

課題名	D-072 大型船舶のバラスト水・船体付着で越境移動する海洋生物の動態把握と定着の早期検出		
課題代表者名	川井浩史（国立大学法人神戸大学自然科学系先端融合研究環内海域環境教育研究センター・生物多様性研究分野）		
研究期間	平成19-21年度	合計予算額	152,973千円（うち21年度 46,503千円） ※予算額には、間接経費を含む。
研究体制	<p>（1）海藻類の移入・定着の現況把握と起源・拡散経路の推定、船体付着防止策の検討と環境に及ぼす影響の評価（神戸大学）</p> <p>（2）有害植物プランクトン移入種の定着・拡散とバラストタンク内堆積物の動態に関する研究（独立行政法人国立環境研究所）</p> <p>（3）バラスト水による海産動物の導入・定着に関する研究（広島大学）</p> <p>（4）バラスト水および船体付着がフジツボ類の越境移動に及ぼす影響（株）海洋生態研究所）</p> <p>（5）分子マーカーを利用したフジツボ類の起源・移動経路解明に関する研究（千葉大学）</p> <p>（6）バラスト水管理条約批准後のバラスト水による生物移動量の推定（東京大学）</p> <p>（7）海運による国際物流に伴う生物フロー解析とバラスト水および船体付着管理手法に関する研究（東海大学）</p>		
研究概要	<p>1. 序</p> <p>近年、物流移動の多様化・加速化・グローバル化により、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。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として世界各国から問題視されている。これに対して国際海事機構（IMO）によりバラスト水管理条約が策定されたが、条約の批准は遅れている。一方、これらの船舶の船体には様々な生物が付着しており、バラスト水と同等またはそれ以上に深刻な越境移入の原因となっていると考えられ、IMOにおいて船体付着生物の処理についての検討が進められている。関連して北太平洋海洋科学機構（PICES）において移入の早期検出に向けたネットワーク整備と検出手法の標準化が進められているが、その移入の実態については不明な点が多い。しかも、経済状況の変動による大型輸送船の沖待ち時間の増加、アジア海域の海運の急増、地球規模の気候変動による沿岸海水温の上昇、港湾域の環境劣化による在来種生物相の衰退など、外来生物の移入リスクはさらに高まっていると考えられる。これに関連して、「船舶における有害な防汚方法の管理に関する国際条約（AFS条約）」が2008年9月に発効し、船体表面へのバイオサイド（生物殺滅剤）として機能する有機スズ化合物を含有する防汚塗料の塗装が禁止された。このため、今後は有機スズ化合物以外のバイオサイドを含む防汚塗料、またはバイオサイドを含まない船底塗料が用いられることとなるが、この場合、これまでより船体付着生物が増加したり、付着生物相が変化したりすることにより、生物移入のリスクが大きくなる可能性が危惧される。しかしながら、海藻類、動植物プランクトン、底生動物などの多くの生物群は種レベルの分類が困難であったり、分類・生態に関わる研究者が少なかったりすることから、分布情報が乏しい場合が多い。このため、ある海域である生物群の分布が新たに確認された場合でも、その種に関する研究データの不足によって分布が知られていなかった在来種であるのか、新たな移入種であるのかを判定するのが困難な場合もしばしば見られる。</p> <p>2. 研究目的</p> <p>上述の背景をふまえて、本研究では大型の船舶に伴って運ばれる代表的な外来海洋生物（海藻類、フジツボ類、カイアシ類、有害植物プランクトン）の実態とその起源・拡散経路を、船体付着生物群、バラスト水中生物群、日本及び世界各地沿岸、特に寄港地周辺の生物群について、形態および遺伝子マーカーを用いた解析により明らかにすることを目的とした。また、船舶を介した移入の機会が多いと考えられる国際港湾において、移入生物を早期に発見する手法のひとつとして、人工の基質（生物付着板）の有効性を検証するとともに、そこに付着した生物を遺伝子マーカーを用いて簡便に同定する手法の開発を目指した。また、国際条約での対策と規制が整備されつつあるバラスト水による生物移入と、現時点では法的な規制が策定されていない船体付着による生物移入の動態を、実際の大型輸送船（主として日豪航路のバラ積み運搬船「A」）をプロジェクト共通の調査対象として定量的に把握し、また多量の生物付着が確認されている部位への新規防汚塗料による付着</p>		

防止対策の効果を検証することで、今後の船舶による生物移入防止対策の策定に科学的な根拠を与えることを目指した。また、バラスト水管理条約批准後のバラスト水による生物移動量を推定するため、タンク内の堆積物の量と質の変化および、排出バラスト水中の生物の量と質の変化をバラスト水管理条約に示された方法、ならびに一般の海洋生物学的手法で測定したほか、処理装置装備船舶のバラスト水試料を観察・計数するとともに、未装備船舶のバラストタンクに沈殿物捕集器を設置して、沈殿物とともにタンク内に混入する可能性のある生物量を計量し、また装置の承認やガイドラインの策定などバラスト水管理条約発効に関連する国際動向情報と、IMOおよびPICESにおける船舶船体付着による生物移動に関する国際動向情報の収集を行った。また、我が国の海運事業活動の調査等から生物移動の発生・変動要因を考察するとともに、代表的な移入生物について、その移入リスクアセスメントモデルを構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法と結果

(1) 海藻類の移入・定着の現況把握と起源・拡散経路の推定、船体付着防止策の検討と環境に及ぼす影響評価

#### 1) 移入海藻類の遺伝的多様性と移入起源・拡散経路の解析

極東アジア原産の緑藻アナアオサ *Ulva pertusa* は、近年ヨーロッパや北米への大陸間越境移入が報告されており、D-04プロジェクトによる予備的な遺伝子解析でもこのことが確認されたが、ニュージーランドにおける現地研究者による研究ではアナアオサは在来種であるとの見解が示されており、結論について疑問が残った。今回世界各地の集団につきミトコンドリア、葉緑体遺伝子と核マイクロサテライト配列による解析を行った結果、日本周辺で46のハプロタイプがみられ、地理的に遠い集団ほど遺伝的にも遠くなるという自然集団で見られる傾向が認められた。一方、ニュージーランドでは日本なみの地点・標本数を解析したが、日本と共通するわずか5つのハプロタイプしか見られず、世界全体でも6つと遺伝的多様性が顕著に小さかった。このことからアナアオサは極東アジアを自生地とし、人為移入により世界各地に急速に拡散したと結論した。

欧州原産の褐藻ヒラムチモは船舶を介して日本に移入したとされてきた。しかし世界各地の集団についてミトコンドリア遺伝子による解析を行った結果、日本の集団では高い遺伝的多様性が認められ、また地理的に離れると遺伝的にも遠くなる傾向が見られたが、欧州、オセアニアの集団は遺伝的多様性が小さく、地理的な距離と遺伝的な距離に相関は認められなかった。このためヒラムチモは定説に反して日本の在来種であり、本種の世界的な分布は多年にわたる船舶を介した越境移動により、攪乱されていると結論した。一方、極東アジア原産の近縁種ムチモは、ミトコンドリア遺伝子による解析から、米国太平洋沿岸の集団は津軽海峡に見られる無性的に繁殖することのできる雌性配偶体が優占する集団、またはこの集団と共通の祖先を持つ集団が移入したものであることが確認された。

#### 2) PICES標準底生生物付着板と遺伝子マーカーを用いた移入付着生物早期検出手法の開発

移入付着生物検出手法の標準化を目指して、北太平洋海洋科学機構 (PICES) 移入生物ワーキンググループ (WG-21) において提案されている底生生物付着板を大阪湾の2カ所に設置し、モニタリングを実施した。その結果、約9ヶ月間の設置で海藻類は湾奥部で7種、湾口部で14種確認され、海産動物は湾奥部で27種、湾口部で32種が確認された。このうち海産移入種とされる種は両地点で計11種が確認され、またこれまで大阪湾では確認されていなかったアミメフジツボが付着するなど、その底生生物付着基質としての有効性が検証された。これら移入種については、湾口部に比べ湾奥部により多くの種が見られる傾向が見られた (湾口部6種、湾奥部8種)。また、プレート上の代表的な付着生物 (フジツボ類及びアオサ類) の環境試料 (複数種の混在する可能性の高い試料) から遺伝子マーカーによる同定を行う手法の開発を目指して、フジツボ類については最低限のPCRと塩基配列決定により日本在来種と移入リスクが高い種の同定を行える18S rDNA部位を明らかにし、DGGE法による分離の条件検討を行った。またアオサ類については在来種についてDGGE法により、環境試料からの種同定が行える部位の選定と、DGGE条件の検討を行った。

#### 3) バイオサイドフリー防汚塗料の環境影響評価

日豪間の大型運搬船を対象に、船体後部の高頻度生物付着領域 (左右2箇所) に2種類のバイオサイドフリー船底塗料をパッチ塗装し、通常塗料との付着生物の違いについてモニタリング調査を実施し、また付着藻類の組成を培養により比較した。その結果、いずれの試験塗料表面にも肉眼で確認できる大きさの付着生物は認められなかったものの、微細藻類の付着が視認できバイオサイドフリー塗料区に珪藻類やシオミドロ属藻類の付着が多く見られたが、バイオサイド塗料区では緑藻類の付着が多く見られた。塗装表面をウレタン発泡スポンジで取り除いた後、スポンジごと培養した結果、バイオサイドフリー塗料区に由来する培養は、付着生物が顕著に繁殖したのに対し、バイオサイド塗料区に由来する培養では、藻類の繁殖は少なかった。

2種類 (フッ素系およびシリコン系) のバイオサイドフリー塗料、および従来から使用されている

バイオサイド塗料を用いて、ISOによって規定された45日間の溶出試験を実施した。得られた溶出液およびその濃縮液の毒性を、海産発光細菌、海産珪藻、塩水性甲殻類を用いた生態毒性試験により評価すると共に、有害成分について化学分析を行った。バイオサイド塗料からの溶出液には3種類の生物に対する強い毒性が認められ、塗料に配合された活性成分である亜酸化銅と亜鉛ピリチオンから生成した銅ピリチオンが毒性の本体であると推察した。これに対し、バイオサイドフリー塗料からの溶出液には生態毒性は検出されず、溶出が疑われた有害な有機フッ素化合物も検出されなかった。本実験条件下では、2種類のバイオサイドフリーは水環境に対して有害影響を及ぼさないと判断された。

## (2) 有害植物プランクトン移入種の定着・拡散とバラストタンク内堆積物の動態に関する研究

### 1) バラストタンク及び船体付着物由来の微細藻類

日豪航路に就航する大型輸送船「A」を対象として、バラストタンク内試料と船体付着物について、両移送媒体の生物多様性と移送の現状を把握するための調査を行った。バラスト水とタンク内堆積物の固定・培養試料の観察から、少なくとも24種（有害種4種を含む）のプランクトン性種を確認でき、船体付着試料から、少なくとも28種の付着性種が確認された。タンク内と船体付着に共通する種は一部のシアノバクテリアと珪藻のみであった。日本における寄港地からは合計48種（有害種13種を含む）が確認され、うち18種（有害種4種）はバラストタンクから検出された種と共通した。付着性種の多くは、シアノバクテリアと珪藻で占められ、その他に熱帯・亜熱帯性種が認められた。また防汚塗料の環境影響評価に関連した付着性微細藻のモニタリング調査では、バイオサイド混入塗料の方がより高い付着防止効果を示した。船体付着試料から、有害種は検出されなかったが、有毒性種を多く含むことが知られるシアノバクテリアを対象として、DGGE解析と主要バンドのDNA配列決定を行い、うち77配列について、遺伝子情報データベースに登録した。

### 2) リアルタイムPCR法を用いた有害植物プランクトンの検出と定量化

越境移動リスクの高い有害植物プランクトン種（*Chattonella* spp., *Heterosigma akashiwo*, *Alexandrium* spp., *Pseudonitzschia* spp.の4種）を対象として、タンク内試料にリアルタイムPCR法を適用した結果、いずれの種も航海後のタンク内堆積物から検出されること、そしてリバラストにより、細胞数が激減する一方で、プランクトン種によって排出のされやすさに違いがあり、*Alexandrium*と*Pseudonitzschia*はオーストラリア寄港地で実際に排出されていることを確認した。オーストラリア港湾で排出される細胞数は、1隻の総バラスト水量約92,000m<sup>3</sup>あたり最大2.3億細胞と見積られた。バラストタンク内に培養チャンバーを設置して行った生存率試験では、航海後に*Heterosigma*と*Alexandrium*の生存率が各々14%と2%に減少したのに対して、*Chattonella*の生存率はほとんど変わらなかった。

### 3) マイクロサテライトマーカーを用いた*Chattonella*の集団解析

本調査で初めてバラストタンク内堆積物中に存在することが確認された有害植物プランクトン*Chattonella*を対象としてマイクロサテライトマーカーを用いた集団解析を行った。その結果、*C. antiqua*集団では集団間の地理的距離と遺伝的距離の間に正の相関が認められたが、*C. marina*集団では相関は認められなかった。2008年に初めて東京湾での出現を確認した*C. marina*の東京湾における集団では、鹿児島湾の集団との類縁性に加えて、他の地域集団には認められない独自の対立遺伝子も認められた。更に人為的に移動・拡散した海洋生物の動態を把握するために、自然試料から直接集団の遺伝的多様性を検出・解析する手法を検討した結果、ニュージーランド、東京湾、瀬戸内海港湾等の堆積物試料から、*Chattonella*のマイクロサテライト領域の多型を検出することに成功した。

