

課題名	D-4 大型船舶のバラスト水・船体付着により越境移動する海洋生物がもたらす生態系攪乱の動態把握とリスク管理に関する研究		
課題代表者名	川井浩史（国立大学法人神戸大学内海域環境教育研究センター・生物多様性研究分野・教授）		
研究期間	平成16-18年度	合計予算額	178,842千円（うち18年度 55,062千円）
研究体制	<p>（1）バラスト水・船体付着により越境移動した生物群集の起源、拡散経路および動態の解析に関する研究（神戸大学、三重大学、<研究協力機関>北海道大学）</p> <p>（2）バラスト水・船体付着生物群集遷移の把握及び管理に関する研究（独立行政法人国立環境研究所、東京大学、静岡県立大学、東海大学、<研究協力機関>日本郵船（株））</p> <p>（3）バラストタンク環境における有害植物プランクトンシストの生理・生態学的研究（独立行政法人国立環境研究所）（平成17年度のみ）</p>		
研究概要	<p>1. 序（研究背景等）</p> <p>近年多様化・加速化・グローバル化した物流移動に伴い生物種の越境移動に拍車がかかっており、これによる生態系の攪乱が大きな問題になっている。20世紀以降だけでも日本の沿岸では40種を超える海洋生物の移入があったとされているが、そのうち約半分が船舶を介した移入と考えられている。なかでもタンカーやバラ積み運搬船等の大型船舶が積載するバラスト水は膨大な量が移動すると見積もられており、我が国は圧倒的なバラスト水輸出国（資源輸入国）として世界各国から問題視されている。しかしながら海洋生態系への関心は比較的希薄であり、バラスト水による生物移動の実態は明確ではない。国際海事機関（IMO）は、バラスト水による生態系越境移動対策として、バラスト水の処理を義務づける国際条約を採択した。しかしながら、バラストタンク内の生物モニタリング手法はいまだ確立されておらず、現在開発が進行しつつあるバラスト水処理装置の性能評価の妥当性を検証するためにも、バラストタンク内の物理化学環境や生物の動態把握は急務である。またこれらの船舶の船体には様々な生物が付着しており、バラスト水と同様、越境移動の原因となっている。一部の海洋生物は日本から世界各地へ分布を拡げ、各地の沿岸生態系の脅威となっているとの批判があり、またこの逆に世界各地から日本に侵入し、生態系を攪乱している生物も多いと考えられるが、その実態は十分に解明されていない。従って、このような船体付着生物群集の動態と、移入生物の起源および拡散経路の解析も早急に進める必要がある。</p> <p>2. 研究目的</p> <p>大型褐藻ワカメ（コンブ目； <i>Undaria pinnatifida</i>）は、北東アジア海域における重要な資源海藻であるが、1970年代初めに養殖目的で地中海に導入されたカキ稚貝に伴って欧州へ侵入したほか、1980年代後半以降は大型船舶（船体付着/バラスト水）による移動でオーストラリア、ニュージーランド、北米太平洋岸、アルゼンチンなどへ分布を広げたとされている。一時期タスマニアの集団が日本のバラ積み運搬船によるとの批判がなされたこともあるが、これら海外におけるワカメ集団の実際の起源については不明である。そこで本研究では、日本を含む原産地と世界各地の移入集団についてミトコンドリア <i>cox3</i> 遺伝子に基づく多様性解析を行うことにより各地集団の起源と拡散経路の推定を行った。また、ワカメ集団のより詳細な遺伝的多様性解析技術の確立を目指して、核遺伝子マイクロサテライトマーカーの導入を行い、韓国、北日本及びニュージーランドのワカメ集団を対象に遺伝的多様性の解析を行った。また、大陸間航路の大型船舶バラストタンク内および船体表面を模した温度・日長環境の培養条件で、ワカメ胞子体・配偶体の培養を行いその生残率を解析することで、大型船舶を介した大陸間移動の可能性を考察した。</p> <p>緑藻アオサ・アオノリ類（アオサ目； <i>Ulva/Enteromorpha</i> spp.）は、港湾を含む浅い沿岸域の代表的な海藻だが、閉鎖性海域の富栄養化により大量に発生し、沿岸生態系に悪影響を与えたり、浜辺に打ち上げられることでグリーンタイドと呼ばれる沿岸環境問題を引き起こしている。また、本研究により実施した大型輸送船の船体付着生物調査やバラスト水の培養実験においても、アオサ・アオノリ類が頻繁に出現しており、船舶を介した移入リスクが高い海藻である。しかし、アオサ・アオノリ類はその形態が単純でかつ可塑性が大きいため、種レベルの同定が非常に困難なグループである。このため、実際にどの程度のアオサ・アオノリ類が日本に持ち込まれ、また日本から他大陸に移入し定着しているかは明らかではない。そこで、代表的な閉鎖性海域である三河湾と大阪湾において優占する個体群を中心にアオサ・アオノリ類を季節的に採集し、遺伝子マーカーを用いて種同定することで、日本への移入・定着したアオサ・アオノリ類の実態を明らかにした。また、日本が原記載地であるアナアオサは、近年欧州や北米で新たにその分布が確認され、越境移入の可能性が示唆されている。そこで日本および世界各地で採集されたアオサ類標本のうちアナアオサと同</p>		

定されたものにつき、より詳細な遺伝子解析を行い、アナアオサの越境移動の実態解明を目指した。

糸状褐藻シオミドロ類はアオサ・アオノリ類と並んで代表的な船体付着海藻であり、その移入・定着は広範にまた頻繁に起こっていると考えられるが、形態形質だけに基づく種レベルの分類が困難である。しかしながらシオミドロ類の世界各地における越境移動の実態が明らかになれば、同様にそのサイズが小さいために同定が困難な微細な付着動植物の越境移動の動態を知る手がかりになる。そこで、遺伝子マーカーを用いた分類の確立を目指して船体表面および世界各地で採集されたシオミドロの系統株を用い、遺伝的多様性の解析を行った。

本研究を実施中に新たに北米太平洋沿岸への移入・定着が明らかになった大型褐藻ホンダワラ類の正確な種同定を行うとともに、遺伝子マーカーを用いた同定の検証と移入起源の推定を行った。

オセアニア原産の二枚貝で、1972年の瀬戸内海における初報告以来、日本各地に分布を広げ、現在では多くの富栄養化した港湾や河口域において底生動物相の優占種となっているコウロエンカワヒバリガイ *Xenostrobus securus* (イガイ科) について、日本への移入経路と国内での拡散過程を明らかにするため、日本、オセアニアの集団を対象に遺伝的マーカーによる多様性解析を行った。

閉鎖性海域に設置され、大陸間航路の大型船舶が頻繁に入出港する国際港湾は船舶を介して移動する生物群の移入・移出のホットスポットであり、また国内における二次拡散源ともなる。そこで、我が国を代表する国際港湾の一つである大阪湾に寄港する大陸間航路大型運搬船と、乾ドック入りした大陸間航路大型運搬船を対象に船体付着生物の調査を行い、生物多様性を明らかにするとともに、海藻アオサ・アオノリ類について遺伝子マーカーを用いた種同定と起源地の推定も行った。

