

2022 年秋季の日高湾における *Karenia* 細胞の空間分布：FlowCam による測定
(卒業論文発表)

Karenia spp.は有害有毒藻類に分類される渦鞭毛藻であり、その内の 1 種である *Karenia mikimotoi* のブルームは海面養殖業に莫大な損失をもたらす可能性がある。本種は 25°C で最大増殖速度を示す暖水性種である。日本近海における本種の主な分布域は西日本沿岸域とされていたが、2015 年に北海道南部に位置する函館湾において本種の赤潮が初めて観測された。この赤潮を形成する *Karenia* spp.は、函館湾沖を東進する津軽暖流によって北海道太平洋側沿岸域に輸送されていると考えられるが、当該海域における植物プランクトンに関する研究はほとんど行われていないのが現状である。植物プランクトン種の研究では、顕微鏡による細胞の計数が主に用いられているが、顕微鏡による作業は時間や労力がかかり、疲労による精度低下の可能性がある。一方で、近年発展が著しい画像解析技術を用いた測器に FlowCam がある。この測器は試料中の粒子を高速で撮影し、短時間でナノ・マイクロサイズのプランクトン画像を得ることが出来る。さらに、FlowCam 画像解析用のソフトウェア VisualSpreadsheet 内のフィルター機能を用いることで、大量の画像から任意の類似画像を自動で選び出すことが可能である。*Karenia* spp.については自動分類機能に関する研究例があるものの、古いソフトウェアを用いた研究であり、現行のフィルター機能によるそれらの情報はまだ報告されていない。そこで、本研究では 2022 年秋季に北海道太平洋側沿岸域において採集した海水試料を用いて、FlowCam による *Karenia* spp.の自動分類に有効な設定を調査した。得られた細胞密度を水理環境データと比較することで、北海道太平洋側沿岸域における *Karenia* spp.の増殖環境の特定を試みた。

2022 年 9 月 15 日から 2022 年 9 月 18 日にかけて、北海道大学水産学部附属練習船「おしよろ丸」および「うしお丸」により、北海道太平洋沿岸域に設けた 3 観測点において、ニスキン採水器により、水深 10、20、30、50、100 m から採水した。海水試料はグルタールアルデヒド（終濃度 1%）により固定した。また、栄養塩分析用に、10 mL スピッツ管に海水を採取し、冷凍保存した。同時に、CTD により、水温、塩分および蛍光値の鉛直プロファイルを得た。航路上で、船底よりくみ上げている表層海水 1 L を、27 地点において採取し、上記と同様の方法で固定した。同時に、栄養塩試料も採水した。表層海水分析装置により、航路上の水温、塩分、蛍光値、濁度を得た。さらに、表層海水をかけ流して貯めた水槽に、赤潮センサーを入れ、FSI (Fluorescence spectral Shift Index) を測定し、試料採取時に記録した。陸上実験室において、栄養塩試料は、オートアナライザーを用いて硝酸塩、亜硝酸塩、アンモニウム塩、リン酸塩およびケイ酸塩濃度を測定した。*Karenia* 細胞計数用の固定試料 1 L を約 20 mL に静沈濃縮した。この濃縮試料からスライドグラス上に 500 μ L を取り、倒立顕微鏡を用いて *Karenia* spp.を計数した。顕微鏡による計数後、濃縮試料を FlowCam によって分析した。FlowCam は、10 倍の対物レンズ、FOV100 のフローセル、1 mL のシリンジを装

着し、AutoImage モードで濃縮試料中の粒子を撮影した。FlowCam の設定項目 Save Raw Camera Images の適用の有無により 2 通りの撮影速度を設定し、各濃縮試料を 4 回ずつ分析した。入手した画像から非 *Karenia* spp.画像と重複した画像を削除し、*Karenia* spp.の細胞数を FlowCam で分析した試料体積 (mL) で割ることで、細胞密度 (cells mL⁻¹) を求めた。FlowCam で撮影された画像データから、*Karenia* spp.の画像 50 枚と非 *Karenia* spp.の画像 950 枚を合わせたデータセットを作成した。同様に、*Karenia* spp.の画像 100 枚のライブラリを作成した。このライブラリから 5 種類の測定項目 (ESD、Aspect Ratio、Average Green、Circle fit、Perimeter) を組み合わせて 31 通りのフィルターを生成し、各フィルターを上記のデータセットに適用して、フィルター機能による *Karenia* spp.の検出を行い、正解率、真の正解率および精度値を求めた。顕微鏡と FlowCam による *Karenia* spp.細胞密度の定量結果を比較した。顕微鏡による *Karenia* spp.細胞密度と環境データ (水温、塩分、クロロフィル *a* 蛍光値、濁度、FSI) との関係を決断木により解析した。さらに、環境要因と *Karenia* spp.細胞密度との関係を明らかにするため、標準化した環境データを説明変数とし、*Karenia* spp.の細胞密度データと併せて、冗長性分析 (dbRDA: redundancy analysis) を行った。

顕微鏡と FlowCam による *Karenia* spp.の細胞密度の定量結果は正の相関を示したが、低密度時にはばらつきが大きかった。このばらつきは、サブサンプリングによる影響の可能性が示唆される。ばらつきはみられるものの、FlowCam は *Karenia* spp.の細胞を検出可能であり、その定量性は細胞密度が 1 cells mL⁻¹ 以上であれば十分に担保されると考えられる。FlowCam のフィルター機能による *Karenia* spp.の自動分類では、単独のフィルターとして ESD、Aspect Ratio、Average Green、Perimeter、Circle fit の順に真の正解率が高かった。複数の測定項目を組み合わせたところ、最大精度値 96%と良好であり、ESD、Aspect Ratio、Average Green の組み合わせが有効であることが示された。正解率は 90–100%であり、フィルター機能を用いることで最大 1 割程度の *Karenia* spp.画像が失われるが、FlowCam による *Karenia* spp.の細胞密度の定量に要する作業時間を大幅に短縮できると考えられる。2022 年 9 月の日高湾及び函館湾の海面は水温 17.6–23.4°C、塩分 33.0–33.8 の範囲であり、全地点でケイ酸塩以外の栄養塩が検出限界以下であった。全域が *Karenia mikimotoi* の増殖可能な水温、塩分の範囲にあり、全ての調査地点で *Karenia* spp.が確認され、0.04–23.17cells mL⁻¹ の範囲であった。栄養塩が枯渇している表層においても *Karenia* spp.が確認されており、*Karenia* spp.が鉛直移動により下層の栄養塩を使用していたと考えられる。調査海域では津軽暖流水が流入しているため、*Karenia* spp.が津軽暖流により輸送されている可能性がある。

本研究によって、FlowCam による *Karenia* 細胞の検出を試みた結果、低細胞密度時のバラツキには留意が必要だが、> 1 cell mL⁻¹ の時に適したフィルター機能を使用することで、迅速に細胞密度を求められることが示された。この分析時間の短縮と省力化に加えて、北海道周辺海域における観測網を充実させることで、*Karenia* spp.の分布の全容解明が期待できる。

久保 光