

伊勢湾の養殖ノリにおける病障害発生の 原因究明と軽減法に関する研究

坂 口 研 一

Study on the Cause Investigate and How to Relieve of the Development of Disease
and Discoloration in Cultivated Laver in Ise Bay

Ken-ichi SAKAGUCHI

キーワード：ノリ，赤ぐされ病，色落ち，伊勢湾

英 文 解 説

The laver farming in one of the most important fishing industries in Ise Bay. However, recently the production has been seriously affected by the disease outbreaks and other physiological damages. In particular, the laver farming is severely damaged by red rot disease induced by *Pythium porphyrae* and discoloration induced by lack of nutrients every year. The purpose of this study is to investigate the cause of development of red rot disease and discoloration disorder in order to impart stability to laver farming in Mie Prefecture and to suggest strategies to prevent their occurrences.

At first, sea conditions were compared and analyzed against the disease and the disorder using a geographical information system (GIS) in order to find relationships between them. For this purpose, monthly average sea conditions which were determined using ecological data during the period of the laver farming of the past twenty years and outbreak of serious red rot disease and discoloration during the same period were analyzed using GIS. It was found that the potential dangerous time and area of red rot disease and discoloration could be roughly estimated by GIS analysis.

Secondary, infection by zoospores released into seawater from zoosporangium is one of the important factors associated with the spread of disease. However, no data on the density of the zoospores in seawater was available and the zoospore concentration in the laver culture farm at the time of disease outbreak was not known. Therefore, in the present study, production of the specific monoclonal antibody recognizing only the disease germ *P. porphyrae* was tried, and the method to measure the zoospore concentration in the seawater was developed.

Consequently, the cell fusion between the spleen cells which were immune to the red rot causative pathogen and mouse myeloma cell was performed, and a highly specific monoclonal antibody product cell which reacted only to the red rot causative pathogen was successfully produced. Furthermore, the detection method of the causative pathogen in the seawater using this antibody was established, and as a result it was possible to observe the increase and decrease in the causative pathogen population in the laver culture farm. This method could detect the causative pathogen before 12 days, to compared with the first time naked eye visibility of the disease. Furthermore, when the density of zoospores of the causative pathogen in seawater was between 10^2 - 10^3 cells per liter, it became clear that the risk of the red rot disease was high. As a result, the possibility of forecasting of this disease was shown.

The abundance of zoospores of the red rot disease is usually high at the time of the disease outbreak and when virulence is prominent, it may not be possible to control the disease by employing a usual acidity solution treatment. However, considering the negative impact on environment and ecosystem or bivalves, the acid treatment without restriction is not desirable. Therefore, when the virulence of the red rot disease was prominent, the effective disease control technique that did not increase the frequency of the acid treatment was examined. When conditions in which disease might spread were present, the laver nets were first immersed for 5 minutes in acidic seawater (pH 2.0) after harvest, and then after 4 days re-immersed for 5 minutes in sea water of 20% salinity. Consequently, such a treatment could control the disease without causing any significant reduction in the growth of larva. Furthermore, the increase in the amount of harvest of laver by this technique was evaluated in the laboratory experiment. It was observed that at 15°C (ca. water temperature of autumn), combination of both acidified seawater and high salinity seawater (20% salt) was the most effective treatment yielding a 1.5 fold increase in the harvest relative to when only acidified seawater treatment was employed.

Next, in order to study the cause of discoloration of laver by the laver in Ise Bay, the Cluster analysis and the principal components analysis were performed using $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ concentration and specific gravity of the 17 culture farms. Subsequently, the source of supply of nutrients in culture farms were estimated by analyzing the surface and bottom layer seawater using GIS, and respective ambient concentrations of $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ in the pore water. Based on these parameters, the laver farms of Mie Prefecture were divided into two big groups, one which does not receive great supply of the nutrients (subsequently referred as coastal type) and the other group which receives great supply of the nutrients from river water (subsequently referred as estuarine type), eg. Kuwana and Matsusaka. Furthermore, the coastal type was divided into two sub-groups, one where supply of the nutrient from the bottom was high, and the other where such supply was low. It was thought as a result of analysis that supply of the nutrients from the bottom was not due to the upwelling but mostly caused by stormy weather. The laver farms in Ise Bay, are more susceptible to occurrence of discoloration if dissolved inorganic nitrogen (DIN) concentration fell below $60\ \mu\text{g/L}$. It was Nansei and Toba areas where DIN quite often fell below $60\ \mu\text{g/L}$ and frequency such occurrences was 30% or more compared to that of other regions of Ise Bay. Such a conclusion was also indicated by the principal component analysis. It was suggested that danger of discoloration in laver farms located in these areas was high.

Further experiments were conducted to examine for the color tone recovery of discolored laver. First of all, the method for evaluating the grade of discoloration of raw laver using color difference meter was examined, and the speeds of reduction and recovery of color tone at two difference temperatures (8°C, 15°C) were measured. Furthermore, efforts were made to recover the color tone of the raw laver by treating for 24 hours after the harvest. As a result of measuring the color tone and photosynthetic pigments, it was observed that among L^* , a^* and b^* value, a^* value had strong relationships with photosynthetic pigments contents. Therefore, I concluded that that a^* value could be used as an index of the color tone of laver. It also became clear that at 15°C, the seawater temperature of autumn, has a large recovery speed compared to that at 8°C, sea water temperature of winter. Furthermore, when a^* value range of the discolored laver was from -0.36 ± 0.48 to -2.68 ± 0.49 , the effective color tone recovery and the increase in the amount of photosynthetic pigments were obtained by treating the laver in $\text{NH}_4\text{-N}$ of 25mg/L for 24 hours. The discolored raw laver was produced on a large scale in the laboratory using the color tone recovery technique. Dry laver was produced and the color tone was compared with that of the untreated one. It became clear that the photosynthetic pigment contents of dry laver increased and recovery of a color tone was apparent event for naked eye.

和 文 解 説

伊勢湾におけるノリ養殖は冬季の基幹漁業となっている。しかし、現在でも多くの病気や生理障害がつきまとい、生産を不安定なものとしている。特にノリ養殖は *Pythium porphyrae* によって引き起こされる赤ぐされ病と栄養塩類の不足によって生じる色落ちによって毎年甚大な被害を受けている。本研究の目的は三重県のノリ養殖の安定化を目指すために赤ぐされ病と色落ちの発生の原因究明と軽減法の開発を行うことである。

まず、伊勢湾の海況と病障害の発生の関係を見いだすため、地理情報システム (GIS) による海況解析と、最も重大な病障害である赤ぐされ病および色落ち発生状況の比較を行った。海況の解析には三重県科学技術振興センター水産研究部の20年間の観測データを用い、GIS 解析ソフトによりノリ養殖漁期中の月別の平均的な海況を表した。また、20年間に発生した重篤な赤ぐされ病と色落ち発生について調査を行った。これらのデータから赤ぐされ病および色落ちの危険時期および海域は GIS による解析によっておおむね推定できることを見いだした。

赤ぐされ病は病変部に形成される遊走子嚢から海水中に放出される遊走子による2次感染が病気の蔓延を引き起こす大きな要因になっている。しかし、これまで赤ぐされ病の遊走子を海水中で検出した例はなく、病気の発生時にノリ養殖漁場でどの程度の遊走子濃度になっているのか全く不明であった。そこで、赤ぐされ病病原菌 *P. porphyrae* のみを特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を試みるとともに、海水中の遊走子濃度の測定方法の開発を行った。

その結果、赤ぐされ病病原菌で免疫を行ったマウス脾臓細胞にマウス骨髄腫細胞を細胞融合させ、赤ぐされ病病原菌に対してのみ特異的に反応するモノクローナル抗体産生細胞を作製することに成功した。さらに、この抗体を用いる海水中の病原菌の検出方法を確立し、養殖期間を通したノリ養殖漁場中の病原菌の消長を観測した結果、間接蛍光抗体法で病原菌を初めて確認した12日後にノリ葉体の病斑が肉眼で認められるようになった。また、病原菌の遊走子が海水 1 L 中に $10^2 \sim 10^3$ 個存在するとき赤ぐされ病の発生する危険性が高いことが判明し、本病気の発生子知の可能性が示された。

赤ぐされ病病原菌の遊走子が高濃度で存在し、病勢が強い時は通常の酸処理剤の使用頻度では赤ぐされ病の十分な防除効果が期待できない。しかし、酸処理は環境面のみならず、生態系や二枚貝類への影響も指摘されているため、制限無く酸処理を行うことは好ましくない。そこで、赤ぐされ病の病勢が強いときにおいても酸処理の頻度を増やす必要がない有効な病害抑制手法を検討した。

その結果、病気が蔓延する可能性のある海況において、摘採後にノリ網を酸性海水 (pH2.0) へ5分間浸漬し、その4日後に塩分濃度20%の高塩分海水へ5分間浸漬処理をすることにより、ノリ葉体の生長が抑制されることなく摘採から次の摘採までの間赤ぐされ病を抑制できることを明らかにした。さらに、この手法を用いてノリ養殖を模倣した装置でノリの収穫量の増加について検討した。その結果、秋芽網生産期を想定した水温 15°C では酸処理と高塩分 (20%) 併用処理を行うと酸処理剤単独使用に比べ収穫量は1.5倍となり増加が著しかった。

次に伊勢湾の漁場別のノリ色落ち発生原因を究明するために、湾内の17の漁場の海水中の硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) 濃度、アンモニウム態窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$) 濃度、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度、比重の水質データを用いてクラスター分析と主成分分析を行い漁場の分類をするとともに、GIS による湾内の表層水と底層水の解析および養殖漁場の底質の間隙水中に存在する $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度を分析することにより、漁場別に栄養塩類の供給源の推定を行った。

その結果、三重県のノリ養殖漁場は桑名や松阪海域に代表される栄養塩類の供給を河川水から大きく受けるグループ (以後河口型漁場とする) とその他の海域に代表される栄養塩類の供給を河川水から大きく受けないグループ (以後沿岸型漁場とする) の2つに大きく分かれ、沿岸型漁場はさらに底層からの栄養塩の供給が大きいグループと小さいグループに分けられた。解析の結果、底層からの栄養塩の供給は冬季の季節風による湧昇流によるものではなく、荒天による底層からの溶出であると考えられた。伊勢湾のノリ漁場は溶存態無機窒素 (DIN) が $60 \mu\text{g/L}$ 未満となると色落ち発生が危惧される。DIN $60 \mu\text{g/L}$ 以下の発生率が30%以上と最も高かったのは南勢地区、鳥羽地区であり、主成分分析からみた栄養塩類の供給が低いレベルと一致した。これらの地区は色落ち

の危険性が高い漁場であると示唆された。

色落ちノリの色調回復を目的に試験を行った。まず、生ノリの色落ちの程度を色彩色差計を用いて客観的に評価する方法の検討を行い、続いて水温による色調低下速度と色調回復速度を測定した。その結果に基づいて摘採後の生ノリの色調を加工前に24時間で回復させる手法を検討した。色調と光合成色素含量を測定した結果、 L^* 、 a^* 、 b^* 値の中で a^* 値は光合成色素含量と非常に強い相関が認められたので、 a^* 値がノリの色調の指標に用いられることを見いだした。色落ち段階別の色調回復はいずれの色落ち段階においても、冬季の冷凍網生産期を想定した8℃の試験区に比べ、秋季の秋芽網生産期を想定した15℃の試験区の方が回復速度が大きいことが明らかとなった。さらに、色落ちしたノリの a^* 値が $-0.36 \pm 0.48 \sim -2.68 \pm 0.49$ の範囲のとき、 $\text{NH}_4\text{-N}$ が25mg/Lの海水中で24時間処理すると、色調回復および光合成色素量の増加に安定した効果がみられた。室内試験で開発した色落ちノリの色調回復手法を用いてノリ養殖を模倣した装置で色落ちした生ノリを大規模に生産し、乾ノリを作製し色調の比較を行った。その結果、乾ノリの光合成色素含有量が増加し、肉眼的にも色調の回復が認められた。

目 次

序 章

第1章 地理情報システム (GIS) による海況解析と病障害の発生状況の比較	10
第1節 伊勢湾の概況	10
第2節 伊勢湾のノリ養殖の概要	10
第3節 地理情報システム (GIS) による海況解析と赤ぐされ病の発生状況の比較	12
第4節 地理情報システム (GIS) による海況解析と色落ちの発生状況の比較	16
第5節 地理情報システム (GIS) から得られたデータによる重回帰分析	17
第6節 考察	18
第2章 アマノリ赤ぐされ病原菌 <i>Pythium porphyrae</i> の早期検出法の開発	19
第1節 赤ぐされ病病原菌 <i>Pythium porphyrae</i> に特異的な新規モノクローナル抗体の作製	19
第2節 モノクローナル抗体の認識特異性	21
第3節 ノリ漁場における赤ぐされ病病原菌の検出	23
第4節 考察	25
第3章 赤ぐされ病抑制手法の開発	26
第1節 低温、低 pH を加味した高塩分処理による病害抑制手法の検討	26
第2節 赤ぐされ病病原菌遊走子の高濃度存在下における病害抑制手法の検討	28
第3節 考察	31
第4章 ノリの色落ちに関与する栄養塩類の供給面からみた伊勢湾のノリ養殖漁場の分類	32
第1節 栄養塩類の供給面からみた伊勢湾のノリ養殖漁場の分類と性質	32
第2節 ノリの色落ちを引き起こす伊勢湾の漁場別栄養塩類濃度レベル	36
第3節 考察	37
第5章 色落ちノリの色調回復手法の開発	38
第1節 生ノリの色調評価と光合成色素含量	38
第2節 水温別のノリの色調低下と回復	41
第3節 色落ちノリの色調回復手法の検討	43
第4節 考察	45
第6章 赤ぐされ病抑制と色落ち回復の実用化試験	46
第1節 酸性海水と高塩分処理の併用による赤ぐされ病罹病ノリの収穫量の向上試験	46
第2節 色調回復ノリを加工した乾海苔の色調回復試験	48
第3節 考察	50
総 括	51
謝 辞	53
引用文献	53

序 章

我が国のノリの生産量は年間約100億枚、金額は1,000億円以上であり、我が国の海面養殖業の中で重要な位置を占めている。三重県のノリ養殖は伊勢湾内と湾口部である鳥羽市の離島周辺海域で行われており、その生産枚数は年により変動はあるものの4～5億枚、生産金額は約40～50億円に達し、伊勢湾における冬季の基幹漁業となっている。

三重県のノリ養殖は1867年に現川越町地先でひび建てを行ったのが最初とされている。その後1950年頃までは、河口域を中心に天然採苗や他県からの移植に依存する形でノリ養殖が行われてきた。Drew (1949) により *Porphyra umbilicalis* の生活環が明らかにされてから (Fig. 1), 多くの研究者により人工採苗技術の開発・普及が行われ、その結果、本県においても湾奥部の河口域

を中心に行われていたノリ養殖が伊勢湾各地に急速に拡大した。さらに1960年代後半には、浮き流し養殖技術の開始、倉掛 (1966) によるノリ網の冷凍保存技術の開発、多収穫性品種の選抜育種などの養殖の技術革新が行われた。1970年代に入ると海苔の加工工程を自動化した全自動乾海苔製造機械が導入され、生産枚数は飛躍的に増大し、1970～1980年代に最盛期を迎えた。しかし、その後の全国的な生産過剰による価格の低迷、加工機器等の経費の増大による漁家経営の不振が続いている。さらに、以前と比較してノリ養殖の中で人為的にコントロールできる過程は増えたものの、依然としてノリ養殖は自然の気象・海況に大きく依存している。そのためノリ養殖には現在でも多くの病気や生理障害が付きまとい、生産を不安定なものとし、ひいては漁家経営を不安定なもの

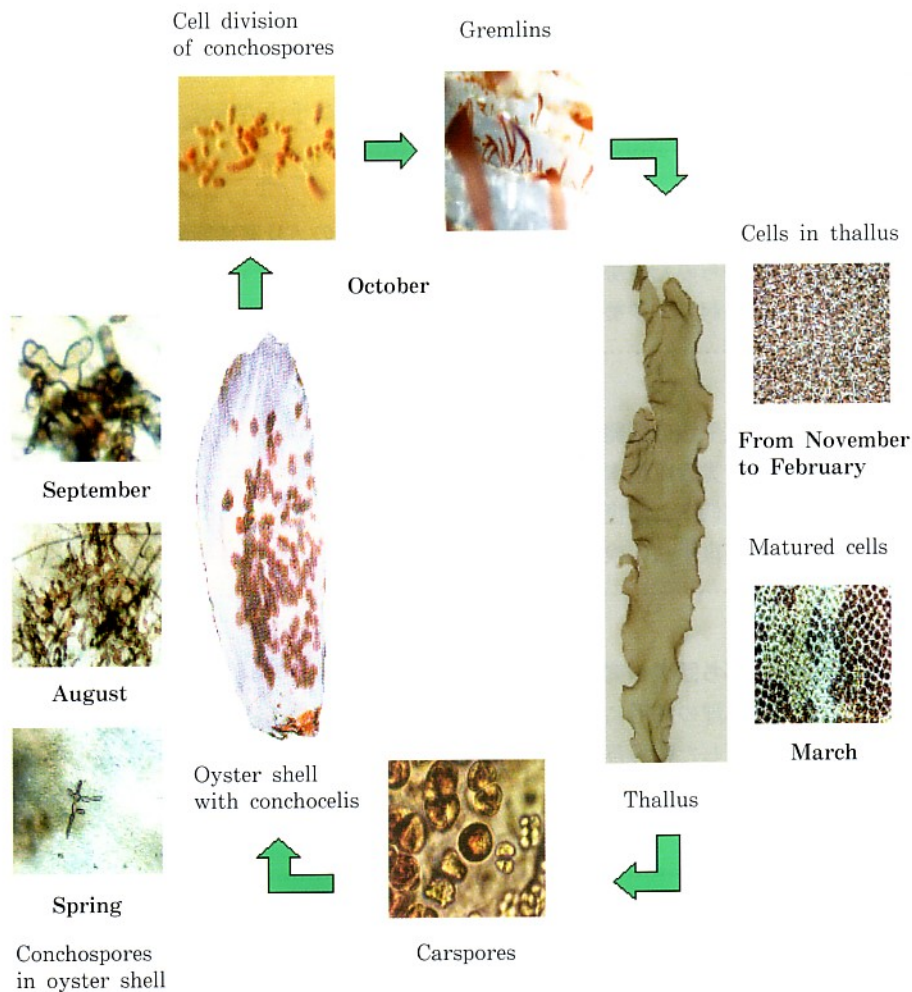


Fig. 1. Life cycle of *Porphyra yezoyensis*

している。

ノリの病気には糸状菌によって引き起こされる赤ぐされ病、細菌によって引き起こされる壺状菌病、生理障害による白ぐされ病等各種のものが存在する。ノリの生理障害には栄養不足による色落ち、各種気象、海況、不適切な養殖管理による芽落ち、芽痛み、河口漁場で発生するバリカン症などがある。中でも赤ぐされ病と色落ちは全国的な規模で毎年のように発生し、ノリ養殖に甚大な被害をもたらしている。

赤ぐされ病は卵菌類 *Pythium* 属によって引き起こされ、新崎 (1947) によってその病気の特徴が報告されて以来多くの研究がなされてきた。一般菌学的性状 (藤田ら, 1976)、培養条件 (佐々木ら, 1969; 加藤ら, 1973)、生育環境要因 (藤田ら, 1977) などについては解明されたものの、病理学的にはまだ未知の部分が多く、今なお全国のノリ養殖場で大きな被害を出している。本病の肉眼的特徴は先ず、葉体の所々に円形の赤さび色斑点が見られることから始まり、さらに病斑は緑黄色に変化して患部は腐敗し、ついには葉体がノリ養殖網から脱落する。また、顕微鏡的特徴は遊走子がノリ葉体表面に付着後、発芽管を出して細胞内に進入し、そこから隣接する細胞

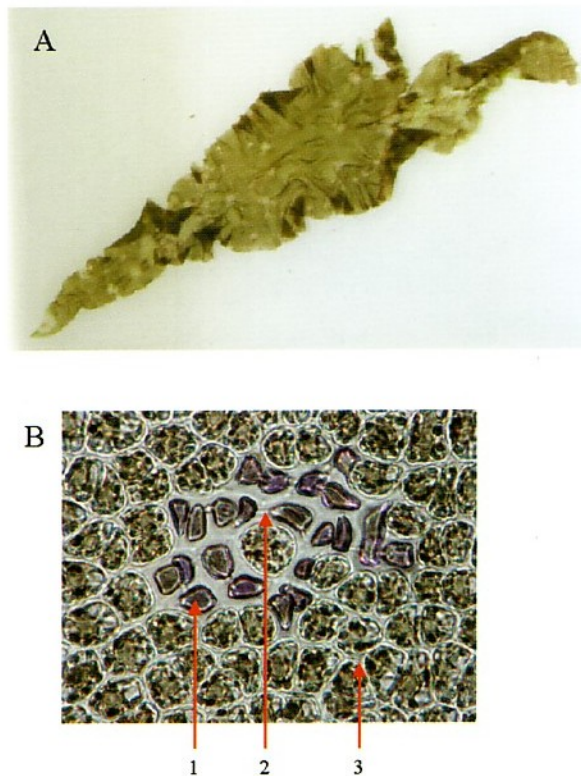


Fig. 2. Thallus (A) and cells (B) of *Porphyra yezoensis* infected by *Pythium porphyrae*. 1, Infected cells; 2, Hyphae of *Pythium*; 3, Healthy cells

を次々と貫通しながら生長する (Fig. 2)。さらにノリ葉体内の菌糸中にも遊走子嚢を造り、そこから遊走子を放出し、二次感染を起こす。しかし、主たる感染源になっている遊走子の海水中的での出現状況やその密度が把握がされておらず、漁場における発病時の詳細な様子は不明である。このため、赤ぐされ病病原菌に特異的な高感度検出法の開発の必要性があると指摘されてきた。

1975年に Kohler らによって、それまで永続培養が不可能であった抗体産生細胞を、永続培養が可能なマウス骨髄腫細胞と融合させ、抗体を産生しながら増殖を続けるハイブリドーマが作られた。これによってモノクローナル抗体を大量に作製する技術が生まれ、従来、主に病原菌の検出に用いられてきたポリクローナル抗体を含む抗血清はモノクローナル抗体に取って代わられるようになった。モノクローナル抗体の作製はポリクローナル抗体の作製に比べ、高度の技術、費用、設備、時間がかかるという短所はあるが、抗原に対する反応は極めて特異的であり、医学分野における種々の疾病の診断、分子生物学分野における研究、微生物の分類など、様々な方面に応用されるようになった。また、水産の分野でも以前から免疫学的手法としてポリクローナル抗体が魚種の判別などに用いられてきたが、近年では有毒渦鞭毛藻である *Alexandrium tamarense* の識別 (Adachi *et al.*, 1993)、せつそう病の原因となる *Aromonas salmonicida* の免疫学的診断 (Yoshimizu *et al.*, 1993)、また現在形態識別が困難であるヒトデ類の浮遊幼生の同定 (Ikegami *et al.*, 1991)、ホタテ貝の浮遊幼生の同定 (Demers *et al.*, 1993) などがモノクローナル抗体を利用して行われている。そこで、本研究では赤ぐされ病病原菌 *Pythium porphyrae* に特異的な新規モノクローナル抗体を作製して、ノリ養殖期間中の漁場における赤ぐされ病病原菌の検出を行い、本病発生時の病原菌濃度を調べた。

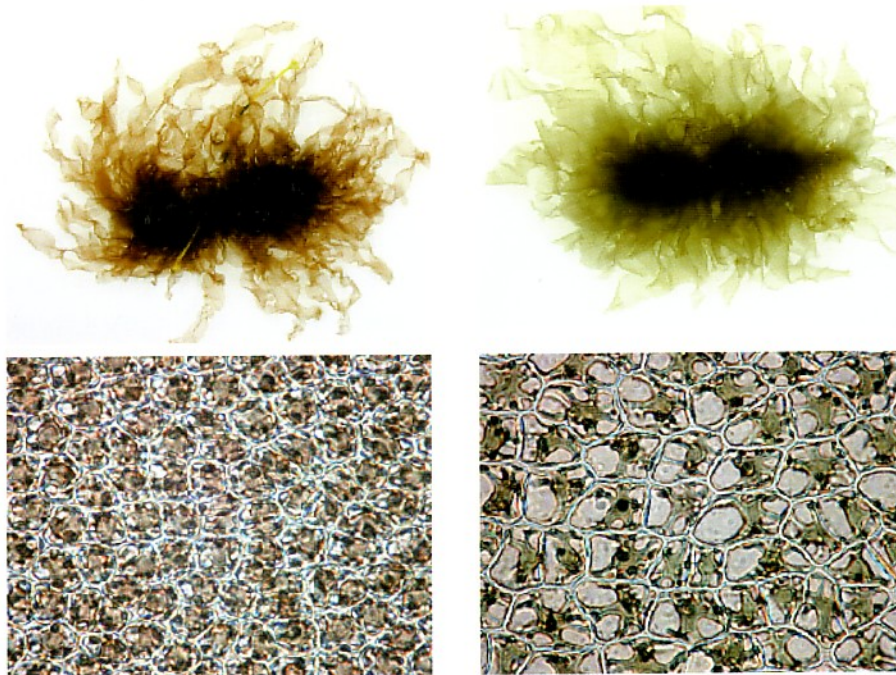
現在、産業規模での赤ぐされ病対策としては、ノリ網の干出、ノリ葉体を pH 2 程度とした酸性海水による浸漬処理 (酸処理)、早期摘採などがあるが、病勢が強いときにはこれらの対策のみでは不十分で、場合によっては漁場の多くのノリ網が生産不能となることがある。酸処理は赤ぐされ病のみならず、ノリ網に付着する緑藻や珪藻の除去などに一定の効果を示すとされるが、酸処理が環境に与える影響やノリの自然食品としてのイメージを大切にす配慮から、現在では各生産県でその使用についての規定が定められ、過剰な使用に歯止めをかけるようになっている。このように酸処理の使用回数や使用時期が制限される中で、赤ぐされ病病原菌の遊走子が高

濃度で存在し、病勢が強い時には酸処理を行っても病気が蔓延し、大きな被害をおよぼすことがしばしばある。そこで、酸処理の頻度を増やすことなく、病勢の強い赤ぐされ病に対して抑制効果があり収穫量を増やす方法を検討した。具体的には、酸処理と高塩分海水による処理を組み合わせる方法であり、両処理の最適な処理間隔や高塩分海水の塩分濃度などについて検討した。また、赤ぐされ病発生時における従来の酸処理と、酸処理と高塩分処理を組み合わせる方法との収穫量の比較を行った。

一方、ノリの生産高を低下させる大きな生理障害の一つに、ノリの色落ちがある。ノリの色落ち現象とは、海水中の栄養塩類の減少によりノリ葉体の色が退色することである (Fig. 3)。海水中の栄養塩類は冬季の降雨量の減少によって陸上からの供給が不足する場合や植物プランクトンの大量発生によって低いレベルで推移することが多い。このため漁場の栄養塩類濃度が、ノリが健全に生育するのに必要なレベルを下回る状態がしばしばみられ、ノリの色落ち現象の一因となる。色落ち現象は全国各地で毎年みられるが、特に2000年度のノリ漁期にはノリ養殖の主産地である有明海で過去最大の規模で発生し、有明海における生産量は対前年比61%まで減少した。

しかし、ノリの色落ちは伊勢湾でも毎年発生し、ノリの商品価値を著しく低下させるなどノリ養殖業に大きな損害を与えている。ノリの色調低下や色落ちはノリ養殖にとって非常に重要なことであるにもかかわらず、養殖現場においては色調の表現は曖昧であり、生ノリの色調の数値化による評価は行われていない。ノリの色調測定はこれまで乾のりの等級分類に色彩色差計を用いた例 (尾形ら, 1966; 工藤, 1999) があるにすぎない。そこで、葉体が半透明である生ノリについて色調を評価する方法を検討した。

これまでにノリの栄養要求や色落ち回復に関する研究がなされてきた (小林, 2001; 佐藤ら, 1959; 伊藤ら, 1960; 武居ら, 1959; 尾形ら, 1963, Amano *et al.*, 1987)。これらの研究によりノリの栄養要求量や色落ち回復に効果的な栄養組成について明らかにされている。しかしこれらの試験はフラスコ内の培養密度の低い条件下での色落ちノリの色調回復試験であることからノリ漁場への応用は難しい。また、河邊 (1987) の報告によると、ノリによる溶存態無機窒素 (DIN) の利用率は10%以下と推測され、海水中へ施肥するとノリと競合する植物プランクトンの増殖を引き起こし、これまでノリの色落ちには根本的な解決策が見いだされていない。そこで、



Normal laver

Seriously discolored laver

Fig. 3. Thalli and cells of normal and seriously discolored laver.

養殖業者に過大な施設負担がかからないことを必須条件として、摘採後のノリを乾ノリへの加工前に色調を回復させる手法を検討した。また、この手法により色調を向上させた生ノリから乾ノリを作製し、乾ノリにおける色調の回復を試験した。

これらの一連の研究から伊勢湾におけるノリの病障害の軽減と品質低下防止についていくつかの知見を得たので統括した。

本論文は全6章よりなり、まず第1章では本研究の現場である伊勢湾の概況と伊勢湾のノリ養殖の概要についてまとめた。次にノリ漁場の環境とノリの病障害の発生との関係について、地理情報システム(GIS)による伊勢湾の表層海況の解析と赤ぐされ病や色落ち発生の危険度および実際のこれらの病障害の発生頻度との比較を行った。

次いで、第2章では赤ぐされ病遊走子の海中における存在量をとらえ赤ぐされ病が蔓延する要因を解明するため、まず、赤ぐされ病病原菌 *Pythium porphyrae* を特異的に認識する新規モノクローナル抗体を作製し、その認識特異性を調べた。また、海水中の遊走子密度の計測方法の開発を行い、養殖漁場でのノリ養殖シーズンを通じた病原菌の密度の変動と病気発生期の密度を計測した。第3章では前章の結果を基に、赤ぐされ病の病勢の強い状態となる遊走子密度を再現し、この状態でも病勢を抑制する手法の開発を行った。

第4章ではノリの色落ち発生と漁場の環境特性との関係を明らかにした。すなわち、ノリ漁場の水質資料をもとに統計的手法で漁場を分類し、栄養塩類の供給源について検討した。さらに、各漁場毎にノリの色落ちが発生する危険レベルまで栄養塩類が低下する頻度について検討した。

第5章ではノリの色調低下や色落ちはノリの品質にとって非常に重要なことであるにもかかわらず、生ノリの色調の数値化による評価は行われていないことに着目し、生ノリの色調を数値化して評価する手法を検討した。また、漁場で養殖中の色落ちノリを根本的に回復させることは非常に難しいため、養殖業者に過大な負担をかけない方法で摘採後のノリの色調を回復させる手法を開発した。

第6章では産業規模での赤ぐされ病抑制と色落ち回復を目的として、第3章と第5章で開発した手法について

規模を拡大し、収穫量向上試験を行い、病勢が強い条件下での効果的な赤ぐされ病抑制手法と、色落ちから色調を回復させた生ノリを用いて乾ノリを作製し、色調の向上試験を行った。

本研究成果の一部は次の通り発表済みである。

- ・ Amano, H., Sakaguchi, K., Maegawa, M., and Noda, H. (1996): The use of a monoclonal antibody for the detection of fungal parasites, *Pythium* sp., the causative organism of red rot disease, in seawater from *Porphyra* cultivation farms. *Fish. Sci.*, **62** (4), 556-560.
- ・ 坂口研一・Chan Sun Park・柿沼 誠・天野秀臣 (2001): 高塩分処理を利用したアマノリ赤ぐされ病抑制手法の検討, 水産増殖, **49**, 77-83.
- ・ 坂口研一・落合 昇・Chan Sun Park・柿沼 誠・天野秀臣 (2003): 色落ちノリの色調評価と硫酸アンモニウム添加海水への浸漬による色調回復, 日本誌, **69**, 399-404.
- ・ Sakaguchi, K., Park, C. S., Kakinuma, M., and Amano, H. (2003): Documentation of yields of laver *Porphyra* after treating with acidified seawater and high salinity seawater to suppress red rot disease, *Suisanzoushoku*, **51**, 233-234.