本研究第2サブグループと連携し、バラストタンク内の物理化学的環境と生物多様性のモニタリングを実施したバラ積み運搬船・コンテナ船を対象に、運行時のタンク内の浮遊動物の動態を明らかにし、リバラスト時などに放出される可能性のある海藻類と動物プランクトンの解析を行った。

バラスト水は海洋生物の越境移動の主要な原因として取り上げられているが、バラスト水中の生物相の動態に関する情報は、試料入手の難しさや船上での処理作業の困難さ等から驚くほど少なく、バラスト水を介した海洋生物の越境移動に関する様々なケーススタディが求められている。そこでバラスト水について調査・研究を行う上で適切なサンプル収集法と処理法を確立すること、フロサイトメトリーや分子生態学的手法により、タンク内生物の動態の詳細について調査すること、そしてバラストタンク内の物理化学的環境要因の特性について明らかにすることを目的として研究を実施した。またバラスト水処理に効果的な環境要因について調査・解析することを目的として、バラスト水から分離した培養株を用いて、実験室内で培養特性試験を実施した。更に本研究の成果を政策策定に活用するためには、バラスト水管理に関する国際条約の現状と今後の展開について把握しておく必要があり、条約実施に必要とされるガイドラインの抱える課題について情報収集を行い、その内容について検討を行った。また有害藻として問題にされている *Chattonella* を対象として、近縁分類群の識別と分布経路の推定を目的とするマイクロサテライトマーカーの開発を行った。

沿岸域の海底泥中には多種多様な有害植物プランクトンのシストが存在することが知られている。こうしたシストは風や波によって、容易に海水中に懸濁してバラストタンクに取り込まれることになる。シストは環境耐性をもつことから、バラストタンク内に残存し、リバラスト海域や他の沿岸域において、バラスト水と共に放出されることで、越境移動する可能性が懸念されている。しかしバラストタンクという特殊な環境下でのシストの生存率や動態など、詳細は不明である。そこで、バラストタンク環境における有害植物プランクトンシストの動態について明らかにすることを目的として、疑似バラストタンク環境を実験室に構築し、シストの生存率の変化を実験的に追跡することで、どのような有害植物プランクトンの種がバラスト水とともに移送され得るのか、また移送の後に定着する可能性のある沿岸海域についてグローバルレベルで予測することを目指した。

3. 研究の方法及び結果

(1) バラスト水・船体付着により越境移動した生物群集の起源、拡散経路および動態の解析に関する研究

1) 遺伝子マーカーを用いた移入大型海藻類の生物多様性解析と拡散経路の推定

a. ワカメ各地集団の遺伝的多様性解析

大型褐藻ワカメを対象に、原産地と移入先を含む世界各地の集団の遺伝的多様性についてミトコンドリア遺伝子を用いて解析した結果、原産地である北東アジアでは27のハプロタイプ(遺伝子型)が確認され、大きく以下の4つの系統群に区分された(図1左): (I) 大陸沿岸(韓国・中国)タイプ; (II) 北日本タイプ; (III) 中部日本太平洋岸タイプ; (IV) 日本海タイプ。この解析によりワカメは原産地では人為的な移入が起こらなければ地域集団の遺伝的多様性は良く保持されているが、養殖のために各地から種苗が持ち込まれている大阪湾周辺では、遺伝的な攪乱が起こっていることが確認された。一方、海外移入集団では、欧州およびメキシコは北日本タイプを、オー

オーストラリア南東部とアルゼンチンは大陸タイプを、カリフォルニアは中部日本太平洋岸タイプを、タスマニア（豪）は日本海タイプを示した（図1左）。ニュージーランドでは複数のタイプが見いだされたが、北島では大陸タイプが優占していたのに対し、南島では大陸タイプと北日本タイプが混在していた。このうちカリフォルニアとメキシコの集団は、比較的最近、本州から大型船舶などによって一次移入された可能性が示唆される。オーストラリアでもタスマニアは日本からの船舶を介した移入の可能性が高いが、オーストラリア本土やアルゼンチンの集団は、同緯度帯にあるニュージーランドからの二次的な拡散の可能性も考えられる（図1右下）。ニュージーランド沿岸において1980年代の移入以降採集された乾燥標本の解析から、北島では漁船の船体に付着したものが移入源である可能性が示されたほか、侵入後現在までに優占集団が変化してきた経過が明らかになった。一方、核遺伝子のマイクロサテライト法による日本・韓国・ニュージーランドの集団の解析結果は、ミトコンドリア遺伝子による解析結果を支持するとともに、南島で大陸タイプと北日本タイプの両移入集団が交雑を起こしている状況が明らかになった（図1右上）。