## (3) バラスト水による海産動物の導入・定着に関する研究

### 1) 中国、韓国における汽水性カイアシ類の微細分布に関する研究

サンフランシスコ湾に導入された東アジア原産カイアシ類の潜在的導入元である中国南部の九龍江河口、甌江河口及び韓国南部において汽水性カイアシ類の微細分布を調査した。中国の汽水域の表面塩分の範囲は約1~20であったが、塩分10~20の間には顕著な群集組成の相違があった。サンフランシスコ湾に導入された肉食性の種*Acartiella sinensis*と*Tortanus dextrilobatus*が本水域で確認されたが、塩分1~10に分布の中心があった。韓国南部において優占する2同胞種*Acartia pacifica*と*Acartia ohtsukai*の明瞭な棲み分け現象が確認され、前者は塩分32以上、後者は16~30の水塊に出現した。

### 2) 日本の国際貿易港における外来性カイアシ類の出現の有無と貿易構造との関連に関する研究

日本の国際貿易港（石狩港、室蘭港、釧路港、苫小牧港、川崎港、名古屋港、大阪港、北九州港、長崎港、佐世保港、那覇港）において浮遊性カイアシ類相を調査したが、外来種の出現は確認できなかった。名古屋港では年間約93万トンのバラスト水の国外からの持ち込みがあると試算されたが、この持ち込みにはコンテナ船が主に関わっていると予想された。

### 3) 東アジア産浮遊性カイアシ類の遺伝的多様性および導入個体群の比較に関する研究

サンフランシスコ湾に定着している東アジア原産でディアプトムス上科に属するカイアシ類3種 *Pseudodiaptomus marinus*、*Acartiella sinensis*、*Sinocalanus doerrii*の導入元を探索するためにミトコンドリアCOIあるいはCytb遺伝子DNA配列を用いて、サンフランシスコ湾と日本、韓国、中国の個体群を比較した。*P. marinus*においては、サンフランシスコ湾の個体群は東京湾、大阪港などと遺伝的に類縁性が高く、これらの海域から導入された可能性が示されたが、中国の個体群は隠蔽的未記載種であることが遺伝的、形態的に確認された。後者2種ではサンフランシスコ湾と中国の個体群間で一つのハプロタイプを共有していたが、*A. sinensis*は中国の複数の場所からの導入、*S. doerrii*は上海からの導入が統計的に示唆された。オレゴン州などに導入された東アジア原産種*Pseudodiaptomus inopinatus*の日本、中国、韓国における遺伝的多様性を調査した結果、複数の隠蔽種が含まれることが初めて明らかになったが、現時点ではどの種が北米に導入されたかは不明である。

#### (4) バラスト水および船体付着がフジツボ類の越境移動に及ぼす影響

H19年度は水島港に入港した調査対象船「A」の船体に付着するフジツボの存在を確認し、それらが川崎港へ移入する可能性についてモデルを使って推定した。しかし、川崎港には世界各地から多くの船が来港するので、H20年度は川崎港へ来港する船舶の仕出地すべてを取り上げ、仕出地周辺に分布するフジツボ全種を対象に、それらが川崎港へ移入する可能性を推定した。その結果、東アジアから、主として温帯や亜熱帯に分布するフジツボ（例えばサクラフジツボ、*Megabalanus tintinnabulum*、ミナミクロフジツボ）の移入可能性が高いとの結果が得られた。そこでH21年度は調査対象船「A」に加え、東アジア航路に実際に就航する二隻の船舶についても船体付着実態調査を行ってモデルの妥当性の検討を行い、同時に船体に付着したフジツボが幼生を放出する可能性についても検討した。さらに、移入可能性が高い種に注意を払うだけでなく、船舶がドライドック出渠後どれくらいの期間で船体の生物汚損が生ずるかを明らかにし、効果的な船体洗浄時期の推定を行ってフジツボ類の越境移動を防ぐ方法についても検討した。その結果、東アジア航路に就航する二隻の船舶の船体から、モデルで移入可能性が高いと推定されたフジツボ種は発見されず、むしろ、移入可能性の高い種は、近年日本に移入したと考えられる*Megabalanus coccopoma*（ココポーマアカフジツボ）も含め、オーストラリア航路に就航する調査対象船「A」の船体から数多く発見された。この調査結果を踏まえ、H21年度は、同航路に就航する船舶に付着するフジツボの移入可能性と移入経路について、改良を加えたモデルを用いてさらに検討を行った結果、移入実績を持つ*M. coccopoma*の移入経路は、船舶の寄港数が多く、長い沖待ちがあるオーストラリア東南部の港が有力であることが示された。さらに、本種の多くが成熟サイズに達し、抱卵個体も数多く見られたことは、船体に付着して移動するフジツボが移入先で幼生を放出し、そこへ移入する能力を持つことを示唆した。また、継続的な船体調査の結果、フジツボ類の船体への付着が始まるのは、ドライドック出渠後の積算停泊期間で2ヶ月半ほどであることも明らかになった。

これらの結果を基に越境移動を防ぐ方法について検討し、水中船体洗浄によって船体からのフジツボ除去を考える場合、除去はドライドック出渠後の積算停泊期間が2ヶ月半に達する以前に実施することが効果的であると考察した。フジツボ類の付着は船体のどの部分でも同じように起こるわけではなく、シーチェストや船体後部にある隙間部分、例えばロープガード、ラダーヒンジやスターンフレーム、さらにはラダー後端部、船首のバルバスバウ後部などで多いことも実船の調査を通じて明らかになったため、上記の水中船体洗浄はこれらの部分を重点的に行なう必要があると考える。

#### (5) 分子マーカーを利用したフジツボ類の起源・移動経路の解明に関する研究

パナマ原産のココポーマアカフジツボ*Megabalanus coccopoma*が西太平洋の日本だけでなく、オーストラリア東岸に外来種として移住していることを初めて明らかにした。本種の日本における定着状況を調べた結果、151地点で生息を確認し、北限は岩手県三陸海岸越喜来湾（ホタテ養殖筏）であることが明らかになった。東京湾ではほぼ全域の灯浮標に、相模湾では全域の定置網に、大阪湾・瀬戸内海東部では灯浮標に分布し、瀬戸内海での西限は愛媛県伊予灘であった。また太平洋岸・高知県室戸岬（定置網：1981年7月27日浦氏採集）および九州・宮崎日南海岸で生育が確認され、南限は志布志湾、鹿児島湾であった。歴史的には1978年8月11日に千葉港に入港した石油タンカーの船底から採集された標本（山口採集）が最古の記録になるが、幼生の付着定着は、日本国内では浦氏採集の1981年7月27日に高知県室戸岬定置網からの標本が現時点での最古になる。

本種の起源・移動経路を解明するためmtDNA COI遺伝子BF<sub>2</sub>-BR<sub>2</sub>で挟まれる383塩基対で系統解析を行った結果、原産国パナマ、日本、ブラジル、オーストラリア、日豪航路の調査対象船「A」から採集された遠隔地域集団間でも極めてよく類似しており、地域に特有のハプロタイプは認められなかった。全個体間の塩基配列の個体変異はわずか4%以下で、ハプロタイプネットワークは単一で、集団間に頻繁な遺伝子交流が起こっていることが示唆された。同様の現象は別の外来種タテジマフジツボにも認められ、ココポーマアカフジツボが調査対象船「A」の船底から採集されたように、遠

隔地間を高速、頻繁に往来し、多数個体の集団が運ばれた結果と推察される。オーストラリア東海岸南部には、歴史的に固有種*M. linzei* が生息していたが、1994年以来本種だけが発見され、固有種は*M. coccopoma* によって排斥された可能性が示唆された。調査対象船「A」はオーストラリア西海岸にも寄港しているため、サブグループ（4）と共同で現地調査を行ったが、西海岸ではココポーマアカフジツボは発見されず、同様の生息環境には東南アジア東部に広域に分布する*M. occator* が生育していることが確認された。

ココポーマアカフジツボの生活史に関して、幼生がブイに付着し、半年で成体サイズになり、性的成熟が確認された。東京湾の灯浮標では通年で本種の付着直後の若齢個体が観察され、その繁殖期はほぼ通年と推定される。その長さは固有種*M. volcano*（繁殖期7-9月）と*M. rosa*（同11-2月）と異なり、年間通して新規個体を生産していた。それらの性質が本種が外来種として日本に定着することができた理由と推定される。

#### （6）バラスト水管理条約批准後のバラスト水による生物移動量の推定

##### 1）沈殿物捕集器を用いたバラストタンクに持ち込まれた生物の定量

バラスト水管理システム搭載後にバラストタンク内に混入して生存する可能性のある生物量を航海ごとに定量するために、バラスト水処理システムを搭載していない2隻の船舶のバラストタンクに沈殿物捕集器を設置し、得られた堆積物の乾燥重量の測定と発芽実験を行った。堆積物の乾燥重量は航海ルートごとに異なっていた。堆積物の乾燥重量は日本-中国および東南アジア間を航行する船舶では0.022-0.326 g/Lであり、日本-東南アジア間を航行する船舶では、0.008-1.830 g/Lであった。2009年度に実施した培養実験では珪藻類の*Navicula sp.*と*Cyclotella sp.*のみが観察された。本研究で行った培養実験において発芽したほぼすべての生物の最小サイズはバラスト水管理条約の規制対象外であり、条約上は生物量0とされる程度であった。このことから、バラスト水処理装置が搭載されていない現在の状態でも生物量は極めて少ないといえる。しかし、我々はバラストタンク内で生きた状態で潜伏し、条件がそろえば再び増殖を開始することができる生物の存在を確認した。

##### 2）バラスト水管理条約と船舶船体付着による生物移動の規制に関する国際動向

バラスト水管理条約は23カ国(2009年12月1日現在)で批准がされ、さらに数カ国の批准が見込まれているが、発効にはまだ1-2年が必要なようである。バラスト水管理システムはすでに世界で20を超えるものが販売あるいは販売を計画されているが、システムの性能を港湾当局管理で実施できるような科学的方法がないことが条約批准の障害になっている。

船体付着汚損に対しては、可能な限り早期に世界的に同一基準で対策を立てようという目的で、国際海事機関(IMO)でガイドライン策定が進んでいる。このガイドラインは2010年に国際海事機関で最終化される可能性が高い。また、このガイドラインは近い将来の条約化されたときの基礎となるものである。ガイドラインには船体付着生物に対するいくつかの対策が盛り込まれている。それらには船底塗料の性能向上や水中搔き落とし機の機能向上が含まれているが、これらの対策に対して国際海事機関メンバー国内でクリーンシップとダーティシップの基準について、また対策の実施方法について意見の相違がある。

#### （7）海運による国際物流に伴う生物フロー解析とバラスト水および船体付着管理手法に関する研究

海洋生物の船体への付着防止に有効な情報を得るため、船社、造船所、塗装メーカー、電力会社を対象に、船体のメンテナンス状況、生物付着状況、生物付着防止技術の現状調査を行った。また、現状では船体の付着防止は主に防汚塗装で行っているが、塗装では限界があるため代替技術として有望な界面活性剤を利用し、「望星丸」のバウスラスタートンネルを対象として評価実験を行った。その結果、ドック時に実施した調査では、付着生物の動物種では環形動物と節足動物が約90%を占め、それらを住処としてヨコエビ、ワレカラ等が移動することが明らかになった。無防汚・塗装剥離部位に最初に付着がおこるが、この部位にフジツボ等が付着すると生物を誘引し付着を助長するので早期の発見、除去が重要であることが示された。また、船体構造・塗装方法上の理由から完全に塗装ができない、運航上で早期に衰耗・剥離する部位があることから、これらの部位には界面活性剤による付着防止が有効であることを示した。

海運における国際物流に伴う生物移動は、船舶の移動に大きく影響を受ける。中でも船舶の長期滞船は、船体付着を大幅に進行させ、生物移動に大きな影響を及ぼすため、その実態把握および停泊日数と付着との関係を把握することが重要である。本研究では、まず日本との貿易量が多いオーストラリアを対象として船体付着をもたらす長期滞船の発生しやすい主要石炭輸出港の入出港船データを入手し、石炭船の滞船状況を明らかにし、次にオーストラリア航路の石炭船の運航データを船社から入手し整理の上、停泊日数と付着状況の関係を分析し、船体付着の進行度を表す指標を作成した。また、船体付着防止対策として実施している短期航海の効果について作成した指標を用いて評価を行った。さらに、液化天然ガス運搬船(LNG船)、コンテナ船の運航及び停泊の状況を明

らかにし、石炭船と停泊状況の差異から船体付着の影響について調べた。

船体付着は港湾での船舶の停泊日数と大きな関係があると考えられている。オーストラリアの石炭積み出し港湾の滞船状況を調査すると共に、寄港石炭船の運航データの解析を行い停泊期間と出港後の船速の関係から付着状況を分析する簡単な指標値を提案した。また長期停泊中の船体付着防止対策として、1週間程度毎に短期航海をすることの効果を確認した。さらに、液化天然ガス運搬船（LNG船）、コンテナ船の停泊日数を調査し、石炭船との比較を行い、長期滞船の影響を受ける船種を確認した。