略 語

本論文では以下の略語を用いた。

- DIN : dissolved inorganic nitrogen
- GIS : geographic information system
- PBS : phosphate-buffered saline
- DMEM : Doubecco's modified Eagle's medium
- PEG : polyethyleneglycol
- FITC : fluorescein isothiocyanate
- IgG : immunoglobulin G
- IgM : immunoglobulin M
- FBS : fetal bovine serum
- IFA : indirect fluorescent antibody
- ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
- COD : chemical oxygen demand

第1章 地理情報システム (GIS) による海況解析と病障害の発生状況の比較

伊勢湾の環境特性についてはその地形、地質 (桑原, 1977), 流れ等の物理特性 (宇野木, 1978; 関根, 1996; 佐藤, 1996) および水質 (西條ら, 1978) について数多くの調査, 研究がなされている。しかし, ノリ養殖漁場という視点から伊勢湾の海況特性について検討された例はこれまでほとんどない。

本章では地理情報システム (GIS) を用いてノリ養殖に関与する伊勢湾の平均的な表層海況について解析し, 伊勢湾のノリ養殖の生産を不安定にし, 品質を低下させる赤ぐされ病や色落ちの発生状況との比較を行った。また, 1980年以降の三重県のノリ養殖実態とその変動を把握するため, 統計資料を基に経営体数, 柵数, 生産枚数, 生産金額, 平均単価について調査した。

第1節 伊勢湾の概況

伊勢湾は面積1,738km², 容積33.9km³, 平均水深19.5m, 最大水深37mを持つ我が国最大級の内湾である。海底地形は中央部が最も深く, 水深30数メートルの海底が広がっており, 湾の東側の知多半島側に比べ, 北側の湾奥部や西側の三重県側の海底は緩やかになっている (Fig. 1-1, Table 1-1)。また, 湾奥には揖斐川, 長良川,

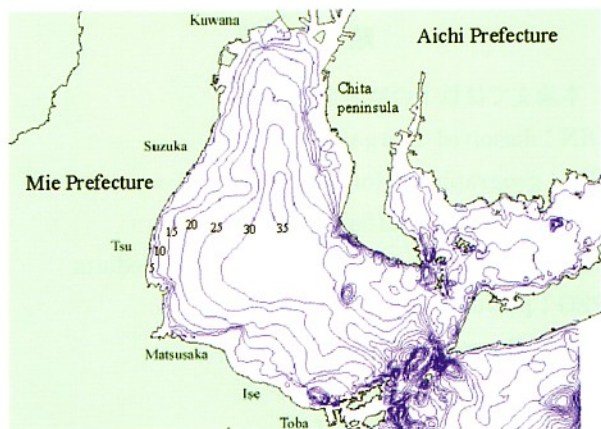


Fig. 1-1. Map showing the depth contour in Ise Bay.

木曾川の大河川 (通称木曾三川とよぶ), 西側には鈴鹿川, 雲出川, 櫛田川, 宮川が流入しており, 河口域は遠浅の地形が形成されている。これらの河川から豊富な栄養塩類が供給され, ノリの生長に必要な不可欠な栄養塩レベルが維持されている。河川流入量は伊勢湾で3.0 km³/month, 東京湾で0.67 km³/month, 大阪湾で0.77km³/monthである。伊勢湾は同じように大都市圏と湾奥に大きな河川を持つこれらの湾と比較して河川流入量が非常に多い。

また, 東京湾や大阪湾と比較して自然海岸が多く残され遠浅の地形により, 湾内の三重県側においては四日市市を除く木曾岬町から鳥羽市にかけて広くノリ養殖が行われている。

第2節 伊勢湾のノリ養殖の概要

方 法

三重県科学技術振興センター水産研究部のノリ養殖施設等調査および三重県漁業協同組合連合会の黒ノリ共販結果より1980年~1999年の20年間の三重県内のノリ養殖の経営体数, 柵数, 生産枚数, 生産金額, 平均単価の推移をまとめた。

結 果

経営体数

1980年度の経営体数は2,135経営体であったが, 漁業者の高齢化, ノリ単価の低迷, 採貝漁業への移行等から年々経営体が減少し, 1987年には941経営体に, 1999年には349経営体にまで減少した (Fig. 1-2)。

柵 数

1980年度の柵数は292,000柵であったが, 経営体数の減少等から年々柵数が減少し, 1988年には188,000柵に,

Table 1-1. Physical characteristics of Ise Bay

Volume (km ³)	Area (km ²)	Maximum depth (m)	Mean depth (m)	Coastline (km)	Valley area (km ²)	Total of the mean flux of main 8 rivers (m ³ /sec) [*]
33.9	1,738	37	19.5	339	13,411	478

* Main 8 rivers are Shounai river, Kiso river, Nagara river, Ibi river, Suzuka river, Kumozu river, Kusida river, and Miya river.

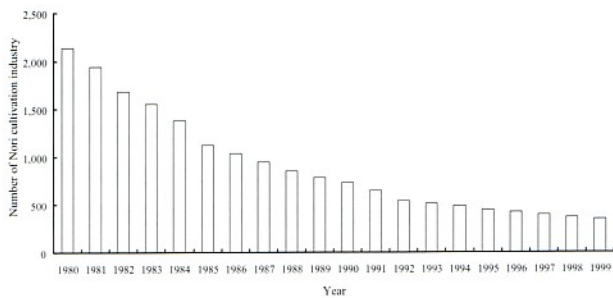


Fig. 1-2. Changes in the number of Nori cultivation industry (1980-1999).

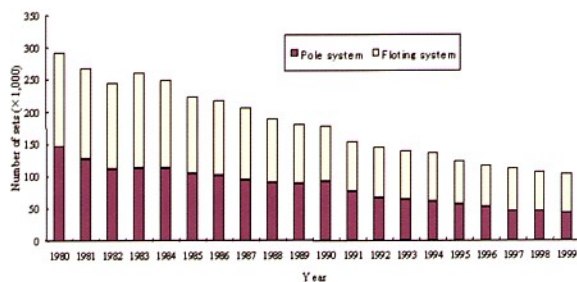


Fig. 1-3. Changes in the number of Nori cultivation sets (1980-1999).

1,999年には103,000柵にまで減少した。伊勢湾では20年間の支柱柵と浮き流し柵との割合は浮き流し柵が全体の50~60%で推移した (Fig. 1-3)。

生産枚数

1980年度の生産枚数は5億1千万枚であったが、1983年から1989年にかけて生産枚数は増加し、おおむね7億枚の生産量であった。しかし、1990年以降はおおむね4億枚から5億枚に減少した。生産枚数について3カ年の移動平均をとり傾向をみると、生産枚数が急増した後安定し、その後急激に減少した後緩やかな減少傾向を示しており、1980年以降の経営体数の減少や柵数の減少とは必ずしも比例していなかった (Fig. 1-4)。

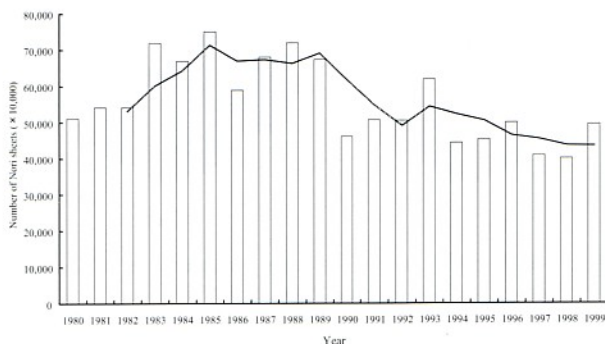


Fig. 1-4. Changes in the number of Nori sheets during 1980 to 1999. Solid line shows the moving average for 3 years.

生産金額

1980年度の生産金額は62億8千万円であったが、1981年から1989年にかけてはおおむね70億円から90億円の生産金額を上げた。しかし、1990年から生産金額は減少し、1993年はおおむね40億円から65億円で、その後はおおむね35億円から40億円で推移した。生産金額について3カ年の移動平均をとり傾向をみると、生産金額が上昇と下降を繰り返しながら、長期的には減少を続けている。生産枚数の減少より、生産金額の減少が大きかった (Fig. 1-5)。

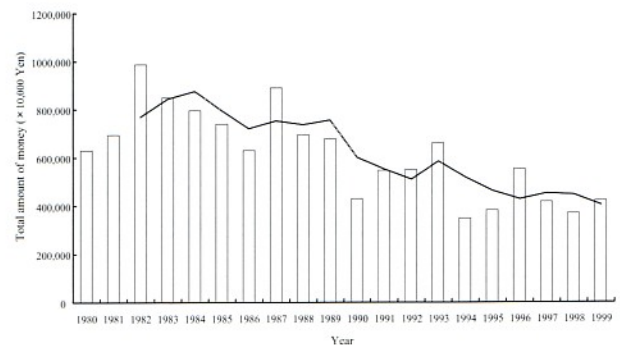


Fig. 1-5. Changes in the total amounts of money of Nori products during 1980 to 1999. Solid line shows the moving average for 3 years.

平均単価

1980年度の100枚当たりの平均単価は1,230円であったが、1982年には1,826円という非常に高い単価であった。これは全国的な年内生産の不振から品不足の傾向があったためである。平均単価には全国の生産枚数の変動と需要の変化が関係することから単価の変動は複雑である。平均単価について3カ年の移動平均をとり傾向をみると1982年の単価を除外すると多少の上昇、下降はあるものの全体的に下降傾向であった。(Fig. 1-6)。

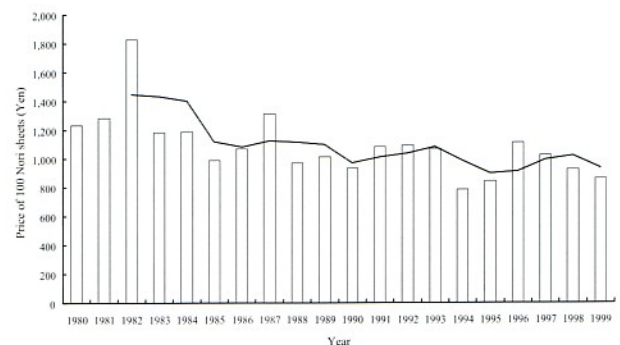


Fig. 1-6. Changes in the price of 100 Nori sheets during 1980 to 1999. Solid line shows the moving average for 3 years.

第3節 地理情報システム (GIS) による海況解析と赤ぐされ病発生状況の比較

伊勢湾の海況の平均的な季節変動についてはこれまでも数多く報告されている (宇野木ら, 1974; 西條ら, 1977; 宇野木, 1978; Sekine *et al.*, 1992; 久野, 1996)。しかし, 5 ヶ年程度の比較的短い期間のデータを用いたものや, ノリの栄養源として重要な溶存態無機窒素 (DIN), リン酸態リン ($PO_4\text{-P}$), またノリと栄養塩の吸収で競合をおこす植物プランクトン量を推定するクロロフィル *a* についてふれられていないものが多い。ここではノリ養殖に影響が大きい表層海水についての季節変動を, 調査項目によってデータの期間に違いはあるものの14ヶ年から20ヶ年の比較的長期のデータを用いて解析した。本節では地理情報システム (GIS) を用いて解析した伊勢湾の平均的な表層海況と重篤な赤ぐされ病の発生状況を比較した。

方 法

ノリ養殖の影響を直接受ける伊勢湾表層の海況の解析には三重県科学技術振興センター水産研究部が毎月実施した浅海定線観測で得られた観測データを用いた。調査定点を (Fig. 1-7) に示した。水温と塩分濃度は項目水質計 (Sea-Bird SBE-911 plus) を用いて, クロロフィル *a* 濃度は蛍光光度計 (Turner model 110-005R) を用いて測定し, DINと $PO_4\text{-P}$ は栄養塩分析装置 (TRAACS 800 BRAN+LUEBBE社) を用いて分析を行った。得られたデータについてペナルティー法による補間 (塩野ら, 1988) を行い, GIS解析ソフト (Arc View3.1 ESRI社) を用いてマップ演算を行って水温・塩分濃度については

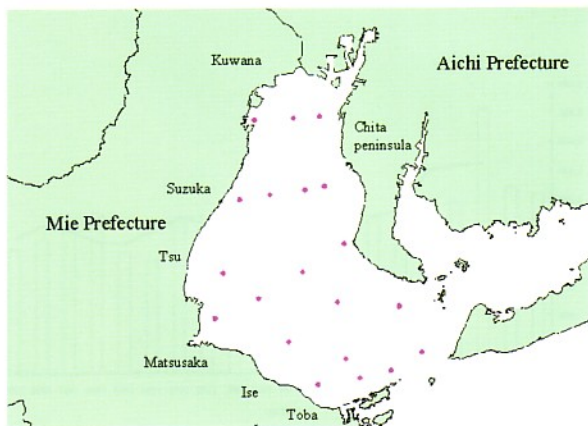


Fig. 1-7. Map showing the sampling stations (red spots) of seawater in Ise Bay.

20年間の, DINおよび $PO_4\text{-P}$ は15年間の, クロロフィル *a* 濃度は14年間の月別の平均的な表層水の特徴を解析した。重篤な赤ぐされ病の発生状況は三重県科学技術振興センター水産研究部が毎漁期後に発行する三重県のり情報総集編 (1980年~1999年) より地区別, 養殖時期別に整理し, 海況と赤ぐされ病の発生状況との比較を行った。

結 果

GISで解析した伊勢湾表層の海況

ノリ生産期の表層水温

1980年から1999年までの20ヶ年の月別の平均表層水温と水温別面積をFig. 1-8 に示した。月別の傾向は11月は三重県沿岸域で17~18℃の海域が広がり, その他の大部分は18~19℃であった。12月は中勢地区と南勢地区の沿岸域で13~14℃の海域がみられた他は三重県側を含む広い海域で14~15℃であった。湾口部と知多半島沿岸にはさらに水温が高い15~16℃の海域が広がっていた。1月は中勢地区と南勢地区の沿岸域で9~10℃の海域が存在するほかは全体として10~11℃の海域が大きく広がり, 湾口部に一部11~12℃の高い水温の海域が存在した。2月は湾内の大部分が8~9℃となり, 湾口部に一部9~11℃の海域が存在した。

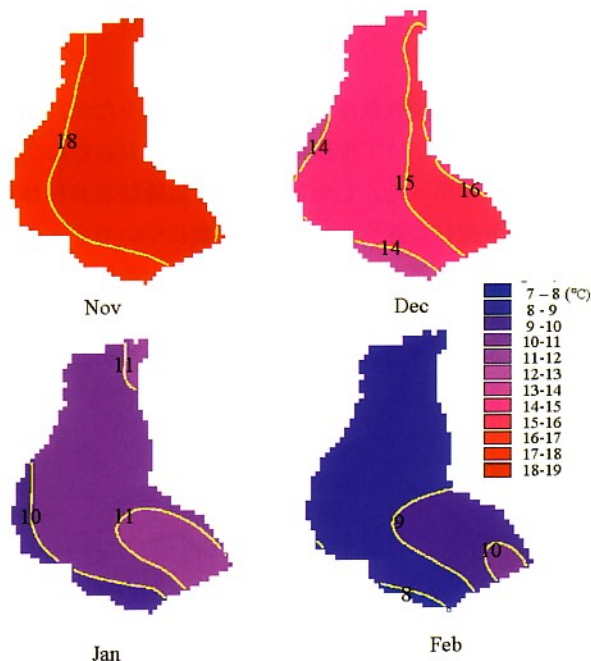


Fig. 1-8. Monthly mean seawater temperature of the surface of Ise Bay during 1980 to 1999.

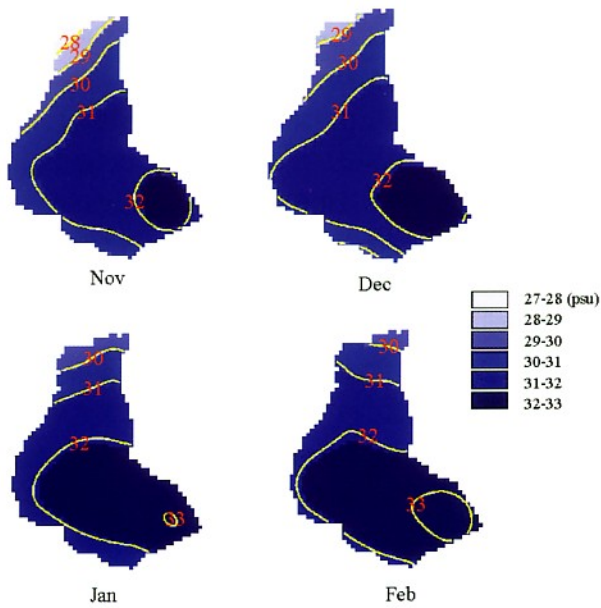


Fig. 1-9. Monthly mean salinity concentrations of the surface of Ise Bay during 1980 to 1999.

ノリ生産期の塩分濃度

1980年から1999年までの20カ年の月別の平均表層塩分濃度をFig.1-9に示した。月別の傾向は11月と12月は桑名地区では29psu以下の海域、鈴鹿地区では29～30psuの海域が、中勢地区と南勢地区の沿岸域で30～31psuの海域が広がった。湾の中央部は31～32psu、湾口部には32psuを越える海域が存在した。1月は桑名地区では29～30psuの海域、鈴鹿地区、中勢地区、南勢地区の沿岸域で30～31psuの海域が広がった。湾の中央部と湾口部には32psuを越える海域が存在した。2月は桑名地区では29～31psuの海域、鈴鹿地区、中勢地区、南勢地区の沿岸域で31～32psuの海域が広がった。湾の中央部と湾口部には32psuを越える海域が存在した。

ノリ生産期のDIN濃度

1985年から1999年までの15カ年の月別の平均表層DIN濃度をFig. 1-10に示した。月別の平均DIN濃度の傾向は11月は桑名地区で180 $\mu\text{g/L}$ 以上、鈴鹿地区は120～150 $\mu\text{g/L}$ 、その他の海域はほぼ90～120 $\mu\text{g/L}$ であった。12月は桑名地区、鈴鹿地区で240 $\mu\text{g/L}$ 以上、その他の海域はほぼ150～180 $\mu\text{g/L}$ であった。1月は桑名地区で240 $\mu\text{g/L}$ 以上、鈴鹿地区は180～240 $\mu\text{g/L}$ 、中勢地区以南の沿岸域で120～150 $\mu\text{g/L}$ の海域が広がった。2月は桑名地区で210 $\mu\text{g/L}$ 以上、鈴鹿地区は150～210 $\mu\text{g/L}$ 、中勢地区以南の沿岸域で90～120 $\mu\text{g/L}$ の海域が広がった。

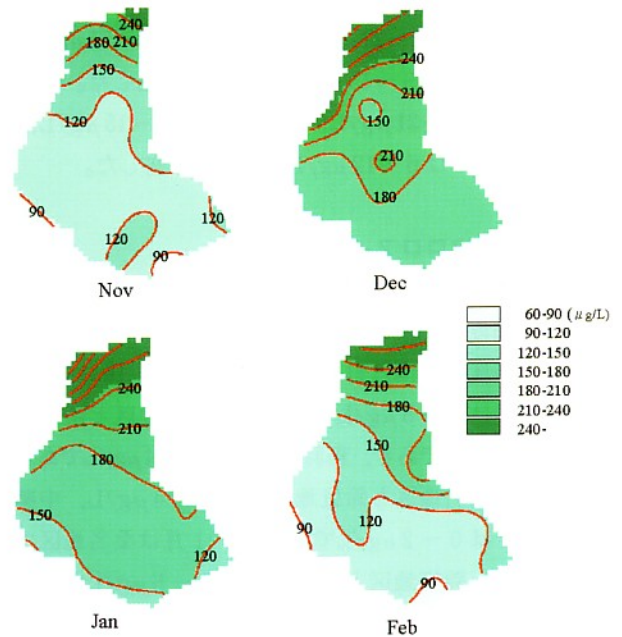


Fig. 1-10. Monthly mean DIN concentrations of the surface of Ise Bay during 1985 to 1999.

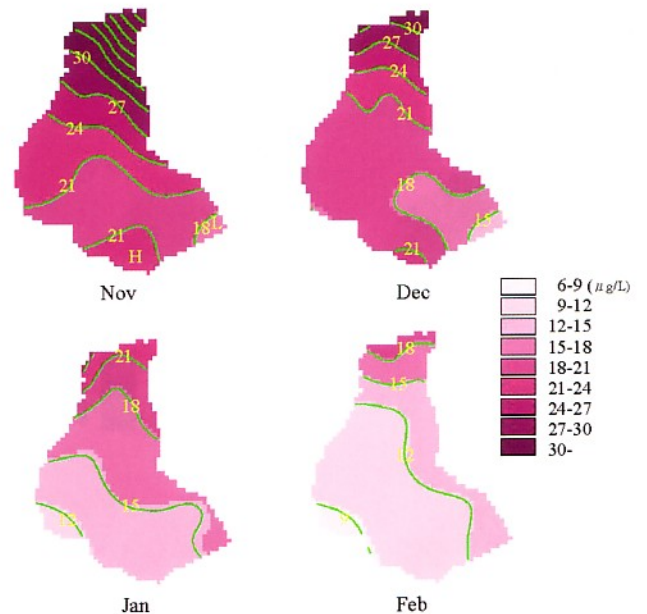


Fig. 1-11. Monthly mean PO₄-P concentrations of the surface of Ise Bay during 1985 to 1999.

ノリ生産期のPO₄-P濃度

1985年から1999年までの15カ年の月別の平均表層PO₄-P濃度を Fig. 1-11に示した。11月は桑名地区で30 $\mu\text{g/L}$ 以上、鈴鹿地区は24～27 $\mu\text{g/L}$ 、その他の海域はほぼ18～24 $\mu\text{g/L}$ であった。12月は桑名地区で30 $\mu\text{g/L}$ 以上、鈴鹿地区は18～24 $\mu\text{g/L}$ 、中勢地区以南の海域は18～21

$\mu\text{g/L}$ で、湾口部には $12\sim 18\ \mu\text{g/L}$ の海域が存在した。1月は桑名地区で $21\sim 27\ \mu\text{g/L}$ 、鈴鹿地区は $15\sim 21\ \mu\text{g/L}$ 、中勢地区以南では $9\sim 15\ \mu\text{g/L}$ の海域が存在した。2月は桑名地区で $15\sim 21\ \mu\text{g/L}$ 、鈴鹿地区は $9\sim 15\ \mu\text{g/L}$ 、中勢地区以南では $6\sim 12\ \mu\text{g/L}$ の海域が存在した。

ノリ生産時のクロロフィル *a*

1986年から1999年までの14カ年の月別平均表層クロロフィル *a* 濃度をFig. 1-12に示した。月別の平均クロロフィル *a* 濃度の傾向は11月は桑名地区で $8\sim 10\ \mu\text{g/L}$ 、鈴鹿地区では $6\sim 8\ \mu\text{g/L}$ であった。中勢地区と南勢地区は $4\sim 6\ \mu\text{g/L}$ であり、鳥羽地区では $2\sim 4\ \mu\text{g/L}$ であった。12月は桑名地区と鈴鹿地区では $2\sim 4\ \mu\text{g/L}$ 、中勢地区以南では $0\sim 2\ \mu\text{g/L}$ であった。1月は桑名地区で $2\sim 4\ \mu\text{g/L}$ 、鈴鹿地区と中勢地区は $4\sim 6\ \mu\text{g/L}$ であった。南勢地区は $2\sim 4\ \mu\text{g/L}$ であり、鳥羽地区では $0\sim 4\ \mu\text{g/L}$ であった。2月は桑名地区で $4\sim 6\ \mu\text{g/L}$ 、鈴鹿地区～南勢地区は $2\sim 4\ \mu\text{g/L}$ であった。鳥羽地区では $0\sim 4\ \mu\text{g/L}$ であった。

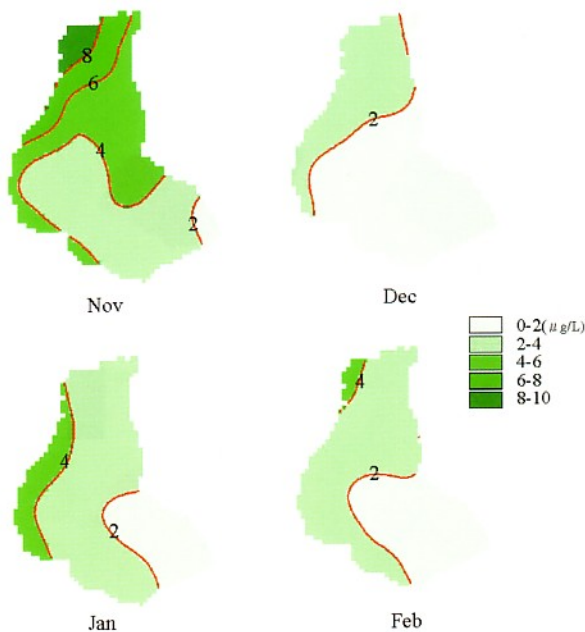


Fig. 1-12. Monthly mean chlorophyll-*a* concentrations of the surface of Ise Bay during 1986 to 1999.

GISで解析した海況からみた赤ぐされ病発生の危険性

赤ぐされ病がノリ養殖漁場で蔓延する環境条件としては低塩分、小潮時、温暖無風などが知られている（秋山, 1973）。また、赤ぐされ病病原菌 *Pythium porphyrae*

の至適生長温度は $15\sim 25^\circ\text{C}$ とされている（佐々木ら, 1969；藤田ら, 1977；Park *et al.*, 2000）。さらに新崎（1962）は培養水温の違いによるノリ葉体上に形成される遊走子嚢の形成量は $12\sim 25^\circ\text{C}$ のとき多いと報告している。また、赤ぐされ病はノリの栄養状態との関係が重要であり、生育良好のノリに多発すると言われている（加藤ら, 1973）。これらの赤ぐされ病発生条件とGIS解析による平均表層海水の状態を比較し本病発生の危険性を検討した。

11月の三重県沿岸の水温は $17^\circ\text{C}\sim 18^\circ\text{C}$ で、赤ぐされ病病原菌の至適生長温度内である。塩分濃度は桑名地区で若干低塩分となっていた。栄養塩類では桑名地区、鈴鹿地区で十分量存在し、病原菌の宿主であるノリの栄養条件がよかった。このことから伊勢湾全域で本病発生の危険性が高いが、中でも低塩分である桑名地区が最も赤ぐされ病発生の危険性が高く、次に鈴鹿地区が高いと判断された。

12月の水温は三重県沿岸では $13\sim 15^\circ\text{C}$ で赤ぐされ病病原菌の生長好適温度となっていた。塩分濃度は桑名地区で若干低塩分となっていた。栄養塩類は湾内全域で十分量存在し、病原菌の宿主であるノリの栄養条件がよかった。このことから、伊勢湾全域で赤ぐされ病発生の危険性が高いと判断された。

1月は三重県の沿岸域で水温は桑名地区と鈴鹿地区で $10\sim 11^\circ\text{C}$ 、中勢地区と南勢地区で $9\sim 10^\circ\text{C}$ となり、赤ぐされ病病原菌の生育は抑制されると考えられた。しかし、桑名地区の水温では $10\sim 12^\circ\text{C}$ と他地区に比べ若干高かった。湾内の塩分濃度は次第に高塩分化し、病原菌の生育は抑制されるが、桑名地区で若干低塩分となっていた。栄養塩類は十分量存在し、病原菌の宿主であるノリの栄養条件がよかった。このことから、水温低下と塩分上昇により、伊勢湾では12月に比べて赤ぐされ病は格段に抑制されると考えられるが、桑名地区は依然好適な条件が多く、赤ぐされ病発生の危険性が高いと判断された。

2月の水温は湾内の大部分で $8\sim 10^\circ\text{C}$ となり赤ぐされ病病原菌の生育は抑制されると考えられた。湾内の塩分濃度はさらに高塩分化し、病原菌の生育は抑制されるが、桑名地区で若干低塩分となっていた。栄養塩類は鈴鹿地区で $90\sim 120\ \mu\text{g/L}$ 、中勢地区以南で $60\sim 90\ \mu\text{g/L}$ となり、これらの地区では病原菌の宿主であるノリの栄養条件がやや悪くなった。しかし、桑名地区では栄養塩類は十分量存在し、病原菌の宿主であるノリの栄養条件がよかった。このことから、1月に比べて赤ぐされ病はさらに抑制されると考えられるが、桑名地区は栄養塩と塩分で依

Table 1-2. The number of serious red rot disease occurred during 1980 to 1999

	November	December	January	February	Total
1980	0	4	0	0	4
1981	2	2	5	0	9
1982	0	4	0	0	4
1983	0	2	0	0	2
1984	3	4	0	1	8
1985	0	4	0	1	5
1986	0	2	1	0	3
1987	0	1	2	1	4
1988	0	3	2	1	6
1989	4	2	0	0	6
1990	2	1	0	0	3
1991	0	5	1	0	6
1992	1	3	1	0	5
1993	2	2	0	0	4
1994	0	0	1	1	2
1995	2	2	0	1	5
1996	0	1	0	2	3
1997	2	1	1	2	6
1998	0	0	0	0	0
1999	0	0	0	0	0
Total	18	43	14	10	85

Table 1-3. Out break of serious red rot disease of laver in Kuwana area

	November	December	January	February
1980				
1981			○	
1982		○*		
1983		○		
1984		○		○
1985		○		○
1986			○	
1987			○	
1988		○		
1989	○		○	
1990				
1991		○	○	
1992			○	
1993	○	○		
1994			○	○
1995		○		○
1996				○
1997		○		○
1998				
1999				

*. red rot disease.

然好適な条件もあり、赤ぐされ病発生の危険性が高いと判断された。

三重県の赤ぐされ病発生状況

1980年～1999年までの20年間における三重県全地区の月別の重篤な赤ぐされ病平均発生状況は、11月は摘採が始まる中旬以降で18件(21%)、12月が43件(51%)、1月が14件(16%)、2月が10件(12%)で、12月の発生が全体

Table 1-4. Out break of serious red rot disease and discoloration of laver in Suzuka area

	November	December	January	February
1980		○*1	●*2	●
1981	●		○	
1982		○		●
1983		○		●
1984	○●	○	●	●
1985		○	●	●
1986	●	○		
1987			●	●
1988		○		
1989	○		●	
1990	○	○	●	●
1991	●	○	●	●
1992			●	●
1993	○			
1994	●	●		●
1995				●
1996		○		
1997	○			
1998				●
1999				

*1, red rot disease ; *2, discoloration.

の半数を占めた。年間に重篤な赤ぐされ病が5件以上と比較的多く発生した年は9ヶ年あった (Table 1-2)。

地区別にみると桑名地区では重篤な赤ぐされ病は20年間で11月に2回、12月には9回、1月には7回、2月には6回発生し、他地区では比較的赤ぐされ病の発生の少ない1月、2月にも高い発生回数であった (Table 1-3)。鈴鹿地区では11月に5回、12月には10回、1月には1回発生し、ほとんどが11月中旬以降と12月の秋芽網生産期に集中していた (Table 1-4)。中勢地区では11月に5回、12月には10回、1月には2回発生し、ほとんどが11月中旬以降と12月の秋芽網生産期に集中していた (Table 1-5)。南勢地区では11月に3回、12月に10回、1月に4回、2月には2回発生し、ほとんどが11月中旬以降と12月の秋芽網生産期に集中していた (Table 1-6)。鳥羽地区では11月に1回、12月に5回、1月に2回、2月には1回発生し、ほとんどが11月中旬以降と12月の秋芽網生産期に集中していた (Table 1-7)。

Table 1-5. Out break of serious red rot disease and discoloration of laver in Chusei area

	November	December	January	February
1980		○*1	●*2	●
1981	○●	○	○	
1982		○		●
1983	●		●	
1984	○●	○		●
1985		○	●	●
1986	●			
1987		○	○	
1988		○	●	
1989	○	○	●	●
1990	○			
1991	●	○●		●
1992		○		
1993				
1994				●
1995				●
1996				
1997	○			
1998				
1999				

*1, red rot disease ; *2, discoloration.

Table 1-7. Out break of serious red rot disease and discoloration of laver in Toba area

	November	December	January	February
1980		○*1		●
1981	●*2		○	
1982		○		●
1983	●			
1984	○●	○		●
1985			●	●
1986	●			
1987			○●	
1988			●	○●
1989				●
1990			●	
1991		○		
1992		○	●	
1993				
1994				●
1995	●			●
1996				
1997				
1998				
1999				

*1, red rot disease ; *2, discoloration.

Table 1-6. Out break of serious red rot disease and discoloration of laver in Nansei area

	November	December	January	February
1980		○*1	●*2	●
1981	○●	○	○	
1982		○		●
1983	●		●	
1984	●			●
1985		○	●	●
1986	●	○		
1987			○●	○●
1988			○●	
1989	○	○		●
1990	●		●	
1991		○	●	●
1992	○	○		●
1993		○	●	
1994	●	●		●
1995	●	○		●
1996			●	
1997			○	○●
1998				
1999				

*1, red rot disease ; *2, discoloration.