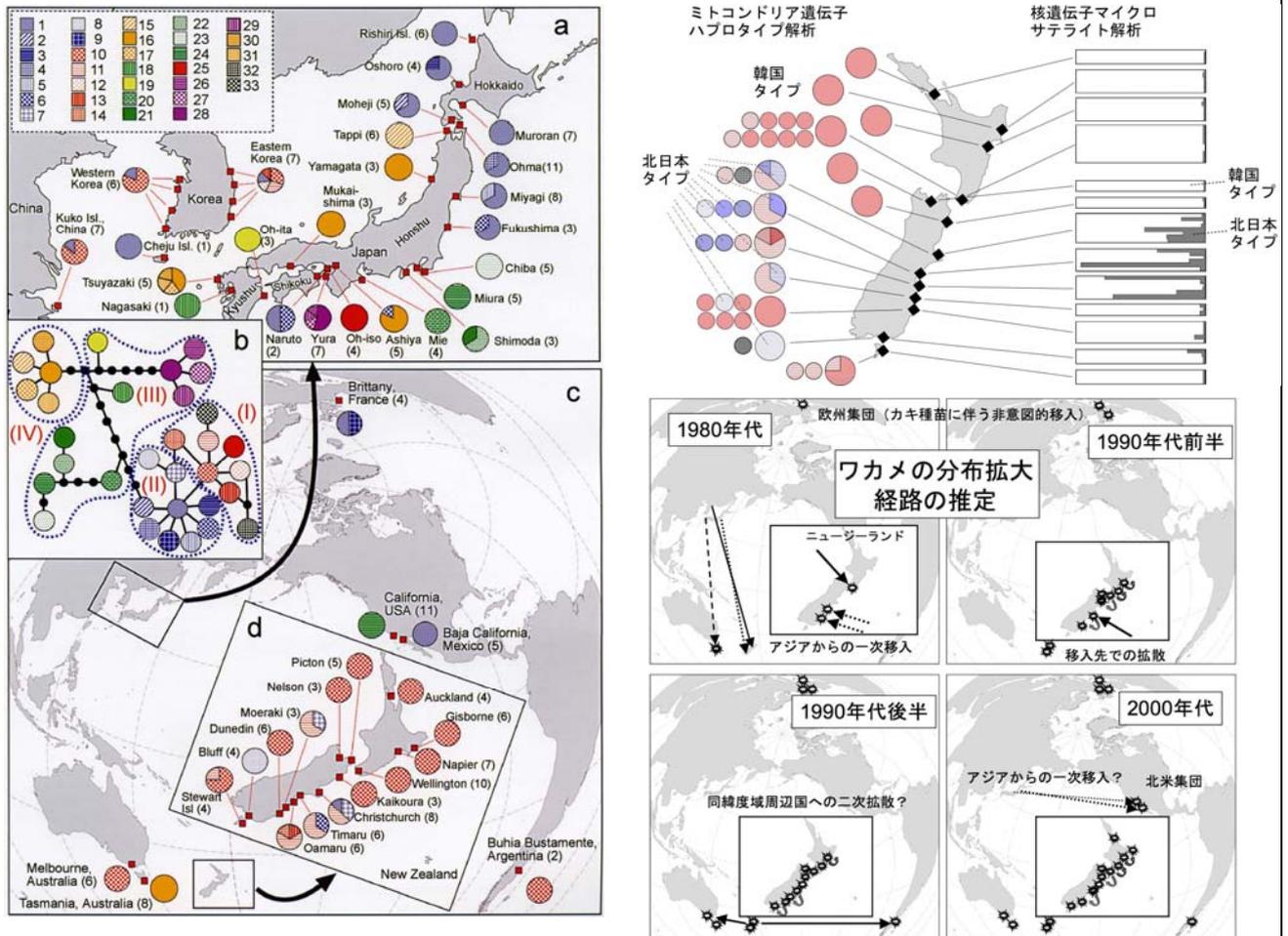


図1. 左：原産地と移入先におけるワカメ集団のmt遺伝子 *cox3* と *tatC-tLeu* 領域DNA配列によるハプロタイプ分布と Minimum Spanning Network 系統樹。右上：ミトコンドリア遺伝子ハプロタイプと、核遺伝子マイクロサテライトによる解析結果の比較。右下：遺伝子解析に基づくワカメ移入集団の拡散経路の推定。

ワカメ配偶体と若い胞子体の培養株を、日豪航路バラ積み運搬船のバラストタンク内水温環境を模した培養条件で培養した結果、胞子体は死滅したが、配偶体は一部残存し、配偶体であれば移動可能であることが示され、実際の移入が船舶を介してにおこった可能性が実験的に確認された。

b. アオサ・アオノリ類の遺伝的多様性と生物地理に関する研究

i. 三河湾、大阪湾において優占するアオサ・アオノリ類移入種の分類

移入種の侵入・定着が ocorrência やすい閉鎖性海域において、どの種類のアオサ・アオノリ類が優占しているのかを明らかにする目的で、三河湾および大阪湾の数地点でアオサ・アオノリ類のうち優占している種の季節的な採集を行い、核rDNAの介在配列(ITS領域)塩基配列を用いた遺伝子マーカーによる分類を行った結果、以下の種が確認された：アナアオサ；ミナミアオサ；ナガアオサ；リボンアオサ；ウスバアオノリ；ヒラアオノリ；*U. flexuosa* (= *E. flexuosa*)；ヒメボタンアオサ；*U.*

californica; *U. scandinavica*; *U. armoricana*。これらのうち、春から夏にはアナアオサが、秋から冬にはミナミアオサが優占した。ミナミアオサは移入種であるとされてきたが、原産地は明らかにできず日本自生種である可能性もある。一方、*Ulva armoricana*, *U. scandinavica*は何れも本研究において初めて日本での分布が明らかになったもので、比較的最近日本に移入してきた種であると考えられる。*U. flexuosa*については日本未産だが日豪航路のバラ積み運搬船の船体からオーストラリアで報告されている個体と同じ遺伝子型を示す個体が採集されており、今後新規移入するリスクが高い。

ii. 海外アナアオサ集団の起源推定

極東アジア原産のアナアオサは、葉緑体遺伝子 *atpH-atpI* 介在領域配列では日本を含む極東アジアから15のハプロタイプが見出され、また1つの集団内にも複数のハプロタイプが存在するなど、比較的高い遺伝的多様性が認められた。一方、移入に起源すると考えられるオセアニア、欧州、北米から採集された標本は、その広い地理的な分布にかかわらず全て1つ（オセアニア、北米）または2つ（欧州）のハプロタイプに属しており、きわめて低い遺伝的多様性しか見られなかった。このため極東アジア以外の集団は極東アジアの限られた地域からの人為的な移入に基づいていることが強く示唆される。

c. 褐藻シオミドロ類のミトコンドリア *cox3* 遺伝子塩基配列による遺伝的多様性解析

神戸大学海藻類系統株保存室に保存されている世界各地産のシオミドロ系統株と、今回の調査で各地および船体表面・バラスト水中より採集した系統株65株につき、ミトコンドリア *cox3* 領域のDNA塩基配列を決定し、分子系統学的解析を行った。その結果、世界各地のシオミドロ属は *Ectocarpus fasciculatus* を除くと8つの、おそらく種に相当する系統群に分類される可能性が示された。このうち船体付着およびバラスト水中から得られた株は *Hinckesia* 属の他、このうちの一つのクレードに相当した。このクレードの系統群はこれまで、南米および欧州から得られているものであり、これらの種で広範囲の移動が occurring している可能性が示唆された。

d. 大型褐藻シダモク（ヒバマタ目； *Sargassum filicinum*）北米移入集団の起源解析

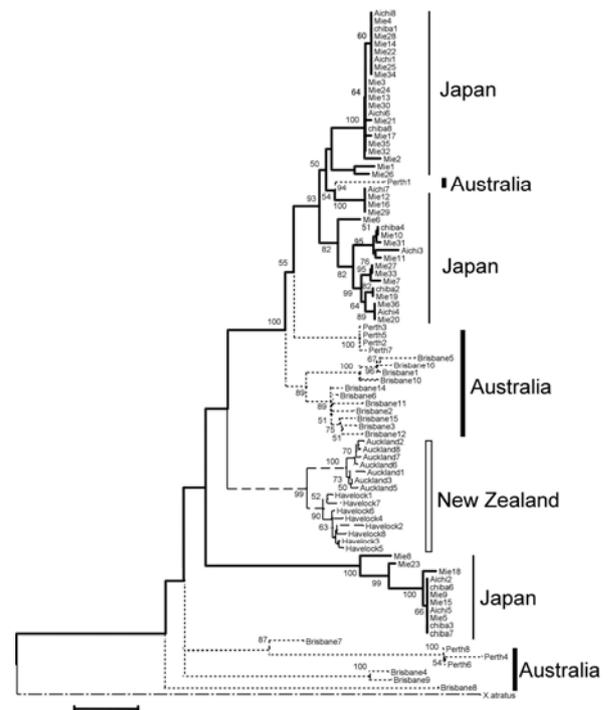
2005年以降に米国カリフォルニア、メキシコバハカリフォルニアに新たに移入したと考えられるホンダワラ類の一種につき、形態学的観察、ミトコンドリア *cox3* 遺伝子領域の塩基配列解析を行った結果、シダモクと同定され、瀬戸内海周辺の集団に由来する可能性が示された。本種はその繁殖特性から第二のタマハキモクとして世界各地に拡散することが危惧される。