#### 4. 考察

一般に移入生物の集団は、移入の際に少数の個体だけが運ばれ、それらが増殖して新たな集団が作られるため原産地の自然集団と比べると遺伝的な多様性が小さい。本研究においても、先行するD-04プロジェクトで解析した褐藻ワカメや本研究で解析した緑藻アナアオサ、褐藻ムチモの場合（何れも極東アジア原産）はこの傾向が認められ、移入先の集団は顕著に小さな遺伝的多様性を示した。一方、ココポーマアカフジツボやドロフジツボは移入集団と考えられる集団でも比較的高い遺伝的多様性を示し、また褐藻ヒラムチモでは世界各地の集団で遺伝的な多様性が攪乱されていることが明らかになった。これは、古くから遠距離の航海を行う船で用いられてきたバラスト（船の航行時の安定のために重りとして用いられる石）やそれにとって代わったバラスト水、あるいは船体付着を介した海洋生物移入が、大航海時代以降、数百年の単位で、大陸間で双方向に引き起こされてきたことによると考えられる。

リアルタイムPCR法による高精度かつ高感度の検出から、越境移動リスクの高い有害植物プランクトン種がバラストタンク内堆積物中に残存するだけでなく、実際に外洋におけるバラスト水交換時やオーストラリア港湾で排出されるバラスト水中に含まれていることが明らかとなった。また同バラストタンク内の2ヶ月に及ぶ培養チャンバー試験の結果でも、調査したいずれの種も死滅することはなく、船舶バラスト水を介した越境移動の可能性が強く示唆された。船体付着試料とバラストタンク内試料に共通する種はごく一部で、有害種は含まれていなかったが、船体付着試料からは毒性種を多く含むことで知られるシアノバクテリアの高い多様性がDGGE法により検出されており、今後注意を払う必要性が示された。また航海途中で付着したと考えられる南方系の付着性種の存在から示唆されるように、船体への付着と越境移動は、船舶航路上で双方向的かつ連続的に起きることが明らかになった。

本研究においては日本の主要な国際貿易港では外来性カイアシ類の出現は確認されなかったが、日本の特定の貿易港からバラスト水を介してサンフランシスコ湾に導入されたと考えられるカイアシ類の存在が遺伝子比較によって示された。日本の国際貿易港ではバラスト水の持ち出し量は持ち込み量を大きく上回る。このことは外国への導入原因となる一方、国内の貿易港には外来種が導入されにくい原因となっていると考える。つまり、廃棄されるバラスト水の起源が日本と同一種が分布する東アジア近辺であるか、あるいはコンテナ船のようにバラスト水が長期間バラストタンクに貯蔵されるため排出時には生きたカイアシ類が含まれない可能性が示唆された。サンフランシスコ湾に中国から導入されたカイアシ類2種は導入元では塩分1~10の水域に分布の中心があることが判明した。また、遺伝子比較によって東アジアには多くの隠蔽種が存在することが明らかになり、北米などに導入された種がどの種に相当するのか今後、精査する必要がある。

効果の高い船体汚損防止剤であった有機スズなどの生物殺滅成分の使用禁止で、船体付着によって移動する生物が増加し、移入リスクが高くなる可能性が指摘されている。これに対して、シリコン系やフルオロ系の生物殺滅成分を含まず、付着生物を早期に脱落させることで船体汚損を防止する新規塗料が開発され、利用が拡大しつつある。そこで国際航路の大型輸送船へのパッチ塗装試験を行い、これらの新規塗料の生物付着防止機能の検証を行った。その結果、肉眼的な大きさの生物の付着防止については、在来型の塗料と同等の付着防止機能が認められたが、これまで比較的少なかった微小藻類（珪藻・褐藻）の付着は増えることが確認され、新規塗料の使用拡大が、移入生物の種類に変化をもたらす可能性が高いことが示された。またこれらの新規塗料は付着生物脱落のメカニズムとして船舶の航行が必要であり、長期滞船により付着生物が増加することも危惧される。

本研究における船舶を介したフジツボ類の移入に関するリスクアセスメントにより、どの海域からどのような船舶によってどのような種がわが国の港へ持ち込まれる可能性が高いかを予測する方法のひとつを提示した。しかし、移入リスクを判断する上では、このほかにも検証しなければならない項目が残されている。例えば「汚損が少ない船は汚損が多い船より移入リスクは低いと言えるか、船舶のメンテナンスの時期や期間はどのように移入リスクに関係するか、移入種候補が移入・定着し、害生物となる危険性をどのように評価するか」などである。このような点の検証を経た上で個々の船舶が持つ移入リスクを評価する総合的な方法を確立する必要がある。しかし、それを確立した後でも移入リスクを回避するためには、入港船舶に対して、船体汚損状況に関する情報提供の求め方や高い移入リスクを持った船舶への警告・対処方法など実際に解決しなければならない問

題が存在する。このような問題を解決するにはわが国の状況に合ったリスク管理手法の開発を行なうことが必要であり、今後の研究課題であると考え。

海運の国際物流に伴う生物移動は、船舶移動に大きく影響を受ける。国際貿易の進展に伴い船舶隻数が増加し移動域も拡大していることから生物移動は、世界的視点で考える必要がある。中でも船舶の長期滞船（停泊）は、船体付着を大幅に進行させ生物移動に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。従って船体付着を介した生物移入リスクを下げるためには、マクロ的見地からは長期滞船を発生させないような貿易形態を構築することや、停泊期間を短縮化するための港湾施設能力の拡充が重要かつ必要である。特に オーストラリアの石炭積み出し港湾においては、積荷設備の機能向上と内陸輸送能力の向上が望まれる。また、ミクロ的には船体付着を防止するための港湾設備の改善、塗装の衰耗・剥離防止のための船体構造・船体整備方法の改善、滞船中の船舶運用（Short Navigation、錨地の選定等）、塗装による防汚を補完する界面活性剤の利用などが有効であると考え。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

その結果、本研究における大型輸送船の船体付着生物多様性調査と、その際に採集された生物試料の遺伝子マーカーを用いた解析がきっかけとなって、新たな移入生物（ココポーマアカフジツボ）の日本沿岸における定着と拡大が明らかになり、その調査対象や研究方法の有効性が検証された。

一方、すでに移入・定着したと考えられる生物群については、さらなる移入・拡散を防止し、また駆除に向けた対策を検討する上でも正確な種レベルの分類に基づきその世界規模の分布域を明らかにし、起源や移入経路を推定することが必要である。そこでこの課題については、移入集団を含む各地域集団の遺伝的多様性を比較することで本来の分布域や移入集団の起源を推定する手法を導入し、その有効性について本研究において検証した。その結果、海藻類については、移入種の代表とされていた海藻類（ヒラムチモ）が定説に反して在来種である可能性が高いことが示されたほか、日本から海外に拡散した種（アナアオサ、ムチモ）についても、その起源について科学的な根拠を与えることができた。また、動物プランクトンであるカイアシ類については、バラスト水などを介して北米太平洋沿岸に移入した集団の起源が日本の特定の港あるいは中国の汽水域にあることを明らかにし、またこれらの生物群に多くの隠蔽種が含まれていることが示され、科学的に重要な発見がなされた。しかし、本研究における詳細な調査によっても、日本の国際貿易港において外来性カイアシ類の移入は確認されなかった。このことはフジツボ類、イガイ類、甲殻類などの付着生物で非常に多くの移入生物が定着していることと顕著な対照を示し、今後の研究に向けて興味深い事実が明らかになった。

船舶に伴って移動する海洋生物の全てについてその港湾、海岸への移入・定着を詳細にモニタリングすることは困難である。このため、移入後生態系に及ぼす影響が大きいと予想される生物群や、有害生物などを重点的に調査・研究する必要があるが、さらにその移入・定着可能性を解析し、よりリスクの高いものを明らかにすることが有効である。その意味で、本研究において、主要な船体付着生物であり、また移入後、短期間で排他的に分布を拡大していったことが明らかになったココポーマアカフジツボを含むフジツボ類について、はじめてリスクアセスメントを実施したことの意義は大きいと考える。

一方、バラスト水中の生物密度は希薄で、タンク内の堆積物の大部分は非生物粒子からなるため、固定試料や培養試料の解析で確認できる植物プランクトン種は限られていた。これに対し、リアルタイムPCR法の導入によって、これまで検出が困難であったバラストタンク内のシストなどからも、有害植物プランクトンの検出が可能になり、さらにタンク内に存在するプランクトン量、シスト量の定量的な比較も可能になった。さらに船体付着生物（バクテリア、微細藻類、アオサ類、フジツボ類）などについても、複数種が混在し、また形態情報による同定が困難な若い個体や休眠胞子（シスト）などの生物試料から抽出されたDNA（環境DNA）から、それらの生物の存在や種同定が可能な手法として、DGGE法を検討し、またそれらの対象生物の種同定に有効な部位のDNA塩基配列情報を蓄積し、遺伝子データベースとして公開したことは科学的にも重要な貢献である。このようにこれまでの分布情報と形態学的な比較だけに頼っていた外来種研究に新しい研究手法のスタンダードを持ち込んだことは、大きな意義があると考え。

生物の自然分散（拡散）と人間活動が介在することによって拡散される生物集団の遺伝的組成に違いがあることを明らかにした。すなわち、歴史的には生物の分布圏外への移住は、パイオニアとなる小集団の移住によるボトルネック効果によって通常の地理的種分化などと異なり、進化の強い引き金になり、集団間の遺伝的特性が地理的に異なるというのが一般的認識であった。その際集団のサイズが移住先の集団の遺伝子組成に大きく関与することが判っていた。しかし、外来性フジツボなどの解析から明らかになった結果は、小集団の分散という自然分散と異なり、大量の付着生物が大型船舶の船体付着を介して長期的にかつ頻繁に運ばれる結果、移住先集団は元々の集団と潜在的に同じ遺伝子組成を持ったものになる可能性が高いことを示している。すなわち、移住集団が船体

付着という人為的理由から十分大きなサイズであれば、移住前と移住後の集団の間では大きな遺伝的な差異が生じないような遺伝子交流の存在が示唆された。

## (2) 環境政策への貢献

本研究で得られた情報は、環境省中央環境審議会瀬戸内部会における中長期ビジョン検討における情報提供、北太平洋海域の環境・漁業行政にかかわる課題を科学的に解明するための政府間機関である北太平洋海洋科学機構(PICES)における沿岸移入生物に関する情報提供と意見交換、国際海事機構(IMO)における、バラスト水管理条約や船体付着生物の防止に向けた検討などに反映されている。特に、バラストタンク内の底生生物や動植物プランクトンの動態や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。また、船体付着生物の動態と多様性に関する研究成果はIMOにおける船体付着生物の防止に向けた国際条約の検討において有益な情報を提供すると考えている。

また、本研究の成果、特にフジツボ類、海藻類などの船体付着を介した移入の拡大が大きな環境問題であることが新聞報道・論説により広く紹介、問題提起され、社会全体に対して今後の施策検討の必要性をアピールできた。

## 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、神戸大学自然科学系先端融合研究環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年生まれ、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)：大塚攻

1959年生まれ、京都大学大学院理学研究科博士後期課程中退、農学博士、現在、広島大学大学院生命圏科学研究科 教授

(4)：大谷道夫

1947年生まれ、東京水産大学漁船運用学専攻科修了、現在、(株)海洋生態研究所 主任研究員

(5)：山口寿之

1944年生まれ、東京大学大学院理学研究科修了、理学博士、現在、千葉大学理学研究科 教授

(6)：福代康夫

1948年生まれ、東京大学大学院農学系研究科博士課程2年次中退、農学博士、現在、東京大学アジア生物資源環境研究センター 教授

(7)：金子仁

1950年生まれ、神戸大学大学院自然科学研究科博士課程修了、工学博士、現在、東海大学海洋学部 教授

## 7. 成果発表状況

(1)査読付き論文

- 1) Kawai, H., Shimada, S., Hanyuda, T., Suzuki, T., Gamagori City Office: Species diversity and seasonal changes of dominant *Ulva* species (Ulvales, Ulvophyceae) in Mikawa Bay, Japan, deduced from ITS2 rDNA region sequences. *Algae*, 22, 221-228. (2007)
- 2) 大塚攻・大谷道夫・Soh H.Y.・Kim M.J.・Lee W.C.・Huang, C.J.・Kimmerer W.J.・下埜敬紀・羽生田岳昭・川井浩史・上田拓史・山口愛果「日本の国際貿易港における外来性カイアシ類の出現の有無とバラスト水の関連」日本プランクトン学会報 55, 115-126. (2008)
- 3) Seong, Y.M., Ohtsuka, S., Ueda, H., Soh, H.Y.: *Acartia (Odontacartia) ohtsukai* Ueda and Bucklin, 2006 (Copepoda, Calanoida, Acartiidae): first record of its occurrence in Korean waters and habitat segregation from its sibling species *A. pacifica* Steuer, 1915. *Zootaxa*, 1841: 61-64. (2008)