第4節 地理情報システム (GIS) による 海況解析と色落ちの発生状況の比較

ノリの色落ち現象とは、海水中の栄養塩類の減少によりノリ葉体の色が退色することである。色落ち現象は全国各地で毎年みられ、ノリの商品価値を著しく低下させ、時にはノリ網全体のノリが摘採不能となり、ノリ養殖業に大きな損害を与える。

三重県においても湾奥部の木曾三川河口域以外では毎年のように発生する。本節ではGISを用いて解析した伊勢湾の平均的な表層海況と重篤な色落ちの発生状況を比較した。

方 法

GISによる伊勢湾表層の平均的な海況解析は第1章第3節の方法で行った。色落ちの発生状況は三重県科学技術振興センター水産研究部が毎漁期後に発行する三重県ノリ情報総集編（1980年～1999年）より地区別、養殖時期別に整理し、海況と色落ちの発生状況の比較を行った。

結 果

GISで解析した海況からみた色落ち発生の危険性

DIN や $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の低下はノリの色落ちを引き起こす。また、植物プランクトンの発生により短期間にDIN や $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度が減少しノリの色落ちの発生を引き起こす。ここでは、15年間にわたる月毎の平均的なDIN濃度および $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度と植物プランクトン量を反映する14年間の平均クロロフィル *a* 濃度から色落ち発生の危険性を検討した。

11月の平均DIN濃度は桑名地区で180 $\mu\text{g/L}$ 以上、鈴鹿地区で120~150 $\mu\text{g/L}$ 、中勢地区、南勢地区、鳥羽地区で60~120 $\mu\text{g/L}$ であった。 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度は全地区で18 $\mu\text{g/L}$ 以上存在した。また、平均クロロフィル *a* 濃度が鈴鹿地区では6~8 $\mu\text{g/L}$ 、中勢地区、南勢地区で4~6 $\mu\text{g/L}$ 、鳥羽地区で2~4 $\mu\text{g/L}$ であった。このことから鈴鹿地区ではプランクトンの発生による色落ちが発生する危険性があり、中勢地区、南勢地区、鳥羽地区ではDIN濃度が低レベルであることから色落ちの発生の危険性が高いと判断された。12月はすべての海域でDIN濃度が120 $\mu\text{g/L}$ 以上、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度は全地区で18 $\mu\text{g/L}$ 以上であること、平均クロロフィル *a* 濃度がすべての海域で4 $\mu\text{g/L}$ 以下であったことから、色落ちの発生の危険性が低いと判断された。1月はDIN濃度がすべての地区で120 $\mu\text{g/L}$ であった。一方、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度は中勢地区、南勢地区、鳥羽地区で9~12 $\mu\text{g/L}$ であった。また、平均クロロフィル *a* 濃度が鈴鹿地区、中勢地区の沿岸域で4~6 $\mu\text{g/L}$ であった。このことから鈴鹿地区、中勢地区では植物プランクトンによる色落ち、南勢地区、鳥羽地区では $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の低下による色落ちの発生の危険性が高いと判断された。2月はDIN濃度は鈴鹿地区で120~150 $\mu\text{g/L}$ 、中勢地区以南の沿岸域で60~120 $\mu\text{g/L}$ の海域が広がった。 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度は鈴鹿地区と鳥羽地区で9~12 $\mu\text{g/L}$ 、中勢地区と南勢地区で6~9 $\mu\text{g/L}$ であった。平均クロロフィル *a* 濃度は桑名地区を除いて4 $\mu\text{g/L}$ 以下と低いレベルであった。このことから、鈴鹿地区では $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の低下による色落ち、中勢地区、南勢地区、鳥羽地区ではDIN濃度と $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の低下による色落ちの発生の危険性が高いと判断された。

三重県の色落ち発生状況

三重県全地区の月別の色落ち発生状況は、11月が20件(22%)、12月が3件(3%)、1月が30件(33%)、2月が39件(43%)で、1月、2月の冷凍網生産期の発生が全体

Table 1-8. Number of serious discoloration of laver occurred during 1980 to 1999

	November	December	January	February	Total
1980	0	0	3	4	7
1981	4	0	3	0	7
1982	0	0	0	4	4
1983	3	0	2	1	6
1984	4	0	1	4	9
1985	0	0	4	4	8
1986	4	0	4	0	8
1987	0	0	0	2	2
1988	0	0	3	1	4
1989	0	0	1	3	4
1990	1	0	3	1	5
1991	2	1	2	2	7
1992	0	0	2	2	4
1993	0	0	1	0	1
1994	2	2	0	4	8
1995	0	0	0	4	4
1996	0	0	1	1	2
1997	0	0	0	1	1
1998	0	0	0	1	1
1999	0	0	0	0	0
Total	20	3	30	39	92

の76%を占めた。年間に色落ちが5件以上と比較的多く発生した年は9ヶ年あった(Table 1-8)。桑名地区では色落ちは桑名地区のノリ養殖漁場は木曾三川の河口に位置するため、10月と11月のように平均クロロフィル *a* 濃度が高い時期もあるが栄養塩濃度は、漁期中をとおしてDINが100 $\mu\text{g/L}$ 以上、 $\text{PO}_4\text{-P}$ は15 $\mu\text{g/L}$ 存在し、重篤な色落ちは起こらなかった(Table 1-3)。鈴鹿地区では20年間で11月に5回、12月に1回、1月に8回、2月に12回発生し、特に1月、2月の冷凍網生産期に高い頻度で重篤な色落ちが発生した(Table 1-4)。中勢地区では11月に5回、12月に1回、1月に5回、2月に8回発生し、特に2月の冷凍網生産期に高い頻度で発生した(Table 1-5)。南勢地区では11月に7回、12月に1回、1月に9回、2月に11回発生し、特に1月、2月の冷凍網生産期に高い頻度で発生した(Table 1-6)。鳥羽地区では11月に5回、12月に0回、1月に5回、2月に8回発生し、特に2月の冷凍網生産期に高い頻度で発生した(Table 1-7)。

第5節 地理情報システム(GIS)から得られたデータによる重回帰分析

第1章第3節および第4節より赤ぐされ病および色落ち発生の危険性について、発生危険時期と海域をGISによる海況解析からおおむね推定することができた。そこでGISによる解析から得られた数値データを用いて赤ぐされ病および色落ち発生の危険性について重回帰分析により関係式を導いた。

方 法

GISによる伊勢湾表層の平均的な海況解析は第1章第3節の方法で行った。赤ぐされ病および色落ちの発生状況は第1章第3節および第4節の方法でとりまとめた。GISにより解析された地区別、月別の平均的な水温、塩分濃度、溶存態無機窒素(DIN)、溶存態無機リン($PO_4\text{-P}$)、クロロフィル *a* (Chl. *a*) の中間値を数値データとして用い、説明変数とした。20年間の重篤な赤ぐされ病および色落ちの発生割合を目的変数とし、統計ソフト(多変量解析, エスミ社)を用いて重回帰分析を行った。

結 果

分析結果は、Tを水温、Sを塩分濃度、Dを溶存態無機窒素(DIN)、Pを溶存態無機リン($PO_4\text{-P}$)、Cをクロロフィル *a* (Chl. *a*) としたとき、赤ぐされ病発生割合の関係式は $Y(\%) = 1.24(T) - 0.87(S) + 0.15(D) + 0.85(P) - 4.71(C) + 10.06$ ($R^2 = 0.65$) で表された。決定係数の検定を行った結果、 $p < 0.01$ で決定係数は有意であり、この関係式は理論上、予測に使用できると判断された。標準編回帰係数はTが0.27, Sが-0.06, Dが0.46, Pが0.29, Cが-0.53であり、赤ぐされ病の発生を規定する要因としてはChl. *a*, DIN濃度が大きいことが明らかとなった。色落ちの割合の関係式は $Y(\%) = -1.35(T) - 0.27(D) - 0.25(P) + 83.02$ ($R^2 = 0.76$) で表された。決定係数の検定を行った結果、 $p < 0.01$ で決定係数は有意であり、この関係式は理論上、予測に使用できると判断された。標準編回帰係数はTが-0.28, Dが-0.76, Pが-0.08であり、色落ちの発生を規定する要因としては圧倒的にDIN濃度が大きく、続いて水温であることが明らかとなった。

第6節 考 察

ノリ養殖の海上養殖作業は貝殻中での糸状体培養や陸上採苗を除けば、10月上旬の野外採苗から始まり、11月上旬にかけて育苗を行い、11月中旬から本養殖に入り、3月中旬頃に終了する。

赤ぐされ病と色落ちについて、三重県全地域で20年間に重篤な赤ぐされ病の発生は85件、色落ちの発生は92件であった。このうち、両方が同時に発生したのは12件であった。赤ぐされ病はノリの栄養状態と密接に関連して

おり、生育良好のノリに多発する(加藤ら, 1973)。そして生育良好のノリ組織では例外なしに赤ぐされ病病原菌の恰好の栄養源である酸性アミノ酸やそのアミドが蓄積しており本菌の生育上の好条件が十分備わっている(渡辺ら, 1970)。GISで解析した海況からみた赤ぐされ病発生の危険性について伊勢湾の表層の海況をGISで解析した結果を検討してみると、湾全体では12月が栄養塩濃度が比較的高く、水温も14~15℃と高く、病原菌の生長に適していると推察された。過去20年間に湾全体で赤ぐされ病が発生した件数を月別にみると、12月は全件数の約半数を占めていた。さらに、伊勢湾を地区別に区切って同様の検討をしてみると、同じようにGISで解析した結果から赤ぐされ病の発生の危険性を推定できることが分かった。このなかで特に危険性が高いのは、11~12月にかけての伊勢湾全漁場および1~3月の桑名地区であった。

GISで解析した海況からみた色落ちの危険性について伊勢湾の表層の海況をGISで解析した結果を検討してみると、湾全体では1月、2月の栄養塩濃度が低く、色落ちの危険が高くなると推察された。過去20年間に湾全体で色落ちが発生した件数を月別にみると、1月、2月の発生が全体の76%を占めた。さらに、伊勢湾を地区別に区切って同様の検討をしてみると、同じようにGISで解析した結果から色落ちの発生の危険性を推定できることが分かった。このなかで特に危険性が高いのは、1月以降の中勢地区、南勢地区、鳥羽地区、続いて鈴鹿地区であった。これらのことから、赤ぐされ病および色落ちの発生危険時期および海域はGISによる海況解析からおおむね推定できることを見いだした。また、重回帰分析得られた関係式は理論上赤ぐされ病と色落ちの発生の危険性を予測できるものであった。

ノリの生産については20年間で経営体数と柵数は大きく減少したが、生産枚数の減少はそれに比べて小さいものであった。この要因としてはノリの品種改良、酸処理剤の普及による病害等による被害の軽減、加工機材の性能の向上による加工可能枚数の増加等により柵当たりの生産枚数が増加したことによる。平均単価の低下は全国的な生産量の増加と高価格の贈答用の需要が減少し、コンビニエンスストアなどでのおにぎり用など低価格帯の需要が増加したことからであった。

第2章 アマノリ赤ぐされ病病原菌 *Pythium porphyrae* の早期検出法の開発

赤ぐされ病は毎年のように全国のノリ養殖漁場で大きな被害を引き起こす病気である。その病徴、生活史、病原性については新崎 (1947) によって紹介され、その後、菌学的性状、病原菌の栄養要求や培養条件について詳しく研究された (藤田ら, 1976; 佐々木ら, 1969; 加藤ら, 1973a, 1973b)。赤ぐされ病は菌糸によるノリ葉体内での広がり、病変部に形成される遊走子嚢から海水中に放出される遊走子による2次感染が、病気の蔓延を引き起こす大きな要因になっている。しかし、これまで海水中の赤ぐされ病遊走子を海水中で検出した例はなく、病気の蔓延時にノリ漁場でどの程度の遊走子濃度になっているのか全く不明である。海水中には様々な生物、非生物が存在しており、この中から形態観察によって遊走子を識別することは不可能である。それを可能にするには抗体を用いた高感度の検出方法の開発が必要であると考えられる。これまでに赤ぐされ病に対する抗体を用いた研究には、ポリクローナル抗体を用いて日本各地の赤ぐされ病病原菌の区別を試みた例 (藤田・銭谷, 1977)、モノクローナル抗体を用いて病原菌の区別を試みた例 (Arashima *et al.*, 1994) があるが、これらは室内で培養された病原菌の地域間の区別に用いられたものであり、海水中の病原菌の検出に適用された例はない。また、赤ぐされ病を引き起こす病原菌の検出を行うためには地域間の病原菌の違いにかかわらず、すべての赤ぐされ病病原菌を認識する抗体を作製する必要がある。そこで、本研究では日本各地に存在する赤ぐされ病病原菌 *P. porphyrae* を認識する抗体を作製するとともに、海水中の赤ぐされ病病原菌の検出方法の開発を行った。

第1節 赤ぐされ病病原菌 *Pythium porphyrae* に特異的な新規モノクローナル抗体の作製

海水中に存在する赤ぐされ病病原菌の密度を定量するために、直接病原菌を検鏡し、計数を行うことで高い精度をもつと考えられる蛍光抗体法を採用することとした。そのために、病原菌である *P. porphyrae* の細胞表層を認識するモノクローナル抗体の作製を試みた。

方 法

供試菌株の培養

供試菌株は愛知県水産試験場尾張分場 (現漁業生産研究所) で純粋分離された赤ぐされ病病原菌 *P. porphyrae*

を用い、コーンミール寒天培地 (日水製薬) 上で培養した菌糸先端部分を7mmに切り取り、合成液体培地100mL中で培養した。培地中に伸張した菌糸のみを別の三角フラスコの合成液体培地2L中に入れて2週間培養した。なお、菌糸の培養は17℃の人工気象器中で行った。

抗原の調製とマウスへの免疫

液体培養した赤ぐされ病病原菌を吸引濾過により濾紙 (NO.2, ADVANTEC) 上に集め、その菌体を0.01mLリン酸バッファーPBS (日水製薬) で洗浄後、濾紙で十分水分をとり、湿重量を秤量した。この菌体にPBS2mLを加え、ガラスホモジナイザーで磨砕し、さらにPBS5mLを加えて遠心分離 (500×g, 5min) し、沈殿に菌体量が10mg/0.5mLとなるようにPBSを加え、さらに菌体量が10mg/mLとなるように完全アジュバント (和光純薬) を加えたものをよく混和し、初回免疫の抗原液とした。2回目以降の免疫には菌体量が10mg/mLとなるようにPBSのみを加えた溶液を抗原液とした。なお、これらの操作はすべて無菌的に行った。

免疫にはBALB/cマウス、6週齢、雄 (日本エルエスシー) を1週間飼育し、外見や行動、摂食に異常のないことを確かめた上で用いた。マウスの腹部をアルコール綿で消毒した後、0.5mLの抗原液をマウスの腹腔内に投与した。初回免疫から2週間後、追加免疫を行い、さらに2週間後最終免疫を行った。

細胞融合

1) ミエローマ (マウス骨髄腫細胞) の調製

細胞融合にはミエローマSp/0-Ag14株を使用した。細胞融合の10日前に、凍結保存しておいたミエローマを融解し、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (日水製薬) で温度37℃、CO₂濃度7%、湿度100%に設定したCO₂インキュベーター内で培養し、細胞がある程度増殖してきた時点で8-アザグアニン培地 [DMEMに1/50量の8-アザグアニン (SIGMA) を添加したもの] に移し、3~4日間培養し、8-アザグアニン培地耐性株を選択した。次に、DMEM培地に戻し、細胞融合当日まで対数増殖期を維持しつつ継代した。

2) マウス脾細胞の調製

最終免疫を行った3日後のBALB/cマウスからクリーンベンチ内で無菌的に脾臓を取り出した。脾臓は

DMEMに牛胎児血清を加えていないDMEM(-)中で歯科用ピンセットを用いて付着物を取り除き、同培地の入ったシャーレの中で細胞をしごきだし、細胞浮遊液を得た。さらにピペッティングを行った後、オートクレーブ済みのナイロンメッシュ(20 μ m)で濾過し、濾液を遠心分離(60 \times g, 3min)して、脾細胞を集めた。さらに、細胞をDMEM(-)で3回洗浄し、最終的に5mLのDMEM(-)に懸濁し、チュルク液(和光純薬)で染色し、血球算定板(ERMA)を用いて生細胞数を算定した。

3) 細胞融合

細胞融合の概要をFig.2-1に示す。算定した両細胞を脾細胞:ミエロマ=10⁸:10⁷になるように50mLの無菌遠沈管(CORNING)に入れ、遠心分離(50 \times g, 5min)を行った。上清をピペットで完全に除去した後、ウォーターバスで37 $^{\circ}$ Cに保温した。あらかじめ37 $^{\circ}$ Cに保温しておいた50%ポリエチレングリコール(PEG#4000, MERCK)溶液1mLを、ゆっくり攪拌している遠沈管に1分間で滴下した。さらに1分間遠沈管をゆっくり攪拌した後DMEM(-)2mLを2分間で、続いて8mLを3分間でときどき攪拌しながら加えた。その後、遠心分離(50 \times g, 5min)し、上清を完全に除去した後、ハイブリドーマ増殖培地(安東ら, 1991)に50倍濃縮ヒポキ

サンチン・アミノプテリン・チミジン(HAT)溶液(Boehringer Mannheim)を加え作製したハイブリドーマ選択培地であるHAT培地30mLを加え、ピペッティングし、あらかじめHAT培地1mL/ウェルを加えて37 $^{\circ}$ Cでインキュベートしておいた24穴マルチプレートに100 μ lずつ300ウェルに播種した。

スクリーニング

細胞融合から10日後、倒立顕微鏡を用いて融合細胞(ハイブリドーマ)が増殖しているウェルを選択し、これらのウェルにハイブリドーマ増殖培地に50倍濃縮ヒポキサンチン・チミジン(HT)溶液(Boehringer Mannheim)を加え作製したHT培地を0.5 μ lずつ加えた。その2日後、選択したウェルの上清を用いて抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

スクリーニングは愛知県産菌株を用いて間接蛍光抗体法(IFA)で行った(Fig. 2-2)。すなわち、適当量の液体培養した赤くされ病原菌を蒸留水で十分洗浄し、ガラスホモジナイザーで磨砕した。湿重量の菌体1mg/mLになるようにPBSで懸濁液を調製し、U底96穴マイクロプレートの各ウェルに50 μ lずつ分注した。次にハイブリドーマの培養上清50 μ lを加え、ロータリーシェイカー(120rpm)上で1時間反応した。これをマイクロプレー

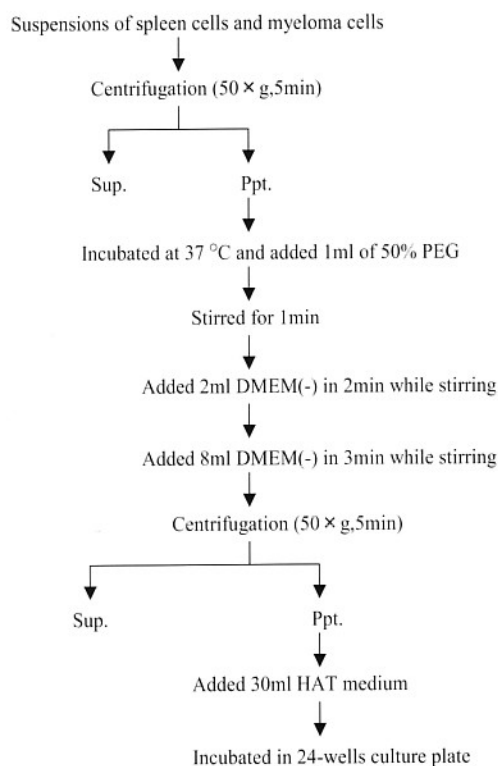


Fig. 2-1. Preparation of hybridoma cells.

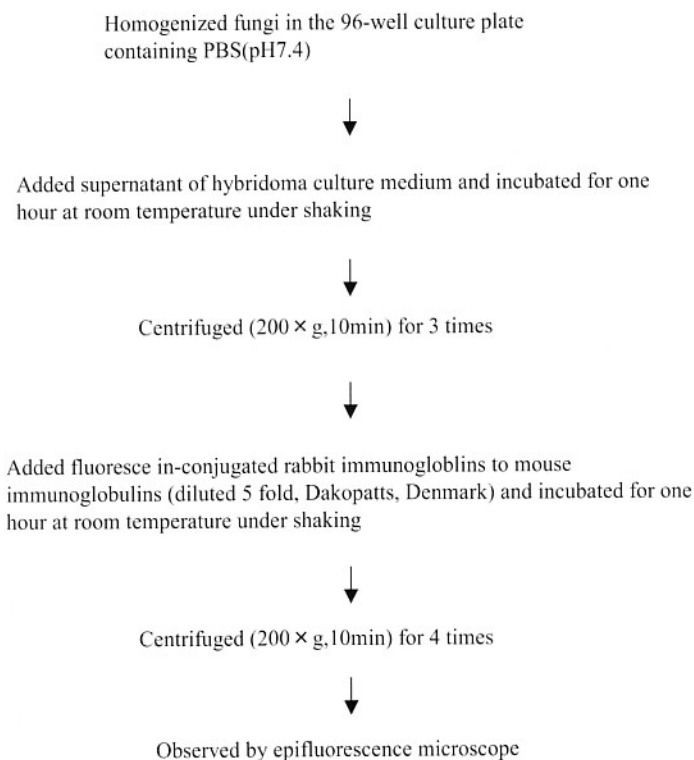


Fig. 2-2. Procedure for the indirect fluorescent antibody technique.

ト遠心機で遠心分離 (200×g, 10min) し、上清を捨て、さらにPBSで3回洗浄した。次に2次抗体としてPBSで50倍希釈したフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識抗マウス免疫グロブリン (IgG+IgM) ウサギ抗体 (ダコジャパン) を各ウェルに50 μ ℓずつ加え、ロータリーシェイカー (120rpm) 上で1時間反応した。マイクロプレート遠心機で遠心分離し、さらにPBSで4回洗浄後、マルチテストスライド (大日本製薬) に1 μ ℓずつ取り、蛍光顕微鏡下でB励起で観察した。

スクリーニングで陽性であったウェル中の肉眼的に確認できるコロニーをマイクロピペットで採取し、あらかじめハイブリドーマ増殖培地を100 μ ℓずつ分注し、37℃でインキュベートしておいた96穴マイクロプレートに1コロニーずつ播種した。数日後、24穴マルチプレートに移し、増殖が早いものから順次2回目のスクリーニングを行い、陽性のコロニーに対して目的とする単一の抗体を産生する細胞を得るためにクローニングを行った。

クローニング

クローニングは限界希釈法で行った。ハイブリドーマの増殖を助けるフィーダー細胞はBALB/cマウス (4週齢, 雄) の胸腺細胞を使用し、細胞融合に使用した脾細胞と同様の方法で調製した。5.0×10⁵/50 μ ℓの濃度で調製した胸腺細胞を96穴マイクロプレートの各ウェルに分注し、あらかじめ37℃でインキュベートした。このマイクロプレートにハイブリドーマをあらかじめスピッツ管内で1細胞/100 μ ℓになるように調製した細胞浮遊液を50 μ ℓずつ播種した。約10日後、1ウェルに1つだけコロニーを生じたものを選びスクリーニングを行った。スクリーニングで陽性だったものに対して1回目と同様の方法で再度クローニングを行い、単一細胞由来単一抗体産生株を数十株得た。日本各地の赤ぐされ病病原菌を認識する抗体産生細胞を選択するため、得られたハイブリドーマ株に対して、日本各地の赤ぐされ病病原菌を認識する株を選択した。

低濃度血清培地への馴化と抗体の分離

20%の血清を含むハイブリドーマ増殖培地10mL中で培養しているハイブリドーマを継代毎に血清濃度が1/2になるようにハイブリドーマ増殖培地の組成から牛胎児血清 (FBS) を除いた無血清培地を加え、培養上清を血清濃度約1%で200mLまで拡大した。

拡大培養した上清を限外濾過とセントリプレップ (アミコン) で1mLに濃縮し、アフィニティークロマトグ

ラフィー (MAPS-IIキット, BIO-RAD) に付し、モノクローナル抗体を分離した。分離したモノクローナル抗体はPBSで透析し、0.5mLずつ小分けして凍結保存し、順次解凍して実験に供した。

結 果

免疫スケジュールには抗原を投与する間隔が種々あるが、本研究では菌糸体湿重量にして、5mg/mLの抗原を2週間間隔で3回投与する方法を採り、また、スクリーニングは細胞表層の抗原を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択するため、病原菌菌糸を用いた間接蛍光抗体法で行った (Fig. 2-3)。選択された細胞に対してクローニングを行い、得られたハイブリドーマ株の中から日本各地の赤ぐされ病病原菌の細胞表層を認識する株を得た。このハイブリドーマを高価なFBSを必要とせず、さらには抗体の分離にも都合のよい無血清培地への馴化を試みたが、完全無血清培地に近づけると馴化の途中で細胞が死滅してしまった。しかしながら、通常のFBS濃度20%から1%に減少させても十分に培養できるまでに馴化することができた。そこで本研究では以後、1%FBSを含む低濃度血清培地中で培養拡大を行った。産生した抗体は培養上清を濃縮後、アフィニティークラムで抗体を分離し、凍結保存した。

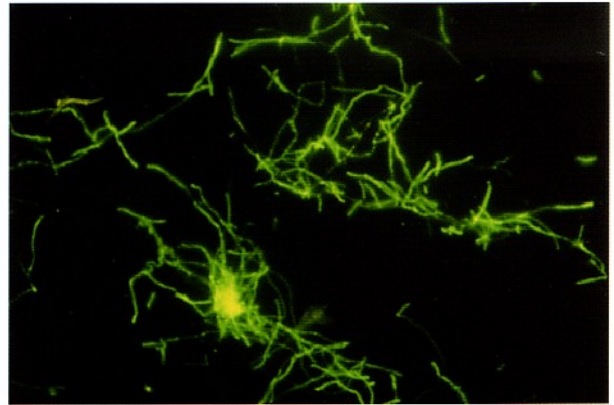


Fig. 2-3. Indirect immunofluorescence of *P. porphyrae* labelled with monoclonal antibody.

第2節 作製したモノクローナル抗体の認識特異性

作製したモノクローナル抗体を利用した赤ぐされ病病原菌の検出手法を開発するに当たり、抗体の諸性質を把握する必要があることから、本節ではその性質について調査した。

方 法

各種 *Pythium* との反応性

得られた抗体が赤ぐされ病原菌を特異的に認識するものであるか否かを確認するため、宮城県産、愛知県産、三重県産、香川県産、佐賀県産、韓国産の赤ぐされ病原菌および陸上植物由来の他の *Pythium* 属 *P. aphanidermatum* (IFO No.7030), *P. irregulare* (IFO No.30346), *P. spinosum* (IFO No.7031) と反応させ、間接蛍光抗体法で確認した。

アイソタイプの検定

作製したモノクローナル抗体のアイソタイプの決定には Mouse MonoAb -ID kit (ZYMED LABORATORIES, INC.) を使用し、酵素抗体法 (ELISA法) により検定を行った。

抗体価の測定

得られた培養上清の実用上の希釈倍率を知るため、抗体価を測定した。抗体価の測定は IFA 法と ELISA 法で行った。両方法には作製したモノクローナル抗体をフラスコ培養し、細胞数が飽和状態になり80%死滅した状態の培養上清を用いた。本試験の希釈系列は PBS により 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024倍に希釈したものをを用いた。間接蛍光抗体法は第2章第1節の方法に従って行った。ELISA 法は次の方法で行った。ELISA 用抗原液は合成培地で培養した菌体を湿重量 1.0g を秤りとり、蒸留水15mLを加え、ブレンダーで5分間破碎し、ソニケーター (MODEL W-375 ULTRASONICS, INC.) で30分間超音波処理した後、海砂C (ナカライテスク) を加えて磨砕した。なお、これらの処理は氷冷下で行った。さらに菌体磨砕液はまず、遠心分離 (5,000×g, 20min) で得た上清をさらにもう一度遠心分離 (2,5000×g, 30min) し、その上清を蒸留水で 25mL に定量して得た。調製した ELISA 用抗原液を 50mM carbonate buffer, (pH9.6) で3倍希釈し、96穴U底プレートの各ウェルに100 μ ℓずつ分注し、4℃で一晩インキュベートした。抗原液を十分除去した後、ブロックエース (雪印乳業) を用いてブロッキングを行い洗浄後、一次抗体としてハイブリドーマ培養上清 (希釈系列) を、二次抗体としてアルカリホスファターゼ標識抗マウス (IgG+IgM) ヤギ抗体 (TAGO社) を反応させ基質であるパラ-ニトロフェニルホスフェイトを発色させた後マイクロプレートリーダー (BIO-RAD モ

デル550) で405nmの吸光度を測定した。

各種物理・化学処理に対する抗原の安定性

前述の方法で調製したELISA用抗原液に対して加熱処理 (100℃, 15min), 過ヨウ素酸酸化 (過ヨウ素酸ナトリウム濃度10mM, 20mM, 40mM, 80mM, 24h), プロナーゼ処理 (10 μ g/mL, 37℃, 4h), トリプシン処理 (100 μ g/mL, 37℃, 4h) をそれぞれ行い、ELISA法により、反応率 (%) = (サンプル-陰性コントロール/陽性コントロール-陰性コントロール) × 100 を測定し、抗原の安定性を調べた。

結 果

各種 *Pythium* との反応性

得られた抗体は宮城県産、愛知県産、三重県産、香川県産、佐賀県産、韓国産の赤ぐされ病原菌のいずれの菌糸の細胞表層をも認識し、陸上植物由来の他の *Pythium* 属 *P. aphanidermatum* (IFO No.7030), *P. irregulare* (IFO No.30346), *P. spinosum* (IFO No.7031) の菌糸と交差反応を起こさないものであった (Table 2-1)。

Table 2-1. Reaction of monoclonal antibody with several species of *Pythium* by indirect fluorescent antibody technique

<i>Pythium</i> used	Reaction
<i>P. porphyrae</i>	
Aichi strain	+
Mie strain	+
Saga strain	+
Miyagi strain	+
Kagawa strain	+
Korea strain	+
<i>P. aphanidermatum</i> (IFO No.7030)	-
<i>P. irregulare</i> (IFO No.30346)	-
<i>P. spinosum</i> (IFO No.7031)	-

アイソタイプの検定

作製した抗体のアイソタイプを検定した結果、IgG₁ の κ 鎖であった (Fig.2-4)。

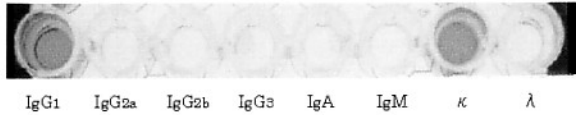


Fig.2-4. Determination of isotype of monoclonal antibody. Mouse MonoAb -ID kit (ZYMED LABORATORIES, INC.) was used for Determination of isotype of monoclonal antibody.

Table 2-2. Maximum dilution of monoclonal antibody able to detect *P. porphyrae* (Aichi strain) by indirect fluorescent antibody (IFA) and ELISA

Dilution of antibody	Detection method	
	IFA* ¹	ELISA * ²
1:2	++	+++
1:4	++	+++
1:8	++	+++
1:16	++	+++
1:32	+	++
1:64	-	+
1:128	-	-
1:256	-	-

*¹ ++, Strongly positive; +, weakly positive

*² ELISA absorbance: +++ , higher than 0.5; ++ , higher than 0.1; and + , higher than 0.05.

抗体価の測定

得られた抗体は間接蛍光抗体法では32倍希釈まで、ELISA法では64倍希釈まで抗原に対して強い反応が認められた。しかし、蛍光顕微鏡で実際の海水試料を観察する場合には夾雑物の影響を考え、濃度が高い抗体を用いることとして、以後の実験は8倍希釈の培養上清を用いた (Table 2-2.)。

各種物理・化学処理に対する抗原の安定性

Table 2-3 に示したように過ヨウ素酸酸化、プロナーゼ処理、トリプシン処理では反応率が大幅に低下したが、加熱処理では反応率が120%に増加した。

第3節 ノリ漁場における赤ぐされ病病原菌遊走子の検出

前節において赤ぐされ病病原菌を特異的に認識する抗体を得ることができた。そこで、海水中の赤ぐされ病病原菌検出法を確立するための基礎技術を室内実験で確立し、その後海水中の病原菌検出への応用を試みた。

Table 2-3. Stability of antigenic determinant against physical, chemical and enzymatic treatments

Treatment	Temperature (°C)	Time (h)	Reactivity(%)*
Heat	100	1/4	120.1
Sodium metaperiodate			
10mM	4	24	22.0
20mM	4	24	10.5
40mM	4	24	10.3
80mM	4	24	5.9
Pronase E (10 μg/ml)	37	4	18.7
Trypsin (100 μg/ml)	37	4	40.4

* Measured by ELISA against intact antigen.

