thalli of *G. textorii*, (D) height and width of *P. suborbiculata*, (E) length of germlings of *U. pinnatifida*.

理ウイルス培養液区よりもウイルス培養液区で良好であった。このことからアナアオサ発芽体の成長に対し、HaV ならびに HcV は阻害的に作用することはないと推察された。

大型海藻に対するウイルスの影響評価試験では、急性毒性の特徴と思われる組織・細胞の崩壊はどの種類においてもまったく見られず、正常な形態形成・成長が確認された。以上のことから、本実験に用いたウイルスは大型海藻に対して短期間の内に影響を及ぼす事はないと推察された。

海産魚類

1. マミチヨグ

1 回目の試験で得られた結果を Fig. 5 に示した。各試験区の pH は 7.4–7.9, 溶存酸素濃度は 4.5–6.5 mg/L の間でそれぞれ変動し、実験期間中、各試験区間でそれらに顕著な差が現れることはなかった（データ非表示）。対照区では、実験開始後 2 日目までに生残個体が 8 ± 1 個体まで減少したが、その後は実験終了時まで減少しなかった。ヘテロカプサ培養液添加区および熱処理ウイルス添加区の実験終了時の生残個体数は、それぞれ 9 ± 0 個体および 8 ± 1 個体であった。一方、ウイルス添加区の生残個体数は実験終了時で 5 ± 3 個体であった。ウイルス培養液添加区で生残個体数が低くなったのは、3 連の試験区の中の 1 試験区で実験開始後 2 日目に死亡個体数が 8 個体に増加したためであり、分散分析の結果、対照区との有意差は確認されなかった（Fisher's PLSD Method, $p > 0.05$ ）。

2 回目の実験期間中、各試験区の pH は 7.8–8.1, 溶存酸素濃度は 3.5–6.6 mg/L の間でそれぞれ変動し、各試験区間でそれらに顕著な差が現れることはなかった（データ非表示）。実験区 B において実験開始後 3 日目に 2 個体、さらに 4 日目に 1 個体の死亡が確認されたが、対照区を含む他の試験区では実験終了時まで死亡個体は確認されなかった（データ非表示）。実験終了時における各試験区のウイルス感染単位は、いずれの試験区でも実験開始時と比較して 5% 程度まで減少した。これらの結果からは、マミチヨグの生残が今回の実験ウイルス密度範囲内で、ウイルスによって影響を受けることはないと推察された。

3 回目の試験で得られた結果を Fig. 6 に示した。各試験区の pH は 7.8–8.1, 溶存酸素濃度は 5.9–6.3 mg/L の間でそれぞれ変動し、試験区間で顕著な差が現れることはなかった（データ非表示）。実験開始時のウイルス感染単位は 7.0×10^5 感染単位/mL であったが、実験終了時には 1.4×10^4 感染単位/mL まで減少していた。対照区、実験区とも、実験開始後 3 日目

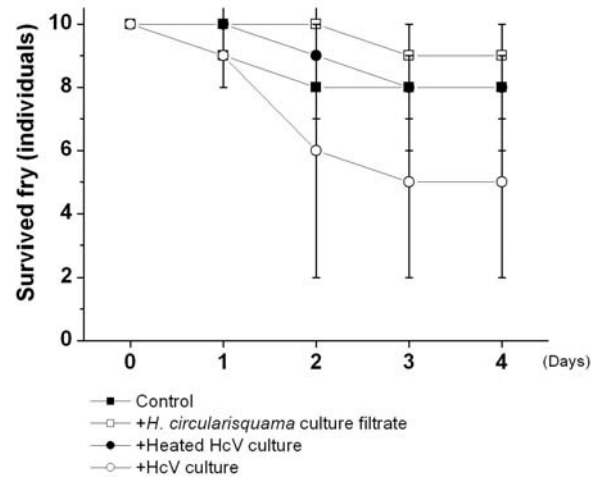


Fig. 5. Temporal changes of survived fry of *Fundulus heteroclitus* (1st experiment) in ■ : cultures of seawater passed through an active carbon filter (control) ; □ : with addition of a *Heterocapsa circularisquama* culture filtrate passed through a $0.8 \mu\text{m}$ pore-size filter; ● : with addition of heat treated HcV culture (100°C for 5 minute) ; ○ : with addition of HcV culture.