- 4) 川井浩史・上井進也・羽生田岳昭・鳶田智・Judie Broom・Wendy Nelson・Frederique Viard「遺伝子マーカーを用いた褐藻ワカメ、緑藻アオサ類移入集団の起源と動態の解析」日本生態学会誌 59: 145-152. (2009)
- 5) 大塚攻・谷村篤・町田龍二・西田周平「浮遊性カイアシ類の両極および反赤道分布について」. 化石 85: 6-13. (2009)
- 6) Demura, M., Noel, M.-H., Kasai, F., Watanabe, M.M., Kawachi, M.: Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* and *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity. *Phycologia*, 48: 518-535. (2009)
- 7) 金子仁・津金正典・伊藤格「界面活性剤による船体への海洋生物付着防止」日本航海学会論文集 121: 77-83 (2009)
- 8) Tomaru, A., Kawachi, M., Demura, M., Fukuyo, Y.: Denaturing gradient gel electrophoresis shows that bacterial communities change with mid-ocean ballast water exchange. *Mar. Poll. Bull.* 60: 299-302. (2010)
- 9) Kogishi, K., Kitayama, T., Miller, K. A., Hanyuda, T., Kawai, H.: Phylogeography of *Cutleria cylindrica* (Cutleriales, Phaeophyceae) in northeastern Asia, and the identity of an introduced population in California. *J. Phycol.*, in press (2010)
- 10) Ohtsuka S, Tomikawa K, Shang X: A new species of *Hemicyclops* (Crustacea: Copepoda: Cyclopoida) found in plankton at the mouth of the Jiulong River, southern China. *Species Diversity* 15. in press (2010)
- 11) 山口寿之・木内将史・堀越彩香・岡本研・川井浩史「東京湾の移入種ココポーマアカフジツボ - 2004-2005年の灯浮標サンプルの再同定」 *Sessile Organisms* 27(2) 印刷中 (2010)

D-072 大型船舶のバラスト水・船体付着で越境移動する海洋生物の動態把握と定着の早期検出  
 (1) 海藻類の移入・定着の現況把握と起源・拡散経路の推定、船体付着防止策の検討と環境に  
 及ぼす影響評価

神戸大学 自然科学系先端融合研究環 内海域環境教育研究センター 川井浩史・羽生田岳昭  
 神戸大学 海事科学研究科 海事科学専攻 岡村秀雄

<研究協力機関>

神戸大学 理学部生物学科

野澤敬

神戸市環境保健研究所

八木正博

平成19～21年度合計予算額 49,026千円

(うち、平成21年度予算額 14,836千円)

※予算額には、間接経費を含む。

[要旨] 近年ヨーロッパや北米への移入が示唆されていたアジア原産の緑藻アオサは、ニュージーランドでは在来種であるとの結論が示されており、疑問が残っていた。そこで世界各地の集団につき遺伝子解析を行った結果、極東アジアを自生地とし、人為移入により世界各地に急速に拡散したことが確認された。欧州原産の褐藻ヒラムチモは船舶を介して日本に移入したとされてきたが、世界各地の集団について遺伝子解析を行った結果、日本周辺でのみ高い遺伝的多様性が認められ、定説に反して日本の在来種であると結論した。一方、東アジア原産の近縁種ムチモは、同じく遺伝子による解析から、津軽海峡に見られる無性繁殖集団が米国太平洋沿岸に移入したことを示した。移入付着生物検出手法の標準化を目指して、PICES WG-21において提案されている底生生物付着板を大阪湾の2カ所に設置し、モニタリングを実施した結果、底生生物付着基質としての有効性が検証された。プレート上の環境試料から遺伝子マーカーによる同定を行う手法の開発を目指して、フジツボ類、アオサ類について最低限のPCRと塩基配列決定により移入リスクが高い種の同定を行える18S rDNA部位を明らかにし、DGGE法による分離の条件検討を行った。

日豪間の大型運搬船を対象に、船体後部の高頻度生物付着領域に2種類のバイオサイドフリー船底塗料をパッチ塗装し、通常塗料との付着生物の違いについてモニタリング調査を実施し、また付着藻類の組成を培養により比較した。その結果いずれの試験塗料表面にも肉眼で確認できる大きさの付着生物は認められなかったものの、微細藻類の付着が視認できバイオサイドフリー塗料区には珪藻類やシオミドロ属藻類が、バイオサイド塗料区では緑藻類の付着が多く見られ、バイオサイドフリー塗料の使用増加により移入藻類の多様性が変化する可能性が示された。パッチ塗装した2種類の塗料および従来からのバイオサイド塗料を用いて45日間の溶出試験を実施し、バイオアッセイを行ったところ、バイオサイドフリー塗料からの溶出液には毒性は認められなかった。

[キーワード] 船体付着、海藻類、遺伝子マーカー、防汚剤、越境移動

## 1. はじめに

人間の経済活動の活発化とグローバル化により、海の生態系においてもさまざまな沿岸性の海洋生物が大洋を越えて移入・定着し、移入先の生態系や漁業に深刻な影響を与える例が報告されている。これらの海洋生物の人為的な移入・定着については、船体付着やバラスト水などの船舶を介した移動と、水産活動に伴う意図的な導入や他の生物に混じって運ばれる非意図的な移入が代表的なものとされているが、前者については近年の船舶の大型化・高速化でさまざまな沿岸生物が船舶によって生きたまま運ばれる可能性が高まった。この際、大陸間航路の大型船舶が頻繁に入出港する国際港湾は、水質汚濁の進んだ閉鎖性海域に設置されることが多く、在来種の生物相が貧弱であることから、大型船舶に付着する生物群が持ち込まれ、あるいは持ち出される、いわば海洋生物の移入・移出のホットスポットとなる可能性が高い。また、これらの港湾は、様々なタイプの運搬船、フェリー、漁船などが頻繁に入港・停泊するため、移入生物の周辺海域への二次拡散源となることも危惧される。これに対して北太平洋海洋科学機構 (PICES) において移入の早期検出に向けたネットワーク整備と検出手法の標準化が進められているが、その移入の実態については依然として不明な点が多い。一方、「船舶における有害な防汚方法の管理に関する国際条約 (AFS条約)」が2008年9月に発効し、船体表面へのバイオサイド (生物殺滅剤) として機能する有機スズ化合物を含有する防汚塗料の塗装が禁止された。このため、今後は有機スズ化合物以外のバイオサイドを含む防汚塗料、またはバイオサイドを含まない船底塗料が用いられることとなるが、この場合、これまでより船体付着生物が増加したり、付着生物相が変化したりすることにより、生物移入のリスクが大きくなる可能性が危惧される。また一方では、バイオサイドを含まないとされる塗料にも毒性があるとする報告もあり<sup>1)</sup>、塗料毎の安全性についても留意する必要がある。

本研究の遂行に当たっては、研究対象とする多様な海洋生物の専門家の参加が不可欠であることと、外国航路の大型船舶の付着生物やバラスト水の調査を実施すること自体に様々な困難や多くの経費が必要であることから、複数のサブグループが共通の大型輸送船 (日豪航路のバラ積み運搬船「A」) を対象として、対象生物を分担し、また異なる研究手法で実施する形で、密接な連携の下に実施した。本報告ではそのうち、主に海藻類移入集団の起源と動態の解析、バイオサイド成分の有無の異なる船体防汚塗料が船体付着生物相に及ぼす影響と環境影響評価に関わる実験、および北太平洋海洋科学機構 (PICES) 移入生物ワーキンググループ(WG-21)による移入海洋底生生物の早期検出手法の標準化に向けた底生生物付着板を用いたモニタリングと、底に付着した生物の遺伝子マーカーを用いた同定手法の開発に関わる部分を記述する。なお、本サブグループと共同で実施した共通調査対象船「A」の付着生物調査結果に基づく付着藻類相の変化に関する解析結果の一部はサブグループ(2)の、フジツボ類の移入リスクアセスメントに関してはサブグループ(4)の、またフジツボ類の遺伝子マーカーによる同定・移入早期検出に関する結果の一部はサブグループ(5)の報告書において記述されている。

## 2. 研究目的

海藻類や底生動物などの多くの生物群は種レベルの分類が困難であったり、分類・生態に関わる研究者が少なかったりすることから、分布情報が乏しい場合が多い。このため、ある海域である生物群の分布が新たに確認された場合でも、その種に関する研究データの不足によって分布が

知られていなかった在来種であるのか、新規外来生物（移入種）であるのかを判定するのが困難な場合がしばしば見られる。そこで、遺伝子マーカーを用いた地域集団の比較によって、その種の本来の分布域を明らかにし、移入種であった場合には移入起源・経路を推定する手法の確立を目指す。また、移入生物の定着・拡散の防止には移入の早い時期に検出し、徹底した除去を行うことが有効であることが知られている。しかしながら、船体付着やバラスト水によって移入する海洋生物は国際港湾周辺にはじめに移入・定着することが多いが、港湾区域は立ち入りの制限などによって、護岸・海底などの調査を行うことは困難である。そこで、生物を付着させる付着板を栈橋などから垂下することで、簡便に付着生物の新規移入を検出し、遺伝子マーカーを用いて同定する方法の有効性の検証を目指して研究を行った。一方、船体防汚塗料における生物殺滅（バイオサイド）成分の使用制限が始まっており、このため船体付着生物が増加したり、生物種が変化したりすることが予想される。そこで、バイオサイド成分を含まない新規塗料の使用拡大が、移入生物相の変化に及ぼす影響と、新規塗料成分自体が環境へ及ぼす影響の評価を目指して以下の3つの目的に関して研究を実施する。

（1）緑藻アオサ類は、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るほか、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。また以前の本経費によるプロジェクト（D-04）において実施した大型船舶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、アオサ類は頻繁に出現しており、船舶を介した移入リスクが高いことが明らかになっている。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にもかかわらず、成長が速く寿命が比較的短いため、種レベルの同定が困難である。このため、ある地域集団が在来集団であるのか、人為的移入に基づく集団であるのかの判定ですら困難な場合が多い。実際、極東アジア原産のアナアオサ *Ulva pertusa* は、近年ヨーロッパ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おり、D-04プロジェクトによる遺伝子解析でも、少数の標本に基づく予備的な解析ではあったが、このことが確認された。しかしその一方で、ニュージーランドでは現地研究者によって行われた国土のほぼ全域にわたる採集と遺伝子解析を含むアオサ類の分布調査において、アナアオサは港湾周辺のみならず、漁業や船舶輸送活動の少ない遠隔地でも分布が確認されたことから、在来種であるとの結論が示された (Heesch et al. 2008<sup>2)</sup>)。

一方、日本へ船舶などによって運ばれ定着した外来海藻類の代表として、様々な文献や環境省がまとめた我が国の移入種（外来種）リストにヒラムチモ *Cutleria multifida* があげられている。ヒラムチモはもともと欧州で記載された種であるが、外国航路の船舶への付着により無性的に繁殖する雌個体だけの集団がオセアニア・南米に移入したとの報告が出されていた<sup>3,4)</sup>。また日本でも本種が比較的最近になってから港湾の近くで発見されたことから在来種ではなく、船を介して移入した外来種であるとの見解が出され、広く知られるようになった<sup>5)</sup>。一方、ヒラムチモと近縁の種ムチモ *Cutleria cylindrica* は日本原産であるが、分布域が大きく離れたカリフォルニアで採集されたものは、雌の個体しか発見されないことから、ヒラムチモ同様に船舶を介した移入種であるとする見解が出されていた。

そこでこれらの海藻類の移入集団を在来集団から区別し、また真に移入集団であった場合、その起源や移入・拡散経路を推定するための手法を確立するため、世界各地で採集されたアナアオサ、ムチモ、ヒラムチモにつき遺伝子解析を行い、各地集団の起源と移入経路について考察する。

(2) 沿岸域の移入付着生物検出手法の標準化を目指して、北太平洋海洋科学機構 (PICES) 移入生物ワーキンググループ (WG-21) が定めた底生生物付着板を大阪湾湾口部の岩屋港と湾奥部の深江に設置し、付着生物相の変遷をモニタリング調査した。また底生生物付着板上の代表的な付着生物である緑藻アオサ類、フジツボ類を対象に、早期に検出する目的で幼体や環境試料を用いて遺伝子マーカーにより同定する手法の開発を行う。

(3) AFS条約の発効により、有機スズ化合物を含有する防汚塗料の存在が禁止され、有機スズ防汚剤を含有する船体塗料を除去して非有機スズ系船底塗料に塗り替える措置、又はシーラーコートにより有機スズ系船底塗料を被覆する措置がとられることとなる。現在までに、環境負荷に配慮した非有機スズ系の防汚塗料が開発されているが、これらの防汚塗料に含まれるバイオサイドの環境に対する影響は十分に明らかにされていない。日本塗料工業会の登録品リスト (2005年公表) によると、我が国で販売される380の防汚システム製品のうち、364 (96%) がバイオサイドを使用し、16 (4%) がバイオサイドを含まないシリコン系塗料などのバイオサイドフリー塗料であった<sup>6)</sup>。これらバイオサイドフリー塗料は、従来の塗料と異なるメカニズム、すなわち生物の付着自体を阻害するのではなく、付着生物が徐々に脱落することで重大な付着を防ぐとされているが、その生物付着の特性については明らかではない。このため今後これらの新規塗料の使用が拡大した場合、船体への付着生物量や組成が変化することにより、移入生物の動態や移入リスクに大きな影響が及ぶ可能性がある。一方、バイオサイド塗料を使用する場合には、塗料表面から海水にバイオサイドが溶出した後に、当該物質の環境残留性、生物蓄積性、毒性が低いこと、すなわち環境への安全性が高いことが望まれる。現在使用されているバイオサイドの多くは分解性が高いことが示されているが、分解経路や分解産物に関する情報等が不足しており、環境への潜在的な悪影響がないとは言えない。そこで以下を目的として研究を行う。