方 法

遊走子の採集

遊走子の放出方法は以下のように行った。純粹分離した赤ぐされ病病原菌をコーンミール寒天培地 (日水製薬) で7日間培養した後、7mm角に切り取った寒天を100mLの三角フラスコに入れた新崎B液体培地 (Arasaki *et al.*, 1968) 40mL中に3ヶ入れ、4日間18℃で静置培養した。ついで、菌全量を十分に洗浄し、濾過滅菌半海水40mL中に移し、100rpmで約12~20時間振とうして遊走子を放出させた。

遊走子の発芽と発芽管の伸長

菌体が遊走子を放出し始めた時点で半海水をナイロンメッシュ (10 μm) で濾過し、菌体と遊走子を分けた。遊走子浮遊溶液は20℃で静置し、その一部を1時間ごとに終濃度5%に調製した中性ホルマリン溶液 (和光純薬) で固定し、顕微鏡観察で遊走子の発芽率と発芽管の長さを測定した。

遊走子の作製した抗体に対する抗原性発現時期

作製した抗体に対する抗原性の発現時期を調べるために、濾過滅菌海水に遊走子が放出されたことを確認後、ナイロンメッシュ (φ10 μm) で濾過した。濾液中の遊走子の一部を1時間ごとに終濃度5%の中性ホルマリンで固定し、IFA法で蛍光顕微鏡下でB筋起により菌糸を観察した。

海水中の赤ぐされ病病原菌密度

ノリ養殖シーズンを通した海水中の赤ぐされ病病原菌の発生状況を調べるため、採苗開始前の9月下旬から1

週間に1, 2度三重県津市の支柱柵漁場で海水を採取し、海水中の遊走子を半海水で作製した合成培地により培養する方法で病原菌の検出を試みた。方法は Fig.2-5 に示した。即ち、ノリ養殖漁場の海水 3 L を目合い 40 μm のナイロンメッシュで濾過し、海水中の夾雑物を取り除いた。次に濾過海水を目合い 3 μm のメンブレンフィルターで濾過し、膜上の遊走子を半海水合成培地中で 18 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間培養した。次に遠心分離 (500 \times g, 5min) し、PBS-T で洗浄・遠心分離 (500 \times g, 5min) した後、残渣に 5 mL の PBS とモノクローナル抗体含有上清を 1 mL を加えて、ピペッティングした後 1 時間室温で反応させた。反応後 PBS-T で洗浄・遠心分離 (500 \times g, 5min) した後、二次抗体として FITC 標識抗マウス免疫グロブリン (IgG+IgM) ウサギ抗体を 50 倍希釈した PBS 5 mL 中で 1 時間室温で遮光して反応した。反応後、PBS-T で十分洗浄し、蛍光顕微鏡を用いて計数した。

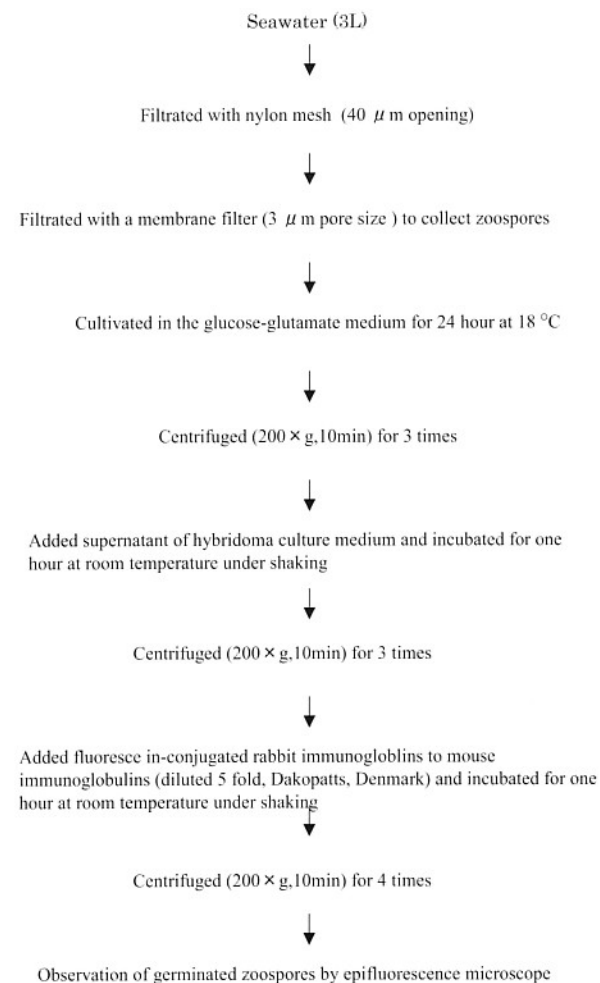


Fig. 2-5. Detection procedure of *P. porphyrae* zoospores in the seawater collected from Nori cultivation farm.

結 果

遊走子の採集

菌体は半海水で振とうすることにより遊走子嚢を形成し、10数時間後から50時間後にかけて遊走子を放出し続けた。遊走子の放出ピークは15時間後から20時間後にみられた。放出された遊走子は滅菌した目合い 20 μm のナイロンメッシュで濾過し、濾液中に採集した。

遊走子の発芽と発芽管の伸長

Fig.2-6 に示したように遊走子は放出されてから 1 ~ 2 時間で 40% 程度発芽し、6 時間後には約 80% に達し、それ以降は発芽率の上昇はみられなかった。一方、発芽した遊走子の発芽管の平均の長さは時間を追って伸び続け、8 時間後には約 150 μm に達した。

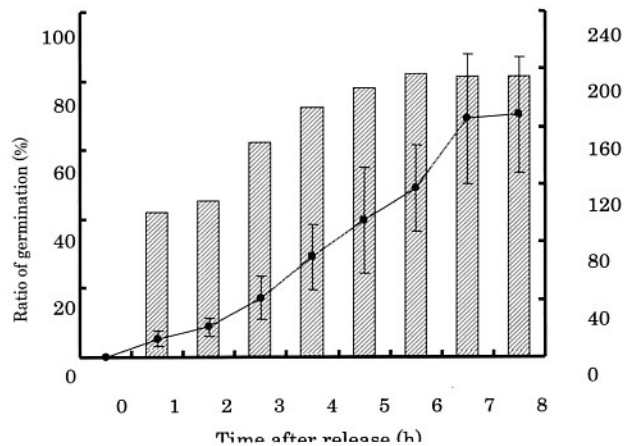


Fig. 2-6. The effect of incubation time on the ratio of germinating to non-germinating zoospores (bars) and average length ($n=100$, with standard errors) of the developing germ-tubes (solid line). Zoospores were maintained in 50% filter-sterilized seawater at 20 $^{\circ}\text{C}$ for up to 8h after release.

遊走子の作製した抗体に対する抗原性発現時期

作製した抗体は遊走子そのものは認識しないが、発芽管の長さおよび太さに関係なく、発芽初期の段階で発芽管部分のみが抗原性を発現することが明らかになった (Fig.2-7)。

海水中の赤ぐされ病原菌密度

Fig.2-8 で判るように多数の微生物や微粒子の中から FITC で標識された赤ぐされ病原菌を検出することができた。養殖期の海水中の赤ぐされ病原菌の菌数変化は Fig.2-9 に示した。最初に病原菌を確認したのは1995

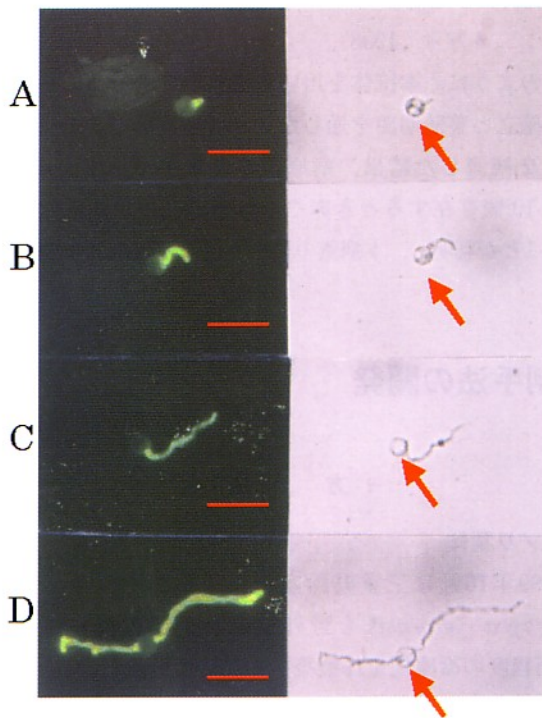


Fig. 2-7. Zoospore and germinated zoospores reacted with monoclonal antibody.
A, non-germinated zoospore; B, zoospore just after germination; C and D, germinated zoospores. Arrows show the location of zoospores themselves. Note only germ-tubes are fluorescing. Scale bars, 30 μ m.

年1月7日で病原菌濃度は11個/Lであった。菌体はその後急速に増加し、1月13日の計測では1,651個/Lとなった。その後赤ぐされ病が肉眼視されるようになった。1月22日には649個/Lまで減少したものの、再び急激な増加を示し、1月25日には4,695個/Lに達した。しかし、その後再び急速に減少し1月31日には122個/Lとなり、2月3日には検出されなくなった。

第4節 考 察

赤ぐされ病についてはこれまで数多くの研究があり、赤ぐされ病蔓延の直接的原因である遊走子の形成と放出について研究されてきた(桜井ら, 1974)。しかし、これまで赤ぐされ病病原菌を海水中から検出する方法が確立されておらず、ノリ漁場にどの程度の病原菌が存在するのか把握することができなかった。このことから当研究室で継代培養している宮城県産、愛知県産、三重県産、香川県産、佐賀県産、韓国産赤ぐされ病病原菌のすべてを認識するモノクローナル抗体を作製し、その抗体の性質を調べた。その結果、本モノクローナル抗体のアイソタイプはIgG₁の κ 鎖であり(Fig.2-4)、実験上32倍希

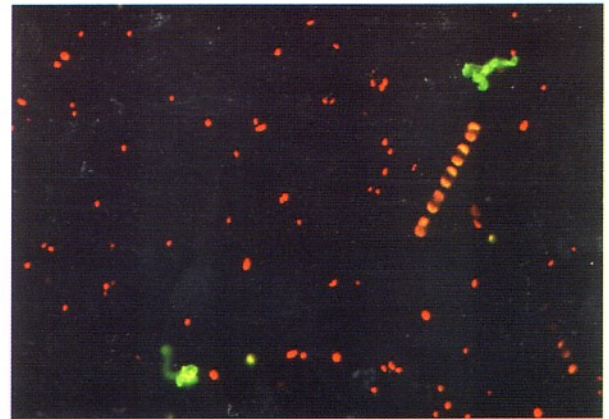


Fig. 2-8. *P. porphyrae* in the seawater collected from Nori farm. Seawater was reacted with monoclonal antibody. Green color shows *P. porphyrae*; Red color shows phytoplankton.

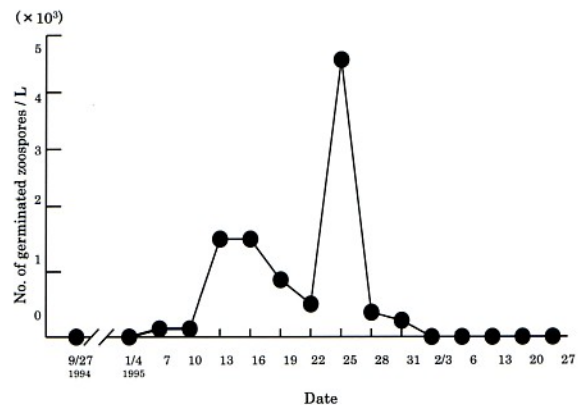


Fig. 2-9. Number of germinated zoospores in the seawater collected from *Porphyra* farms using the pole system in Tsu between September 1994 and February 1995.

積までは問題なく使用できることがわかった(Table 2-2)。

各種物理・化学処理に対する抗原の安定性を調べた結果、過ヨウ素酸酸化は炭水化物を分解し、プロテアーゼはタンパク質を分解することから抗原決定基には細胞壁のタンパク質部位、多糖部位の両方が関与すると考えられた。

Pythium 属との反応性については当研究室で継代している赤ぐされ病病原菌6種すべてを認識したのに対し、陸上植物から分離された *Pythium* 属3種とは全く交差反応を示さなかった(Table 2-1)。このことは、得られた抗体は赤ぐされ病病原菌に対する特異性の高さを示しており、海水中の病原菌の検出に利用できるものと考えられた。

次いで、海水中の赤ぐされ病病原菌検出法を確立するための試験により、本抗体は病原菌の糸状体だけでなく発芽初期の発芽管をも認識するが、遊走子自体は認識しないことが明らかになった(Fig.2-7)。

本抗体は病原菌の糸状体のみを認識することから遊走子を培養し、菌糸体にしたものを検出する方法を用い、養殖期間を通したノリ漁場中の病原菌の消長を観測したところ、ノリ養殖期間中に最大4,695個/L確認することができた。本抗体を分与して同様の試験を実施した愛知県水産試験場、福岡県水産海洋技術センターでは病害発生時にはノリ養殖漁場において病原菌遊走子数100～

8,300個/Lを確認したことを報告している（小谷ら、1996；二ノ方ら、1998）。

このように、本抗体を用いる海水中の病原菌の検出方法の確立と養殖期間を通したノリ養殖漁場中の病原菌の消長を観測した結果、病原菌の遊走子が海水1L中に $10^2 \sim 10^6$ 個存在するとき赤ぐされ病の発生する危険性が高いことが判明し、本病気の発生予知の可能性が示された。

第3章 赤ぐされ病抑制手法の開発

アマノリ赤ぐされ病に対する薬剤の抑制効果については、これまで農薬、抗生物質、アミノ酸などによる菌糸の発育抑制作用が調べられ（新崎、1947；須藤ら、1954；野田ら、1979）、それぞれ一定の効果が報告されているが、現在では、昭和50年代より普及した有機酸を主成分とするpH2程度の酸処理剤が頻用されている。酸処理剤は当初、養殖ノリ網に混生してくる緑藻の除去を目的として開発されたが、赤ぐされ病にもある程度の効果があることが観察された。しかし、酸処理の使用は環境面のみならず、生態系や二枚貝類への影響も指摘されているため、制限無く酸処理を行うことは好ましくない。また、海苔の食品としての安全性を考慮して使用回数や使用時期が制限される中で、赤ぐされ病病原菌の遊走子が高濃度で存在し、病勢が強い時には酸処理剤を用いても病気が蔓延し、大きな被害およびすことがしばしば認められる。しかし最近、高塩分濃度下での酸処理（以下高塩分酸処理と略す）が通常の塩分濃度下（約3%）、pH2程度の酸処理（以下酸処理と略す）よりも効果があるということが観察され、一部のノリ養殖現場では高塩分酸処理を実施している例もある。

本章では先ず、赤ぐされ病病原菌の菌糸の生長を阻害する要素である低pHと低温を加味した複合的な高塩分酸処理法による赤ぐされ病病害抑制効果の検討を行った。次に病原菌遊走子の高濃度存在下での酸処理とその4日後に高塩分海水処理を行う病害抑制手法について検討を行った。

第1節 低温、低pHを加味した高塩分処理による病害抑制手法の検討

酸処理剤原液の希釈により異なるpHにした酸処理剤による病害抑制効果を検討し、ついで低pHと低温を加味した高塩分酸処理による病害抑制効果を調べた。

方 法

供試ノリ葉体

1999年10月に三重県鈴鹿市白子地先でスサビノリ *Porphyra yezoensis* を野外採苗および育苗し、葉長1cm程度の冷凍網を作製後、 -20°C で貯蔵した。

赤ぐされ病の感染方法

冷凍網から約3cmの網糸を切断した。これを天然海水中で、水温 15°C 、白色蛍光灯で海水面照度3,000 lxとし、明期9時間、暗期15時間で2週間通気培養し、葉長3～4cm程度に生長させた。試験に必要な本数の網糸を塩分2.7%の天然海水100Lを入れたパンライト水槽中で、赤ぐされ病感染ノリと共に上述の培養条件で2日間通気培養することにより赤ぐされ病に感染させ、以下の試験に用いた。

pHの異なる酸処理による赤ぐされ病抑制効果の検討

上述の方法で赤ぐされ病に感染させたノリ葉体付き網糸を、感染2日後に有機酸を主成分とした酸処理剤（みのり一番、中央化成）を天然海水で希釈してpH1.25からpH3.0までpH0.25間隔で調整した溶液（水温 15°C 、塩分3%）中で5分間の浸漬処理をした。その後、上述の培養条件で毎日換水を行い、通気培養を続けながら、1週間に1度のpH別の酸処理を2回行い、感染から18日後の試験終了時に病害抑制効果を肉眼で判定した。

低温、低pH、高塩分処理による病害抑制効果の検討

赤ぐされ病病原菌 *P. porphyrae* の菌糸の生長は低温、低pH、高塩分で阻害されると言われている（藤田ら、1977；藤田ら、1980；Park *et al.*, 2000）。そこで罹病葉体に対してこれらの条件を組み合わせることで処理することにより、より効果的な病害抑制効果を得ることができると

Table 3-1. Treatment conditions of the combination of high salinity seawater, low temperature and low pH for suppression of red rot disease of *Porphyra*

Experimental group	Salinity (%)	Temperature (°C)	pH	Submersion duration (min)	No. of treatment per week	Total treatment no.
1 (Control)	3	15	2.0	5	1	3
2	5	15	1.93	5	1	3
3	10	15	1.77	5	1	3
4	15	15	1.63	5	1	3
5	3	0	2.0	5	1	3
6	5	0	1.93	5	1	3
7	10	0	1.77	5	1	3
8	15	0	1.63	5	1	3
9	10	-5	1.77	5	1	3
10	15	-5	1.63	5	1	3
11 (Negative control)	—	—	—	—	—	—

かどうか検討した。上述の方法で感染させた網糸を、感染から2日後にTable3-1に示す塩分濃度、温度、pHの異なる処理液中で5分間浸漬した。その後、上述の条件で培養しながら1週間に1度の浸漬処理を2回行い、感染から18日後に病害抑制効果を肉眼で判定した。

結 果

pHの異なる酸処理による赤ぐされ病抑制効果の検討

Fig. 3-1にpHの異なる酸処理を施した葉体の病害抑制

効果を酸処理を施さなかった葉体とを比較して示す。pH2.25～pH3.0の酸処理液で処理した葉体は病害がひどく、ほとんどの葉体は死滅して網糸から流失した。網糸に残った葉体も顕微鏡観察の結果、ほとんどすべての細胞に菌糸の貫通が認められた。これに対し、pH2.0以下の処理溶液で処理したものは葉体の流失がみられず、病状の進行も緩やかであった。顕微鏡観察を行ったところ、赤ぐされ病原菌菌糸は認められるものの健全細胞が多かった。従って、pH2.25以上の処理では病害抑制効果がみられず、pH2.0～pH1.25の酸処理液で処理を行うと罹病ノリの病気の進行をかなり抑制できることがわかった。

低温、低pH、高塩分処理による病害抑制効果の検討

上述のpHの異なる酸処理の結果から、pH2.0以下の低pHでの処理が病害抑制に有効であることが確認できた (Fig. 3-1)。そこでTable3-1に示すpH2.0、塩分3%、処理温度15°C、処理時間5分間の酸処理を対照区とし、高塩分、低温、低pH処理下による他の試験区の病害抑制効果を調べた。その結果、試験区10で他の試験区2～9よりもやや病害抑制効果がよく、対照区に比べ生長も若干よかったが、全体としては低温、低pH下における高塩分酸処理区は対照区と比較して大差はなかった (Fig. 3-2)。

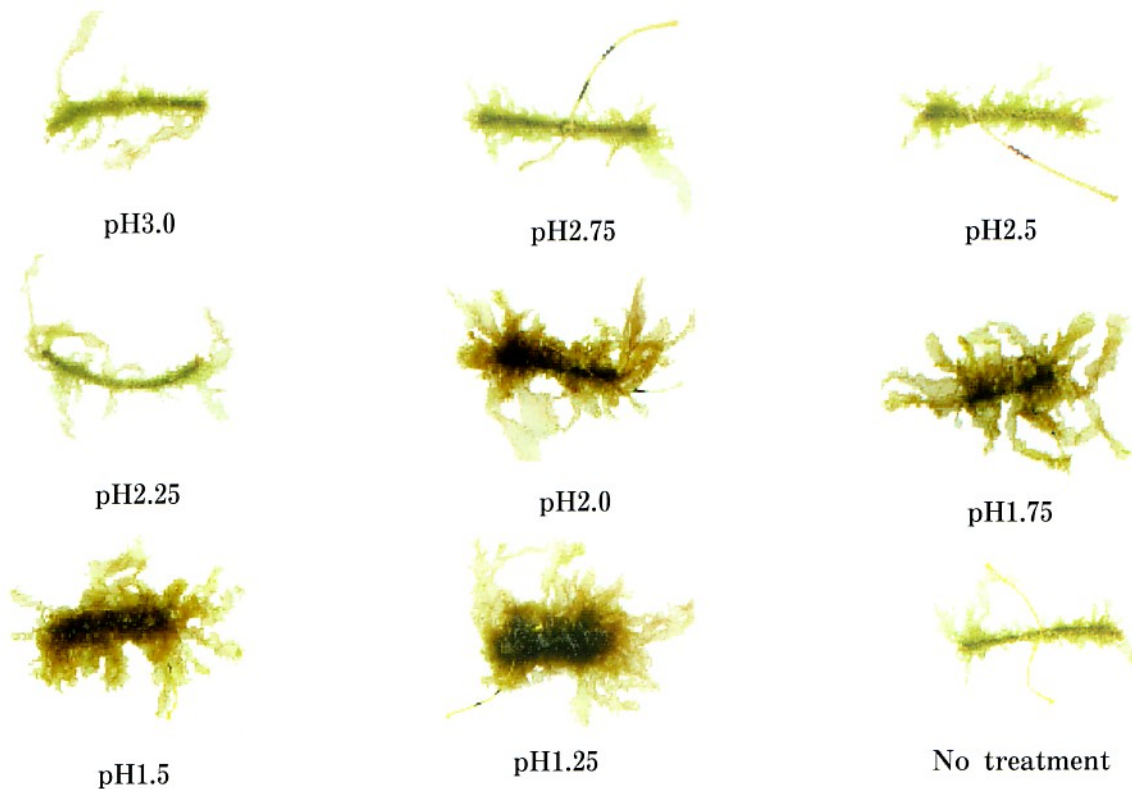


Fig. 3-1. Effect of a varying acidity for the suppression of red rot disease of *Porphyra*.

第2節 赤ぐされ病病原菌遊走子の高濃度存在下における病害抑制手法の検討

前節の結果からも言えるように、pHが2.0以下であれば赤ぐされ病病原菌の拡大は抑制されるが (Fig. 3-1)、実際の漁場ではpHが2.0以下の酸処理を行っても病気が蔓延することがたびたびある。これは酸処理を行った時点で既にノリの葉体内に進入している病原菌には効果があるが、海水中に多くの遊走子が存在する場合には、ノリ網を海水中に戻した後、多くの遊走子が葉体に感染するため次の酸処理までに菌糸が広がり病気の蔓延を防御しきれないことによる。しかし、制限無く酸処理を行うことは環境面のみならず、海苔という食品へのイメージからも好ましくない。そこで、漁場に高密度で遊走子が

存在する場合にも病害を抑制する手法を検討するため、酸処理と高塩分海水処理を併用した試験を行った。

方 法

遊走子の調製と赤ぐされ病感染方法

第2章第3節と同様の方法で遊走子を放出させた。放出された遊走子は菌糸とともに目合い20 μ mのナイロンメッシュで濾過し、濾液中に遊走子を得た。遊走子濃度が約20,000個/Lになるように調整した塩分2.7%の天然海水100Lに第3章第1節と同様の方法で培養したノリを入れ、塩分2.7%、水温15 $^{\circ}$ C、白色蛍光灯で海水面照度3,000 lxとし、明期9時間、暗期15時間の培養条件で2日間通気培養しノリ葉体に赤ぐされ病を感染させた。

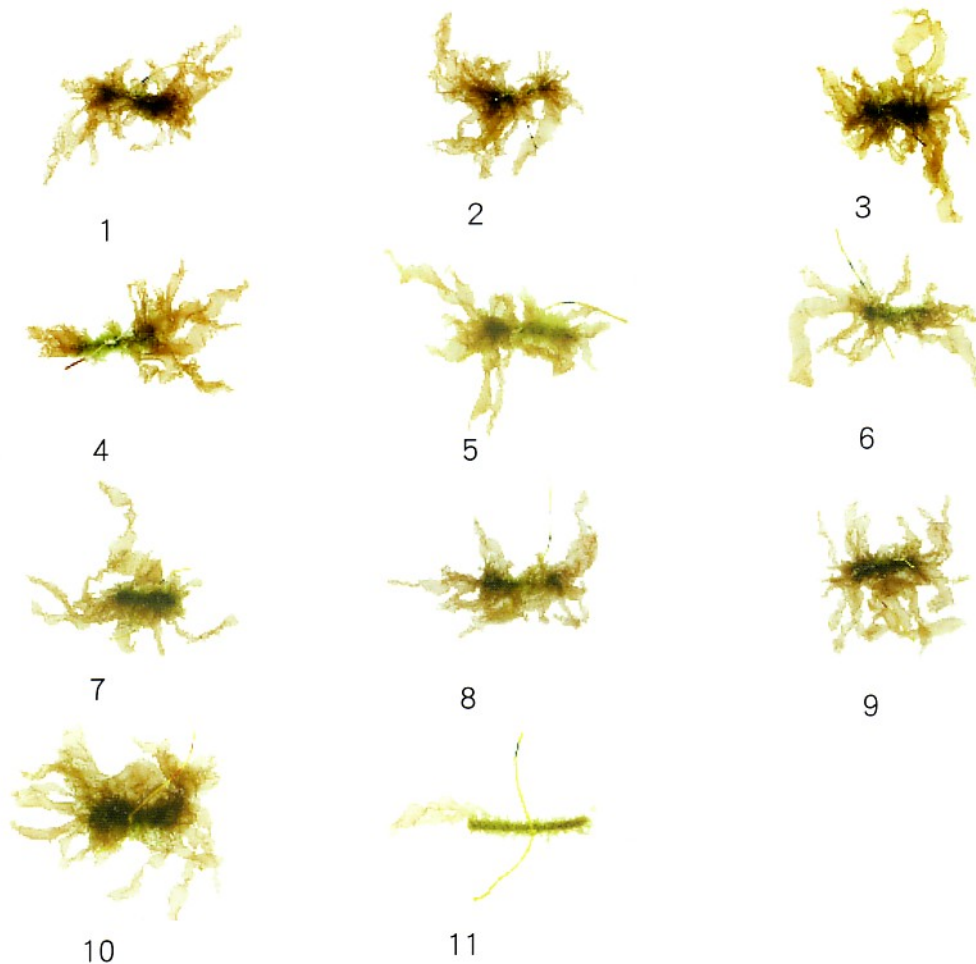


Fig. 3-2. Combined effects of a high-salinity seawater, low temperature and low pH for suppression of red rot disease of *Porphyra*.

Each number to experimental group listed in Table 3-1.

- 1, treatment with 3% salinity, 15 $^{\circ}$ C, and pH 2.0 (Control);
- 2, 5% salinity, 15 $^{\circ}$ C, and pH 1.93;
- 3, 10% salinity, 15 $^{\circ}$ C, and pH 1.77;
- 4, 15% salinity, 15 $^{\circ}$ C, and pH 1.63;
- 5, 3% salinity, 0 $^{\circ}$ C, and pH 2.0;
- 6, 5% salinity, 0 $^{\circ}$ C, and pH 1.93;
- 7, 10% salinity, 0 $^{\circ}$ C, and pH 1.77;
- 8, 15% salinity, 0 $^{\circ}$ C, and pH 1.63;
- 9, 10% salinity, -5 $^{\circ}$ C, and pH 1.77;
- 10, 15% salinity, -5 $^{\circ}$ C, and pH 1.63;
- 11, No treatment (Negative control).

酸処理と高塩分海水処理の併用による病害抑制効果試験

Table 3-2 に示した各塩分濃度で、Fig. 3-3 に示すスケジュールに従って試験を実施した。即ち、感染から2日後に5分間酸処理した後、塩分2.7%の天然海水中100Lで4日間培養した。感染6日後にTable 3-2 に示した各処理条件により5～25%まで5%刻みに調整した高塩分海水に5分間浸漬した後、再び3日間上述の条件で培養した。感染9日後に酸処理を行い、12日間の試験終了後、各試験区の病害抑制効果を肉眼で判定した。試験期間中は毎浸漬処理後に遊走子濃度が約20,000個/Lになるように100Lのパンライト水槽に遊走子を新たに添加した。

酸処理、高塩分海水処理による赤ぐされ病原菌菌糸の生長抑制効果

高塩分海水処理により赤ぐされ病原菌菌糸の生長が抑制されているかを調べた。Table3-3 に示した各塩分濃度処理条件で Fig. 3-4 に示すスケジュールに従って試験を実施した。即ち、直径3mmの円形にくりぬいたノリ葉体56枚を遊走子濃度約20,000個/L、塩分2.7%の天然海水100Lを入れたパンライト水槽中に2時間入れて赤ぐされ病に感染させた。葉体を海水で洗浄後、1試験区あたり8枚ずつにわけ、上述の培養条件で通気培養

Table 3-2. Sequential treatment conditions of acidity and high salinity seawater for suppression of red rot disease

Experimental group	Salinity (%)	Temperature (°C)	pH		Submersion duration (min)	No. of treatment per week	Total treatment No.
			1st	2nd			
1 (Control)	3	15	2.0	—	5	1	2
2	5	15	2.0	8.0	5	2 ^b	3 ^c
3	10	15	2.0	7.9	5	2 ^b	3 ^c
4	15	15	2.0	7.7	5	2 ^b	3 ^c
5	20	15	2.0	7.6	5	2 ^b	3 ^c
6	25	15	2.0	7.5	5	2 ^b	3 ^c
7	3	15	2.0	2.0	5	2 ^b	3 ^c
8 No treatment (Negative control)	—	—	—	—	—	—	—

a: Two treatments of acid solution during 12days.

b: One treatment of acid solution and one treatment of high salinity seawater.

c: Two treatments of acid solution and one treatment of high salinity seawater during 12days.

Table 3-3. Treatment conditions of high salinity seawater for suppression of hyphal growth of red rot disease

Experimental group	Salinity (%)	Temperature (°C)	pH
1 (Control)	3	15	2.0
2	5	15	8.0
3	10	15	7.9
4	15	15	7.7
5	20	15	7.6
6	25	15	7.5
7 No treatment (Negative control)	—	—	—

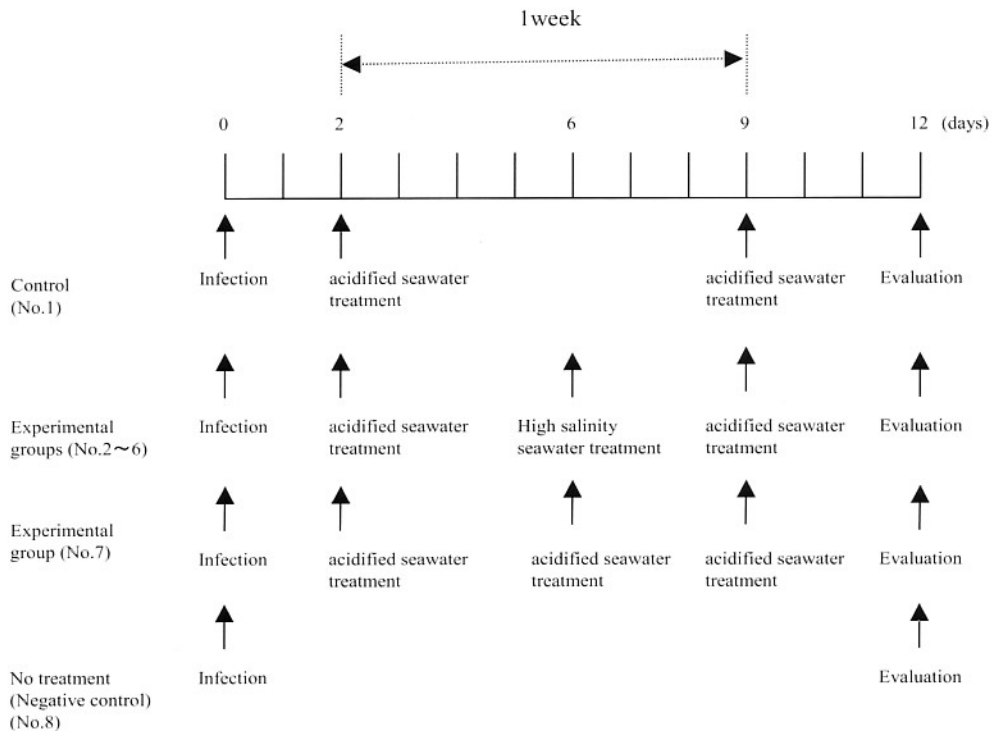


Fig. 3-3. The schedule of the sequential treatments of acidified and high salinity seawater for suppression of red rot disease of *Porphyra*.

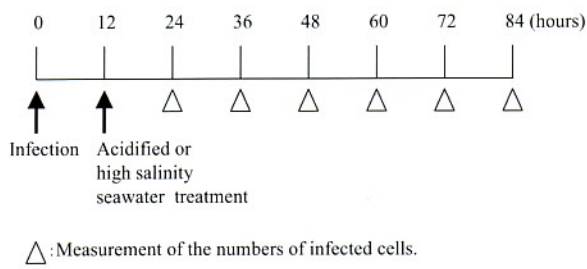


Fig. 3-4. The schedule of high salinity seawater treatments for the suppression effect on hyphal growth of red rot disease of *Porphyra*.