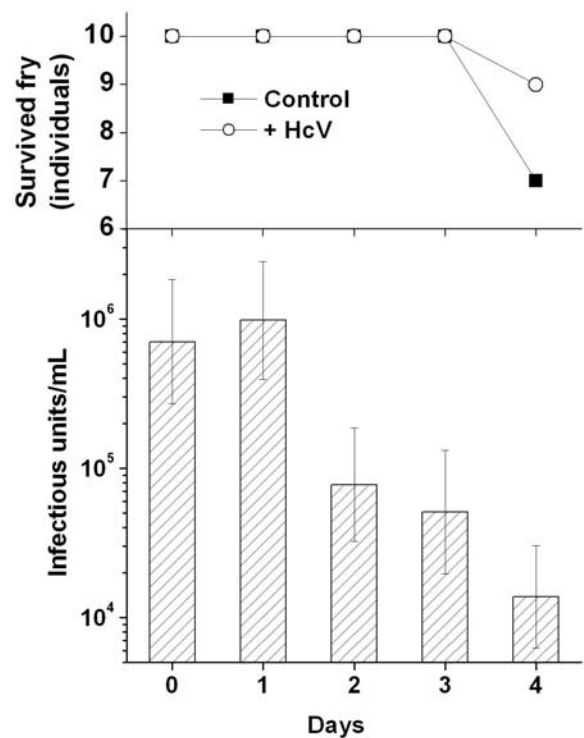


Fig. 6. Temporal changes of survived fry of *Fundulus heteroclitus* (3rd experiment), in ■ : cultures of seawater passed through an active carbon filter (control) ; ○ : with addition of HcV culture, and HcV infectious units in the virus added culture.

まで死亡個体は確認されなかったが、4日目にそれぞれ3個体、1個体の死亡が認められた。

以上の結果から、ウイルス HcV がマミチヨグの生残に対し、今回の実験のような短期間のうちに重篤な影響を及ぼすことはないものと推察された。

2. トラフグ, ヒラメ, マダイ

有用海産魚へのウイルス接種試験の結果を Table 3 に示した。実験期間中の各試験区の水温, 塩分はそれぞれ18–19°C, 30.4–31.4 ‰の範囲内で変動した。トラフグ試験区では, HcRNAV 曝露区において1個体死亡が確認され, HcV では死亡は確認されなかった。またヒラメ試験区においても, HcV ならびに HcRNAV 曝露区とも稚魚の死亡はなかった。マダイ試験区では HcRNAV 曝露区ならびに対照区で3個体ずつ死亡個体が確認されたが, HcV 曝露区では稚魚の死亡はなかった。いずれの試験区でも対照区に比べてウイルス曝露区で著しい稚魚の死亡は発生しなかったことから, HcV ならびに HcRNAV が有用魚類の生残に対して短期的に悪影響を及ぼす可能性は低いと推察された。

マウス

ウイルス投与区において, マウス1頭に対する HcV 投与量は 3.3×10^9 感染単位/mLであったため, 微生物農薬安全性ガイドラインにある, マウス1頭

に対し 10^8 感染粒子以上の投与を行うという基準(農林水産省農産園芸局植物防疫課, 1995)を満たす十分量が投与できているものと判断された。各投与区のマウス体重の推移を Fig. 7に示した。いずれの投与区においても同様な体重推移が観察され, HcV 投与による影響は認められなかった。また実験期間中, マウスに行動異常等の外観上の変化も観察されなかった。さらに実験終了後の解剖による内臓組織の状態観察からも, 各組織に異常は認められなかった。以上の結果から, HcV は微生物農薬安全性ガイドラインを参考にしたマウスに対する急性毒性試験において, 影響はないものと推察された。

まとめ

赤潮防除を目的として藻類ウイルスの現場への適用を考える上で, 主要な環境生物に対する影響を測定することは, その安全性を保証する上で不可欠な工程である。本実験では, 少なくとも今回実験に用いた生物群に対して, 藻類ウイルスは急性毒性を持たないと推察された。これまでの研究においても, 今回用いた藻類ウイルスが, 宿主以外の微細藻類に対して影響を及ぼさなかったということが報告されている(Nagasaki and Yamaguchi, 1997; Tarutani *et al.*, 2001; Tomaru *et al.*, 2004a)。このことは HaV, HcV, HcRNAV がきわめて高い宿主特異性を持つことを示すものである。同じ微細藻類ウイルスであるハプト藻の *Chrys-*

Table 3. Number of survived fries after 96 hour incubation following virus exposure tests.