- ① 外国航路の大型輸送船を対象として、高頻度生物付着部位にバイオサイドフリー塗料をパッチ塗装し、付着防止対策の効果と付着生物相の変化を解明する
- ② バイオサイドフリー塗料の水環境に及ぼす影響を評価するため、溶出試験から得られる溶出液の環境影響を明らかにする

### 3. 研究方法

#### (1) 移入海藻類の遺伝的多様性と移入起源・拡散経路の解析

##### 1) 緑藻アオサ移入集団の起源探索に関する研究

日本を含む極東アジアおよび欧州、北米、南米、豪州、ニュージーランドからアオサ類を採集し、核rDNA ITS領域塩基配列によりアオサと同定された標本の156地点247個体について、3つの異なる分子マーカー (葉緑体*atpH-atpI*介在領域、ミトコンドリア*cob-cox3*介在領域、核遺伝子マイクロサテライト領域) を用いて、各地域集団の遺伝的多様性を比較した。

##### 2) 褐藻ムチモ・ヒラムチモ集団の生活史型と遺伝的多様性

ムチモについては日本 (17地点68個体)、韓国 (1地点2個体)、カリフォルニア (2地点15個体) から採集した標本を対象に、またヒラムチモについてはH20年度までに得られていた日本 (9地点40個体)、ヨーロッパ (5地点26個体)、NZ (1地点3個体) の標本に、今年度新たに採集したオーストラリア南部 (Aldinga, Coobowie : 2地点計17個体) の標本を加えて、ミトコンドリア遺伝子*cox2*および*cox3*とその介在配列の塩基配列を決定し、地域集団毎のハプロタイプ組成を比較した。

また、ムチモについては日本(14地点102個体)、韓国(1地点2個体)、カリフォルニア(1地点15個体)を、ヒラムチモについては日本(9地点61個体)、欧州(2地点3個体)、ニュージーランド(1地点5個体)を対象に、各地域集団の配偶体の性比を、配偶子嚢の形態観察により解析した。また、ムチモ16個体(日本5地点11個体;カリフォルニア2地点5個体)について、ヒラムチモ11個体(日本6地点8個体;欧州2地点3個体)について、雌性配偶子を培養し、その生活史型を解析した。

### (2) PICES標準底生生物付着板と遺伝子マーカーを用いた移入付着生物早期検出手法の開発

北太平洋海洋科学機構(PICES)移入生物ワーキンググループ(WG-21)による底生生物付着板を大阪湾湾奥部の神戸大学海事科学部船着き場と湾口部の淡路島岩屋港に設置し(図1c)、2-3週ごとに付着板上(図1a)に固定した不織布・ビニールテープと下(図1b)に固定したプラスチックシャーレを回収し、付着藻類を光照射培養庫で培養するとともに、エタノールで固定した。

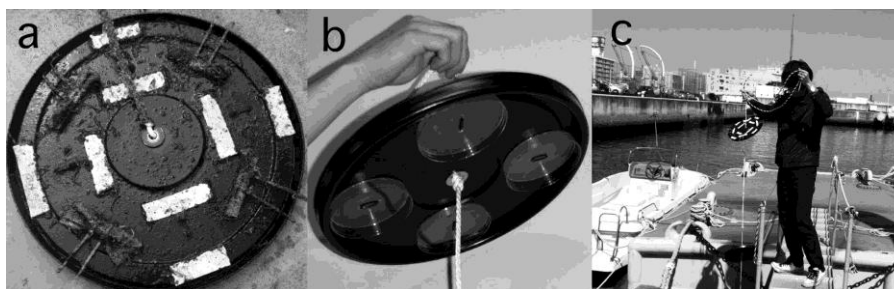
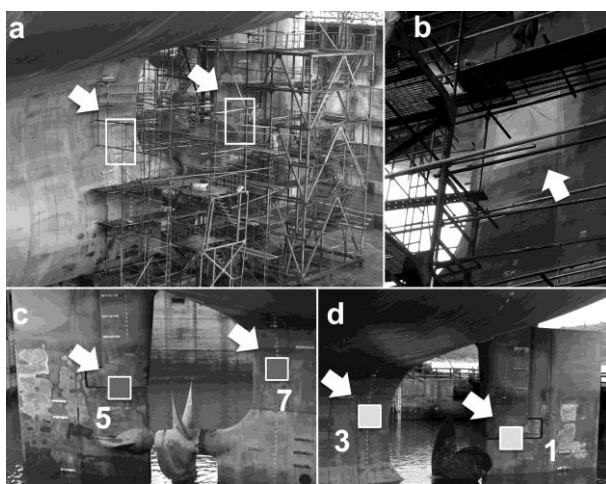


図1. PICES WG-21標準底生生物付着板(改良型)。a. 上面, b. 下面, c. 設置場所(大阪湾深江)

エタノール固定サンプルより、DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) により海藻類のDNAを、またDNeasy Tissue Kit (Quiagen) により動物のDNAを抽出し、わずかな塩基配列の違いを検出することが可能な手法であるDGGE法により、複数種の混在する可能性のあるサンプルから種レベルの同定が可能な遺伝子マーカーの探索を行った。遺伝子マーカー候補として動物(フジツボ類)については核コードの18S rDNAを対象とし、PCRにより、対象領域を増幅し、DNA塩基配列を決定した。また海藻類(アオサ類)については葉緑体コードの*rbcL*遺伝子を対象とし、データベースに登録されている塩基配列をもとに検討を行った。

### (3) バイオサイドフリー船底塗料のパッチ塗装による付着防止効果の評価

#### 1) バイオサイドフリー船底塗料のパッチ塗装実験



調査対象輸送船「A」について、日本寄港時に船首、船尾の船体付着生物の付着状況を潜水調査(2007年9月)した。その後、乾ドック時に高頻度生物付着部位(船体後部の左右2箇所、ラダーの左右2箇所)に2.0 x 0.6m区画でシリコン系のバイオサイドフリー防汚塗料を塗装し(2007年11月)、日本寄港時に潜水調査により経過観察した(2007年12月, 2008年9月, 2009年1月, 9月, 10月, 11月)。

図2. バイオサイドフリー塗料塗装実験. a, b, ドライドック時の塗装状況; c, d, 塗装実験区。右舷の2箇所（図2c, no.5,7）にフルオロタイプ塗料（塗料A）を塗布；左舷の2箇所（図2d, no.1,3）にシリコンタイプ塗料（塗料B）を塗布。

## 2) バイオサイドフリー防汚塗料の環境影響評価

上で選定した2種類のバイオサイドフリー塗料（塗料A, 塗料B）に加え、従来から使用されているバイオサイド塗料（C）を対照として用いた。塗料Cは、バイオサイドとして亜酸化銅と亜鉛ピリチオンを含有する。塗料表面積が200m<sup>2</sup>となるよう塗布したプラスチック製の円筒形試験シリンダー（直径63mm、長さ158mm）を用い、ISO（2007）<sup>7)</sup>に従って、45日間の溶出試験を実施した。試験シリンダーは通常は養生槽内に人工海水を循環させながら保持し、溶出試験では試験シリンダーを海水1.5Lに浸して60rpmで回転させ、1hr後の溶出液を得た。人工海水はASTM（2003）<sup>8)</sup>に従って調製し、0.2mmのろ過膜でろ過して用いた。溶出液1.5Lを固相カラム（SepPak tC18）を装着した吸引式固相抽出装置に通水して有機性物質を濃縮し、メタノールで脱着させた試料をジメチルスルホキシド（DMSO）1mLに転溶した。この濃縮液の濃度を100%とし（濃縮液1%は溶出液15mLに相当）、3種類のバイオアッセイで生態毒性を評価した。溶出試験は大型人工気象機内で実施し、温度は25±1°C、蛍光灯を連続照射して水面での照度を40luxとした。それぞれの塗料について、溶出試験を2回実施した。海産発光細菌*Photobacterium leiognathi* SBを用いたテストキット

（ToxScreen II、CheckLight社）で試料の毒性を評価した。溶出液試料1mLに2μLの海産発光細菌*P.leiognathi* SBを加え、直ちにルミノメーターを用いて発光量を測定し、25°Cの暗所に60分静置して発光量を測定することにより、発光阻害量としてΓ（ガンマ）値を算出した。濃縮液については試料を希釈しながら試験し、Γ=1となる時の試料の50%発光阻害濃度（60-min EC<sub>50</sub>）を算出した。試験は2回の繰返しとした。海産珪藻*Skeletonema costatum*(NIES-323)を用いて濃縮試料の毒性を評価した。初期細胞濃度が10<sup>4</sup>cells/mLとなるように接種し、20°Cの人工気象器内に静置し、連続照明下で暴露実験を行った。藻類細胞濃度は蛍光光度計を用いて72hr後まで24時間毎に*in vivo* クロロフィル量を測定し、72hr暴露後の50%生長阻害濃度（72-hour EC<sub>50</sub>）を算出した。塗料A、Bについては0、1、14、21、42、45日後の濃縮液0.01、0.001、0.0001%（溶出液150、15、1.5μLに相当）で、塗料Cについては各日の濃縮液0.01、0.001、0.0001%で、またDMSOのみについても1、0.1%で試験を行った。試験は3回の繰返しとした。水性甲殻類*Artemia salina*を用いて濃縮試料の毒性を評価した。シストから24時間以内に孵化した個体を用いた。試験容器には24wellマイクロプレートを用い、10個体/1mL/wellとして甲殻類を暴露した。このマイクロプレートを25°Cの人工気象器内の暗所に静置し、48時間後に実体顕微鏡下で生存数を計測し、生存率（%）を算出した。塗料A、B、Cについて0、14、21、31、45日後の濃縮液1、0.1%で試験を行った。試験は3回の繰返しとした。

バイオサイド塗料（C）からの溶出液には強い毒性が認められたため、毒性の原因物質を探索した。本塗料には亜酸化銅と亜鉛ピリチオンが含有されていることから、溶出液の濃縮液には銅ピリチオンが存在し、毒性を示すことが予測された。そこで、ポリマーベースの逆相カラムを用いたHPLCにより、銅ピリチオンおよび亜鉛ピリチオンを同時に定量する方法を開発した。バイオサイドフリー塗料（A）はフッ素系高分子であるため、PFOS等の有害な有機フッ素化合物が溶出する可能性がある。そこでバイオアッセイによる溶出試験後のバイオサイドフリー塗料シリンダー（A）と（B）を用いて、最長7日間、連続して回転溶出させて溶出液を調製し、17種類の有機フッ

素化合物についてLC/MS/MS分析を行った。溶出時の環境条件は、前記した溶出試験と同じとした。

#### 4. 結果・考察

##### (1) 移入海藻類の遺伝的多様性と移入起源・拡散経路の解析

##### 1) 緑藻アナアオサ移入集団の起源探索に関する研究

今回の調査で新たに分布が確認された南米チリの標本を含む世界各地（日本、韓国、ロシア、北米、チリ、豪州、ニュージーランド、フランス、イギリス、ドイツ）のアナアオサは、葉緑体遺伝子介在領域 (*atpI-atpH*) とミトコンドリア遺伝子介在領域 (*cob-cox3*) の塩基配列解析では、調査地域全体で48のハプロタイプ（遺伝子型）に分類された（図3-5）。そのうち、極東アジア（98個体）では46ハプロタイプがみられ、ハプロタイプ多様度は0.965と非常に高い値を示した（図5）。

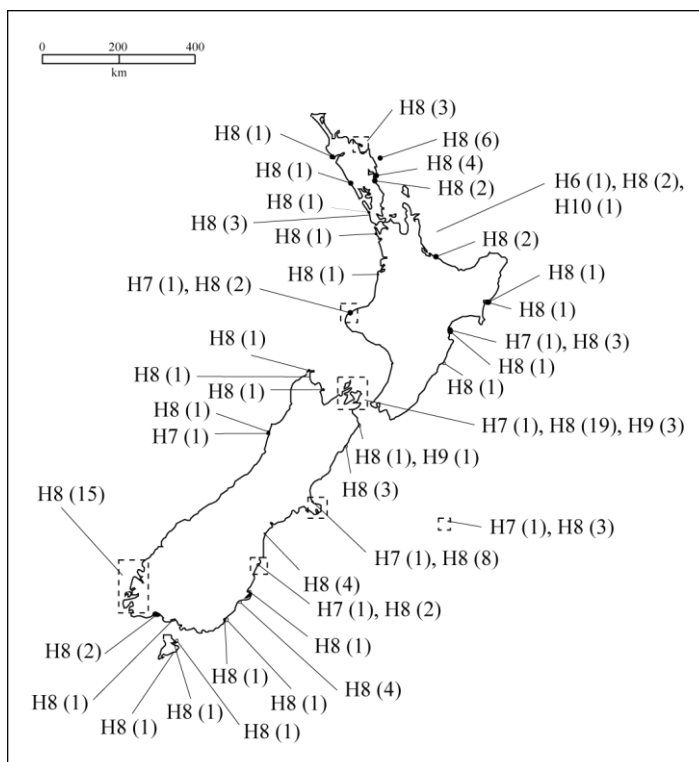
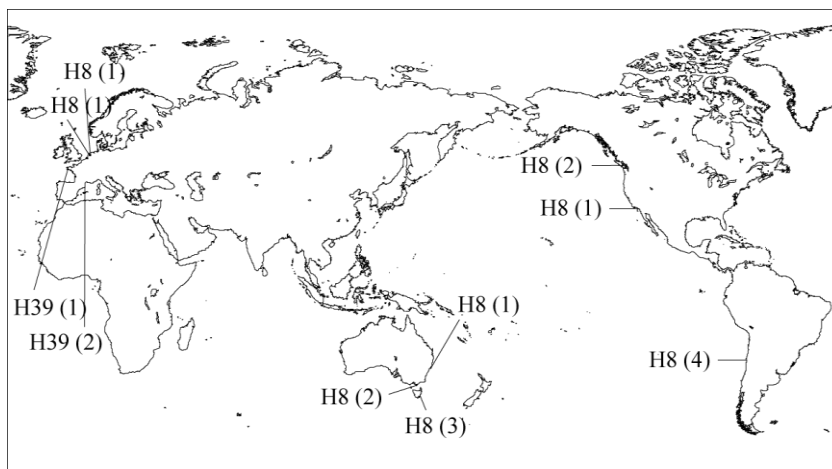