した。12時間後に Table 3-3 に示した各高塩分海水に 5 分間浸漬した。その後、12時間毎に84時間後まで、1つの遊走子から感染が拡大した細胞数はノリ葉体を0.2% エリスロシン溶液で染色し洗浄後、顕微鏡写真をデジタルカメラで撮影し、印刷した後計数した。

酸処理と高塩分海水処理の併用がノリの生長に及ぼす影響
酸処理と高塩分海水処理の併用がノリの生長にどのよ

うな影響を及ぼすか調べた。健全なノリ葉体から直径 3 mmの円形にくりぬいたもの60枚に、酸処理を5分間実施した後、塩分2.7%、水温15℃、白色蛍光灯で海水面照度3,000 lx、明期9時間、暗期15時間の培養条件で4日間通気培養した。その後各10枚ずつに分け、海水にNaClを加えることにより塩分濃度5~25%まで5%刻みに調整した高塩分海水に5分間浸漬処理後、さらに3日間処理前と同じ培養条件で培養した。ノリの生長は、葉体の面積をパーソナルコンピューターに接続したカラーレスキャナー(エプソンGT-7600)に取り込み、画像解析ソフトLIA32(Windows版フリーソフトウェア、名古屋大学 山本一清助教授開発)を用いて解析した。

結 果

酸処理と高塩分海水処理の併用による病害抑制効果試験

Table 3-2 に示した各試験区で感染12日後の病害抑制効果を調べた結果を Fig. 3-5 に示した。pH2.0、塩分3%、処理温度15℃、処理時間5分間で週1回の酸処理を実施

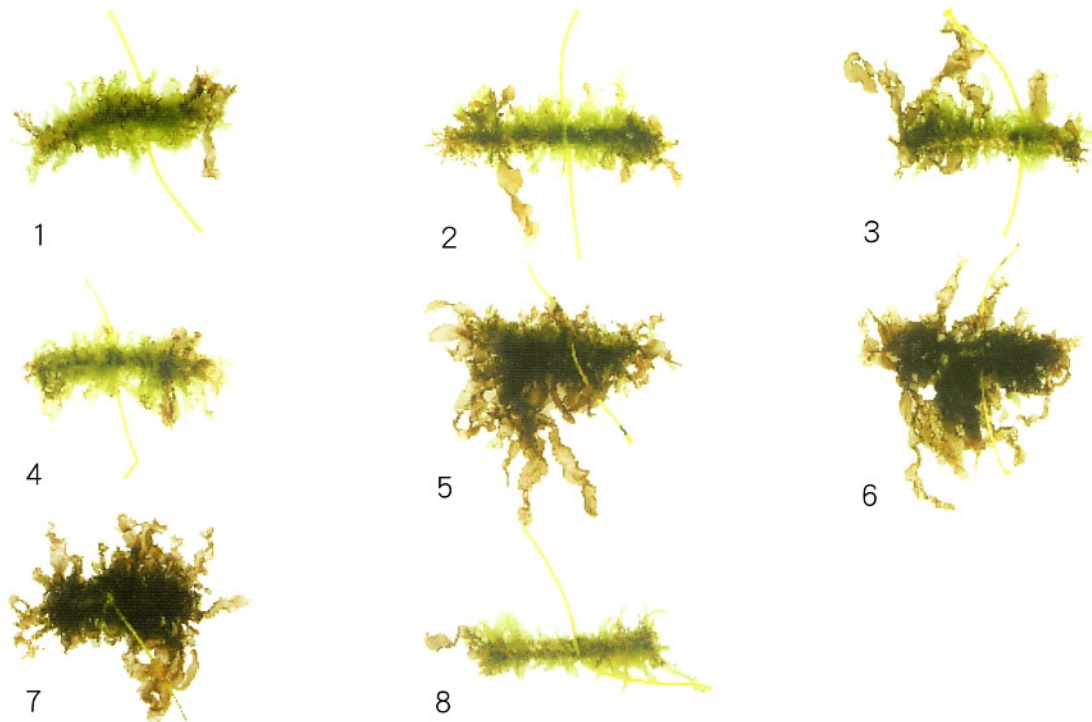


Fig. 3-5. Effect of sequential treatments of acidified and high salinity seawater for the suppression of red rot disease of *Porphyra*.

- 1: Acidified seawater treatment once a week (Control).
- 2: Weekly treatment of acid solution followed by weekly treatment of high salinity (5%) seawater.
- 3: Weekly treatment of acid solution followed by weekly treatment of high salinity (10%) seawater.
- 4: Weekly treatment of acid solution followed by weekly treatment of high salinity (15%) seawater.
- 5: Weekly treatment of acid solution followed by weekly treatment of high salinity (20%) seawater.
- 6: Weekly treatment of acid solution followed by weekly treatment of high salinity (25%) seawater.
- 7: Acidified seawater treatment twice a week.
- 8: No treatment (Negative control).

する対照区（1区）と比較して週2回の酸処理区（7区）は病害抑制効果が非常に高いものであった。一方、酸処理後4日後に高塩分海水処理を併用する1～6区では塩分濃度5%（2区）および10%（3区）区では対照区と比較してほとんど抑制効果がみられなかった。塩分濃度15%（4区）では試験開始後9日間は抑制効果がみられたが、その後病気が進行し、試験終了時までには抑制効果が持続しなかった。塩分濃度20%（5区）、25%（6区）では週2回の酸処理区（7区）と等しい著しい病害抑制効果が認められた。

酸処理、高塩分海水処理による赤ぐされ病原菌菌糸の生長抑制効果

酸処理と塩分濃度20%および25%の高塩分海水処理の併用により著しい病害抑制効果がみられたので（Fig. 3-5）、高塩分海水処理による病原菌菌糸の生長抑制効果を調べた。

遊走子による感染から84時間後までの感染初期の病原菌の生長を Fig. 3-6 に示した。試験結果は大きく3つのグループに分かれた。今回の5分間の処理条件下では塩分濃度5および10%区では感染細胞数の推移は無処理区のそれに近く84時間後には約300細胞で、生長抑制効果はほとんど認められなかった。15%区はある程度の生長抑制効果が認められたが、病原菌菌糸は遅いながらも生長を続け84時間後には約80細胞であった。20、25%区は酸処理区に近い推移を示し、84時間後に20～30細胞と著しい生長抑制効果を示した。

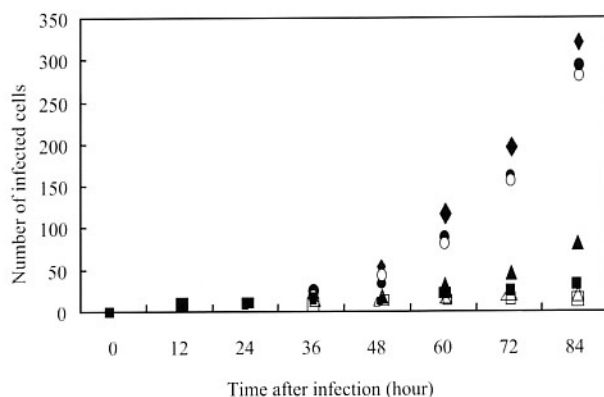


Fig. 3-6. Suppression effect of high salinity seawater on the growth of fungal hyphae of red rot disease. □, Control; ◆, Negative control; ●, 5% Salinity; ○, 10% Salinity; ▲, 15% Salinity; △, 20% salinity; ■, 25% salinity.

酸処理と高塩分海水処理の併用がノリの生長に及ぼす影響

酸処理と高塩分海水処理の併用がノリ葉体の生長に及ぼす影響を調べた結果を Fig. 3-7 に示した。試験開始時の葉体面積が7.6mm²であった葉体は、酸処理1回の対照区では試験終了時に25.8mm²となり3.4倍の生長がみられた。酸処理と高塩分海水処理の併用区では塩分濃度5%では3.6倍、10%では3.2倍、15%では3.1倍、20%では3.4倍、25%では2.8倍の生長がみられた。対照区と各試験区の生長を比較した結果、5～20%区では有意差がみられなかった（*t*検定、*p* > 0.05）が、25%試験区については有意な生長率の低下がみられた（*p* < 0.05）。

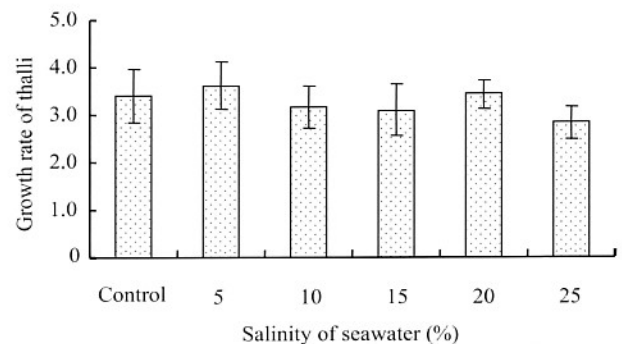


Fig. 3-7. Effect of sequential treatments of acid solution and high salinity seawater on the growth of *Porphyra* thalli. Growth rate of thalli was calculated by comparing the final thalli area with initial ones. Vertical bars show standard deviation.

第3節 考 察

赤ぐされ病がノリ養殖漁場で蔓延する環境条件としては低塩分、小潮時、温暖無風などが知られている（秋山、1973）。また、赤ぐされ病病原菌 *P. porphyrae* の菌糸の生長は低温、低pH、高塩分で阻害されると言われている（藤田ら、1977；藤田ら、1980；Park *et al.*, 2000）。pHの異なる酸処理による赤ぐされ病病害抑制試験の結果、赤ぐされ病を抑制するためには、酸処理液のpHを2.0以下にすることが必要であるとわかった（Fig. 3-1）。この結果は現在ノリ養殖漁場で使用されている酸処理剤のpHと一致していた。低温、低pH下における高塩分酸処理の病害抑制効果については、全体としては酸処理のみを行った網糸と顕著な差がみられなかった（Fig. 3-2）。この理由は、2.0以下の低pHや20%以上の高塩分処理によって赤ぐされ病病原菌は死滅するか、生長を休止させることができることから、病害抑制には低温処理などの複合的な処理はほとんど新たな効果を示すことがなかったと考えられる。したがって、病害の抑制に重要なこと

は、現在以上の薬剤の強さではなく、酸処理後に再び遊走子が付着し感染が広がることから、病害抑制処理の頻度を高くすることであると考えられた。

赤ぐされ病病原菌の遊走子の高濃度存在下における病害抑制試験では、遊走子が高濃度に存在する場合には一般に通常の酸処理を行っても病気が蔓延する事例が多いこと、また今回の試験（第3章第1節）で低温、低pH下における高塩分酸処理のみでは著しい効果がなかったことから（Fig. 3-2）、酸処理と高塩分海水処理の併用により病害抑制処理の頻度を高くして抑制効果を高める手法を検討した。

遊走子が高濃度で存在する場合、病害蔓延は遊走子によるノリ葉体への高密度の感染と次の酸処理までの間にそれらの菌糸が生長し、隣り合う病斑部が一つになる程拡大することと考えられる。したがって、赤ぐされ病病原菌遊走子が高濃度で存在する環境下では週1回の酸処理では病気の進行を十分には抑制できないと考えられた。しかし、制限無く酸処理を行うことは環境面のみならず、海苔という食品へのイメージからも好ましくない。このため、酸処理と高塩分海水処理の併用により、酸処理の

頻度を増やすことなく次の摘採まで病害抑制を行う試験を行った。今回の酸処理と高塩分海水処理の併用試験における赤ぐされ病病原菌の遊走子濃度はこれまでに海水中で測定された間接蛍光抗体法による最高濃度レベルの4,700個/L（Amano *et al.*, 1996）や8,300個/L（小谷ら, 1996）より多い20,000個/Lに設定した。1週間のうち1度の酸処理とその4日後に1度の高塩分処理を行ったところ、塩分濃度20および25%区で著しい病害抑制効果がみられた（Fig. 3-5）。この結果は純粋培養した赤ぐされ病病原菌に対して高塩分海水処理による生長抑制試験の抑制効果と一致した（Fig. 3-6）。しかしながら、直径3mmにくりぬいた小さなノリ葉体では、酸処理と高塩分海水処理の併用で25%の塩分濃度にするノリの生長速度が低くなる（Fig. 3-7）という結果が得られたので、実際のノリ養殖では20%の高塩分海水処理を行う方がよいと考えられた。今回の試験で、病気が蔓延する可能性のある海況において、摘採間隔中に1度の酸処理と1度の高塩分海水処理をそれぞれ実施することにより大きな赤ぐされ病抑制効果をもたらす可能性があることがわかった。

第4章 ノリの色落ちに関与する栄養塩類の供給面からみた伊勢湾のノリ養殖漁場の分類

ノリの色落ち現象とは、海水中の栄養塩類の減少によりノリ葉体の色が退色することである。色落ち現象は全国各地で毎年みられ、ノリの商品価値を著しく低下させ、時にはノリ網全体のノリが摘採不能となり、ノリ養殖業に大きな損害を与える。

河口域以外のノリ養殖漁場では、栄養塩類は冬期の降雨量の減少にともなって陸上からの供給が不足したり、植物プランクトンの大量発生によって低いレベルで推移することが多い。このため、ノリが健全に生育するのに必要な栄養塩レベルを下回る状態がしばしばみられ、ノリの色落ち現象の一因となる（河邊, 1987；小林, 2001）。三重県のノリ養殖は木曾岬町から鳥羽市にかけての伊勢湾で行われている。これまで三重県のノリ漁場は、桑名地区（木曾岬～桑名市 No.1～1）、鈴鹿地区（楠町および鈴鹿市 No.4～8）、中勢地区（津市～松阪市 No.9～11）、南勢地区（明和町～二見町 No.12～15）、鳥羽地区（鳥羽市とその離島 No.16～17）という地域別に分類され（Fig. 4-1）、養殖指導やデータ集計がなされてきた。これは行政や漁業協同組合にとって有効なグループ分けであるが、今後ノリの色落ちに対する漁場別の養殖方針を

決めるためには、漁場の特性を客観的な方法を用いて分類する必要がある。そこで、統計的手法による漁場の分類を試み、実測データから分類された漁場の性質を調べた。また、漁場別の栄養塩濃度の傾向と分類された漁場グループとの関係を調べた。

第1節 栄養塩類の供給面からみた伊勢湾のノリ養殖漁場の分類と性質

これまでに統計的手法を用いて海水について分類を行った例として、多変量解析を用いた水質からみた赤潮の要因、判別、予知（大内ら, 1981；大内, 1984；加藤ら, 1985）、伊勢湾の水質環境の分類（加藤ら, 1984）などがある。三重県のノリ養殖漁場は伊勢湾内にあることから、河川の影響を大きく受ける漁場と、低気圧や季節風による荒天の影響を受ける漁場に大別される。しかし、各漁場を漁場特性により分類した例はない。そこで本節では三重県のノリ養殖漁場についてノリの色落ちに関与する硝酸態窒素（ $\text{NO}_3\text{-N}$ ）、亜硝酸態窒素（ $\text{NO}_2\text{-N}$ ）、アンモニウム態窒素（ $\text{NH}_4\text{-N}$ ）とリン酸態リン（ $\text{PO}_4\text{-P}$ ）および海水の比重を変数として1996年から1998年のデー

タを用いて解析し、多変量解析のクラスター分析および主成分分析により漁場の分類を行った。さらに、水質の実測値を用いて分類された漁場の性質をしらべた。

方法

クラスター分析

分析用の海水を採取した伊勢湾内の17測点を Fig. 4-1 に示した。解析には三重県科学技術振興センター水産研究部が毎年10月から3月までのノリ養殖期間に週1回実施しているノリ漁場栄養塩分析結果のうち、1996年から1998年のデータを使用した。使用した変数は各測点の表層水の比重、NH₄-N、NO₃+NO₂-N、PO₄-Pである。海水の比重は卓上型塩分計 (DIG-AUTO MODEL3-G、鶴見精機) を用いて測定し、NH₄-N、NO₃+NO₂-N、PO₄-P は栄養塩分析装置 (TRAACS 800、BRAN+LUEBBE社) を用いて分析を行った。

上記の4変数を基準化し (Table 4-1)、統計ソフト (多変量解析、エスミ社) を用いて分類感度が高いウォード法でクラスター分析を行った。

主成分分析

クラスター分析と同様のデータを用い、統計ソフトを用いて主成分分析を行った。

GIS で解析した表層水と底層水の比較

伊勢湾の表層と底層 (底上1m) の水温、NH₄-N、

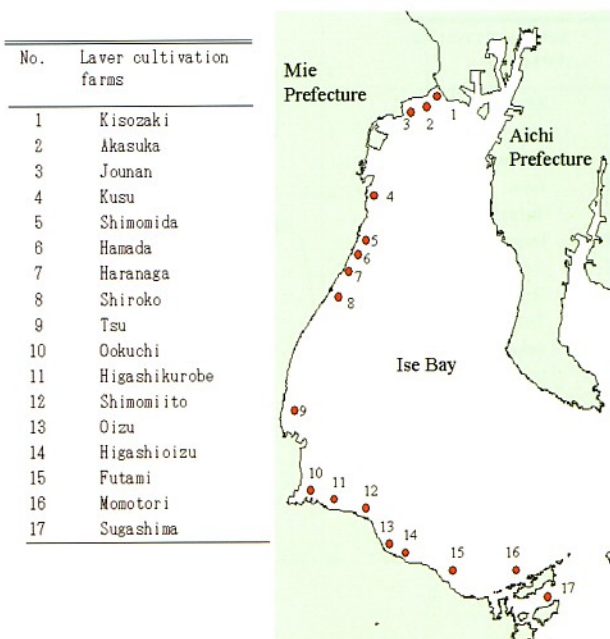


Fig. 4-1. Map showing the location of the seawater sampling stations at laver cultivation farms.

Table 4-1. The normalize score of characteristics of seawater at laver cultivation farms

No.	Cultivation farms	Specific gravity	NH ₄ -N	NO ₃ +NO ₂ -N	PO ₄ -P
1	Kisozaki	-1.77	2.26	1.00	1.22
2	Akasuka	-3.07	2.74	3.08	2.52
3	Jounan	-0.37	0.43	0.78	1.55
4	Kusu	-0.17	-0.20	1.43	-0.09
5	Shimomida	0.21	-0.30	-0.05	0.17
6	Hamada	0.31	0.46	-0.02	0.36
7	Haranaga	0.53	-0.18	-0.39	0.20
8	Shiroko	0.47	-0.41	-0.48	-0.33
9	Tsu	0.41	-0.40	-0.49	0.06
10	Ookuchi	-0.20	0.46	-0.05	0.80
11	Higashikurobe	0.11	-0.33	-0.18	-0.27
12	Shimomiito	-0.28	-0.36	-0.43	-0.47
13	Oizu	0.28	-0.60	-0.67	-1.02
14	Higashioizu	0.29	-0.48	-0.52	-0.86
15	Futami	0.35	-0.63	-0.67	-1.01
16	Momotori	0.64	-0.66	-0.73	-0.86
17	Sugashima	0.92	-0.81	-0.83	-1.00

PO₄-Pについて、極めて強い水温躍層が発達していると思われる8月と、躍層が存在しないと思われる2月の比較をおこなった。水温については1980~1999年の20年間、NH₄-N および PO₄-P は1985~1999年15年間の平均的な表層水の特徴を GIS で解析した。

底泥の性状と間隙水中のNおよびPの濃度

ノリ養殖が行われる浅海域において底泥の性状と間隙水中のNおよびPの濃度を調べるため、Fig. 4-2 に示した海域の4測点において2001年12月、2002年2月、4月、6月、8月、10月の計6回実施した。ST1と2は支柱柵漁場である水深2m、ST3と4は浮き流し漁場である水深5mの浅海域である。底質の採集にはスミスマツ

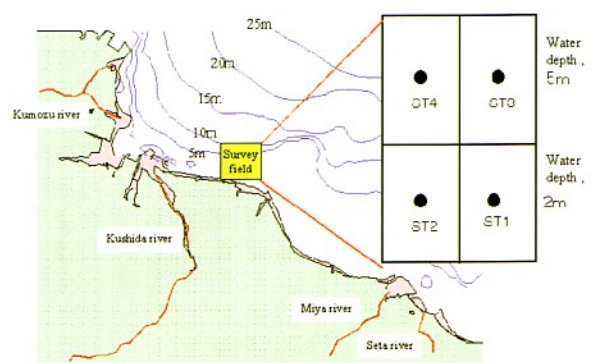


Fig. 4-2. Map showing the location of the sampling stations of seawater and the void water on the neritic region in Ise Bay.

キンタイヤーグラブサンプラーを用いた。底質の性状について、化学的酸素要求量 (COD) は水質汚濁調査指針による方法により、間隙水中の DIN および $PO_4\text{-P}$ 濃度は 1 N の塩化カリウム溶液で栄養塩類を抽出後、GF/C ガラスフィルター (Whatman) で濾過を行い栄養塩分析装置 (TRAACS 800, BRAN+LUEBBE 社) を用いて測定した。同時にバンドン採水器を用いて底層水を採取し、間隙水と同様の方法により DIN および $PO_4\text{-P}$ 濃度を測定した。

結 果

クラスター分析

漁場間の類似度を比較するためにクラスター分析を行い、その結果を Fig. 4-3 に示した。クラスター結合の漁場間の距離は桃取-菅島で 0.03、大淀-東大淀で 0.03、大淀-二見町で 0.06、原永-津市で 0.12、白子-桃取で 0.27、木曾岬-赤須賀で 0.35、下御糸-大淀で 0.41、白子-東黒部で 0.44、城南-大口で 0.65、白子-下御糸で 0.72、下箕田-原永で 0.76、木曾岬-城南で 1.01、下箕田-浜田で 1.47、木曾岬-楠町で 1.62、下箕田-白子で 1.91、木曾岬-下箕田で 4.21 であった。分析に用いた 17 の漁場では Fig. 4-3 の左側 5 漁場 (グループ A) と右側 12 漁場 (グループ B) との類似度が非常に低く、2 つのクラスターに大きく分類された。

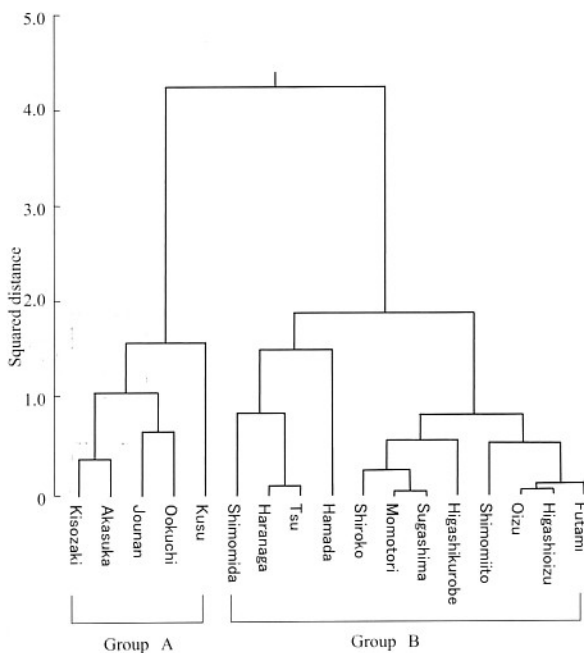


Fig. 4-3. Dendrogram based on cluster analysis of the seawater samples collected from laver cultivation farms in Ise Bay during 1996 to 1998.

主成分分析

Table 4-2 に全主成分と固有値、寄与率およびその累積寄与率を示した。第 1 主成分の寄与率は 90.2%，第 2 主成分の寄与率は 4.9% で第 2 主成分までの累積寄与率は約 95.1% であり、情報の損失は 4.9% であった。その主成分得点 (スコア) を Fig. 4-4 に示した。第 1 主成分では比重は正の値を示し、 $NH_4\text{-N}$ 、 $NO_3\text{+NO}_2\text{-N}$ 、 $PO_4\text{-P}$ は負の値を示すことから河川水流入強度を表す成分と考えられる。第 2 主成分は固有値、寄与率ともに低く、主成分の説明力は第 1 主成分と比べて著しく低いものの比重、 $NH_4\text{-N}$ 、 $PO_4\text{-P}$ が正の値を示し、 $NO_3\text{+NO}_2\text{-N}$ が負の値を示すことから、底層からの栄養塩類の供給を表す成分と推測される。第 2 主成分までの各主成分のスコアは

$$Z_1 = 0.51(\text{比重}) - 0.51(NH_4\text{-N}) - 0.50(NO_3\text{+NO}_2\text{-N}) - 0.49(PO_4\text{-P})$$

$$Z_2 = 0.48(\text{比重}) + 0.08(NH_4\text{-N}) - 0.37(NO_3\text{+NO}_2\text{-N}) + 0.79(PO_4\text{-P})$$

で与えられた。

Table 4-2. Eigenvalues and its cumulative contributions of four principal components

Principal component	Eigenvalue (λ)	Contribution (%)	Cumulative contribution
Z_1	3.61	90.16	90.16
Z_2	0.20	4.93	95.09
Z_3	0.16	4.05	99.13
Z_4	0.03	0.87	100.00

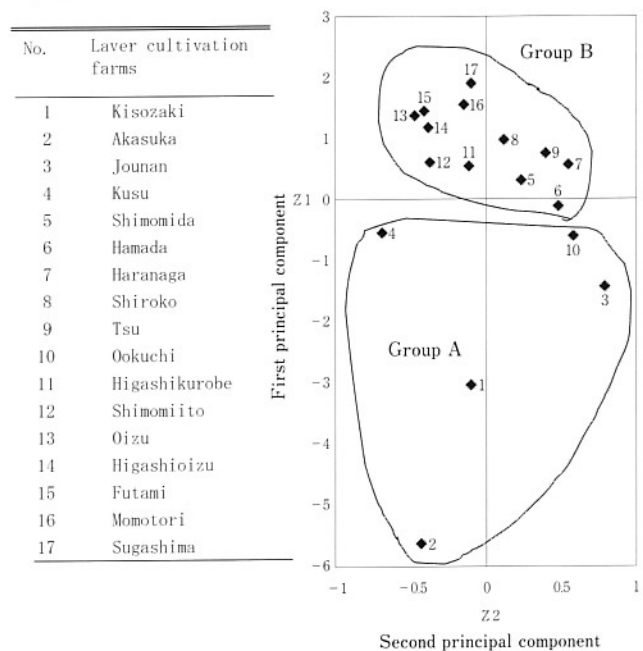


Fig. 4-4. The scatter diagram of the principal components of laver farm.

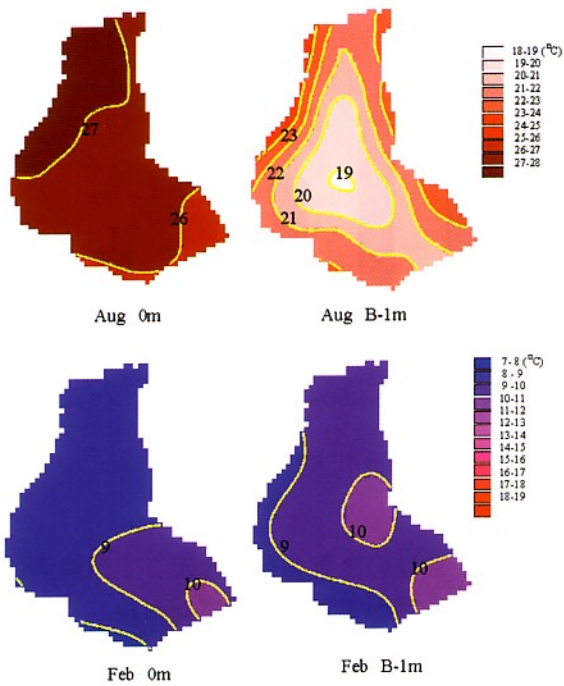


Fig. 4-5. Monthly mean seawater temperature of the surface (0m) and bottom layers (B-1) in Ise Bay during 1985 to 1999.

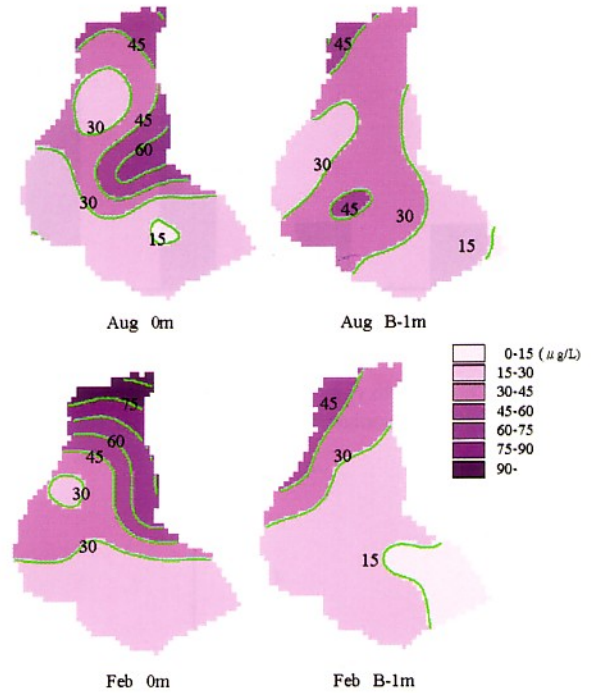


Fig. 4-6. Monthly mean $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations of the surface (0m) and bottom layers (B-1) in Ise Bay during 1985 to 1999.

GISで解析した表層水と底層水の比較

8月の表層水の平均水温は26~28℃の海域が大部分を占めているのに対し、底層水の平均水温は18~22℃の海域が湾の大部分を占め、水深が深い海域ほど低い傾向がみられた。一方、2月の表層水の平均水温は8~10℃の海域が大部分を占めているのに対し、底層水の平均水温は8~11℃であった。このことから、8月は非常に強い水温躍層が存在し、上層水と下層水の混合がほとんど起こっていないが、2月では水温躍層はみられず、湾全域で上層水と下層水の混合が起こっていることがわかった (Fig. 4-5)。

8月の表層水の平均 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は15~30 $\mu\text{g/L}$ の海域が最も広く占めているのに対し、底層水の平均 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は30~45 $\mu\text{g/L}$ の海域が最も広く占め、若干底層水の方が $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が高かった。一方、2月の表層水と底層水の平均 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度を比較すると若干表層水の方が $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が高かった (Fig. 4-6)。

8月の表層水の平均 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度は15~45 $\mu\text{g/L}$ の海域が広く占めているのに対し、底層水の平均 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度は15~75 $\mu\text{g/L}$ の海域が広く占め、干底層水の方が $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度が高かった。一方、2月の表層水と底層水の平均 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度を比較すると共に6~15 $\mu\text{g/L}$ の海域が広く占めほとんど差はみられなかった (Fig. 4-7)。ノリ養殖が行われる冬季には湾の水温躍層が消滅していること、

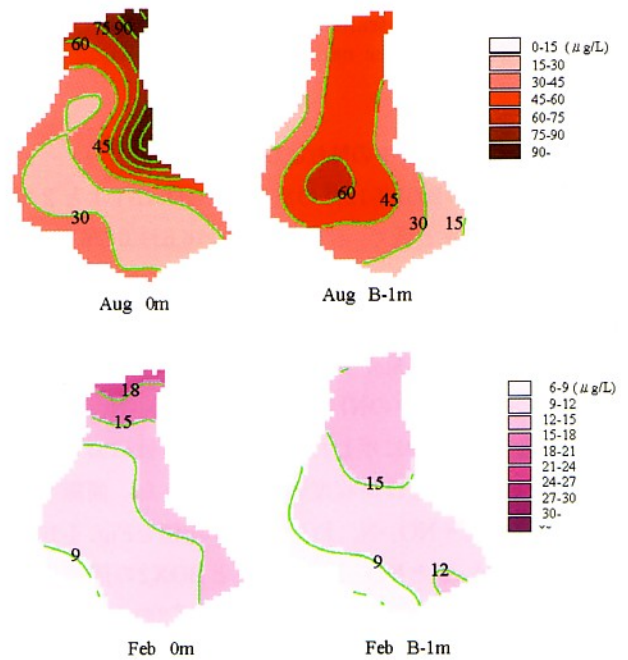


Fig. 4-7. Monthly mean $\text{PO}_4\text{-P}$ concentrations of the surface (0m) and bottom layers (B-1) in Ise Bay during 1985 to 1999.

温度低下により拡散係数が減少することから底泥からのNおよびPの溶出速度が低下する (林, 1983)。このことから2月の $\text{NH}_4\text{-N}$ や $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度は表層水とほとんど変わらないことがわかった。

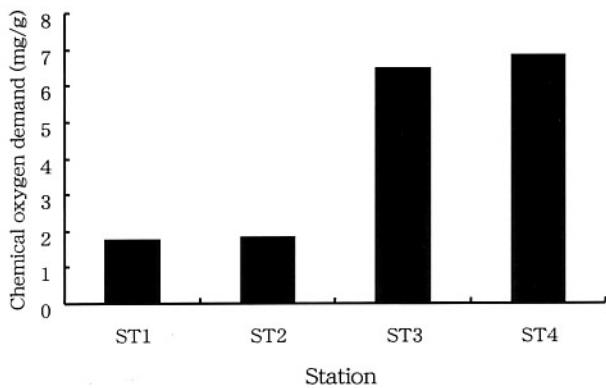


Fig. 4-8. Chemical oxygen demand on the neritic region in Ise Bay in December 2001. ST1~4 shows Fig.4-2.