	Time (h)	Control	+ HcV (Individuals)	+ HcRNAV
<i>Takifugu rubripes</i>	0	20	17	17
	96	20	17	16
<i>Paralichthys olivaceus</i>	0	10	10	10
	96	10	10	10
<i>Pagrus major</i>	0	23	18	15
	96	20	18	12

Fries of *T. rubripes*, *P. olivaceus* and *P. major* were exposed to HcV10 (2.2×10^6 , 3.0×10^5 and 3.0×10^5 infectious units/mL, respectively) or HcRNAV (3.7×10^6 , 5.1×10^5 and 5.1×10^5 infectious units/mL, respectively). Virus exposure time for *T. rubripes*, *P. olivaceus* and *P. major* were 10, 8 and 10 minutes, respectively. Fries for controls were not exposed to the viruses. The fries thus treated were incubated for 96 hours in a 30 L of filtered seawater passed through a 0.2 µm pore-size filter. A half of culture seawater was changed to a new one every 24 hour.

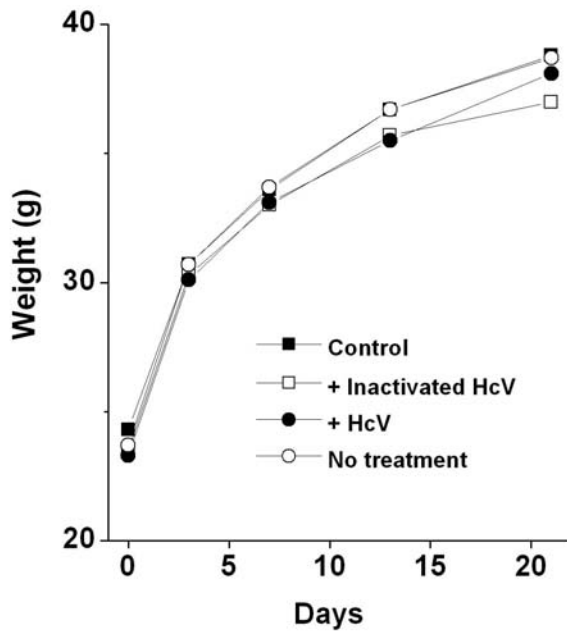


Fig. 7. Temporal changes of mice weights (n=3) ■: administered concentrated SWM-3 medium (control); □: inactivated HcV culture; ●: HcV culture (1.1×10^{10} infectious units/mL); ○: concentrated autoclaved distilled water (no treatment). Concentrations of HcV culture and autoclaved distilled water were carried out with using hollow fiber membrane filter. The titer of the concentrated HcV culture exposed under 20,000 lux light condition for 24h was decreased to 5.5 infectious units/mL and its culture was treated as inactivated HcV culture in this experiment.

ochromulina brevifilum に感染する CbV が *Chrysochromulina* 属の複数の種に対して感染性を持つこと (Suttle and Chan, 1995), また, 褐藻類を宿主とするウイルスは本来の宿主以外の近縁藻に対して感染し増殖抑制や形態異常をしばしば引き起こすこと (Kapp, 1998) と比較した場合, HaV, HcV, HcRNAV はより限定された厳密な感染範囲を持つものと推察される。よって, 本研究に用いたウイルス HaV, HcV, HcRNAV の他生物に対する安全性は高く, 海洋環境に散布した場合でも標的宿主以外の生物に影響を及ぼす可能性はきわめて低いと推察される。

今後, 藻類ウイルスの微生物農薬としての実用化の可能性を吟味する上で, 本実験で得られたデータを基本とし, 必要に応じ長期間にわたるウイルスの各種生物に対する曝露試験等の安全性評価に関わるデータを蓄積することにより, 海洋環境中に散布するための藻類ウイルスの安全性基準を早急に策定することが必要である。

謝 辞

二枚貝類, 餌料, 実験器具を提供していただいた薄浩則博士 (瀬戸内海区水産研究所), ならびに供試生物を提供いただいた角埜 彰氏 (瀬戸内海区水産研究所), 永井清仁博士 (ミキモト真珠), 門永圭史氏 (山口県内海栽培漁業センター), 大内 晟博士 (広島県栽培漁業センター), 今井一郎博士 (京都大学) に深謝いたします。