図3. (上) 葉緑体ゲノムとミトコンドリアゲノムの塩基配列に基づくアナアオサのハプロタイプの分布（極東アジア、ニュージーランドは図4, 5に示す）。括弧内の数字は調査した個体数を示す。  
図4. (左) 極東アジアでのアナアオサの葉緑体遺伝子とミトコンドリア遺伝子によるハプロタイプの分布（括弧内は個体数）。網掛けしたハプロタイプは、極東アジア以外の地域にも分布していることを示す。



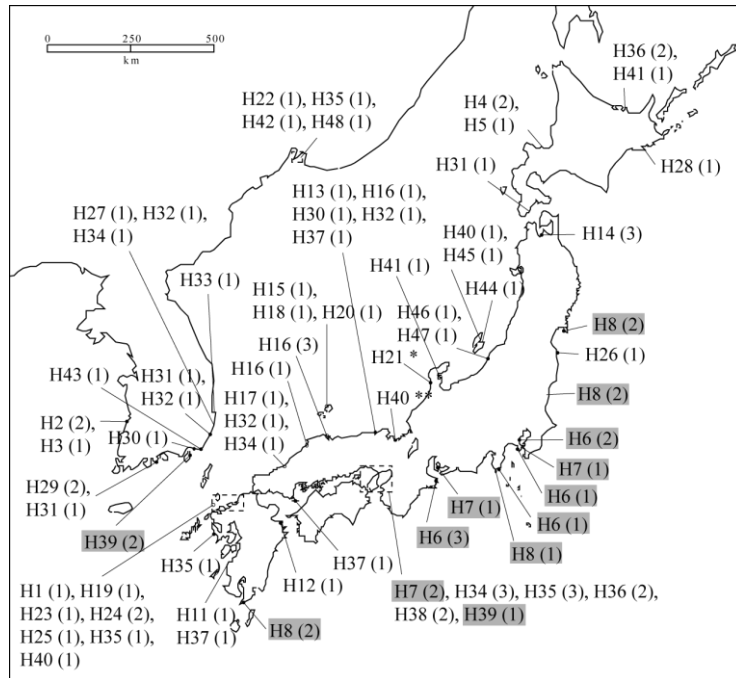


図5. ニュージーランドにおけるアナアオサの葉緑体とミトコンドリア遺伝子によるハプロタイプの分布（括弧内は個体数）。

一方、沿岸域のほぼ全域から標本が得られたニュージーランド（121個体）については、5つのハプロタイプのみがみられ、また特定のハプロタイプ（H8）が9割近く（88.4%）を占め、ハプロタイプ多様度は0.213と極東アジアに比べ顕著に低い値を示した（図4）。また、欧州では2つのハプロタイプ（H8, H39）が、北米、南米では1つのハプロタイプのみ（H8）がみられた（図3）。

一方、今回新たに開発した核遺伝子に対するマイクロサテライトマーカーを用いた解析では、十分なサンプル数が得られた極東アジアとニュージーランドの集団について解析を行い、極東アジアで14遺伝子型、ニュージーランドで6遺伝子型が見出された（図6、7）。葉緑体遺伝子、ミトコンドリア遺伝子による解析と同様、極東アジア以外の地域では極東アジアに比べ遺伝的多様性が顕著に低く、また極東アジアにも見られる特定の遺伝子型（G4）が84.6%を占めていた。

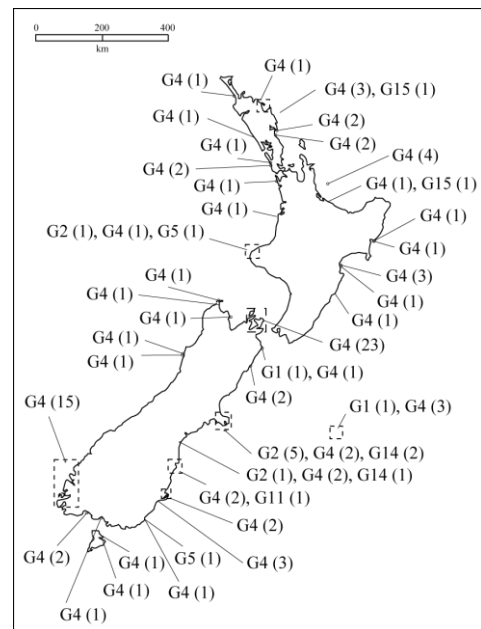
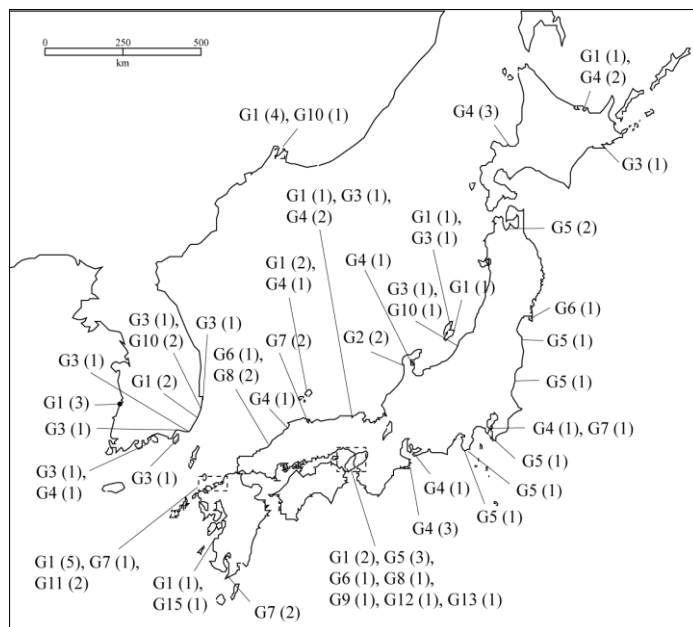


図6. (左) 極東アジアでのアナアオサのマイクロサテライト解析による遺伝子型の分布（括弧は個体数）。  
図7. (右) ニュージーランドでのアナアオサのマイクロサテライト解析による遺伝子型の分布（括弧内は個体数）。

これらの結果は、極東アジア以外の地域のアナアオサ集団は、遺伝的多様性が極めて低いこと

な母集団に由来することを示唆しており、移入に伴うボトルネック・創始者効果によると解釈される。このため、極東アジア以外の集団はニュージーランドも含めいずれも極東アジアからの人為的な移入に基づいていることが確認された。また越境移入の起源は、オセアニアと北米、南米については日本の太平洋沿岸の集団からの一次的あるいは二次的な移入であると考えられる。一方、欧州の集団については、ワカメや他の海藻類と同様に、水産目的で導入されたカキの稚貝に伴って、移入したと考えられ、今回の解析でも日本周辺で一般的なハプロタイプに加えて、日本の一部（大阪湾）と韓国でしか確認されていないハプロタイプが含まれていた。このため、移入が頻繁に起こっており、また多様な経路で移入した可能性がある。

## 2) 褐藻ムチモ・ヒラムチモ集団の生活史型と遺伝的多様性

日本周辺及びカリフォルニアのムチモ標本は、ミトコンドリア *cox2*・*cox3* 遺伝子、および *cox3* 遺伝子に隣接する遺伝子間領域と ORF 領域の塩基配列から、全体で 23 のハプロタイプ (A-W) に分類された (図 8、9)。このうち日本周辺では 23 すべてのハプロタイプがみられたが、それぞれの地域集団内でもある程度の遺伝的多様性が認められ、また地域間では地理的に遠いほど遺伝的にも遠くなる傾向 (すなわち有性生殖による遺伝子交流が起こりやすい近隣の集団同士は遺伝的に近縁なものが多く、地理的に離れたところでは遠くなる) がみられた。一方、カリフォルニアのムチモは、15 個体全てが同じハプロタイプで、遺伝的に均一であった。この北米集団のハプロタイプは津軽海峡大間、韓国、九州北部 (志賀島) の 3 集団に同じタイプが見られた。

ムチモ配偶体は本来雌雄異株で、野外で採集される個体 (配偶体) には通常、雄と雌の両方の個体が含まれる。しかし、津軽海峡に面する大間や函館の周辺では雌の個体しか採集されない海域があることが報告されており、この集団では雌の生殖細胞が単為生殖することにより、雌の個体だけが無性的に繁殖している<sup>9)</sup>。一方、カリフォルニアで採集されたムチモ 15 個体もすべて雌で、また無性的に繁殖する能力を持っていることが培養実験により確かめられた (図 10)。これに対して、韓国と九州北部の集団は雄だけ、または雄と雌の両方の個体が採集されており、無性繁殖集団ではない。このため、遺伝子マーカーに解析と生活史型の両方から判断して、北米に生育するムチモはこれまでの仮説通り、日本周辺からおそらく船を介して運ばれた移入集団で、また大間のような無性的に繁殖している集団に由来することが明らかになった。

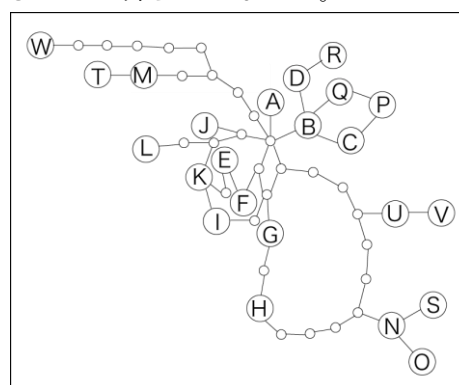
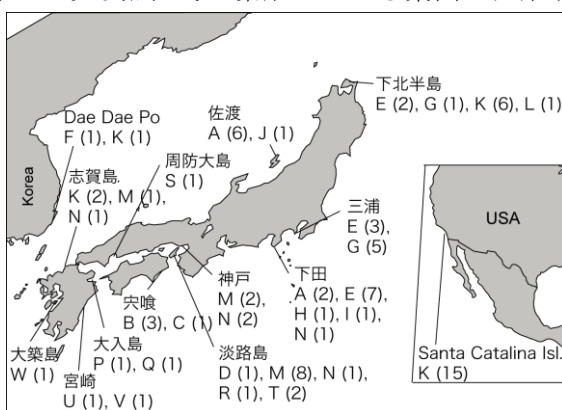
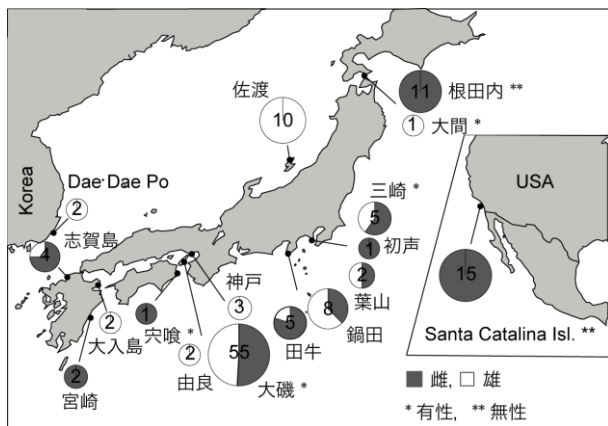


図 8. (左) ミトコンドリア遺伝子にもとづくムチモのハプロタイプ (A-W) の分布 (括弧内は個体数)。

図 9. (右) ハプロタイプ間の関係を示す最節約ネットワーク図

カリフォルニアやメキシコ・パハカリフォルニア海域では、最近ワカメの移入・繁殖が大きな環境問題になっているほか、最近になって新たなホンダワラ類 (シダモク) も移入・定着してい



ることが明らかになり (D-04プロジェクト成果、10) 同じような経路・メカニズムで日本沿岸からの移入が起こっていると考えられる。これらの種は何れも雌雄同株または単為発生による無性生殖を行うか、大量の子孫を作る一年生の海藻類である点で共通している。