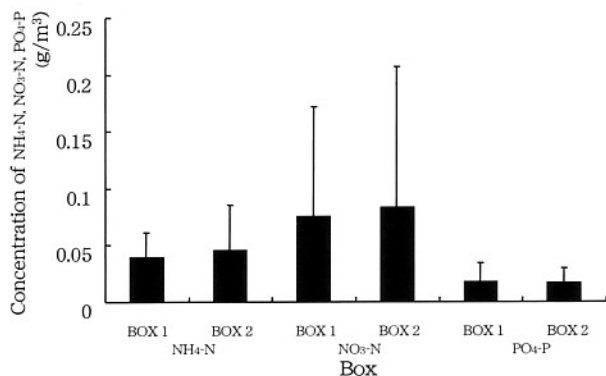


Fig. 4-9. Mean concentration of NH₄-N, NO₃-N, PO₄-P in the seawater on the neritic region in Ise Bay

底泥の性状と間隙水中のNおよびPの濃度

調査開始時の2001年12月の底質のCODはST 1と2では1.8mg/乾泥gと低く、ST 3と4では6.5および6.8mg/乾泥gとやや高い値を示した (Fig. 4-8)。この結果から、調査海域をST 1と2の有機物量が少ない浅海域 (BOX1)、ST 3と4の有機物量が多い浅海域 (BOX2)、の2海域に分類した。海水中のNH₄-N, NO₃+NO₂-N, PO₄-Pの平均値をFig. 4-9に示した。いずれの項目においてもBOX1とBOX2でほぼ同程度の濃度であった。間隙水のNH₄-N, NO₃+NO₂-N, PO₄-Pの平均値をFig. 4-10に示した。NH₄-NとNO₃-NはBOX1とBOX2の間で有意な差はみられなかったが、PO₄-PはBOX2の方が有意に濃度が高かった ($P < 0.01$)。NH₄-N, NO₃+NO₂-N, PO₄-P濃度について海水と間隙水について比較すると、BOX1の間隙水中のNH₄-N, NO₃+NO₂-N, PO₄-P濃度はそれぞれ海水の139倍、47倍、69倍であり、BOX2の間隙水中のNH₄-N, NO₃+NO₂-N, PO₄-P濃度はそれぞれ124倍、35倍、104倍であった。

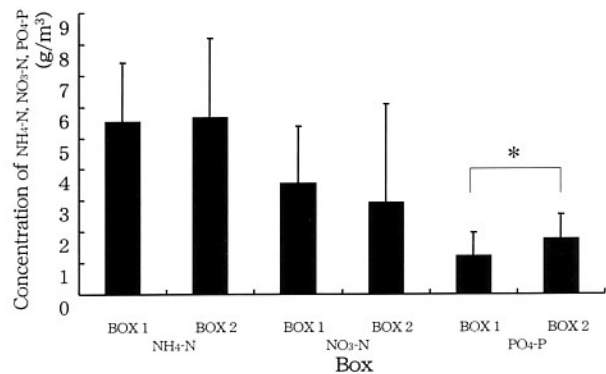


Fig. 4-10. Mean concentration of NH₄-N, NO₃-N, PO₄-P in the void water on the neritic region in Ise Bay. *Statistical significance ($p < 0.01$)

第2節 ノリの色落ちを引き起こす伊勢湾の漁場別栄養塩類濃度レベル

前節で統計手法により伊勢湾のノリ漁場を水質の性質の近さで分類を行い、さらに栄養塩類の供給源が河川水からの供給以外の要因として湧昇流や底泥からの栄養塩類の溶出について検討を行った。ここでは、漁場別に実測値から導いた色落ち発生が危惧されるDIN濃度の発生頻度を算出し、統計による漁場分類と比較を行った。

方 法

漁場別栄養塩類濃度の抽出

ノリが生育に必要なDIN濃度は海水の水温や流速とも関係するため、常に一定の値ではないが、一般的には100μg/Lが十分量とされている。ノリは実際の漁場では常に一定のDIN濃度ではなく、濃度の上昇と下降、水温、流速の変化、それらが続く時間など多くの要素の影響を受ける。そのため、確定した色落ちが生じるDIN濃度を算定することはできないが、長年の分析値と色落ちの発生状況から三重県ではノリの色落ち発生が危惧されるDIN濃度40~60μg/L、重篤な色落ち発生が危惧されるDIN濃度は40μg/L未満とするのが妥当な数値と考えられる。そこで第4章第1節で用いたノリ漁場栄養塩分析結果の1996年から1998年のデータから、ノリの色落ち発生が危惧されるDIN濃度40~60μg/Lと重篤な色落ち発生が危惧される40μg/L未満になる漁期中の日の割合を伊勢湾内の17測点別に示した (Table 4-3)。

Table 4-3. Dissolved inorganic nitrogen concentrations obtained from 17 laver farms during 1996 to 1998

No.	District	DIN				
		average	S. D	rate below 40 μ g/L	rate 41 ~60 μ g/L	rate below 60 μ g/L
1	Kisozaki	344.7	153.2	0.0	0.0	0.0
2	Akasuka	522.4	333.8	0.0	3.9	3.9
3	Jounan	261.6	133.9	0.0	2.0	2.0
4	Kusu	299.7	390.6	0.0	2.0	2.0
5	Shimomida	171.9	123.5	11.5	1.9	13.5
6	Hamada	201.0	204.3	8.2	4.1	12.2
7	Haranaga	144.1	85.7	11.8	3.9	15.7
8	Shiroko	125.2	73.3	15.2	2.2	17.4
9	Tsu	130.4	159.3	9.8	21.6	31.4
10	Ookuchi	198.5	126.6	3.8	3.8	7.7
11	Higashikurobe	154.7	111.7	15.6	0.0	15.6
12	Shimomiito	132.4	82.7	3.3	13.3	16.7
13	Oizu	104.2	97.6	29.4	11.8	41.2
14	Higashioizu	125.4	83.4	19.2	7.7	26.9
15	Futamichou	102.6	68.2	16.7	12.5	29.2
16	Momotori	99.0	66.8	18.0	20.0	38.0
17	Sugashima	84.4	44.4	14.0	18.0	32.0

結 果

漁場別栄養塩類濃度の抽出

漁場別のDIN濃度の平均値、標準偏差とDIN濃度が40 μ g/L未満になる日の割合、DIN濃度が41~60 μ g/Lになる日の割合、DIN濃度が60 μ g/L未満になる日の割合をTable 4-3に示した。栄養塩類濃度をDIN濃度と比較すると、各漁場の平均値は菅島の84.4 μ g/Lから赤須賀の552.4 μ g/Lまで幅広く分布した。さらに各漁場においても標準偏差が大きく、DIN濃度の値に大きなばらつきがみられた。色落ち発生が危惧されるDIN濃度60 μ g/L以下についてさらに細かくみると、重篤な色落ち発生が危惧されるDIN濃度40 μ g/L未満になる日の割合は大淀が最も高い29.4%で、続いて東大淀19.2%、桃取18.0%、二見町16.7%、東黒部15.6%、白子15.2%、菅島14.0%、原永11.8%、下箕田11.5%であった。その他の漁場は10%以下であった。色落ち発生が危惧されるDIN濃度41~60 μ g/Lになる日の割合は津市が21.6%、桃取が20.0%、菅島が18.0%と高い値を示し、続いて下御糸13.3%、二見町12.5%、大淀11.8%で、その他の漁場は10%以下であった。色落ち発生が危惧されるDIN濃度60 μ g/L未満となる日の割合は大淀が41.2%、桃取38.0%、菅島32.0%、津市31.4%、二見町29.2%、東大淀26.9%と高く、下箕田、浜田、原永、白子、東黒部、下御糸は12~17%その他の漁場は10%以下であった。

第3節 考 察

三重県のノリ養殖漁場をクラスター分析で分類した2つのグループで主成分スコア上の各点をまとめると、グループA（以後河口型漁場とする）とグループB（以後沿岸型漁場とする）の2つに大きくわかれた（Fig. 4-4）。河口型漁場に分類された漁場は木曾三川河口域の漁場と櫛田川河口漁場と楠町であり、地理的にみてもこの分類は妥当であると考えられた。主成分分析の結果より第2主成分を栄養塩類が底層から供給される成分と推測した。実際、毎年ノリ養殖期に漁場の栄養塩類の分析を週1回の頻度で行っているが、栄養塩類濃度が大きく上昇するのは大量の河川水の流入と強い風による荒天後である。主成分分析の結果からでは底層からの栄養塩類の供給が湧昇流によるものか底質からの溶出によるものか分らなかった。

伊勢湾以外の内湾における湧昇流については東京湾の北東風によって生じる湧昇流の例（松山ら、1990；鈴木ら、1997；佐々木、1993；柿野ら、1987）、噴火湾の例（大谷、1986）、大村湾の例（森、1961）などが報告されており、東京湾では湧昇流による青潮により二枚貝に大きな被害を与えている（柿野、1986）。伊勢湾においても貧酸素水塊は毎年のように発生し、西よりの風が長期間吹いた後、貧酸素水塊が沿岸域に接岸し、二枚貝の大量へい死を引き起こす例がある（萩田、1985；坂口ら、1998）。このことから伊勢湾では西よりの風が吹き続け

ることにより東向きの吹送流が発生し、沿岸表層水を補う形で底層からの湧昇流が生じていると考えられる。ノリ養殖期にも冬季の北西風により湧昇流は生じていると考えられるが、Fig. 4-6とFig. 4-7に示したように冬季の底層水は表層水と比較して栄養塩類の濃度にほとんど差がないことから湧昇流が栄養塩の供給源にはなっていないと考えられた。一方、ノリ養殖が行われる浅海域の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3+\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度について海水と間隙水について比較すると、間隙水中の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3+\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度は数十倍から100倍程度高かった。また、底泥上部の海水が流動し、底泥表層がある程度攪拌された場合にN、Pの溶出速度は増大することが報告されている(林, 1983)。これらのことから、ノリ漁場となっている浅海域においては荒天による底泥の巻き上げによる栄養塩の溶出は無視できないものであると考えられた。

漁場別に栄養塩類濃度をDIN濃度で比較すると、Table 4-3に示すように平均値で6.5倍の幅広い値をとり、

各漁場においても大きなばらつきがみられた。漁場別のDIN濃度 $60\mu\text{g/L}$ 未満となる日の割合と主成分スコア上のクラスター分析による漁場分類を比較したところDIN濃度 $60\mu\text{g/L}$ 未満となる日の割合は大淀、桃取、菅島、津市、二見町、東大淀が最も高く、主成分スコアからみると津市を除いて河川水、栄養塩類の溶出の影響がともに低い位置にあった。次にDIN濃度 $60\mu\text{g/L}$ 未満となる日の割合が高い下箕田、浜田、原永、白子、東黒部、下御糸であり比較的河川水の影響がやや少ない位置にあった。その他の漁場はDIN濃度 $60\mu\text{g/L}$ 未満となる日の割合は10%以下であり、それらはすべて河川水の流入が多いグループAに分類された。また、伊勢や鳥羽海域は河川水、栄養塩類の溶出の影響がともに小さく、同時にDIN濃度が $60\mu\text{g/L}$ 未満となる日の割合が最も高いため、海流の動きが小さいときには特に色落ちの危険性が高い漁場であると示唆された。

第5章 色落ちノリの色調回復手法の開発

伊勢湾の色落ちは、栄養塩類の供給からみると伊勢・鳥羽地区で起きる危険性が高く、次に鈴鹿地区で高いことを第4章で明らかにした。ノリの色落ちは伊勢湾では過去20年間のデータからみてかなりの頻度で起き、産業的に無視できない損害を与えてきた。この色落ちの抑制または回避はノリ養殖が海況に依存している限り極めて困難である。これまでにノリの栄養要求やノリ養殖漁場での施肥による色落ち回復に関するいくつかの研究の努力はなされてきた(小林, 2001; 佐藤ら, 1959; 伊藤ら, 1960; 武居ら, 1959; 尾形ら, 1963, Amano *et al.*, 1987)。しかし、色落ちには根本的な解決策がない上、唯一多少の効果が認められる施肥についても栄養塩類が海水中へ拡散するため効果が低減することや、現在は環境に配慮した養殖を行うことが求められていることから、ノリ養殖漁場で直接行うことは好ましくないとされている。また、ノリの色落ちは程度の差が大きいにもかかわらず、乾のり製造前の生ノリの色調についての表現は大まかなもので、客観的な測定がなされた例はほとんどない。色落ちしたノリの色調回復について論ずる場合においても葉体の色調測定は必須のものであるが、色調測定はこれまで色彩色差計による乾のりの等級分類の例(尾形ら, 1966; 工藤, 1999)があるにすぎない。そこで今回は生ノリの色落ちの程度を色彩色差計で評価すると

も、過大な施設負担がかからないことを必須条件とし、高密度かつ24時間の浸漬処理によって、摘採後の生ノリの色調を加工前に回復させることを目的として、最適な $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度を検討した。

第1節 生ノリの色調評価と光合成色素含量

ノリは栄養塩類が欠乏すると光合成色素が減少して色落ちする。そこで、葉体の色落ち過程における生ノリの葉体の色調について色彩色差計による測定を行い、色落ちの程度の数値化を試みるとともに、各色落ち段階における光合成色素量の変化を調べた。

方 法

供試ノリ葉体

2001年10月に三重県鈴鹿市白子地先でスサビノリ *P. yezoensis* を野外採苗および育苗し、葉長1cm程度の冷凍網を作製後、 -20°C で貯蔵した。冷凍網は試験時に切断して、40cmの長さのノリ糸を作製した。ノリ糸は天井と周囲の窓から採光できる屋内のノリタンク培養装置(縦150cm横90cm高さ45cm)内のステンレス製の枠に10本張った。タンク内の360Lの天然海水中に含まれる栄養塩類の濃度を維持するために、新しい天然海水を1時間に20L流水しながら、ノリ糸を張った枠を10cm/sの

速度でモーターで水平に往復運動させて水温10℃で2週間培養し、葉長5～10cm程度に生長させた後、試験に用いた。

海水中の栄養塩類の測定

培養に用いた天然海水のNO₃-N, NO₂-N, NH₄-NおよびPO₄-P含有量は、培養に用いた海水を0.2μmのフィルター (DISMIC-25, ADVANTEC) でろ過した後、栄養塩分析装置 (TRAACS 800, BRAN+ LUEBBE) を用いて分析した。

各色落ち過程における葉体の色調と光合成色素量

ノリタンク培養装置の海水流入を停止し、DINが100 μg/L以下に低下したのを確認後、経時的にノリ葉体を採取し、一部を葉体の色調と光合成色素量の測定に、残部を第3節の色調回復試験に用いた。すなわち、隔日にノリを計8回採取し、1サンプルに対し葉体10枚の色調測定を行った。色調は色彩色差計 (CR-300, ミノルタ) を用いてキャリブレーションプレートに食品用ラップフィルムで保護した上に、ノリ葉体を1枚ずつ広げ測定した。なお、Table 5-1 にラップフィルムで保護したキャリブレーションプレートのL*値, a*値, b*値の測定結果を示した。

クロロフィル a, フィコエリトリン, フィコシアニンの各光合成色素量は、天野ら (1978) の方法に準じて各色素を抽出後、吸光光度法により求めた。葉体の色調と光合成色素含量との関係は回帰分析により調べた。

Table 5-1. L*,a*,b* values of the calibration plate covered by the lap film

n	Tristimulus value		
	L *-value (Mean ± S.D.)	a *-value (Mean ± S.D.)	b *-value (Mean ± S.D.)
20	96.69 ± 0.32	0.18 ± 0.03	2.25 ± 0.18

色彩色差計による生ノリの色調分類

前項でL*値, a*値, b*値と各光合成色素含量の回帰分析を行ったところ、a*値で最も強い相関がみられた。そこで、a*値を用いてノリ葉体の色調段階を分類し、細胞の検鏡を行うとともに、葉体中に占める液胞および細胞間隙の割合について比較した。液胞および細胞間隙の割合は葉体の顕微鏡写真を撮影後、画像解析ソフトLIA32を用いて色素体と液胞および細胞間隙に判別分類し、計測した (Fig. 5-1)。

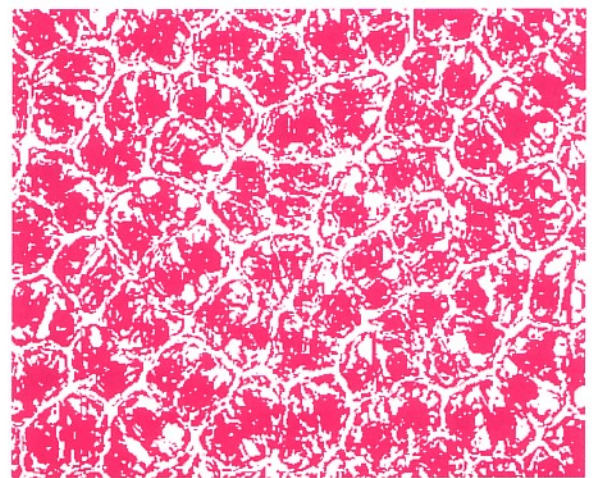
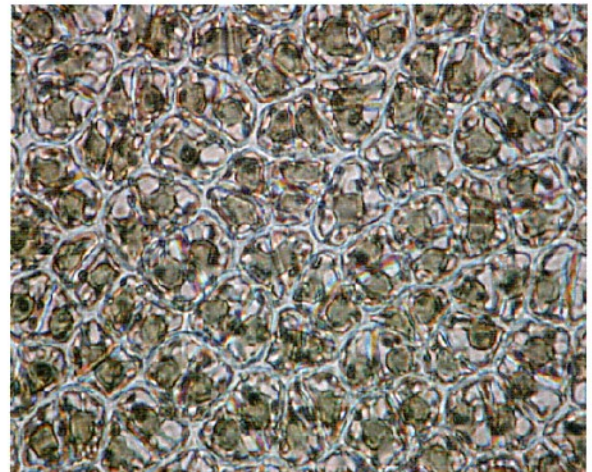


Fig. 5-1. Distinction of the chromatophore, vacuoles, and distances between cells measured by using the image analysis software LIA32.

Upper photograph: light microscopic observation.

Lower photograph: treated by image analysis software LIA32.

結 果

栄養塩類の変化

試験開始日から14日後までの培養海水のDINとPO₄-Pの変化を Fig. 5-2 に示した。試験開始時のDINは52.4 μg/L, PO₄-Pは35.2 μg/Lであった。試験開始後4日目までにDINは急激に減少して10 μg/L程度となり、以後14日まで緩やかに減少した。PO₄-Pは8日目まで徐々に減少し、8日目には10 μg/L以下となり、以後14日まで緩やかに減少した。

葉体の色調の変化と光合成色素含量

8回採取した葉体の明度を示すL*値, 赤～緑方向を表すa*値, 黄～青方向を表すb*値および2日前に採取

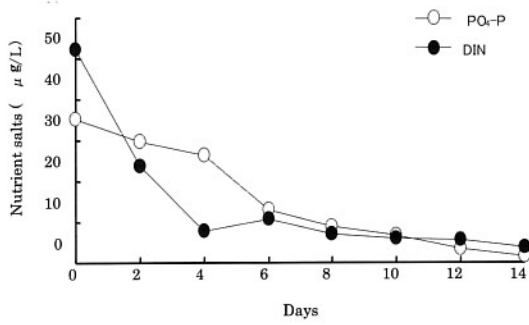


Fig. 5-2. Decreases of nutrient levels in the cultivation tank after dissolved inorganic nitrogen (DIN) levels fell below 100 µg/L.

した葉体との色差 (ΔE^*ab) を Table 5-2 に示した。色差は $\Delta E^*ab = [\{ (\Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2} \}^2 + \Delta L^2]^{1/2} = (\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2)^{1/2}$ で表され、 $\Delta E^*ab = 1.5 \sim 3.0$ の範囲で色差の程度は「感知し得るほど異なる (noticeable)」(村田, 1980) に分類された。今回の試験では試験開始から日数が経過するに従って、 L^* 値と b^* 値は高くなり、 a^* 値は低くなり、各回の測定ではすべてがその2日前に測定したノリに比べて ΔE^*ab が 2.0 より大きな値を示した。このことは、葉体1枚レベルでみると、栄養塩が不足した条件下では少なくとも2日間で葉体の色が異なることが知覚されることを意味している。

次に葉体中の光合成色素量の変化を Fig. 5-3 に示した。クロロフィル *a* は試験開始時に 1.02 mg/g (湿重量) であったものが、試験終了時には 0.37 mg/g (湿重量) に減少した。フィコエリトリンは試験開始時に 7.29 mg/g (湿重量) であったものが、試験終了時には 1.49 mg/g

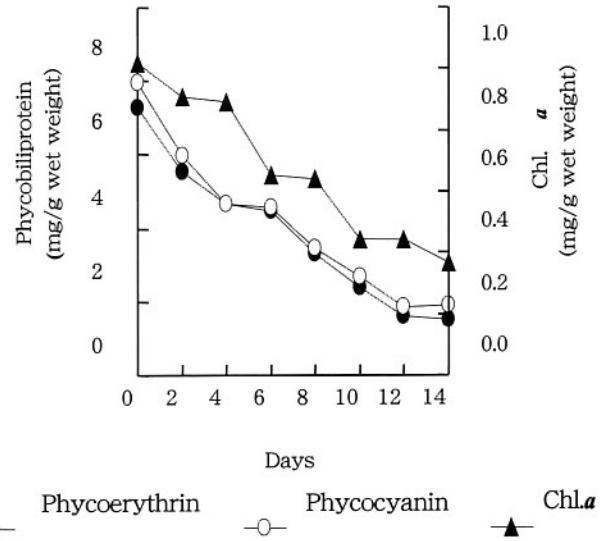


Fig. 5-3. Changes in the levels of photosynthetic pigments in laver obtained after DIN levels fell below 100 µg/L.

(湿重量) に減少し、フィコシアニンは 7.95 mg/g (湿重量) であったものが、1.90 mg/g (湿重量) に減少した。試験終了時にはフィコエリトリンとフィコシアニンはクロロフィル *a* の減少率 64% に比べ、それぞれ 80%、76% と大きく減少した。肉眼観察では、8日以降の葉体は中程度から重度の色落ち状態で、これらのノリを乾のり製品にすると退色した製品となってしまふ。この時、葉体の a^* 値がはじめてマイナスの値を示し、葉体の色調が赤方向から緑方向に移行した点が特徴的であった (Table 5-2)。この時の光合成色素含量は、クロロフィル *a*、フィコエリトリン、フィコシアニン含量が葉体 1 g (湿重量) 当たりそれぞれ 0.64 mg、3.3 mg、3.5 mg

Table 5-2. Changes in L^* , a^* , and b^* values and color difference of the laver after DIN levels fell below 100 µg/L

Days after DIN levels fell below 100 µg/L	Tristimulus value			Color difference (ΔE^*ab)
	L^* .value (Mean ± S.D.)	a^* .value (Mean ± S.D.)	b^* .value (Mean ± S.D.)	
0	58.78 ± 2.46	4.26 ± 0.74	11.15 ± 0.39	—
2	66.66 ± 3.08	3.12 ± 0.78	12.15 ± 1.03	8.02
4	66.19 ± 2.85	1.63 ± 1.20	13.62 ± 1.22	2.14
6	70.24 ± 1.59	0.99 ± 0.79	13.08 ± 0.68	4.14
8	71.36 ± 1.73	-0.36 ± 0.48	15.80 ± 1.76	3.23
10	73.69 ± 2.38	-1.52 ± 0.78	15.47 ± 1.86	2.63
12	78.84 ± 2.61	-2.68 ± 0.49	15.57 ± 0.89	5.28
14	77.26 ± 2.30	-3.88 ± 0.69	18.26 ± 1.42	3.35

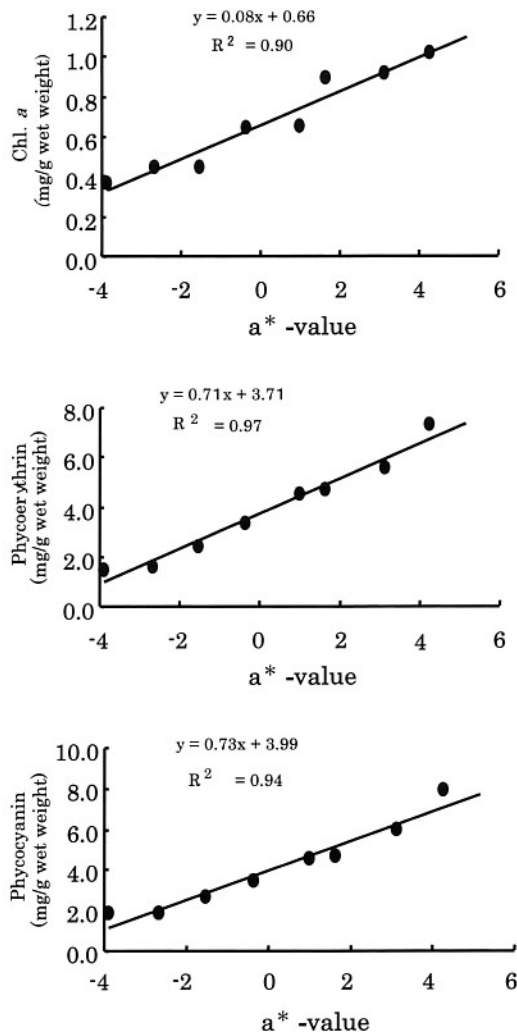


Fig. 5-4. Relationships between a^* -values and levels of photosynthetic pigments in laver obtained after DIN levels fell below $100 \mu\text{g/L}$.

であり、それぞれ実験開始時の62%、45%、45%に低下していた。

ノリ葉体の L^* 値、 a^* 値、 b^* 値と各光合成色素含量の回帰分析を行ったところ、 L^* 値とクロロフィル a 、フィコエリトリン、フィコシアニンの重相関係数 (R^2) は、それぞれ0.83、0.96、0.95であり、 a^* 値とクロロフィル a 、フィコエリトリン、フィコシアニンでは、それぞれ0.90、0.97、0.94、 b^* 値とクロロフィル a 、フィコエリトリン、フィコシアニンでは、それぞれ0.81、0.86、0.84であった。最も強い相関がみられた a^* 値と各光合成色素の相関を Fig. 5-4 に示した。

色彩色差計による生ノリの色調分類

a^* 値が-4~+6 までの葉体の色調段階を Fig. 5-5 に示した。

a^* 値が低下するに従って色調は赤系統から緑系統へ、色の濃さは薄くなった。 a^* 値が-4~+6までの細胞写真を Fig. 5-6 に示した。ノリの色調の低下は主として光合成色素含量の低下による。一方で色落ちしたノリは細胞中に大きな液胞が占め、色素体は細胞内に偏って存在している。色調の低下に伴う液胞および細胞間隙の割合は a^* 値が+6~+1 までは低下するとともに30%台で緩やかに増加した。しかし、 a^* 値が0以下になると、 a^* 値が0で45.8%、-1で51.6%、-2で52.4%、-3で56.5%、-4で60.1%と急激に減少した。 a^* 値が-3までの液胞および細胞間隙の割合の増加は細胞に占める液胞の増大が要因であったが、 a^* 値が-4では細胞内部は顆粒状となり細胞が萎縮したことで、細胞間隙の割合の増加が要因であった。

第2節 水温別のノリの色調低下と回復

ノリの色調低下と回復は栄養塩の他に水温と大きく関係している。水温が高い条件下で栄養が不足すると色調低下が早い、栄養の回復後は色調の回復も早いこと、水温が低い条件下で栄養が不足すると色調低下が遅いが栄養回復後の色調回復も遅い(水野, 1996)。しかし、色調の低下速度や各色調段階別の回復についてはほとんど知られていない。そこで、前節で色調の程度を評価するための指標として有効であった a^* 値を用いて、栄養不足時の水温別の色調低下と各色調段階からの水温別色調回復について調べた。

方 法

供試ノリ葉体

第5章第1節と同様の方法で冷凍網を2週間培養した。

水温別の色調低下

水温15℃(秋芽網生産期を想定)と8℃(冷凍網生産期を想定)の試験区を設け、それぞれを止水し、DINが $100 \mu\text{g/L}$ 以下に低下したのを確認後、1日おきにノリ糸についたノリ葉体をそれぞれ10枚ずつ採取し、第6章第1節と同様の方法で計12段階の色調を22日後まで測定した。

各色調段階からの水温別色調回復

各色落ち段階のノリ糸を水温15℃と8℃に設定した天然海水を入れたノリタンク培養装置に移し、栄養塩類が不足しないように流水中で培養しながら、色調の回復程度を色彩色差計を用いて毎日測定し、秋芽生産期と冷凍

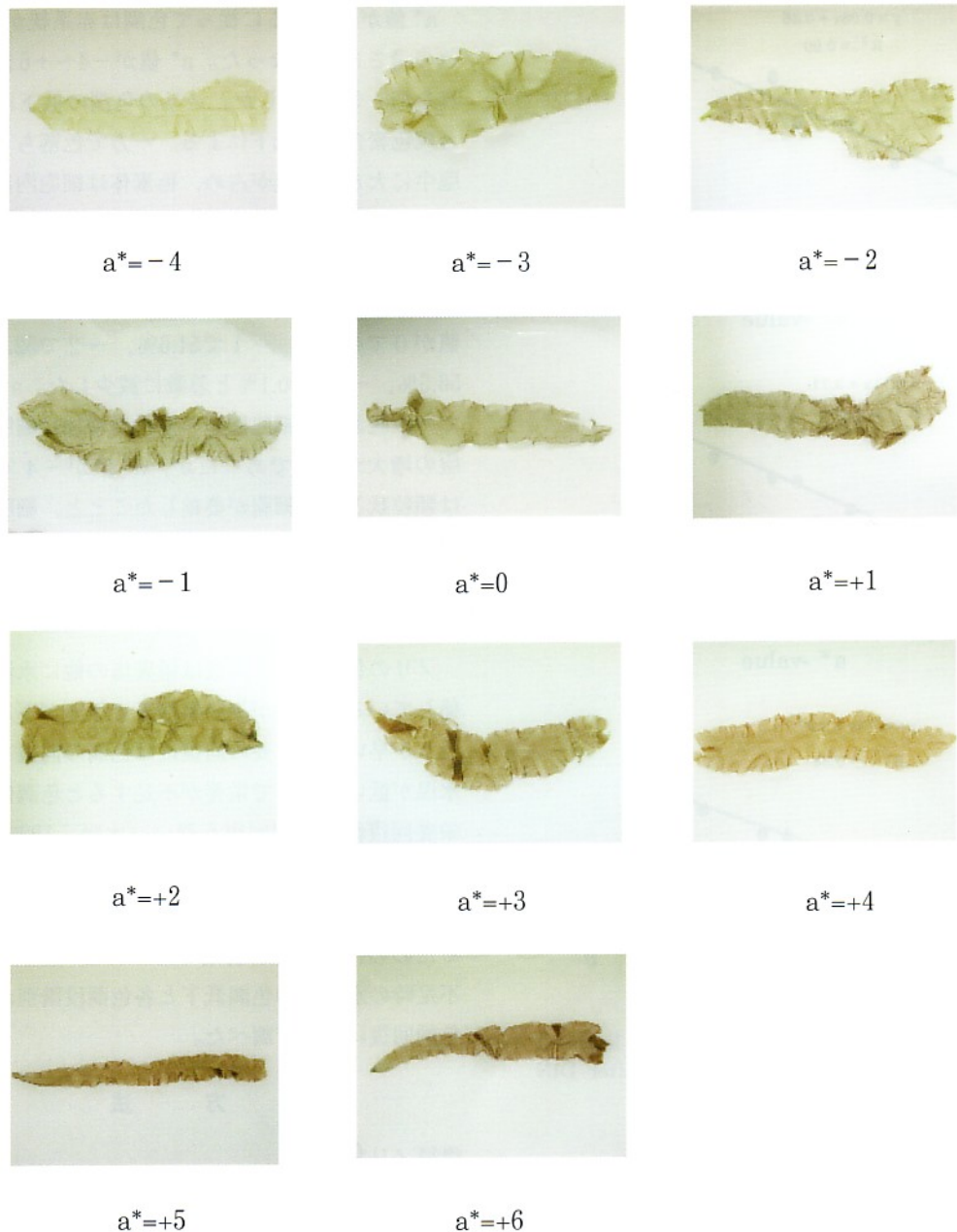


Fig.5-5. Color of laver classified by a^* -value measured with colorimeter.