2) コウロエンカワヒバリガイの遺伝的多様性と移入起源・拡散経路の解析

日本各地、ニュージーランド、オーストラリアにおいて採集したコウロエンカワヒバリガイについて、ミトコンドリア *COI* 領域と16SrDNA領域のDNA塩基配列を決定し、分子系統解析および

PCR-RFLP解析を行った（図2）。その結果、ニュージーランドでは北島と南島において独立して分化が起こっており、遺伝的な交流はないことが示された。また制限酵素断片解析（*EcoT22I*）では、ニュージーランドの集団は日本の集団とは異なる遺伝子型を持っていることが示され、日本の集団はオーストラリアの集団に由来すると考えた。そこでオーストラリアと日本の集団について *AfaI* によるPCR-RFLP解析を行った結果、日本では全体で3つのハプロタイプしか出現しなかったのに対して、オーストラリアでは一地域でも最大で5つのハプロタイプを有し、オーストラリア全体で見ると6つのハプロタイプが存在し、遺伝的多様性が高く、ハプロタイプ出現頻度は地域ごとに異なっていた。中でも、Newcastle（豪）の個体は日本の個体と遺伝子構造が似通っていることから、日本のコウロエンカワヒバリガイはNewcastleから持ち込まれた可能性が高いと考察した。

図2. 日本、オーストラリア、ニュージーランド産コウロエンカワヒバリガイ個体群のミトコンドリア *COI* 遺伝子による分子系統解析結果（近隣結合合法系統樹）



3) 大陸間航路の大型輸送船の船体付着生物群集の多様性解析

a. 海藻類

大陸間航路のバラ積み船を対象に、停泊時に潜水作業で、または乾ドック内で船体表面を調査し、

船体各部に着生している海藻類、付着動物類を採集した。これらの付着生物はその形態に基づいて分類するとともに、海藻類の一部については遺伝子マーカー (*rbcL*, 核rDNA ITS領域) を用いた解析により原産地を推定した。その結果、海藻類では緑藻アオサ・アオノリ類数種、糸状褐藻 (シオミドロ属、*Hinckia*属)、紅藻アクロケチウム類、マサゴシバリ類、イシゴロモ類などの着生が確認された。このうち、アオサ・アオノリ類については船体および後述のバラスト水から採集された個体と同じハプロタイプの個体が、日豪の両方の寄港地から採取されており、船体付着がこれらの種の双方向的な越境移入を引き起こしている可能性が示唆された。

b. 動物プランクトンの多様性と経時変化

船体付着動物については、大阪湾に入港するバラ積み船2隻各1回の潜水調査だけでも50種を超える底生動物が確認された。このうち22種はフジツボ類で、日本国内から報告されたことのない種4種を含み、なかでもオセアニア原産の*Eliminius modestus*は原産地の水温・塩分などの生育環境が類似していることから日本沿岸への移入、定着が極めて高い種であると考えた。

一方、乾ドック入りしたバラ積み船、コンテナ船、自動車運搬船の船体付着生物調査では、刺胞、触手、節足、軟体、環形、扁形、脊索の7門90種類が確認された。バラ積み船には、いずれも多く付着動物が確認されたが、コンテナ船や自動車運搬船では種数、生物量ともに少なく、わずかにシーチェストや舵部分だけに見られた。この違いは船の航行速度、停泊時間、淡水域の航行の有無などの要因に基づくと考えた。バラ積み船4隻について、動物群別の個体数頻度を検討したところ、フジツボ類と端脚類が優占していた。フジツボ類の湿重量頻度では、平滑な船体ではサンカクフジツボが優占し、次いで*Tetracilitella purpurascens*やヨーロッパフジツボが優占していた。一方後部の電食防止板周辺やシーチェスト、プロペラカバー、とも部では多くの場合、*Megabalanus tintinnabulum*が優占し、次いで*Austrobalanus imperator*、ミナミアカフジツボ、アカフジツボが優占していた。

4) バラ積み船バラストタンク内で生存する海藻類および動物プランクトンの動態解析

a. タンク内の水温・塩分の変動

日豪航路のバラ積み運搬船のバラストタンク内の水温は17.3-31.7℃、塩分は29.3-33.9 psuの間で変動した。水温は日本出航後、毎日上昇し、2004年12月と2005年6月では調査開始からリバラスト (バラストタンク内の海水を外洋海水に置換する処理) までの5日間で10℃以上上昇した。リバラスト以降は30℃前後に安定した。塩分はリバラスト後上昇したが、季節・日変動は小さかった。タンク内の表層と近底層の間では、水温や塩分の変動傾向に差が認められなかった。

b. 海藻類

日豪航路のバラ積み運搬船において、出港から入港までの10-13日間、バラストタンクから採水し、バラスト水中の海藻類の孢子・発芽体を実験室内で培養し、出現した可視的な藻体を分子マーカー (*rbcL*, 核rDNA ITS領域) を用いた解析により種同定した。その結果、出航後約1週間は、アオサ類の幼体がタンク内に生存しており、リバラストなどにより排出されることが明らかになった。

c. 動物プランクトンの多様性と経時変化

採水した水サンプルを目合100 μmのプランクトンネットで濃縮し、5%中性ホルマリンで固定後、そこに含まれる動物プランクトンを光学顕微鏡で同定し、また個体数の計測を行った。その結果、有孔虫類、有鐘繊毛虫類、アカンソメトロン (放散虫) 類、枝角類、カイアシ類、腹足類幼生、二枚貝類幼生、多毛類幼生などの種が確認され、なかでもカイアシ類は調査を通じて多くみられ、合計18種 (成体) が確認された。バラスト水内の全動物プランクトンの個体数密度は、どの調査においても調査初期に最も高く (160-4200個体/100L)、経時的に急速に減少し、リバラスト直前までに1割以下になった。日豪航路では、多くの場合入港までに動物プランクトンは確認されなくなったが、一部の航海では、密度は低いが多毛類幼生とアカンソメトロン類、有孔虫類が入港時にも確認された。減少率は肉食性種や懸濁物食性種では急激であるのに対し、堆積物食性や寄生性種では緩やかだった。表層と近底層の動物の個体数密度は、調査開始時には大きな差があったが、その後小さくなり、調査終了時まで変動傾向は類似していた。