図10. ムチモ地域集団の性比と生活史型  
\*は有性の生活史が観察された集団を、\*\*は無性の生活史が観察された集団を示す。

一方、ヒラムチモについては、H20年度までに調査した標本に、H21年度に新たにフランスの地中海沿岸 (Cannes, Antibes, Villefranche) とギリシャ・レスボス島において採集した標本を加えてミトコンドリア *cox2* 遺伝子と *cox3* 遺伝子、加えて *cox3* 遺伝子に隣接した遺伝子間領域と ORF 領域の塩基配列を決定し、個体間で比較した。その結果、全体で10のハプロタイプ (H1-H10) が認められた (図11)。このうち日本のヒラムチモ (9集団40個体) は7つのハプロタイプ (H2, H5-H10) を示し、ハプロタイプ多様度は  $0.6572 \pm 0.0503$ 、ヌクレオチド多様度は  $0.007269 \pm 0.003805$  であった。一方、自生地であると考えられているヨーロッパのヒラムチモ (5集団20個体) は3つのハプロタイプ (H2, H3, H10) を示し、ハプロタイプ多様度は  $0.1857 \pm 0.1102$ 、塩基多様度は  $0.002717 \pm 0.001621$  であった。

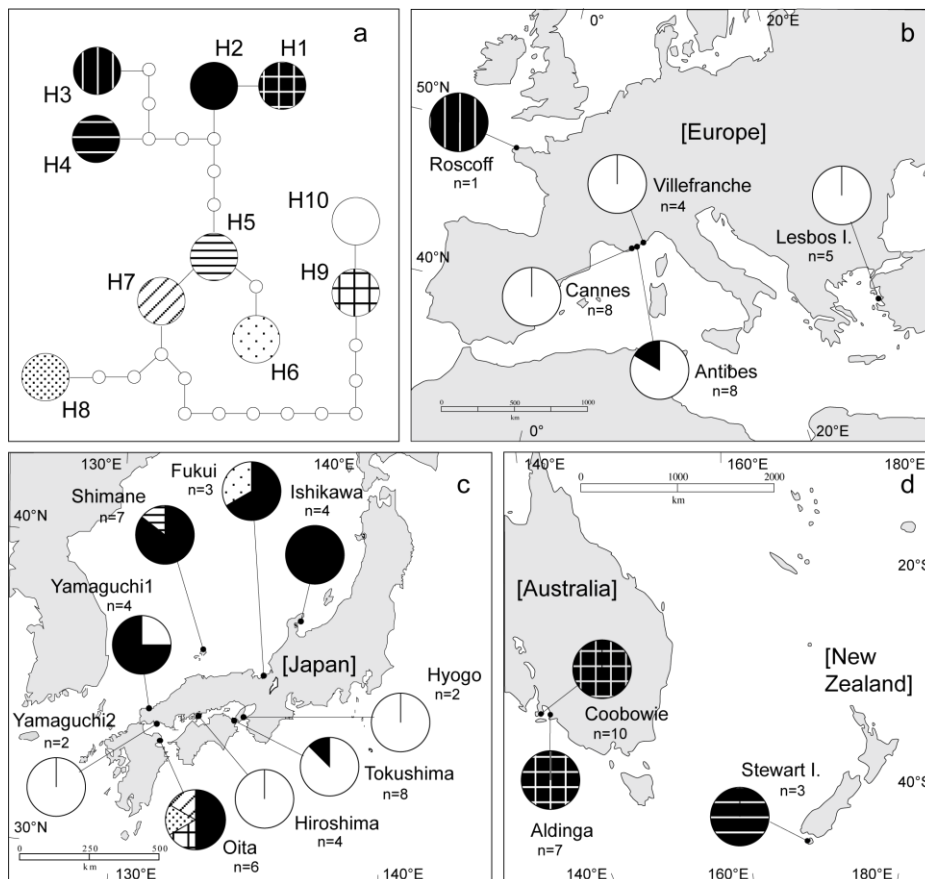


図11. a: ハプロタイプの最節約ネットワーク、b-d: ミトコンドリアゲノムの塩基配列 (86個体、1227bp) にもとづくヒラムチモのハプロタイプ (H1-H10) の分布 (b: ヨーロッパ、c: 極東アジア、d: オセアニア)

日本と同様に越境移入の可能性が指摘されているニュージーランドのヒラムチモ（1集団3個体）は1つのハプロタイプ（H4）を示し、オーストラリアのヒラムチモ（2集団17個体）も1つのハプロタイプ（H1）のみを示した。日本のヒラムチモのハプロタイプ多様度およびヌクレオチド多様度はヨーロッパのヒラムチモのそれを大きく上回っており、ヌクレオチド多様度についてはムチモ（ $0.004776 \pm 0.002538$ ）よりも高い値を示した。こうした遺伝的多様性の高さの要因として、ヒラムチモが多系統群あるいは側系統群である可能性も考えられたが、系統解析の結果はヒラムチモの単系統性を強く支持するものであった（図12）。

またこの2つのグループはそれぞれ地理的なまとまり（主に日本海沿岸の5集団と瀬戸内海の4集団）を示しており、地理的な距離と遺伝的な距離には弱い正の相関が見られた（図13）。これらの結果はいずれもヒラムチモが日本の在来種であることを示唆しており、タイプ産地であるヨーロッパで最初にその生育が報告された1801年<sup>11)</sup>以前に日本沿岸からヨーロッパに移入した可能性を示している。

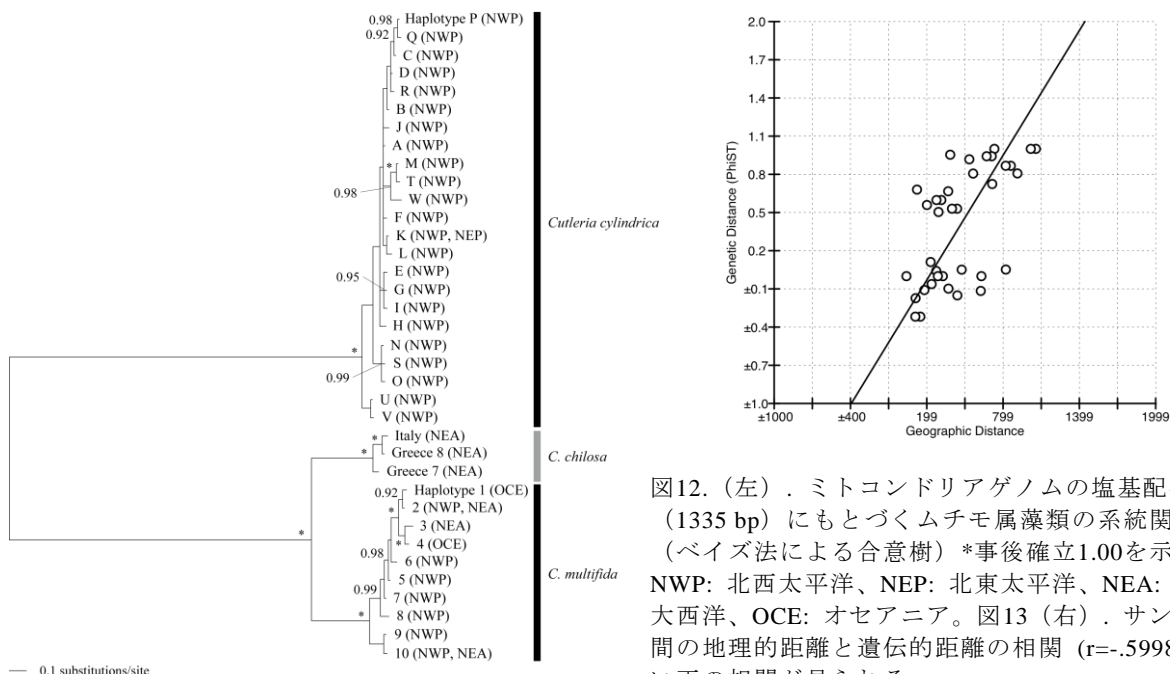


図12. (左) . ミトコンドリアゲノムの塩基配列（1335 bp）にもとづくムチモ属藻類の系統関係（ベイズ法による合意樹）\*事後確立1.00を示す、NWP: 北西太平洋、NEP: 北東太平洋、NEA: 北東大西洋、OCE: オセアニア。図13 (右) . サンプル間の地理的距離と遺伝的距離の相関 ( $r = -0.5998$ )。弱い正の相関が見られる。

## (2) PICES標準底生生物付着板と遺伝子マーカーを用いた移入付着生物早期検出手法の開発

### 1) PICES標準底生生物付着板の改良と設置

PICES標底生生物付着板は、カナダの研究グループにより主として付着動物（特にホヤ類）を移入の早期検出を目指して考案・製作され、中国、韓国、米国などの加盟国で標準化に向けた実証実験が行われている。本研究では、海藻類の移入の検出も効果的に行えるよう、上面に不織布と剥離容易な白色のビニールテープを設置し、大阪湾の湾奥部（深江）と湾口部（岩屋港）に設置し、生物付着の定期的モニタリングを実施した。その結果、設置後2週間程度で、珪藻類のマットやそれを摂食するワレカラなどの動物の着生が認められ、2ヶ月程度で表面全体が海藻類や底生動物で被われるようになった。設置9ヶ月で、海藻類の付着が湾奥部で7種、湾口部で14種確認された他、海産動物については湾奥部で27種、湾口部で32種が確認された。このうち、海産移入種とされる種は両地点で計11種が確認され、またこれまで大阪湾では確認されていなかったアミメ

フジツボが付着するなど、その底生生物付着基質としての有効性が検証された。また、これら移入種については、湾口部に比べ湾奥部により多くの種が見られる傾向が見られ（湾口部6種、湾奥部8種）、新規移入生物の検出に適した性質を持っていることが確認された。

## 2) DGGE法を利用した移入フジツボ類の早期検出方法の確立

<i>Amphibalanus reticulatus</i>	CGTCTATGTCGCGCCATCTGCCCC TCTGCGCGTACGGCG-CTCTTGGAGTGACGA
<i>A. eburneus</i>	CGTCTATGCCGTGCCATTTACCC TCTGCGCGTACGGCG-CTCTTGGAGTGACGA
<i>A. amphitrite</i>	CGTCTATGCCGTGCCATCTGCCCC TCTGCGCGTACGGCG-TTCTTGGAAATGACTA
<i>Fistulobalanus kondakovi</i>	CGTCTATGCCGTGCCATCTGCCCC TCTGCGCGTACGGCG-TTCTTGGAAATGACGA
<i>F. albicostatus</i>	CGTCTATGCCGTGCCATCTGCCCC TCTGCGCGTACGGCG-TTCTTGGAGTGACGA
<i>Tetraclita squamosa</i>	CNAATATCCTGTAGCATCCGATT TCTGCGCGTACGGCG-ATCTTGGATTGACGA
<i>T. purpulescens</i>	CNAATATCCTGTAGCATCCGATT TCTGCGCGTACGGCG-ATCTTGGATTGACGA
<i>T. japonica</i>	CGAATATCCCGCGCATCTGATT TCTGCGCGTACGGCG-ATCTTGGATTGACGA
<i>T. panamensis</i>	NNCATACGCGCGCCATCCGATT TCTGCGCGTACGGCG-ACCTCCGATTGACGA
<i>Chthamalus challengerii</i>	CGAATATCCTGTAGCATCTGATT TCTGCGCGTACGGCG-ATCTTGGATTGACGA
<i>Yamaguchiella coeruleusens</i>	CATATATCCCGTGGCATCCGATT TCTGCGCGTACGGCG-ATCTTGGATTGACGA
<i>Balanus trigonus</i>	CGTCTAT-CCGTGCTACCTGCCCC TCCACTTGGAAATGCG-GTCTTGGATTGGCGT
<i>Megabalanus volcano</i>	CGACTATGCCACGCCACCCGCC TCTGCTAGTAGCGGGCG-GTCTTGTATTGGGGAC
<i>M. oculator</i>	CGACTATGCCACGCCACCCGCC TCCGCTAGTAGCGGGCG-GTCTTGTATTGGGGAC
<i>M. rosa</i>	CGACCATGTCATGCCACCCGCC TCCGCTAGTAGCGGGCG-GTCTTGTATC-GGGAC
<i>M. coccopoma</i>	CGACTATGTCATGCCACCCGCC TCCGCTAGTAGCGGGCGTCTTGTATTGGGGAC
<i>Megabalanus sp.</i>	CGACTCTGTGCGCGCCGCCGCC TACCGT AGTGC GTA GCACCGT ATTGGGGAC

図14. フジツボ類（17種）の18S rDNA 遺伝子の塩基配列（配列間で変異がある部分のみを抜粋）点線の枠はDGGE法に用いた領域を示す。

日本産および、本研究における実船調査において大型船舶での船体付着が確認されたが現時点では日本への定着は確認されていない移入リスクの高い海外のフジツボ類を含む7属17種について、核ゲノムの18S rDNA遺伝子の部分配列（5'末端側約 970 bp）やミトコンドリアゲノムの16S rDNA遺