網生産期の各色調低下段階からの回復の程度を調べた。

結 果

水温別の色調低下

DINが $100 \mu\text{g/L}$ 以下になった試験開始時の a^* 値は 15°C の試験区では4.4, 8°C では3.4であった。8日目までは 8°C 方が色調は低下していた。 15°C では試験開始10日後の a^* 値が0.5付近で一時的色調低下が緩やかとなったが、ほぼ直線的に色調低下がみられた。一方、 8°C では試験開始6日後の a^* 値が0.7付近から12日後の0.4まで色調

低下の停滞期がみられ、12日以降は 15°C の方が色調が低下した。22日後にはほぼ同じ色調となった (Fig.5-7)。

各色調段階からの水温別色調回復

試験開始から22日後までのいずれの色調段階においても 15°C で色調回復させた方が 8°C よりも明らかに回復速度が速かった。また、 15°C ではいずれの色調段階でも1日ごとの色調回復が著しいものであったが、 8°C では色調低下の停滞期がみられたが、その間は色調回復も鈍化した (Fig. 5-8)。

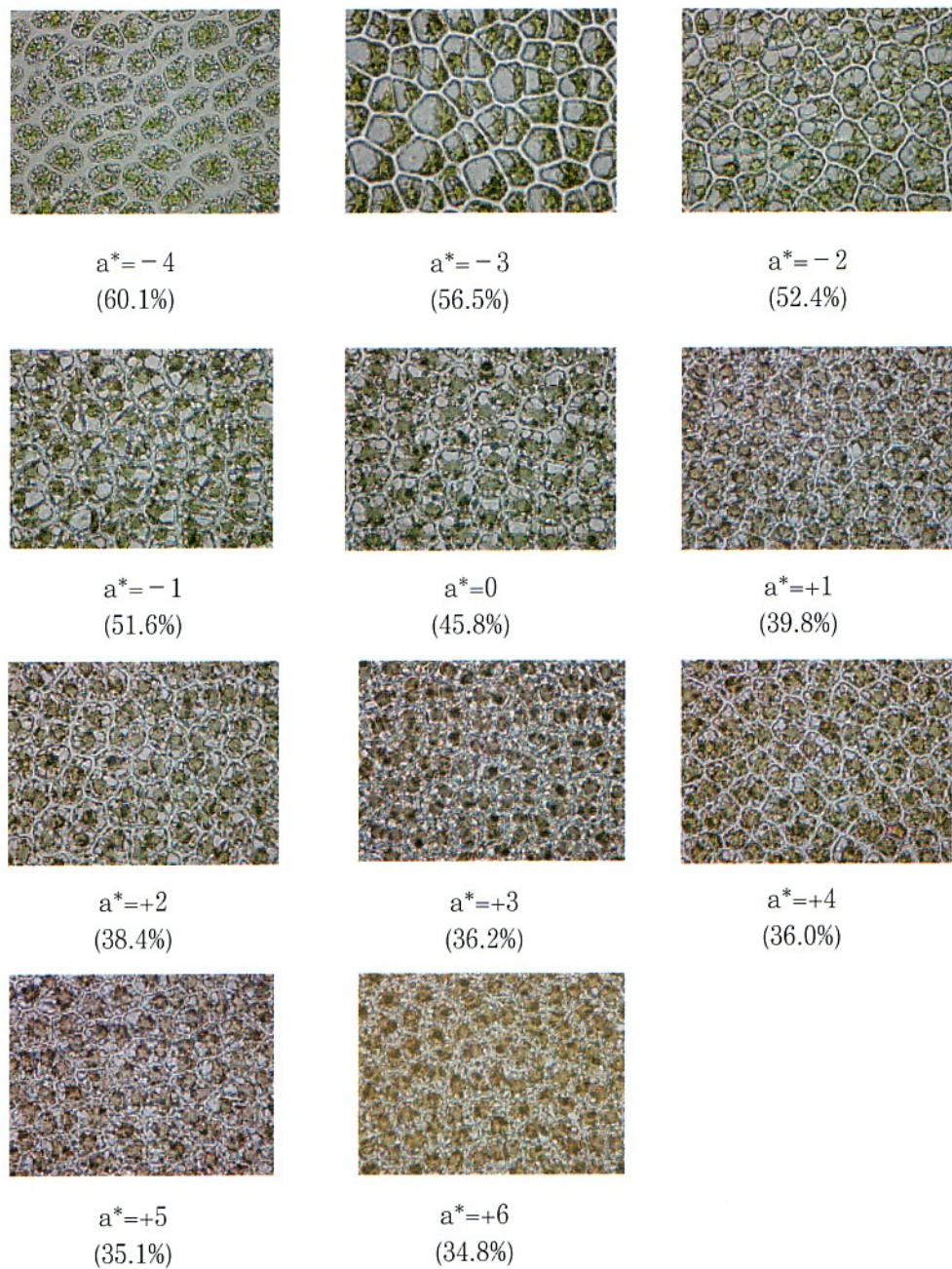


Fig.5-6. Microphotographs of the cells of laver classified by a*-value measured with colorimeter. Figures in parentheses show the relative percent of the surface areas of vacuoles and the distances between cells in the thalli.

第3節 色落ちノリの色調回復手法の検討

第1節で分類した各色調段階の生ノリについて、摘採後の生ノリの色調を高密度かつ短期間の浸漬処理によって、加工前に回復させる最適NH₄-N濃度を検討した。

方 法

色落ちのノリの色調回復方法

上述の方法で採集した8検体のノリ葉体1g(湿重量；

水分含量80%)を、加工現場のノリ攪拌タンクにならって周囲を遮光した70mLの容器に入れ、NH₄-N濃度1, 10, 25, 50mg/Lの4段階になるように調製した硫酸アンモニウム添加海水30mL中で、照度3,000 lx, 明期9時間, 暗期15時間, 水温は第5章第2節で8℃に比べて15℃の方が色調回復速度は速かったが、加工時は10℃以下の冷水の使用が推奨されていることと、高密度での貯蔵処理であることから10℃とし、通気しながら24時間処理した。

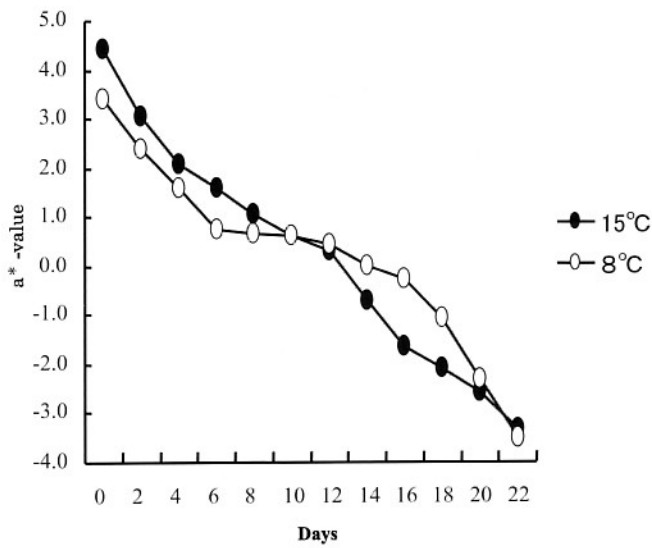


Fig. 5-7. Changes in a*-values in different water temperatures at 8 and 15°C. a*-values were measured with colorimeter.

葉体の色調色素分析

処理後の葉体色調を色彩色差計で測定し、LAB表色系で評価した。各試験区は *t* 検定（両側確率）により有意差検定を行った。また、光合成色素含量第5章第1節に従って測定した。含有量はノリ湿重量1gあたり（水分含量80%）で示した。

結 果

各色落ち過程に対するNH₄-N濃度の検討

a* 値が0を下回り明らかに退色し始めた試験開始8日以降の試験結果を Fig. 5-9 に示した。8日後のノリの a* 値は-0.36であったが、NH₄-N濃度10mg/Lで24時間浸漬処理したものは a* 値が0.25となり、浸漬前に比べて有意に上昇した ($p < 0.05$)。NH₄-N濃度25mg/Lでも a* 値は0.74となり有意に上昇した ($p < 0.01$)。同様に10日後のものはNH₄-N濃度25mg/Lで a* 値は-1.52から-0.69に、12日後のものはNH₄-N濃度25mg/Lで

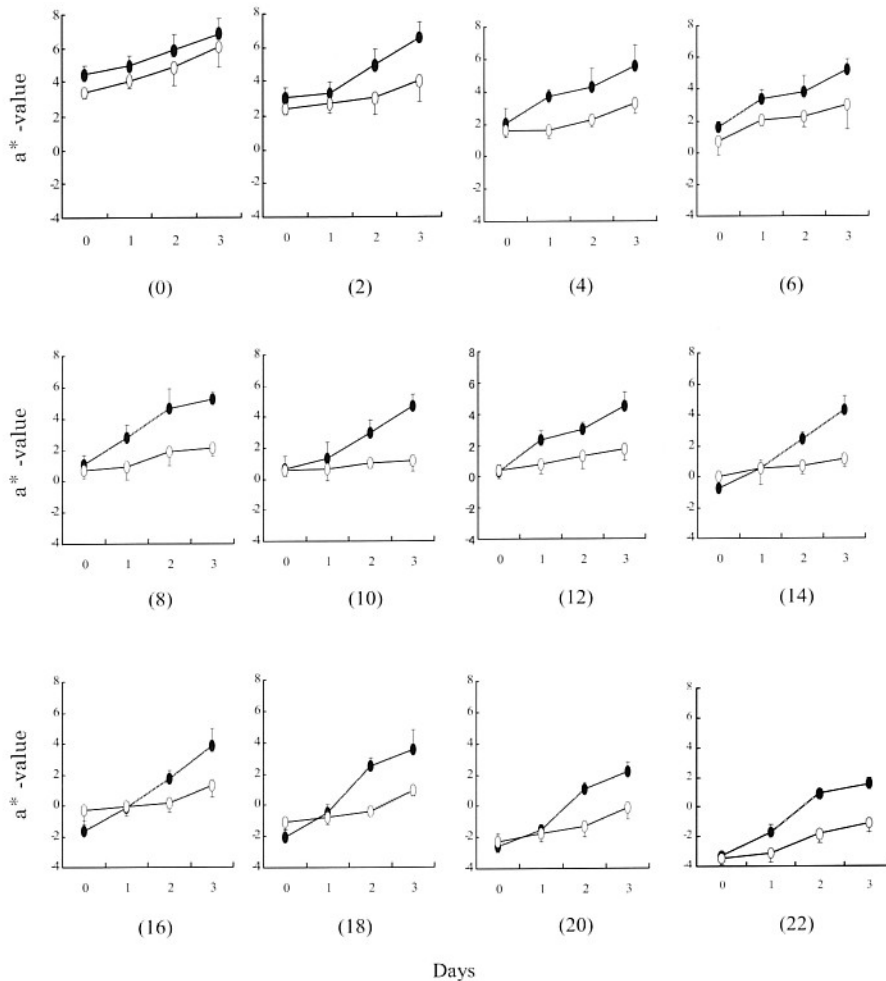


Fig.5-8. Changes in a*-values of thalli after beginning of recovery test of the color. The axis of abscissa shows the days after beginning of recovery test of the color. Numbers in parentheses show the past days of discoloration test.

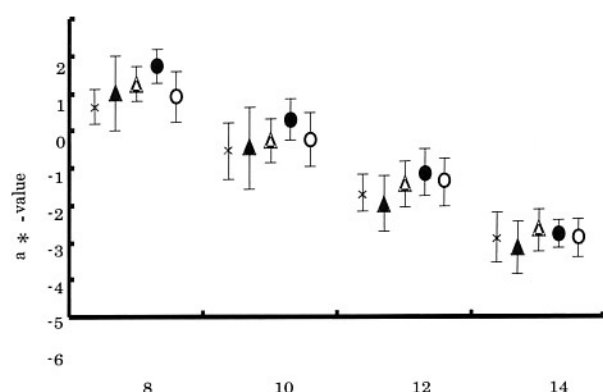


Fig. 5-9. Effect of $\text{NH}_4\text{-N}$ treatment on the recovery of the color in discolored laver.

Discolored thalli were immersed in seawater enriched with various concentrations of $\text{NH}_4\text{-N}$ for 24 hours. Concentration of $\text{NH}_4\text{-N}$; × : free, ▲ : 1mg/L, △ : 10 mg/L, ● : 25mg/L, ○ : 50mg/L. Thalli Color was evaluated using LAB colorimetric system.

-2.68から-2.10にそれぞれ有意に上昇した ($p < 0.05$)。14日後のものはいずれの $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度においても有意な a^* 値の上昇はみられなかった。8, 10, 12日後の色落ち過程に対して色調回復効果があった $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度25mg/Lで処理したノリの光合成色素量は、処理前に比べて8日後のノリでクロロフィル a 、フィコエリトリン、フィコシアニンそれぞれ141%、116%、116%、10日後のノリではそれぞれ186%、135%、139%、12日後のノリではそれぞれ140%、153%、157%となり効果が明らかであったが、14日後のノリではそれぞれ123%、106%、105%であった。このように、14日後の細胞質が顆粒化した極めて重度の色落ちノリでは a^* 値とクロロフィル a 含量はやや上昇したが、フィコビリタンパク質含量は回復せず、葉体としての色調回復効果はほとんどなかった。総合的に見ると8日目から12日目の中程度から重度の色落ちノリ (a^* 値でみると-0.36から-2.68) を $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度25mg/Lで24時間処理するのが効果的であった。

第4節 考 察

今回の試験ではノリ葉体の色調変化の評価にLAB表色系を用いた。LAB表色系では、明度を L^* 軸であらわし、色度の軸は、心理的な四原色の赤～緑を a^* 軸に、黄～青を b^* 軸にあらわして、これら三つの軸が、立体的に直交する色空間として表現される。この表色系は波長を基礎においていないという短所があるが、理解しやすい色度図であるという長所があるので本研究で用いた。

色落ちに伴うノリ葉体の色調変化をみると、 L^* 値は高くなり、 a^* 値は低くなり、 b^* 値は高くなった。すな

わち葉体は栄養塩類の不足により色が薄くなり、赤味が低下し黄味が増した。色調と光合成色素含量を測定した結果、 L^* 、 a^* 、 b^* 値の中で a^* 値は今回測定した光合成色素含量と非常に強い相関が認められた (Fig. 5-4)。しかし、色彩色差計による光合成色素含有量の推定には、 a^* 値は波長に基礎をおいた値ではないこと、また各光合成色素含量やその含有比率と a^* 値との関係を知る必要があることなど、さらに詳細な検討を要する。

また8回にわたって測定した各色落ち過程の色差測定の結果は、その1回前 (2日前) の色落ち過程での測定したノリに比べて、すべてが ΔE^*ab が2.0以上であったことから、葉体は2日間で知覚し得るほどに色が変化することがわかった (Table 5-2)。このことは、従来経験的に行われてきた栄養塩類不足時には早期に摘採することの重要性を数値ではじめて裏付けるものである。

色調回復試験ではいずれの色調段階においても水温が高い方が色調の回復が早いこと、低水温では a^* 値が0.5付近で栄養不足状態でも色調低下が停滞し、栄養状態が改善しても色調回復が鈍いことが明らかとなった (Fig. 5-7, Fig. 5-8)。したがって、高水温期にはすべての色調段階で、栄養塩類濃度の早期の回復が見込めない場合には素早い摘採が求められる。しかし、栄養塩類濃度の回復が見込まれる場合には数日間ノリの色調回復を待つことが効果的である。一方、低水温期には a^* 値が+1以上の時と0以下の色調段階では栄養不足による色調低下および栄養状態の改善による色調回復速度が高水温期程ではないが、ある程度速いので、栄養塩類濃度の早期の回復が見込めない場合には素早い摘採が求められる。しかし、栄養塩類濃度の回復が見込まれる場合には数日間ノリの色調回復を待つことが効果的である。 a^* 値が0以上+1以下の色調段階では色調の低下速度も回復速度も遅いことから摘採を優先すべきノリ網があればそれを優先し、なければ a^* 値が0以上+1以下の色調段階のノリを摘採するのが効果的である。

今回の色調回復試験では、試験開始8日後の中程度の色落ちから12日後の重度の色落ち葉体では、 $\text{NH}_4\text{-N}$ を25mg/L濃度になるように添加した海水中で24時間処理すると、色調回復および光合成色素量の増加に安定した効果がみられた。すなわち、この間の硫酸アンモニウム処理前の葉体の a^* 値の平均は-0.36～-2.68の範囲であったが、処理後は0.74～-2.10の範囲に改善された (Fig. 5-9)。なお、今回の試験で用いた $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度1mg/Lは実際のノリ養殖漁場の海水中の濃度としては高濃度であるが、摘採後に色調回復を目的とした短期で高密度の浸

漬に使用するには不十分であったと推測され、一方NH₄-N濃度50mg/Lでは最適な濃度をやや上回っていたと考えられる。

施肥に関して太田(1980)は色落ちしたノリには2つのタイプがあり、1つは色が薄いだけで細胞の形は角張って丸みが少なく、細胞間隙が小さいタイプ、もう一つは細胞が丸みを帯びて細胞間隙が広く、細胞質が顆粒化した細胞と液胞が大きい細胞が共に多数存在するタイプであると報告している。これらのノリに1週間施肥を行った結果、前者は施肥の効果がみられたが、後者では色調がほとんど回復しないとしている。今回の試験では色が薄く細胞間隙が狭い軽度の色落ちのもの、大きな液胞をもつ細胞が目立ち細胞間隙が少し広い中程度から重度の色落ちのもの、液胞が大きい細胞と細胞質が顆粒化した細胞が混在し、細胞間隙が広い極めて重度の色落ちのもの3つのタイプが認められ(Fig. 5-6)、その中で中程度から重度の色落ちのものについて最も安定した色調回復効果が認められた(Fig. 5-9)。

これまでに施肥による葉体の色調や各種成分含量の回復については、本研究結果よりも低い無機態窒素濃度で室内で1週間～2週間で長期間培養する試験について実

施され、程度の差はあれ、ある程度の効果が認められている(小林, 2001; 佐藤ら, 1959; 伊藤ら, 1960; 武居ら, 1959; 尾形ら, 1963, Amano *et al.*, 1987; Conitz *et al.*, 2001)。しかし、色落ち対策のため生産規模でノリ養殖漁場での海上施肥は昭和30年代に始まったものの、効果はそれほど高くなく、河邊(1987)はノリによるDINの利用率は10%程度を越えないものと推定し、さらに施肥が競合するプランクトンの増殖を助けるとも報告している。また、現在は施肥による環境への負荷の問題もあり、実際に海上で施肥を行うことは好ましくない。しかも産業的には、陸上で葉体に栄養を与える場合、低密度で長期間培養することは事実上実施不可能である。そこで今回は実際ののり加工現場で、現有の施設を利用し、ノリの摘採後から加工に入るまでの間に葉体の色調を向上させることを目的とした。そのため、葉体を高密度で且つ24時間の処理という条件下で色調向上試験を行った結果、中程度から重度の色落ちノリはNH₄-Nが25mg/Lの濃度になるように硫酸アンモニウムを添加した海水に24時間浸漬処理することにより、色調向上効果がみられることがわかった。

第6章 赤ぐされ病抑制と色落ち回復技術の実用化試験

第3章で効果がみられた赤ぐされ病抑制手法を用いて実験規模を拡大し、秋芽網生産期と冷凍網生産期にノリタンク培養装置を用いて、ノリの収穫量の増加率について試験した。また、第5章で生ノリの色調向上効果がみられた手法を用いて実験規模を拡大し、実際に乾ノリを作製し、色調の比較を行った。

第1節 酸性海水と高塩分処理の併用による赤ぐされ病罹病ノリの収穫量の向上試験

第3章では赤ぐされ病病原菌の遊走子が高濃度で存在する場合には酸処理または高塩分処理を実施した後、新たに感染した菌糸の感染範囲が未だ小さい4日後に高塩分処理することで著しい病害抑制効果がみられることを明らかにした。次に、第3章の試験で病原菌生長抑制効果が認められた条件に対して、実用化に向けた試験として、ノリタンク培養装置を用いて培養規模を拡大して試験を行い、秋芽網生産期と冷凍網生産期の収穫量の増加率について検討した。

方 法

供試ノリ葉体

第5章第1節と同様の方法で冷凍網を2週間培養した。

2001年10月に三重県鈴鹿市白子地先でスサビノリ、*Porphyra yezoensis*を野外採苗および育苗し、葉長1cm程度の冷凍網を作製後-20℃で貯蔵した。試験時にノリ網を約40cmに切断しノリ糸を作製した。海水360Lを入れたノリタンク培養装置(縦150cm横90cm高さ45cm)にノリ糸を10列に張り、自然光下で、流水(45L/h, 1日あたり3回転)で、水温(秋芽網試験は15℃, 冷凍網試験は8℃)で自動装置により10cm/sの速度で反復運動させて2週間前培養した。

収穫量向上試験

前培養後、秋芽網生産期を想定した試験(水温15℃)と冷凍網生産期を想定した試験(水温8℃)との2試験をそれぞれ以下のように行った。すべてのノリの葉長を

そろえるためノリ糸から1 cmのところで摘採し、その4日後に病原菌の遊走子を投入し試験を開始した。病原菌の遊走子は5,000/Lの密度になるようにタンクに入れ、ノリ葉体に感染させた。遊走子で感染させた3日後にノリ葉体を無作為に10枚顕微鏡で検鏡し、感染箇所数を計測した。同時に、ノリ葉体の面積をパーソナルコンピューターに接続したカラスキャナー (GT-7600, エプソン) に取り込み、画像解析ソフトLIA32を用いて計測し、感染箇所数から葉体への初期感染密度を測定した。培養したノリ糸10本は2本ずつ無処理区、酸処理区、酸処理+高塩分 (20%) 処理併用区、高塩分 (20%) 処理区高塩分 (15%) 処理区の5試験区に分けた。遊走子を投入した3日後に1回目の摘採を行い、その後Fig. 6-1に示す処理を開始した。即ち酸処理区は1週間に一度の摘採後に、pH2.0の酸処理剤による5分間の浸漬処理を行った。酸処理+高塩分 (20%) 処理併用区は摘採後にpH2.0の酸処理剤による5分間の浸漬処理を行い、その4

日後に20%の高塩分海水による5分間の浸漬処理を行った。20%高塩分処理および15%高塩分処理は、酸処理+高塩分 (20%) 処理併用区と同様の間隔で週1回の摘採と2回の浸漬処理を行った。無処理区は週1回の摘採のみを行った。上記の条件で予備摘採から5週間試験を行った。

結 果

秋芽網生産期を想定した試験

秋芽網生産期を想定した試験では初期感染の密度は1.6箇所/cm²であった。各試験区の第1回の摘採量は無処理区3.19g、酸処理区3.08g、15%塩分処理区3.41g、20%塩分処理区3.17g、酸処理+20%塩分処理区3.12gであった。試験中赤ぐされ病が激しく蔓延し、無処理区は摘採回数2回で、15%高塩分処理区では3回で以降はノリの生長がみられず摘採不能となった。その他の試験区についてそれぞれの試験区の第1回摘採量を100%とし、

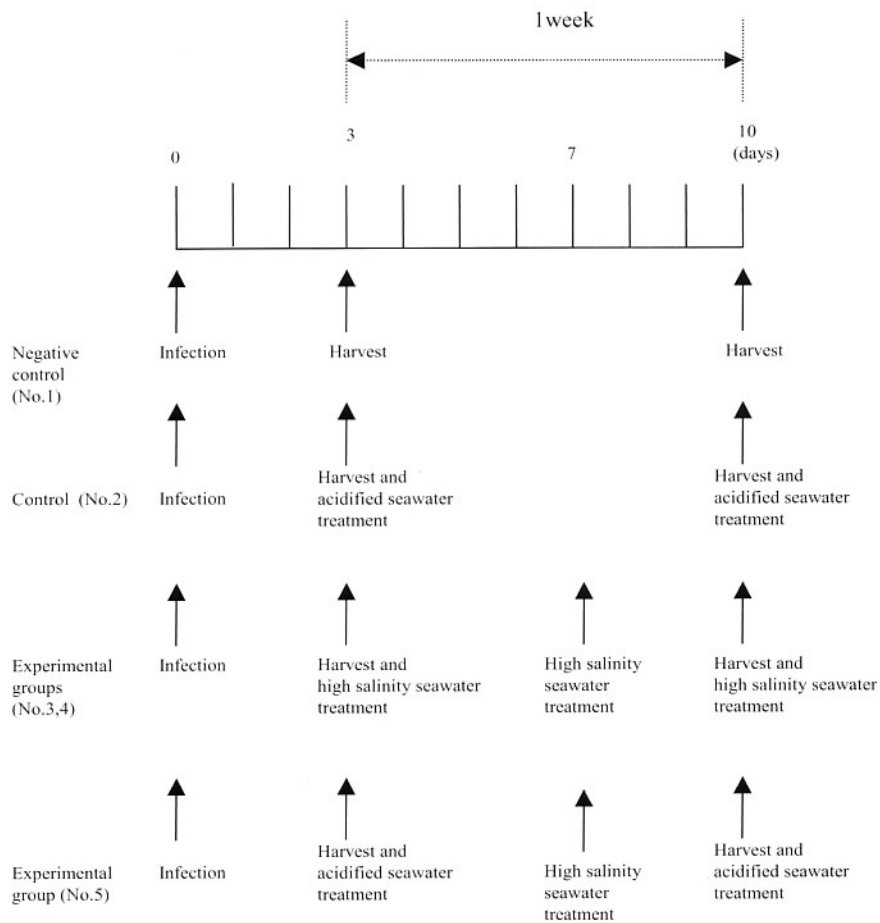


Fig. 6-1. The schedule of the sequential treatments of acidified seawater and high salinity seawater for suppression of red rot disease of *Porphyra*.
 No.1, No treatment (negative control); No.2, Acidified seawater treatment (control); No.3, High salinity seawater treatment (15% salt); No.4, High salinity seawater treatment (20% salt); No.5, Acidified seawater treatment and high salinity seawater treatment (20% salt).

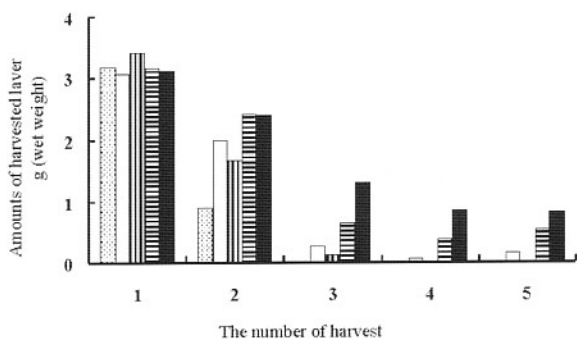


Fig. 6-2. Amounts of harvested laver under the culture condition of 15°C.

■, No treatment (No.1, negative control);
 □, Acidified seawater treatment (No.2, control);
 ▨, High salinity seawater treatment (No.3, 15% salt);
 ▩, High salinity seawater treatment (No.4, 20% salt);
 ■, Acidified seawater treatment and high salinity seawater treatment (No.5, 20% salt).

その後の第5回までの摘採量の推移をみると酸処理区は2.00g (64.9%), 0.26g (8.4%), 0.07g (2.3%), 0.16g (5.2%), 酸処理+20%塩分処理区は2.39g (76.6%), 1.31g (42.0%), 0.86g (27.6%), 0.82g (26.3%), 20%塩分処理区は2.42g (76.3%), 0.66g (20.8%), 0.38g (12.0%), 0.54g (17.0%)であった。それぞれの試験区の摘採量の合計を無処理区の合計を基準にみると酸処理区は1.4倍, 酸処理+20%塩分処理区は2.1倍, 20%塩分処理区は1.8倍, 15%塩分処理区は1.2倍であった。酸処理剤の単独使用に比べて酸処理+20%塩分処理区と20%塩分処理区でそれぞれ摘採量が1.5倍, 1.3倍優れていた (Fig. 6-2)。

冷凍網生産期を想定した試験

冷凍網生産期を想定した試験では初期感染の密度は0.4箇所/cm²であった。水温15°Cの試験に比べ水温8°Cでは初期感染箇所の密度が1/4であり, 緩やかに病気が蔓延した。各試験区の第1回の摘採量は無処理区2.25g, 酸処理区2.31g, 15%塩分処理区2.34g, 20%塩分処理区1.91g, 酸処理+20%塩分処理区2.02gであった。無処理区は摘採は4回できたが, 以降はノリの生長がみられず摘採不能となった。その他の試験区について, それぞれの試験区の第1回摘採量を100%とし, その後の第5回までの摘採量の推移をみると酸処理区は2.54g (110.0%), 2.15g (93.1%), 1.88g (81.4%), 1.32g (57.1%), 酸処理+20%塩分処理区は2.01g (100.0%), 2.27g (112.4%), 1.75g (86.6%), 1.25g (61.9%), 20%塩分処理区は1.87g (97.9%), 2.01g (105.2%), 1.69g (88.5%), 1.13g (59.2%), 15%塩分処理区は2.42g

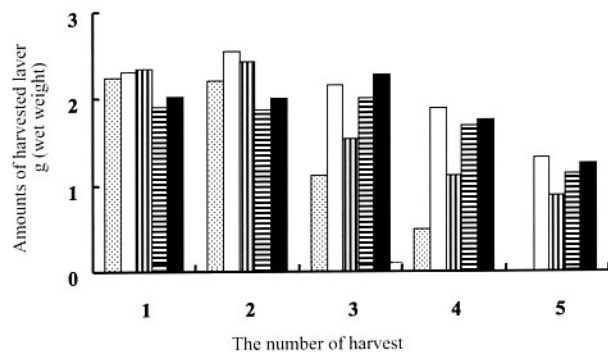


Fig. 6-3. Amounts of harvested laver under the culture condition of 8°C.

□, No treatment (No.1, negative control);
 □, Acidified seawater treatment (No.2, control);
 ▨, High salinity seawater treatment (No.3, 15% salt);
 ▩, High salinity seawater treatment (No.4, 20% salt);
 ■, Acidified seawater treatment and high salinity seawater treatment (No.5, 20% salt).

(103.4%), 1.54g (65.8%), 1.12g (47.9%), 0.87g (37.2%)であった。摘採量の合計を無処理区の合計と比較すると酸処理区は1.7倍, 酸処理+20%塩分処理区は1.5倍, 20%塩分処理区は1.4倍, 15%塩分処理区は1.4倍であった。酸処理剤の単独使用に比べて酸処理+20%塩分処理区, 20%塩分処理区, 15%塩分処理区は若干劣っていた (Fig. 6-3)。

第2節 色調回復ノリを加工した乾海苔の色調回復試験

第5章の試験でNH₄-N添加海水に24時間処理することで色調向上に効果があることが明らかになった。そこで, 実用化に向けた試験として, 生ノリの処理の規模を拡大し, さらに実際に処理を行ったノリから乾ノリを作製し, 色調の比較を行った。

方 法

供試ノリ葉体

第5章第1節と同様の方法で冷凍網を2週間培養した後, 止水状態で2週間培養し, ノリを色落ちさせた。

乾ノリの色調測定と光合成色素量の測定

第5章第3節の試験で色調向上の効果が高かったNH₄-N濃度25mg/Lと, 次いで効果が高かった10mg/Lの処理で処理を行った。1Lの容器にノリ葉体をそれぞれ湿重量で30g入れ, さらにNH₄-N添加海水を500mL加え, 24時間, 温度はノリの加工は10°C以下の冷水で行うことが推奨されていること, 高密度で貯蔵することから10°Cで処理を行った。その他の処理条件は第5章第3節

の方法と同様の方法で行った。得られたノリ葉体の色調を測定した後、処理したノリを全量用いて乾ノリを作製した。即ち、生ノリを水道水で洗浄し、ミキサーで細断したのち、水道水で濃度調節を行い、手抄きを行った後40℃で2時間30分乾燥させた。前日に無処理の葉体を使用して作製したコントロールと2種類の処理を行った葉体の計3種類の乾ノリを作製し、色調と光合成色素量の比較を行った。

結 果

乾ノリの色調測定と光合成色素量の測定

板ノリに加工する前の生ノリの色彩色差計による測定結果をTable 6-1に、作製した乾ノリの結果をTable 6-2に示した。a*値は対照区1.17, NH₄-N濃度10mg/L処理区1.37, NH₄-N濃度25mg/L処理区1.59であった。対照区とNH₄-N濃度10mg/L処理の色差はΔE*ab=0.91であり、色差の程度(村田, 1980)は「わずかに異なる(slight)」に分類された。一方、対照区とNH₄-N濃度25mg/L処理の色差はΔE*ab=2.05であり、色差の程度は「感知し得るほどに異なる(noticeable)」に分類された。肉眼的観察でも対照区, NH₄-N濃度10mg/L処理区, NH₄-N濃度25mg/L処理区の順で赤黒い色調が濃くなることが確認できた(Fig. 6-4)。光合成色素はクロ

ロフィルaは対照区3.15mg/g, NH₄-N濃度10mg/L処理区3.60mg/g, NH₄-N濃度25mg/L処理区3.76mg/gであった。フィコシアニン是对照区13.80mg/g, NH₄-N濃度10mg/L処理区19.18mg/g, NH₄-N濃度25mg/L処理区19.98mg/gであった。フィコエリスリンは対照区12.56mg/g, NH₄-N濃度10mg/L処理区16.86mg/g, NH₄-N濃度25mg/L処理区17.88mg/gとなり、いずれの

Table 6-1. Changes in L*, a*, and b* values of the discolored laver after treatment of each NH₄-N concentration (n=10)

Experimental group	L*-value (Mean ± S.D.)	a*-value (Mean ± S.D.)	b*-value (Mean ± S.D.)
1*	76.39 ± 3.55	-0.77 ± 0.86	14.37 ± 1.42
2	71.43 ± 1.56	-0.24 ± 0.75	13.75 ± 2.39
3	65.80 ± 3.08	0.28 ± 0.62	14.23 ± 1.38

* 1, No treatment (Negative control); 2, 10mg/L NH₄-N; 3, 25mg/L NH₄-N.