(2) バラスト水・船体付着生物群集遷移の把握及び管理に関する研究

1) バラストタンク内の物理化学的環境とクロロフィルの連続モニタリング

バラストタンク内の物理化学的環境特性について明らかにするとともに、植物プランクトン由来のクロロフィルの経時変化を追跡するために、航路および船種の異なるバラ積み船とコンテナ船を対象として調査を行った。バラストタンク内に、多項目水質計およびクロロフィルセンサーを設置 (図3) して、クロロフィル、温度、pH、塩濃度、溶存酸素濃度(DO)について、連続モニタリングを行った。

日本-豪州航路のバラ積み船について (図3)、2004年8月から2005年8月までの全航海の連続モ

モニタリングデータを得ることができた。また日本ーアジア各国ーUSA航路のコンテナ船について（図3）、2005年8月下旬から2006年1月上旬までの約5ヶ月間の連続モニタリングデータを得ることができた。バラスト水の温度、溶存酸素濃度(DO)、クロロフィル等の経時変化、季節変化、リバラストの影響等に関する詳細な情報が得られ、実験室内におけるバラストタンク内環境を再現した培養試験等に利用するとともに、バラストタンクの基礎情報としての整備を行った。またバラスト水の重金属濃度の変化について調査した結果、航海とともにCdの濃度が高くなり、逆にPbの濃度は低くなること、Niの濃度はそれほど変わらず、Snは検出限界以下の値、またZnは腐食防止のために設置されている亜鉛棒からの溶出によりタンク内で高濃度に上昇することが分かった。

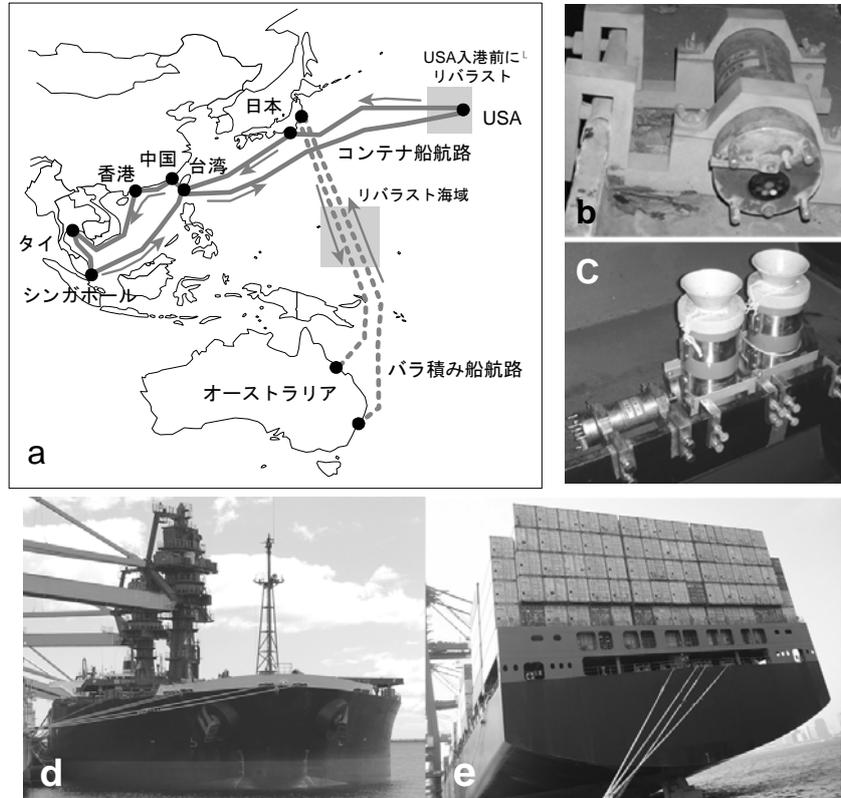


図3. 調査を行った航路及び船舶、バラストタンク内機器類。航路図 (a)。バラストタンク内に設置されたクロロフィルセンサー (b)とセディメントトラップ (c)。停泊中のバラ積み船 (d)とコンテナ船 (e)。

2) バラストタンク内における植物プランクトンおよび関連微生物の動態

バラストタンク内の生物の現存量と多様性の経時変化について調査解析するために、2004年8月、2004年12月、2005年6月にバラ積み船（日ー豪間）にて、2005年8月、2006年6月にコンテナ船（日ーアジア各国ーUSA間の一部）にて乗船調査を行った。何れの船舶でも時間経過とともにバラストタンク内で連鎖型コロニーを形成する珪藻でコロニーの断片化と細胞の損傷が認められ、死細胞が増加した。またバクテリア、原生動物、植物プランクトンの死骸等が混在する懸濁性粒子塊が時間とともにした。バラストタンク内は完全な暗黒条件下であり、また隔壁や補強構造の入り組んだ複雑な構造上、航行中に波風の影響を受けることで、タンク内で攪拌や水圧の変化が生じていた。多くの植物プランクトンはこうした物理的な影響により急速に衰退するとともに、これらを捕食、分解する原生動物やバクテリアの活性化・増殖が認められた。一方、*Pseudo-nitzschia*など一部の珪藻類は活発に滑走運動を行っており、バラストタンク環境に対してある程度の耐性を示す生物群の存在も明らかになった。バラ積み船では、日本出港から5-10日目に行われるリバラストにより植物プランクトンと原生動物は激減し、急速な衰退が認められた。コンテナ船の場合、日本とアジア各国間では、近距離で温度変化が少なく、バラ積み船と比較して、ハプト藻や緑藻などより多様な生物群を確認できたこと、そしてUSAから日本への航海の場合、特に秋から春にかけてバラストタンク内が1.5~10℃の低温に保たれており、長距離・長期間の航行にも関わらず、バラスト水や堆積物中から増殖能力をもつ植物プランクトンやシスト様細胞が確認された。これまでに両船舶のバラストタンク内で生存が確認された種についてリストに取りまとめた。

標準的な計測手法の一つであるセディメントチャンバーを用いたマイクロサイズのプランクトンの計測結果では、日本出港時の初期値の0.02%~0.005%にまで減少することが明らかになった。例えばバラ積み船の2004年12月の航海では、1,260 cells/mlの細胞密度が、オーストラリア到着時に64cells/L（初期値の0.005%）に減少した。バラスト水1トンあたりに換算すると64,000 cells/tonで、これには*Chaetoceros*、*Pseudo-nitzschia*、*Asterionella*といった珪藻が含まれていた。これはIMOの基

準値を大きく下回る値であるが、同サンプルの濃縮サンプルを培養処理することで、増殖能をもつ種も確認された。一方、フローサイトメトリで計数・解析されたピコ・ナノサイズプランクトンの場合、マイクロサイズのプランクトンと比べて、多くの細胞が残存しており、初期値の10～70%の減少しか認められなかった。