文 献

- Chen L. C. M., Edelstein T., and McLachlan J., 1969: *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.*, **5**, 211-220.
- Hiraoka M. and Enomoto S., 1998: The induction of reproductive cell formation of *Ulva perutusa* Kjellman (Ulvales, Ulvophyceae). *Phycol. Res.*, **46**, 199-203.
- Honjo T., 1993: Overview on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma akashiwo*, in "Toxic phytoplankton blooms in the sea" (ed. By Smayda T. J. and Shimizu Y.), Elsevier, Amsterdam, pp. 33-41.
- Horiguchi T., 1995: *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (Peridiniales, Dinophyceae), a new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycol. Res.*, **43**, 129-136.
- 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, pp. 9-21.
- 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.
- 今井一郎, 1999: 微生物を用いた赤潮の防除. 化学工業, **50**, 668-676.
- Imai I., Itakura S., Matsuyama Y., and Yamaguchi M., 1996: Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) in culture. *Fisheries Sci.*, **62**, 834-835.
- 伊藤克彦, 今井一郎, 1987: ラフィド藻, 「赤潮生物研究指針」(日本水産資源保護協会編), 秀和, 東京, pp. 122-130.
- Kapp M., 1998: Virus infecting marine brown algae. *Virus Genes*, **16**, 111-117.
- 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棟の解明. 水研センター研報, **7**, 24-105.
- Matsuyama Y., Uchida T., and Honjo, T., 1997: Toxic effects of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on clearance rate of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **146**, 73-80.
- Nagai K., Matsuyama Y., Uchida T., Akamatsu S., and Honjo, T., 2000: Effects of a natural population of the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on the survival of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fisheries Sci.*, **66**, 995-997.
- Nagai K., Matsuyama Y., Uchida T., Yamaguchi M., Ishimura M., Nishimura A., Akamatsu S., and Honjo, T., 1996: Toxicity and LD₅₀ levels of the red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on juvenile pearl oysters. *Aquaculture*, **144**, 149-154.
- 長崎慶三, 1998: 殺藻性ウイルスによる赤潮防除の可能性. *Microb. Environ.*, **13**, 109-113.
- Nagasaki K. and Yamaguchi M., 1997: Isolation of a virus infectious to the harmful bloom causing microalga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquat. Microb. Ecol.*, **13**, 135-140
- Nagasaki K., Tarutani K., and Yamaguchi M., 1999: Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 898-902.
- 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.
- Nagasaki K., Tomaru Y., Tarutani K., Katanozaka N., Yamanaka S., Tanabe H., and Yamaguchi M., 2003: Growth characteristics and intra-species host specificity of a large virus infecting the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Appl. Environ. Microb.*, **69**, 2580-2586.
- 西澤一俊, 千原光雄, 1979: 藻類研究法, 第1版, 共立出版, 東京, 754pp.
- 農林水産省農産園芸局植物防疫課, 1995: 微生物農薬の安全性評価に関する基準, 農林水産省農産園芸局植物防疫課編, 46pp.
- 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.
- Suttle C. A., 1993: Enumeration and isolation of viruses, in "Handbook of methods in aquatic microbial ecology" (ed. by Kemp P.F., Sherr E. and Cole J. J.), Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 121-137.
- Suttle C. A. and Chan A. M., 1995: Viruses infecting the marine Prymnesiophyte *Chrysochromulina* spp.: isolation, preliminary characterization and natural abundance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **118**, 275-282.
- Tarutani K., Nagasaki K., Itakura S., and Yamaguchi M., 2001: Isolation of a virus infecting the novel shellfish-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **23**, 103-111.
- Tarutani K., Nagasaki K., and Yamaguchi M., 2000: Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4916-4920.
- Tatewaki M., 1966: Formation of a crustaceous sporophyte with unilocular sporangia in *Scytosiphon lomentaria*. *Phycologia*, **6**, 62-66.
- Tomaru Y. and Nagasaki K., 2004: Widespread occurrence of viruses lytic to the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* along the western coast of Japan. *Plankton Boil. Ecol.*, **51**, 1-6.
- Tomaru Y., Katanozaka N., Nishida K., Shirai Y., Tarutani K., Yamaguchi M., and Nagasaki K., 2004a: 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**, 227-238.
- Tomaru Y., Tarutani K., Yamaguchi M., and Nagasaki K., 2004b: Quantitative and qualitative impacts of viral infection on *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) population during a bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Aquat. Microb. Ecol.*, **34**, 227-238.
- 和田 実, 中島美和子, 前田広人, 2002: 粘土散布による赤潮駆除, 「有害・有毒藻類ブルームの予防と駆除」(広石伸互, 今井一郎, 石丸 隆編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 121-133.
- 吉田吾郎, 吉川浩二, 寺脇利信, 2000: 低温保存したアカモク幼胚の発芽率と成長. 日水誌, **66**, 739-740.