Table 6-2. L*, a*, and b* values and color difference of the processed dried laver processed after with each NH₄-N concentration

Experimental group	Tristimulus value			Color difference (ΔE*ab)
	L*-value (Mean ± S.D.)	a*-value (Mean ± S.D.)	b*-value (Mean ± S.D.)	
1*	32.02 ± 2.14	1.17 ± 0.30	6.18 ± 1.25	-
2	31.41 ± 1.48	1.37 ± 0.27	5.53 ± 0.88	0.91
3	30.27 ± 1.83	1.59 ± 0.18	5.20 ± 1.20	2.05

* 1, No treatment (Negative control); 2, 10mg/L NH₄-N; 3, 25mg/L NH₄-N.



Control



NH₄-N concentration:10 mg/L



NH₄-N concentration:25 mg/L

Fig. 6-4. Improvement of the color of dried lavers processed after treated with each concentration ammonium sulfate.

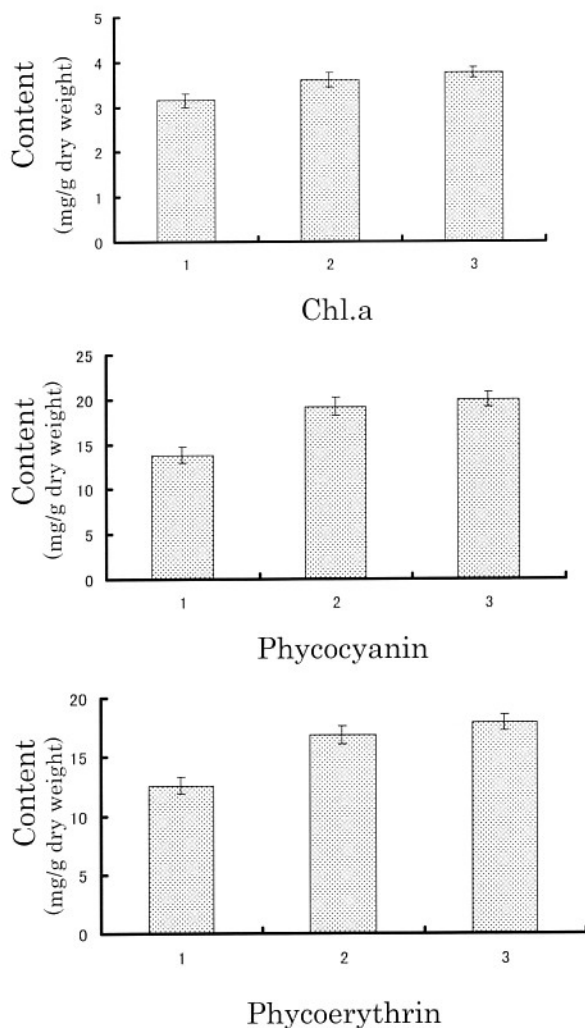


Fig. 6-5. Photosynthetic pigments levels in the dried laver processed after treatment with each concentration of ammonium sulfate.

1, No treatment (Negative control); 2, 10mg/L NH₄-N; 3, 25mg/L NH₄-N.

光合成色素含量も対照区に対して NH₄-N 濃度10mg/L, 処理区NH₄-N濃度25mg/L処理区の順で増加した (Fig. 6-5)。

第3節 考 察

秋芽網生産期を想定した試験 (水温15℃) と冷凍網生産期を想定した試験 (水温8℃) ではタンクに入れた遊走子量は同じであったにもかかわらず、ノリに対する初期感染の割合は水温15℃の方が多く約4倍の感染密度を示した。これは遊走子の感染力が水温8℃では水温15℃に比べ著しく低下したものと考えられる。

一般に赤ぐされ病原菌 *Phythium* の至適培養温度は15~25℃と言われている (佐々木ら, 1969; 藤田ら, 1977; Park *et al.*, 2000) こと, また新崎 (1962) は

培養水温の違いによるノリ葉体上に形成される遊走子囊の形成量は12~25℃で多いと報告していることから, 8℃では病勢がかなり衰えたものと考えられる。酸処理と高塩分処理の併用による収量増加効果は15℃試験区では酸処理+高塩分 (20%) 処理併用区, 高塩分処理区 (20%) で酸処理区より摘採量がそれぞれ1.5倍, 1.3倍で酸処理剤単独使用に比べ収量の増加が見られた (Fig. 6-2)。しかし8℃試験区では酸処理+高塩分 (20%) 処理併用区, 高塩分処理区 (20%) の摘採量がそれぞれ0.9倍, 0.8倍で酸処理剤単独使用に比べやや収量が減少した (Fig. 6-3)。これは, 水温が高く, 赤ぐされ病の蔓延速度が速い秋芽網生産期には酸処理の4日後に高塩分 (20%) 処理を行う方法や, 高塩分処理 (20%) の4日後に再び高塩分処理 (20%) を行う方法が病原菌を抑制する効果が高く, それゆえ収量が高くなったものと思われる。しかし水温が低く, 赤ぐされ病の蔓延速度が遅い冷凍網生産期には高頻度の処理がノリの生長を抑制することから酸処理剤単独使用の方が収量が高くなったものと考えられる。

今回の試験結果より秋芽網生産期を想定した試験では酸処理と高塩分処理の併用は酸処理剤単独使用に比べ病状悪化による品質の劣化の程度が少なく, 摘採不能になるまでの期間が長いことから, 病勢が強い期間にもある程度の収穫量が維持でき, 海況の変化により病勢が衰えた時の秋芽網の生産回復が期待できることが判った。これらの結果から秋芽網生産期における赤ぐされ病対策として酸処理と高塩分処理の併用が効果的であると考えられる。

色調を回復させたノリから乾ノリを製造する場合, 第5章の色調回復試験に示したように水温8℃に比べて水温15℃の方が色調の回復そのものは速い (Fig. 5-8)。しかし, 海苔の加工は冷水 (10℃以下) が推奨されていること, また15℃では高密度の浸漬で葉体の鮮度を落とす可能性も考えられたため, 今回は10℃で浸漬処理を行った。色調を回復させた生ノリから乾ノリを作製し比較したところ, 光合成色素含有量も増加し, 肉眼的にも色調の向上が認められた (Fig. 6-4)。現在, 海苔は自然食品であるというイメージを大切にするため, 加工段階で着色料や添加物は使用されていない。栄養塩類の添加によりノリ葉体内の代謝による色調の改善はノリ本来の能力を利用するもので, 人工着色等とは意味合いが異なることから, この手法による色調回復の生産現場への適用も今後検討する必要がある。

総 括

ノリ養殖は伊勢湾の基幹漁業であるにもかかわらず、全国的な生産過剰による価格の低迷、加工機器等の経費の増大による漁家経営の不振が続いている。さらに、ノリ養殖には現在でも多くの病気や障害がつきまとい、このことは生産を不安定なものとする大きな要因となっている。中でも、赤ぐされ病と色落ち現象は毎年発生し、ノリの生産量、生産高に大きな影響を与える深刻なものであり、その対策が急がれる。

赤ぐされ病の抑制手法を考える上で、主たる感染源になっている遊走子の海水中の出現状況や感染密度を把握するため、赤ぐされ病病原菌に特異的な高感度の検出方法の開発を試みた。さらに、赤ぐされ病病原菌の遊走子が高濃度で存在し、病勢が強い時には酸処理剤を用いても病気が蔓延し、大きな被害をおよぼすことがしばしば認められる。そこで、従来行われている酸処理をベースにさらに病害抑制効果の高い手法の開発を試みた。

一方、各漁場におけるノリの色落ち要因を把握するためにノリ漁場の栄養塩類の種類や量、比重などの水質から統計的手法によりノリ養殖漁場を分類し、漁場の特性を明らかにしようと試みた。また、ノリの色調低下や色落ちはノリ養殖にとって非常に重要なことであるにもかかわらず、養殖現場においても色調の表現は曖昧であり生ノリの色調の数値化による評価は行われていない。このことから生ノリについて色調を評価する方法の開発を試みた。また、ノリ養殖漁場におけるノリの色落ちは根本的な解決策がないのが現状である。そこで、摘採後のノリを過大な施設負担がかからないことを必須条件として加工前に色調を向上させる手法の開発を試みた。

まず、第1章では伊勢湾のノリ養殖の概要について、三重県科学技術振興センター水産研究部のノリ養殖施設等調査および三重県漁業協同組合連合会の黒ノリ共販結果より1980年～1999年の20年間の三重県内のノリ養殖の経営体数、柵数、生産枚数、生産金額、平均単価の推移をまとめた。20年間で経営体数と柵数はそれぞれ大きく減少したが、生産枚数の減少はそれに比べて小さいものであった。この要因としてはノリの品種改良、酸処理剤の普及による赤ぐされ病をはじめとする病害等による被害の軽減、加工機器の性能の向上による加工可能枚数の増加等により柵当たりの生産枚数が増加したことと考えられた。次に伊勢湾の平均的な表層の海況をノリ養殖と密接な関係のある項目についてまとめた。海況の解析に

は三重県科学技術振興センター水産研究部が毎月実施した伊勢湾定線観測で得られた観測データを用いた。ここではノリ養殖に影響が大きい表層海水についての季節変動を、調査項目によってデータの期間に違いはあるものの14ヶ年から20ヶ年の比較的長期のデータを用い、GIS解析ソフト (Arc View3.1 ESRI社) により解析を行った。また、三重県科学技術振興センター水産研究部が毎漁期後に発行する三重県の情報総集編 (1980年～1999年) より20年間に発生した重篤な赤ぐされ病と色落ちについてまとめ、水質解析からみた赤ぐされ病、色落ちの危険時期と記録に基づく発生状況を比較した。その結果、観測値のGISによる解析結果から推測される赤ぐされ病および色落ちの発生危険時期および海域はGISによる海況解析からおおむね推定できることを見いだした。

赤ぐされ病は菌糸によるノリ葉体内での広がり、他、病変部に形成される遊走子嚢から海水中に放出される遊走子による2次感染が病気の蔓延を引き起こす大きな要因になっている。しかし、これまで赤ぐされ病の遊走子を海水中で検出した例はなく、病気の蔓延時にノリ漁場でどの程度の遊走子濃度になっているのか全く不明であった。そこで第2章では日本各地に存在する赤ぐされ病病原菌 *Pythium porphyrae* を認識する抗体を作製するとともに海水中の遊走子濃度の検出方法の開発を行った。作製されたモノクローナル抗体は日本各地から集めた赤ぐされ病病原菌5株と韓国産1株のすべてを認識したのに対し、陸上植物から分離された *Pythium* 属3種とは全く交差反応を示さなかった。このことから、得られた抗体は赤ぐされ病病原菌に対する特異性の高さを示しており、海水中の病原菌の検出に利用できるものと考えられた。次いで、海水中の赤ぐされ病病原菌検出法を確立するための試験により、本抗体は病原菌の糸状体だけでなく発芽初期の発芽管をも認識するが、遊走子自体は認識しないことが明らかになった。このことから病原菌の検出のためにはより発芽率の高い遊走子の培養法の検討が必要となった。室内における各種試験により海水中の病原菌の検出方法を確立し、養殖期間を通したノリ漁場中の病原菌の消長を観測した。本研究ではノリ養殖期間中に最大で4,695個/Lの遊走子を確認することができた。本抗体を分与して同様の試験を実施した愛知県水産試験場、福岡県水産海洋技術センターについては、病害発生時にはノリ養殖漁場において数100～8,300個/Lの病原菌

を確認したことを報告している（小谷ら，1996；二ノ方ら，1998）。このように，モノクローナル抗体を利用して海水中の赤ぐされ病病原菌を検出する技術が開発されたことにより，病害発生時のノリ養殖漁場の海水中に存在する遊走子のオーダーが $10^2 \sim 10^3$ 個程度であることが明らかとなった。

赤ぐされ病病原菌の遊走子が高濃度で存在し，病勢が強い時は通常の酸処理の使用頻度では十分な効果が期待できない。しかし，制限無く酸処理を行うことは環境面のみならず，海苔という食品へのイメージからも好ましくない。そこで赤ぐされ病の病勢が強いときにおいても酸処理の頻度を増やすことなく有効な病害抑制手法を検討した。その結果，病害の抑制に重要な点は，現在以上の薬剤の強さではなく，酸処理後に遊走子が付着し感染が広がることを考慮して，病害抑制処理の頻度を高くすることであることが明らかとなった。赤ぐされ病病原菌の遊走子の高濃度存在下での病害蔓延は，遊走子によるノリ葉体への高密度の感染と酸処理までの間にそれらの菌糸が隣り合う病斑部が一つになるほどに生長することが要因であると考えられた。本研究で，病気が蔓延する可能性のある海況において，摘採間隔中に1度の酸処理と1度の高塩分海水処理をそれぞれ実施することにより，大きな赤ぐされ病抑制効果をもたらす可能性があることが推察された。

第4章では伊勢湾の漁場別のノリの色落ち要因を把握するために，漁場の栄養塩類の種類や量，比重などの水質を統計的手法によって解析し，漁場の分類を試みた。また，GISによる水質の解析およびノリ養殖漁場の海水と間隙水の水質分析を行った。さらに，漁場別の栄養塩濃度の傾向と分類された漁場グループとの関係を調べた。その結果，三重県の黒ノリ養殖漁場をクラスター分析で分類した2つのグループで主成分スコア上の各点をまとめると，河口型漁場（グループA）と沿岸型漁場（グループB）の2つのグループに大きく分かれた。沿岸型漁場の漁場への栄養塩類の供給についてみると冬季の北西風により湧昇流は生じていると考えられるが，冬季の底層水は表層水と比較して栄養塩類の濃度にほとんど差がないことから湧昇流が栄養塩の供給源にはなっていないと考えられた。一方，ノリ漁場となっている浅海域においては荒天による底泥の巻き上げによる栄養塩の溶出は無視できないものであると考えられた。

漁場別に重篤な色落ち発生の危険性があるDIN40 $\mu\text{g/L}$ 未満となる日の割合と主成分スコア上のクラスター分析による漁場分類を比較すると，DIN40 $\mu\text{g/L}$ 未満となる

日の割合は大淀，桃取，菅島，津市，二見町，東大淀が最も高く，主成分スコアからみると津市を除いて河川水，湧昇流の影響がともに低い位置にあり，次にDIN40 $\mu\text{g/L}$ 未満となる日の割合が高いのが下箕田，浜田，原永，白子，東黒部，下御糸であり比較的河川水の影響が少ない位置にあった。その他の漁場はDIN40 $\mu\text{g/L}$ 未満となる日の割合は10%以下であり，それらはすべて河川水の流入が多いグループAに分類された。また，伊勢や鳥羽海域は河川水，栄養塩類の溶出の影響がともに小さく，同時にDINが40 $\mu\text{g/L}$ 未満となる日の割合が最も高く，流速が小さい時には特に色落ちの危険性が高い漁場であると示唆された。

ノリの色落ちは程度の差が大きいにもかかわらず，生ノリの色調についての表現は大まかなもので，客観的な測定がなされた例はほとんどない。第5章では生ノリの色落ちの程度を色彩色差計で評価した。また，過大な施設負担がかからないことを必須条件とし，摘採後の生ノリの色調を加工前に回復させることを目的として，最適な $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度を検討した。さらに，効果があった処理により色調が向上した生ノリを用いて乾ノリを作製し，色調の比較を行った。色調と光合成色素含量を測定した結果， L^* ， a^* ， b^* 値の中で a^* 値は今回測定した光合成色素含量と非常に強い相関が認められたので a^* 値をノリの色調段階の指標に用いた。 a^* 値により分類した色調段階は肉眼による葉体の色調のみならず細胞の形態とも一定の関係を示しており， a^* 値によるノリ葉体の色調分類は妥当なものであった。

ノリ養殖には秋芽網生産と冷凍網生産があるが，水温によるノリの色調低下と回復を比較したところ，栄養不足の状態においては秋季の高水温期ではほぼ直線的に色調の低下がみられ，冬季の低水温期は a^* 値で+0.5付近に色調低下の停滞期がみられた。色調の回復は高水温期では回復が速かったが，低水温期では鈍化した。これは低水温による細胞内の代謝速度の鈍化が要因であると考えられた。色調回復試験では，試験開始8日後の中程度の色落ちから12日後の重度の色落ち葉体では， $\text{NH}_4\text{-N}$ を25mg/L濃度になるように添加した海水中で24時間処理すると，色調回復および光合成色素量の増加に安定した効果がみられた。すなわち，この間の硫酸アンモニウム処理前の葉体の a^* 値の平均は-0.36～-2.68の範囲であったが，処理後は0.74～-2.10の範囲に改善された。今回の試験では色が薄く細胞間隙が狭い軽度の色落ちのもの，大きな液胞をもつ細胞が目立ち細胞間隙が少し広い中程度から重度の色落ちのもの，液胞が大きな細胞と

細胞質が顆粒化した細胞が混在し、細胞間隙が広い極めて重度の色落ちのもの3つのグループが認められ、その中で中程度から重度の色落ちのものについて $\text{NH}_4\text{-N}$ が25mg/Lの濃度になるように硫酸アンモニウムを添加した海水に24時間浸漬処理することにより、色調向上効果がみられることが判明した。さらに色調を向上させた生ノリから板ノリを作製し比較したところ光合成色素含有量も増加し、肉眼的にも色調の向上が認められた。

第6章では第3章の実験レベルで効果がみられた赤ぐされ病抑制手法を用いて実験規模を拡大し、秋芽網生産期と冷凍網生産期にノリタンク培養装置を用いて、ノリの収穫量の増加率について試験した。さらに、第5章で色調向上効果がみられた条件で規模を拡大し色調回復させた生ノリから乾ノリを製造して色調回復効果を確認した。その結果、病害抑制効果は秋芽網を想定した場合には酸処理と高塩分処理の併用による効果は酸処理+高塩分(20%)処理併用区、高塩分処理区(20%)で酸処理区より摘採量がそれぞれ1.5倍、1.3倍で酸処理剤単独使用に比べ収穫量の増加が見られた。冷凍網を想定した場合には酸処理+高塩分(20%)処理併用区、高塩分処理区(20%)の摘採量がそれぞれ0.9倍、0.8倍で酸処理剤単独使用に比べやや収穫量が減少した。また、色落ち回復手法によって処理した色落ちノリから製造した乾ノリは色調向上効果が光合成色素含量からも肉眼観察から確認された。

以上のように、本研究では赤ぐされ病および色落ちの発生危険時期と海域をGISによる海況解析からおおむね推定することができた。次に、赤ぐされ病病原菌に特異的なモノクローナル抗体を開発した結果、病原菌遊走子が海中に $10^2\sim 10^3$ 個/Lの時、本病が発生する危険性が高いことが分かり、病気の発生を予知できる可能性が示された。さらに赤ぐされ病の抑制には、酸性海水(pH2.0)と20%塩分濃度海水への浸漬処理が有効であり、収穫量も酸処理の単独実施に比べて1.5倍となった。色落ちについては、伊勢湾のノリ漁場は栄養塩類の供給において2つのグループに分けられ、供給が少ない伊勢・鳥羽地区は海流が弱いときには特に色落ちの危険性が高いと判断された。さらに色落ちノリの色調回復には、色落ちが中～重度の時に $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度25mg/Lで24時間の処理が有効であり、乾ノリ製品の色調を向上させることができた。本研究はノリの重要な病障害である赤ぐされ病と色落ちについていくつかの新知見と抑制法を提供することができた。今後の伊勢湾のノリ養殖業の発展につながることを期待したい。

謝 辞

本研究は三重大学生物資源学部 天野秀臣教授の御指導、御鞭撻の下に行われたもので、ここに深甚なる謝意を表します。また、柿沼 誠講師には細部にわたり御指導、御配慮を賜り、厚く御礼申し上げます。

さらに、論文のとりまとめに際して貴重な御助言をいただきました三重大学生物資源学部 小池 隆教授、前川行幸教授、加納 哲教授にも深く感謝いたします。

また、社会人学生として三重大学大学院に入学して、本研究を遂行するに当たり、様々な点で御理解と御配慮をいただきました三重県科学技術振興センターの方々に深く感謝いたします。特に、水産研究部および鈴鹿水産研究室の方々の励ましと御指導、御配慮には深い感謝の意を表します。

最後に、研究に際して何かと御手を煩わした三重大学大学院生物資源学研究科海洋生物化学研究室の皆様から感謝申し上げます。

引用文献

- Adachi, M., Sako, Y., and Ishida, Y. (1993): The identification of conspecific dinoflagellates *Alexandrium tamarense* from Japan and Thailand by monoclonal antibodies. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 327-332.
- 秋山和夫 (1973): のりの病気. (日本水産学会編), 恒星社恒星閣, 東京, pp7-11.
- 天野秀臣・野田宏行 (1978): のりの品種と光合成色素. 日水誌, **44**, 911-916.
- Amano, H., Noda, H. (1987): Effect of nitrogenous fertilizers on the recovery of discoloured fronds of *Porphyra yezoensis*. *Bot. Mar.*, **30**, 467-473.
- Amano, H., Sakaguchi, K., Maegawa, M., and Noda, H. (1996): The use of a monoclonal antibody for the detection of fungal parasites, *Pythium* sp., the causative organism of red rot disease, in seawater from *Porphyra* cultivation farms. *Fish. Sci.*, **62**, 556-560.
- 新崎盛敏 (1947): アサクサノリの腐敗菌に関する研究. 日水誌, **13**, 74-90.
- 新崎盛敏 (1962): アサクサノリ人工養殖に関する研究 III. 農電研報, **3**, 87-93.
- Arasaki, S., Akino, K., and Tomiyama, T. (1968): A comparison of some physiological aspects in a

- marine *Pythium* on the artificial medium. *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.*, **12**, 203-206.
- Arashima, K., Amano, H., Suginaga, R., and Noda, H. (1994): Preparation of monoclonal antibodies against the fungal parasite, *Pythium* sp., the causative organism of laver red rot. *Fish. Sci.*, **60**, 481-482.
- 安藤民衛・千葉 丈 (1991): 単クローン抗体実験操作入門. 講談社サイエンティフィク, 東京,
- Drew, K. M. (1949): Conchocelis-phase in the life-history of *Porphyra umbilicalis* (L.). *Kutz, Nature*, **164**, 748-749.
- 藤田雄二・銭谷武平 (1976): 有明海のり漁場から分離したあかぐされ病原菌 *Pythium* に関する研究-I. 一般菌学的性状. *日水誌*, **42**, 1183-1188.
- 藤田雄二・銭谷武平 (1977): 有明海ノリ漁場から分離したあかぐされ病原菌 *Pythium* に関する研究-II. *日水誌*, **43**, 89-95.
- 藤田雄二・銭谷武平 (1977): 有明海のり漁場から分離したあかぐされ病原菌 *Pythium* に関する研究-IV. 病原菌株の血清学的区別. *日水誌*, **43**, 1313-1318.
- 藤田雄二・右田清治 (1980): あかぐされ病罹病のり葉体の乾燥および冷凍保存による病原菌 *Pythium porphyrae* の死滅について. *長崎大水産学部研報*, **49**, 11-16.
- 萩田健二 (1985): 貧酸素水と硫化水素水のアサリのへい死に与える影響. *水産増殖*, **33**, 67-71.
- 林 孝市郎 (1983): 底泥からのNおよびPの溶出速度, 内湾底泥をめぐる物質収支の動態解明に関する研究. *水産庁*, 73-75.
- Ikegami, S., Mitsuno, T., Kataoka, M., Yajima, S. and Komatsu, M. (1991): Immunological survey of planktonic embryos and larvae of the starfish *Asterina pectinifera*, obtained from the sea, using a monoclonal antibody directed against egg polypeptides. *Biol. Bull.*, **181**, 95-103.
- 伊藤啓二・佐藤孜郎・佐藤美和・松本文夫 (1960): アサクサノリの生化学的研究-II. 諸種窒素源の利用機構について. *日水誌*, **26**, 938-943.
- 岩崎民夫・安藤民衛・市川かおる・保井孝太郎 (1983): 単クローン抗体ハイブリドーマとELISA. 講談社サイエンティフィク, 東京, pp1-14.
- Jan M. Conitz, Pobert Fagen, Sandra C, Lindstrom, and F, Gerald Plumley. (2001): Growth and pigmentation of juvenile *Porphyra torta* (Rhodophyta) gametophytes in response to nitrate, salinity and inorganic carbon. *J. Appl. Phycol.*, **13**, 423-431.
- 柿野 純 (1986): 東京湾奥部における貝類へい死事例一特に貧酸素水の影響について. *水産土木*, **23**, 41-47.
- 柿野 純・松村皐月・佐藤善徳・加瀬信明 (1987): 風による流れと青潮との関係. *日水誌*, **53**, 1475-1481.
- 加藤 盛・渡辺 競・佐藤陽一 (1973): 養殖アマノリの疾病に関する研究-VI. ノリ赤腐病菌の栄養生理について. *日水誌*, **39**, 771-775.
- 加藤 盛・渡辺 競・佐藤陽一 (1973): 養殖アマノリの疾病に関する研究-VII. 各地に発生する赤腐病病原菌の栄養生理と病原性について. *日水誌*, **39**, 859-865.
- 加藤 進・大熊和行・広部 宏・清水千秋・前川徳昭 (1984): 統計手法による伊勢湾水質環境分類の試み. *日水誌*, **50**, 1981-1989.
- 加藤 進・広部 宏・前川徳昭 (1985): 判別分析からみた赤潮要因について. *日水誌*, **51**, 7-12.
- 河邊克巳 (1987): 内湾富栄養化問題の周辺-ノリ漁業との関係-. *沿岸海洋研究ノート*, **25**, 25-33.
- 菅 民郎 (1996): 多変量統計分析. 現在数学社, 京都, pp207-236.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- 小林邦男 (2001): ノリとプランクトンの栄養競合. *海苔と海藻*, **63**, 1-8.
- 小谷正幸・岩淵光伸・藤井直幹・淵上 哲 (1996): ノリ養殖生産管理技術に関する研究. 平成8年度水産業関係地域重要新技術開発促進事業報告書. 福岡県水産海洋技術センター有明研究所, pp1-11.
- 工藤盛徳 (1999): 乾海苔の品質計測法に関する基礎研究-可視光の吸収と反射による評価法の検討-. 「海苔増殖振興会会報V」, 財団法人 海苔増殖振興会, 東京, 198-206.
- 久野正博 (1996): 伊勢湾における海況の季節変化. *三重水技研報*, **6**, 27-46.
- 倉掛 武雄 (1966): ノリ網冷蔵の手引き. 全国海苔貝類漁業協同組合, 東京, 1-72.
- 桑原 徹 (1977): 伊勢湾・三河湾の地形・地質. *沿岸海洋研究ノート*, **15**, 69-77.
- 松山優治・当麻一良・大脇 厚 (1990): 東京湾の湧昇に関する数値実験-青潮に関連して-. *沿岸海洋研究*

- ノート, 28, 63-74.
- 森 勇 (1961): 大村湾の苦潮について. 日水誌, 27, 389-394.
- 村田幸男 (1980): 測色と色比較の方法「新編色彩科学ハンドブック」. (日本色彩学会編). 東京大学出版会, 東京, 244.
- 二ノ方 圭介・伏屋 満・植村宗彦・八木昇一・峯島史明(1998): モノクローナル抗体を利用したあかぐされ病発生拡大予察技術の開発. 平成10年度バイテク利用養殖システム高度化事業報告書. 愛知県水産試験場.
- 野田宏行・天野秀臣・太田扶桑男・堀口吉重 (1979): アミノ酸ののり赤ぐされ病治ゆおよび防除効果. 日水誌, 45, 1155-1162.
- 尾形英二・松井敏夫 (1963): アサクサノリの呼吸に関する研究-II. 生長物質, 窒素化合物の影響および乾燥, pHの影響に関する再検討. 日水誌, 29, 991-995.
- 尾形英二・北角 至 (1966): 乾ノリの品質と光沢の関係について. 水産大学校研究業績, 15, 41-47.
- 太田扶桑男 (1980): 色落ちノリは施肥で必ず回復するか. 「のり検診の手引き」. 九州山口海苔増殖研究連絡協議会, 福岡, 45-48.
- 大谷清隆 (1986): 短時日吹く風によって生じる沿岸湧昇. 沿岸海洋研究ノート, 23, 155-165.
- 大内 晟・高山晴義 (1981): 主成分分析による赤潮図について. 日水誌, 47, 1275-1279.
- 大内 晟 (1984): 判別分析による赤潮予知. 日水誌, 50, 1647-1651.
- Park, C. S., Sakaguchi, K., Kakinuma, M., and Amano, H. (2000): Comparison of the morphological and physiological features of the red rot disease fungus *Pythium* sp. isolated from *Porphyra yezoensis* from Korea and Japan. *Fish. Sci.*, 66, 261-269.
- 西條八東・宇野木早苗 (1977): 伊勢湾・三河湾の海況特徴と生産力. 沿岸海洋研究ノート, 14, 10-18.
- 西條八東・八木明彦・三田村緒佐武 (1978): 伊勢湾・三河湾の水質と基礎生産. 沿岸海洋研究ノート, 16, 57-64.
- 坂口研一・南 勝人・瀬古準之助・伊藤 徹 (1998): 貧酸素によるアサリ漁場影響調査. 平成9年度三重県水産技術センター事業報告. 三重県, 187-188.
- 坂口研一・Chan Sun Park・柿沼 誠・天野秀臣(2001): 高塩分処理を利用したアマノリ赤腐れ病抑制手法の検討. 水産増殖, 49, 77-83.
- 桜井保雄・秋山和夫・佐藤重勝 (1974): ノリあかぐされ病菌の遊走子の形成・放出について. 東北水研研究報告, 33, 119-127.
- 佐々木 実・佐藤重勝 (1969): ノリ赤腐れ病菌の培地組成と培養温度について. 東北水研報, 29, 125-132.
- 佐々木克之 (1993): 内湾および干潟における物質循環と生物生産【4】東京湾の青潮の形成機構. 海洋と生物, 15, 249-254.
- 佐藤孜郎・佐藤美和・伊藤啓二・松本文夫 (1959): アサクサノリの生化学的研究-I. 窒素源添加培養による窒素成分の変化. 日水誌, 25, 661-666.
- 佐藤 敏 (1996): 伊勢湾表層の循環流について. 沿岸海洋研究, 33, 221-228.
- 塩野清治・升本真二・弘原海清 (1988): BASICによるコンターマップ II応用編. 共立出版.
- Sekine, Y., Mazutani, H., and Motoya, T. (1992): Seasonal variations in temperature, salinity and density in- and off Ise Bay. *Bull. Fac. Bioresources, Mie Univ.*, 8, 1-18.
- 関根義彦 (1996): 伊勢湾. 沿岸海洋研究, 34, 45-51.
- 須藤俊造・梅林 脩 (1954): ノリのクサレに対する二, 三の薬剤抑制効果. 日水誌, 19, 1179-1182.
- 鈴木 亨・松山優治・長島秀樹 (1997): 成層期の東京湾における北東風による循環流及び湧昇域の形成過程に関する数値実験. 沿岸海洋研究, 35, 99-108.
- 武居 薫・宮沢 正 (1959): アサクサノリの施肥に関する研究-I. 主として無機態窒素の吸収について. 水産講習所研報, 8, 199-207.
- 宇野木早苗 (1974): 内湾の海水交流と鉛直混合に関する一考察. 沿岸海洋研究ノート, 11, 85-95.
- 宇野木早苗 (1978): 伊勢湾・三河湾の物理環境. 沿岸海洋研究ノート, 15, 143-154.
- 柳 哲雄 (1996): 東京湾・伊勢湾大阪湾への外洋の影響に関する比較沿岸海洋学のすすめ. 沿岸海洋研究, 34, 59-63.
- Yoshimizu, M., Direkbusarakom, S., Ezura, Y., and Kimura, Y. (1993): Monoclonal antibodies against *Aeromonas salmonida* for serological diagnosis of furunculosis. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 333-338.