検出、計数の困難な真核性微生物を対象として、分子生態学的手法の一つであるDGGE法による遺伝子レベルでの解析も行った。最上部と最下部のサンプルで基本的なバンドパターンは一致していること、港内の海水サンプルのバンドパターンは時間経過とともに変化し、バンドが一定の濃さを維持する場合、バンドが次第に薄くなる場合、そしてはじめは存在しなかったバンドが出現する場合が認められた。すなわちバラスタタンク内で数が一定の生物群、そして減少もしくは増加する生物群の存在が示唆された。バラスタタンク内で数の増加が認められた生物の場合、リバラストで一時的に希釈されるが、その後速やかに回復することが明らかになった。

バラ積み船とコンテナ船の停泊時、そしてドック入りした他の船舶を対象として、バラスタタンク内堆積物に含まれる植物プランクトンおよび関連する真核性微生物の多様性調査を行った。様々な種類の植物プランクトンとシスト様細胞、原生動物が高頻度で観察され、まれに線虫や海藻類等も確認された。植物プランクトンの多くは珪藻類、次いで渦鞭毛藻が多かった。これらの多くは培養処理により増殖が認められ、MPNによる推定では1種につき45～96細胞/g(湿重量)の細胞密度で堆積物中に存在することが示唆された。生存微生物を多く含む堆積物の淡水処理を行った結果、海水の50%程度の塩濃度では、一部の植物プランクトンで生存率の低下が認められ、海水の1%程度の淡水に近い塩濃度では、植物プランクトンの生存率は0となり、培養処理でも生存が確認されなくなった。しかし*Euplotes*などの繊毛虫や鞭毛虫は、いずれの処理でも処理前と同じ生存率であった。また堆積物の乾燥処理に伴う生物多様性の変化をDGGE法と培養処理により確認した。

3) 細菌類および関連微生物の動態

生菌数及び全菌数共に上下層で相関(Kendoll's rank correlation; 生菌数 $\tau = 3.23$, $p = 0.001$ 、全菌数 $\tau = 54$, $p = 0.003$) が認められ、菌数の有為な差はなかった(Wilcoxon rank test; 生菌数 $W = 91$, $p = 0.758$ 、全菌数 $W = 60$, $p = 0.514$)。細菌数に関して上層と下層の間で相違は無いと考えられた。またリバラストの効果に関しては、洋上交換前に比べて洋上交換後に細菌数の平均値は減少し、表層の生菌数を除く全てケースで有意に減少するのが認められた(Wilcoxon test; 生菌数表層 $W = 12$, $p = 0.142$ 、下層 $W = 4$, $p = 0.048$ 、全菌数の表層 $W = 0$, $p = 0.002$ 下層、 $W = 0$, $p = 0.007$)。DGGE法により得られたバンドパターンについてクラスター分析を行なった結果、洋上交換を境にして、洋上交換前と交換後、各々でまとまる大きな2つのクラスターを形成すること、そして多次元尺度法による解析の結果から、洋上交換の前後でもタンク内で保持されている間に菌相が変遷することが明らかになった。更に、バラスタ水管理条約で検査対象となっている病原体の調査結果から、沿岸性の病原体に対して、沖合い水によるリバラストは一定の除去効果が認められること、ウイルス状粒子は全菌数と同様にリバラスト後に有意に減少し、鞭毛虫は、リバラスト後に有意に増加することが明らかになった。不定期に実施した乾ドック入りした大型商船のバラスタタンク調査では、全菌数が、船舶やタンクの違いにかかわらず $10^{5.5} - 10^{6.6}$ cells/mL であり、海洋の全菌数とほぼ同じ桁数であること、そして特徴的な糸状微生物の存在が明らかになった。この糸状微生物は、全菌数の0.04 - 9.15倍の生物量に達し、バラスタタンク内の微生物生態系に何らかの役割を担っている可能性が考えられた。

4) 連続暗条件、温度、亜鉛の及ぼす植物プランクトンへの影響調査

植物プランクトン培養株を用いて、バラスタタンクに特徴的な環境要因に関する培養試験を行った。培養株の培養試験により、ピコサイズの種を含む植物プランクトンの一部の種では暗条件に対し耐性を持つことが明らかになった。また栄養塩を添加しないバルクの系においても同様の結果が得られた。バラスタタンク内で著しい増加が認められている亜鉛は、植物プランクトンの生存に対して、暗条件下での減少を促進しないことが示唆された。

5) *Chattonella*におけるマイクロサテライトマーカーの開発

マイクロサテライトマーカーの開発のために複数の方法を試みて、Zane et al. (2002)の方法により、解析に使用可能なマイクロサテライトマーカーを開発することができた。開発したマーカーは、*Chattonella*属の4種*C. antiqua*、*C. marina*、*C. ovata*、*C. minima*に適用可能であり、増幅DNA断片長の比較から、*Chattonella*属4種の遺伝的類似度が極めて高いこと、種内および種間で合計7つの多型が混在することが明らかになった。またそのうち50%の個体がヘテロ接合体であることが分かった。

6) 生物群集遷移を考慮したバラスタ水管理手法

これまでの調査及び実験結果を踏まえ、生物群集遷移を考慮したバラスタ水管理手法について提言を行うために、バラスタ水管理条約の発効に向けてIMOで検討されているガイドラインについて運用上の問題点を整理し、処理装置については諸外国及び国内の装置の方式、開発段階及び今後の動向を詳細に調査した。また実船におけるバラスタ水の交換位置、交換方法及び交換時間の現状を調査した。将来において既存船にバラスタ水処理装置が搭載される場合の搭載場所、搭載に要するスペースなどの問題点を検討し、バラスタタンク内への清水投入実験を行うことで、i) タンク内沈殿物の処理に対する効果の有無を確認し、ii) 既存船においてバラスタタンクに清水注水が配管上

可能かどうかについて調査を行った。更に3年間にわたる調査及び実験結果を踏まえ、バラスト水条約発効時に運用上考慮すべき事項を整理した上で、将来におけるバラスト水管理手法への提言をまとめた。これらの結果は条約発効後の国内法の整備に際し、有効に活用されることが期待される。

(3) バラストタンク環境における有害植物プランクトンシストの生理・生態学的研究

1) 日本の港湾から採取した海洋表層堆積物のシストの種組成と多様性

日本の港湾、5地点より採取した堆積物を対象としてシストの種組成と多様性の調査を行った。ナトリウムポリタングステン酸塩段階勾配分離を用いてシストを選別することにより、18種類のシストを検出した。また一定の希釈段階で培養処理を行い、栄養細胞の出現頻度からシスト数の推定を試みたところ、有害な種はそれぞれ200-500シスト/g(堆積物湿重量)に達することが見積もられた。

2) バラストタンク環境が渦鞭毛藻シストに及ぼす影響

各種条件下で、発芽試験を行ったところ、種によって反応は異なり、バラストタンク内環境を想定した「暗黒—攪拌—温度変動」からなる複合ストレスでは、*Alexandrium*や*Cochlodinium*等の有害種を含む多数の植物プランクトンの発芽を確認出来た。一方、高濃度Cd/Znを条件に加えることにより、発芽が抑制される可能性も示唆された。

3) バラストタンク環境が栄養細胞に及ぼす影響

珪藻の場合、擬似的バラストタンク環境条件下で、細胞へのダメージが認められたが、通常条件下に戻すことにより、速やかに回復した。渦鞭毛藻の場合、暗黒条件によるダメージはほとんど認められず、シストの形成もなかった。しかし、「暗黒—攪拌—温度変動」の複合ストレス条件下では、株によって異なる反応を示し、死滅する株、一部の栄養細胞が残存する株、シスト様細胞を形成する株を認めることができた。

4. 考察

(1) 世界各地に分布を拡大しつつある褐藻ワカメについて、原産地と世界各地の移入集団の遺伝的多様性を、ミトコンドリア遺伝子塩基配列及び核遺伝子マイクロサテライト解析を併用して解析することで、世界の移入集団の起源を明らかにし、また経時的な拡散過程を推定することができた。中でもニュージーランドの集団は、移入初期から現在まで複数回の移入があり、これらの集団が交雑を繰り返しながら優占する集団の変化がおこっていることが初めて明らかになった。一方、自生地(日本)の自然集団では人為的な導入がなければ、遺伝的多様性が良く維持されていることも示され、移入後きわめて短期間で国全体に蔓延したニュージーランドでは漁具の移動や船舶などによる人為的な要因で拡散が引き起こされたと考えられる。

日本沿岸でのアオサ・アオノリ類の調査からは三河湾、大阪湾などにおいて、*Ulva armoricana*, *U. californica*, *U. flexosa*, *U. scandinavica*などの、これまでほとんど報告されたことのない移入種が、地域によってはすでに優占していることや、日本の沿岸からは報告されていない種が船体付着生物として確認されるなど、今後も増加する可能性が示された。逆に、日本以外の調査では、極東アジア原産のアオサが極めて広範囲に拡散しており、またそれが日本の太平洋沿岸に起源する事が示唆された。このことは、ワカメに関する研究成果と考え合わせても、海藻類の大陸間越境移動がこれまで考えられていたよりはるかに広範囲で、また急速に進行していることを示している。

もう一つの代表的な船体付着海藻であるシオミドロ類については、種レベルの同定に適した解像度を持つミトコンドリア遺伝子を用いて世界各地の系統株の遺伝的多様性解析を行い、船体付着シオミドロ類の遺伝子解析による種同定システムの構築にむけて大きく前進した。

本研究で新たに北米沿岸への移入が確認された褐藻シダモクは、過去に世界各地に蔓延した移入海藻類の多くと共通する性質(雌雄同株、一年生、大量の生殖細胞)を持っており、第二のタマハキモクとして拡散を続ける可能性が高く、各国における監視体制の強化が必要であると考えられる。

底生動物については、遺伝子解析によるコウロエンカワヒバリガイの起源特定を行ったが、これは国内に移入した海洋無脊椎動物についてDNA分析により原産国を特定した初めての例である。またPCR-RFLP法による解析に成功したので、より簡便に多くの試料を検査することが可能になった。

船体付着海藻・動物およびバラスト水中動物プランクトン調査では、バラ積み船では船体の部位により、その多寡、種組成に大きな違いが見られることが明らかになった。一方、淡水域を航行するコンテナ船では付着生物が極めて少なかった。これらの結果は今後船体付着生物を抑制するための方策を考える上で有効な資料となると考える。また日本と南半球の間を往復するバラ積み運搬船のバラストタンク内の浮遊動物の動態調査では、出航後数日で、著しい個体数の減少が見られ、ほとんどの種がリバラスト時または到着時には死滅していることが確認された。

(2) バラストタンクは外界から分断されており、外界とは異なる環境が形成されている。バラストタンク内に取り込まれた生物の状態や生存に影響を及ぼす環境要因として、i) 完全な暗闇、ii) 亜鉛、カドミウム等の金属濃度の上昇、iii) 風・波浪による水圧や攪拌、iv) 移動に伴う水温の変化

等が挙げられる。特に水温はバラスタンク内の環境パラメーターの中で、大きく変化しており、生物の生存や状態変化、そして多様性の変遷に最も影響する要因と考えられた。またバラ積み船で行われているリバラスタでは、約95%のバラスタ水が外洋海水に置換され、生物量が大幅に減少し、海水の諸性質も変化した。センサーによる連続モニタリングでも、リバラスタ後にクロロフィル値が検出限界以下に低下しており、リバラスタが生物量の低減に効果を挙げていることが明らかになった。バラスタ水の漲排水が不規則に行われるコンテナ船では、動植物プランクトンの動態について不明な点が多かったが、連続モニタリングの結果から、植物プランクトン量の遷移に関して、従来通り漲水後に急速に減少する場合と漲水後にほとんど濃度が変化しない場合の2タイプが観測されるなど、タンク内の生物の挙動に関する興味深い知見を得ることができた。後者の現象はこれまでのところセンサーによる連続モニタリングでのみ確認されているのだが、越境移動の点で非常に問題であり、種組成を含めた詳細な調査が今後必要と言える。

バラスタンク内に取り込まれた生物は、特殊環境といってもよいタンクの中で、状態を変化させ、数を増減させている。この変化は生物種によって異なり、数を減らすグループ（大部分の動植物プランクトン）、一定数を保持するグループ（一部の珪藻や原生動物）、そして増加するグループ（原生動物）が認められた。ナノからマイクロサイズ（3~20 μ m）の植物プランクトンの場合、初期細胞密度の5-20%の割合で日々減少しており、リバラスタが行われる場合には、リバラスタ後に初期細胞密度の0.005-0.01%にまで減少した。例えば2004年12月のオーストラリア停泊時には、64cells/LというIMOの基準値（10個体/ml）を大きく下回る数値であった。しかしこうした低細胞密度の試料であっても、培養処理を行うことで、増殖する種類が確認されるなど、リバラスタを行っていても越境移動する可能性のあることが示唆された。コンテナ船では、バラ積み船と比較して、生存細胞数が多く、また多様な生物群が確認された。これは日本-アジア各国間では、距離が短く、温度変化も小さく、外洋でのリバラスタ処理が行われなかったためと考えられ、日本-アジア各国間で海洋生物が越境移動するリスクの大きいことが示唆された。一方、アジア各国からUSAへの航海の場合、長距離で温度差が大きく、USA沿岸に到着する前にリバラスタが行われることから、生物の移動リスクは低いこと、そしてUSAから日本への航海の場合、冬季にバラスタタンク内が低温に保たれ、長距離・長期間の航行にも関わらずバラスタ水や堆積物中から増殖能力を有する生物が検出されることから、時期によっては越境移動のリスクが大きくなることが示唆された。DGGE法という分子生態学的手法により、バラスタタンク内における微生物の変遷を遺伝子レベルで解析した結果、時間とともに増加する生物群の中には、DNAのホモロジーから、病原性の種や寄生性の種と近縁な種が含まれており、バラスタ水排水域における生態系への影響が懸念された。

バラスタタンク内の堆積物の調査から、様々な種類の植物プランクトンやシスト様細胞が検出され生物の越境移動を防ぐ上で、堆積物中の生物の除去は重要な課題と言えた。多数の生存微生物を含むタンク内の堆積物について、淡水処理後の微生物の生存率変化を調査した結果、海水の50%程度の塩分では、一部の植物プランクトンで生存率の低下が認められ、海水の1%程度の淡水に近い塩分では、植物プランクトンの生存率は0となり、培養処理でも生存は確認されなくなった。しかし*Euplotes*などの繊毛虫や鞭毛虫は、処理前とほぼ同じ生存率を保つことが判明した。一方、堆積物の乾燥処理では、植物プランクトンおよび原生動物の生存率が0となることが、培養試験とDGGE法による調査から確認された。淡水処理や乾燥処理といった堆積物の処理は、既存の船でも十分に対応可能であり、海洋生物の移動のリスクの低減につながる処理方法となる可能性が考えられた。

細菌を中心とした微生物群集の調査では、リバラスタにより全菌数・ウイルス状粒子は減少するが、航海中に一部の細菌や鞭毛虫が増殖することが明らかになった。またドック入りした船舶の調査ではバラスタタンク内に長期間滞留しているバラスタ水から糸状微生物が高頻度に検出され、長期間タンク内に保存されることで、独自の微生物生態系がつけられている可能性が示唆された。

有害植物プランクトンとして知られる*Chattonella*では、地域集団レベルでの遺伝的多様性を比較するための研究がこれまでも行われていたが、今のところ種内や種間の差を示すことすらできない。今回、世界でもはじめて*Chattonella*を対象としたマイクロサテライトマーカーの開発に成功し、これまで11セットのプライマーセットを確立した。78株について解析した結果、全ての株を個体識別することが可能な精度であることが分かった。

(3) 日本の港湾と瀬戸内海で採取した海洋堆積物表層サンプルより、様々な渦鞭毛藻などの有害藻類のシストが検出された。こうした堆積物試料のシスト数を培養試験から推定したところ、有害種はそれぞれ200-500シスト/g（堆積物湿重量）に達することが見積もられた。バラスタタンクの容量と海水中に再懸濁する堆積物の推定値から、一度の航海で、2千万-4億個のシストが運搬される可能性が考えられた。バラスタ水を介して海洋堆積物が輸送されることにより、生物拡散の高いリスクが存在することになる。またバラスタタンクの擬似的な環境を構築して行った実験からは、

シストの発芽がタンク内環境下に置かれることで促進されることが示唆された。更に種によってはバラストタンク環境下に置かれた場合、栄養細胞からシスト様細胞に移行する現象も認められた。リバラスト処理を行うことで、こうした堆積物中のシストや栄養細胞から移行したシスト様細胞が、外洋環境に放出されることになり海流等により、様々な環境に拡散する危険性も考えられた。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

大陸間越境移動した大型海藻類（褐藻ワカメ、シダモク、シオミドロ類、緑藻アオサ類）や底生動物（コウロエンカワヒバリガイ）について、原産地、移入先、バラスト水および船体表面から採集された標本を遺伝子マーカーを用いて同定し、またその集団間の遺伝的多様性を比較する手法を確立し、移入集団の起源と拡散経路を考察した。また大陸間航路大型運搬船の船体付着生物に関する調査により、60種をこえる底生生物を確認し、船体の部位よりその組成、量が異なることを明らかにした。また、バラストタンク内にセンサーを設置し連続的な物理化学的環境の長期モニタリングを行うとともに、タンクからの適切な細菌類、動・植物プランクトンのサンプル収集・処理法について検討を行い、実地調査を行った。その結果、タンク内の生物多様性が環境の変化や生物間の相互作用の影響を受けて変化するプロセスを詳細に解明できた。

(2) 地球環境政策への貢献

本研究で得られた、越境移動海洋生物の起源・拡散経路を推定するための方法論と解析技術、及びその動態に関する知見は、新たに制定された「海洋基本法」の各項目に関わる施策策定において、重要な貢献をすると考える。また、バラストタンク内の海藻・動物プランクトンの動態や船体付着生物の多様性に関する成果は、バラスト水条約に基づくバラスト水処理の効果を検証するためのモニタリングの実施上、有用な情報を提供するほか、今後の船体付着生物を含めた船舶による生物移動の法的な規制の必要性を検証する上でも重要な知見を提供すると考える。本研究の成果の一部は、環境省を含む関連省庁のバラスト水条約対応に関する委員会、北大西洋海洋科学機構(PICES)における海洋移入生物の多様性解析と対策に関わる委員会での検討において有用な情報を提供してきたほか、新聞報道などにより一般市民にもこの問題に関する興味を喚起してきた。

6. 研究者略歴

課題代表者：川井浩史

1955年生まれ、北海道大学理学研究科博士課程修了、理学博士、現在、神戸大学内海域環境教育研究センター教授

主要参画研究者

(1)：川井浩史（同上）

(2)：河地正伸

1964生まれ、筑波大学生物科学研究科3年次中退、理学博士、現在、独立行政法人国立環境研究所 主任研究員

(3)：Noël, Mary-Hélène（平成17年度のみ）

1968年生まれ、パリ大学博士課程修了、理学博士、現在、EFフェロー

7. 成果発表状況（本研究課題に係る論文発表状況）

(1)査読付き論文

- 1) S. Uwai, W. Nelson, K. Neill, W.D. Wang, L.E. Aguilar-Rosas, S.-M. Boo, T. Kitayama and H. Kawai: *Phycologia*, 45, 687-695 (2006) “Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* deduced from mitochondria genes – Origins and succession of introduced populations”
- 2) M. Ohtani, T. Ohmi, S. Uwai, T. Hanyuda, R.E. Prabowo, T. Yamaguchi, H. Kawai: *Biofouling* 23: 277-286. (2007). “Occurrence and diversity of barnacles on international ships visiting Osaka Bay, Japan, and their risk of introduction.”
- 3) K.A. Miller, J. Engle, S. Uwai, H. Kawai: *Biological Invasion*. 9: 609-613. (2007) “First Report of the Asian Seaweed *Sargassum filicinum* Harvey (Fucales) in California, USA.”
- 4) M. Demura, M. Kawachi, M. Kunugi, T. Nishizawa, F. Kasai and M.M. Watanabe: *Molecular Ecology Notes*: 7: 315-317. (2007) “Development of microsatellite markers for the red tide-forming harmful species *Chattonella antiqua*, *C. marina*, and *C. ovata* (Raphidophyceae).”