伝子の部分配列（約500 bp）を決定し、種内および種間の配列の違いを比較した。その結果、18S rDNA遺伝子については、種内に変異が見られず種間で 1-16塩基の変異が見られた（図14）。一方、16S rDNA遺伝子については、種内および種間のどちらについても変異が見られた。DGGE法は原理的に1塩基以上の違いをバンドパターンの違いとして検出可能であり、この方法を用いた移入種の検出には種内に変異が見られず種間のみに変異が見られる遺伝マーカーが適当である。従ってDGGE法を用いたフジツボ類の遺伝的種同定には18S rDNA遺伝子を用いることとし、DGGE用のプライマーの開発及び泳動条件等の検討を行った。塩基配列を決定した約970 bpのうち、種間で最低1塩基以上の変異が確認された領域（約300-350 bp）を増幅するようにプライマー5種類（Forward側3種類、Reverse側2種類）を設計しPCRを行った結果、4通りのプライマーの組み合わせにおいて、対象としたフジツボ類全てについて十分な増幅が認められた。その後、これらのPCR産物を用いてDGGE法に基づく電気泳動を行い、種特異的なバンドパターンの識別に適当なDGGE法の各種条件の検討を行ったが、これまでの条件検討においては、種の識別に適当な条件を確認できなかった。このため、複数種のサンプルが混じっている可能性のある環境試料から抽出したDNA（環境DNA）からのそれぞれの種の分離と種同定には、今後さらにプライマー配列の位置や配列の改善、DGGE法に用いる遺伝子領域の変更などの検討が必要である。

## 3) DGGE法を利用した移入アオサ類の早期検出方法の確立

データベースに登録されているアオサ属藻類の*rbcL*遺伝子のうち、日本に分布する11種について塩基配列を比較し、5'末端の塩基配列（約350bp）中に1-11塩基の種間変異を確認した。これを基にDGGE法用のプライマーを設計し、日本産アオサ類12種を用いてDGGE法の各種条件の検討を行った。その結果、移動度の違いにより9つのバンドパターンが示され、7種については種特異的なパターンが認められた（図15）。今後更に泳動条件等を検討することにより、日本産アオサ類のほぼ全ての種についてその種特異的なパターンの識別が可能になると考えている。また、環境DNAを用いて同様の解析を行うことにより、同方法の有効性を確認する必要がある。

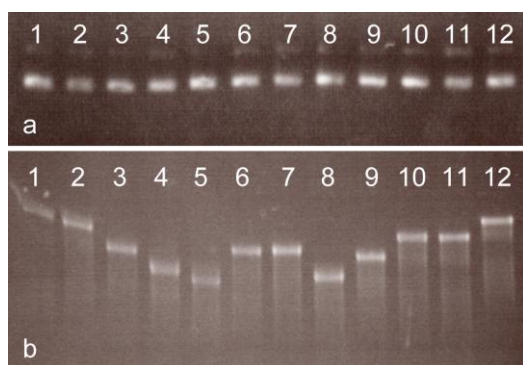


図15. アオサ類 (1-12) を用いたPCR-DGGE法の結果a. PCR法を用いた*rbcL*遺伝子領域の部分配列の増幅、b. DGGE法によるPCR産物の分離 1: *Ulva rigida*, 2: *U. linza*, 3: *U. tanneri*, 4: *U. arasakii*, 5: *U. lactuca*, 6: *U. fasciata*, 7: *U. pertusa*, 8: *U. compressa*, 9: *U. californica*, 10: *U. flexuosa*, 11: *U. ohnoi*, 12: *U. spinulosa*

### (3) バイオサイドフリー船底塗料の塗装実験による付着防止効果の評価

#### 1) バイオサイドフリー船底塗料の塗装実験

本研究では主に日本と豪州の間を行き来する大型の鉄鉱石運搬船を対象として、船体に付着する大型藻類の有無や種類の調査を行った。また現在船体塗料として広く一般的に使用されているバイオサイド塗料（生物に対する有毒性有り）とバイオサイドフリー塗料との比較を行うため、調査対象とした大型船の一部に設けた試験塗料区画（船体後部の右舷2区画、左舷2区画の計4区画）にバイオサイドフリー塗料を塗り、それ以外の部分のバイオサイド塗料（亜酸化銅と亜鉛ピリチオン（有機銅防腐剤）を含む）との比較（塗料表面に付着する生物の違い）を行った。

調査対象船は2007年11月にドッグ入りして船体の再塗装を行い船体表面の付着生物が排除された状態にあった。その後2007年12月、2008年12月、2009年1月に潜水調査を行い、再塗装から約1年後の2008年12月以降、船首および船尾（プロペラ）の一部に肉眼で確認できる大きさの大型藻類の付着が認められた（表1）。

表1. 調査対象船「A」の船体に付着していた主な大型藻類

	2007年12月	2008年12月	2009年1月
船首	無し	アオサ類（緑藻）、シオグサ類（緑藻）	アオサ類、シオグサ類
船尾・プロペラ	無し	アオサ類、シオミドロ類（褐藻）	無し

日豪航路の調査対象船「A」について、船体付着海藻の多様性調査を実施し、遺伝子マーカーによる同定の結果、緑藻ヒラアオノリ *Ulva compressa*, ミナミアオサ *Ulva ohnoi*, 紅藻スジムカデ *Grateloupia ramosissima* が確認された。これらは何れも日本に分布する種であるが、東アジア原産と考えられるミナミアオサ、スジムカデはこれまで南半球での分布は報告されておらず、今後船舶を介して豪州へ移入することが危惧される。一方、「A」船が荷下ろしする護岸から細雨下海藻類の遺伝子マーカーによる調査では新奇の移入海藻類は今のところ同定されていない。

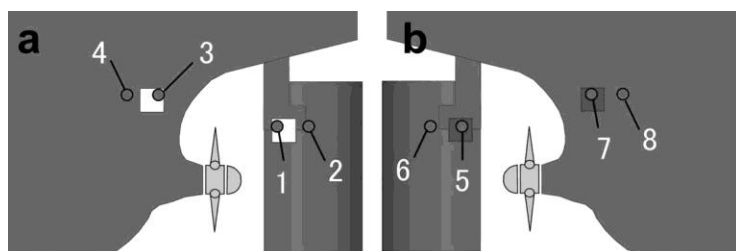


図16. 調査対象船「A」船尾への通常塗料とバイオサイドフリー塗料の塗装実験。

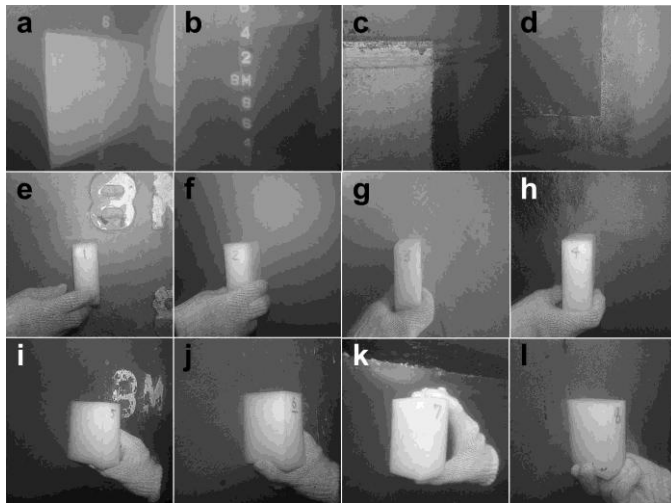
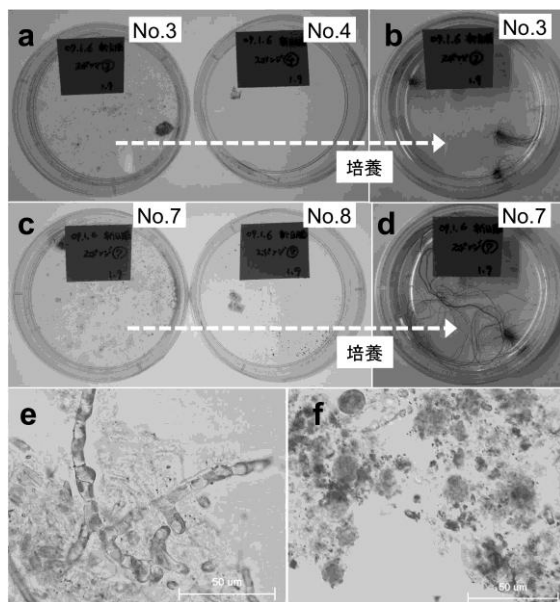


図17. 調査対象船「A」バイオサイドフリー塗料のパッチ塗装時と、その経過（1.5年経過時）の状況。a, シリコン系塗料塗装時; b, フルオロ系塗料塗装時; c, シリコン系塗料経過; d, フルオロ系塗料経過; e-l, 塗装部位1-8の経過。

この調査対象船「A」の2008年11月の乾ドック時に、船尾部の高頻度生物付着部位にシリコン系バイオサイドフリー船底塗料を塗布し（図16、17）、2008年12月、1月に経過観察を行った。この時点では、通常塗料、バイオサイドフリー塗料の表面の何れにも肉眼的な付着生物は観察されなかったが、塗装表面をメラミン系スポンジにより擦り取り、培養実験に供した。

いずれの調査の際にも試験塗料表面に肉眼で確認できる大きさの付着生物は認められなかった。一方、試験塗料のパッチ塗装に伴う被覆のために養生テープが貼られた部位（試験塗料、対照塗料の何れも十分に塗布されなかったと考えられる部位）には多数のフジツボの着生が確認されたことから、試験試料、対照試料のいずれも大型動物または大型海藻類の付着防汚については少なくとも同等の防汚機能を有していることが確認された。しかし、ウレタンスポンジで擦り取ると



試験塗料区画（バイオサイドフリー塗料）とそれに隣接する区画（バイオサイド塗料）のいずれにも微細な藻類の付着が視認できた（表1）。2009年1月の調査ではバイオサイドフリー塗料区に珪藻類やシオミドロ属藻類の付着が多く見られたのに対し、バイオサイド塗料区では緑藻類の付着が多く見られ、付着生物相に違いが認められた（図18）。

図18. 船体表面に付着していた生物（スポンジで採取）。a, No.3（シリコン系塗料）, No.4（バイオサイド塗料）, b, No.3の培養により出現したアオサ類, c, No.7（フルオロ系塗料）, No.8（バイオサイド塗料）, d, No.7の培養により出現したアオサ類, e, シリコン系塗料表面サンプルの拡大（糸状褐藻類）, f, バイオサイド塗料表面サンプルの拡大（単細胞緑藻類）

この付着生物の付いたスポンジを培養した結果、培養開始後40日の時点で両者（図18）に顕著な違いが認められた。すなわちバイオサイドフリー塗料区に由来する培養は、シャーレ全体に付着生物が広がり肉眼的にもその増加がはっきりと確認されたのに対し、バイオサイド塗料区に由来する培養では、藻類の増加は軽微であった。

## 2) バイオサイドフリー防汚塗料の環境影響評価

### ① 溶出液の濃縮試料の生態影響

塗料Cからの溶出液の濃縮試料が海産発光細菌に及ぼす毒性を図19に示す。1回目と2回目の試験では毒性に差があったが、60-min EC<sub>50</sub>は0.0008~0.009%の範囲にあり、毒性は極めて強かった。塗料Cでは試験開始直後に多量の防汚剤が溶出して強い毒性が示された後は毒性が弱まると考えられたが、試験期間を通して毒性は一定（2回目の結果）あるいは経時的に強くなった（1回目の結果）。これに対して、塗料AおよびBからの試料の60-min EC<sub>50</sub>は試験期間を通して0.1%以上であり弱い毒性が観察されたが、ブランクの人工海水濃縮液にも同様の毒性が示された。このことから、塗料AおよびBの濃縮液は海産発光細菌に有意な阻害を及ぼさないと言えた。

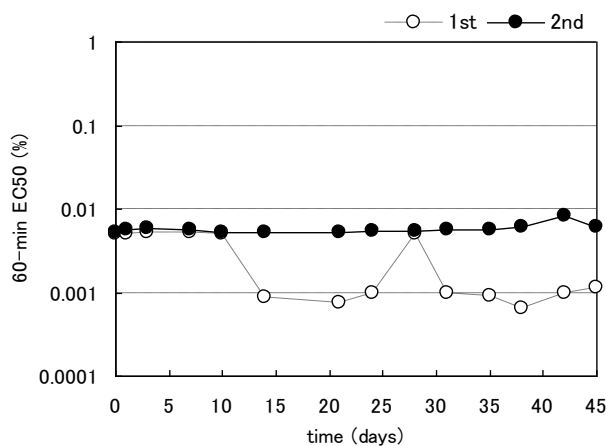
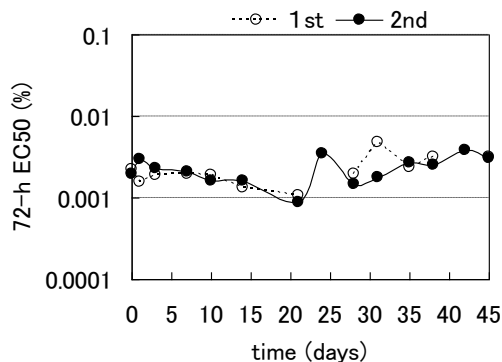


図19. バイオサイド塗料Cからの溶出液濃縮試料が海産発光細菌に及ぼす毒性

図20. バイオサイド塗料Cからの溶出液濃縮試料が海産藻類に及ぼす毒性

濃縮液が海産藻類に及ぼす毒性を図20に示す。濃縮液の調製に用いたDMSOは0.01%以上で有意な阻害影響を生じたので、これ以上の濃度では試料を供試できなかった。塗料AとBの濃縮液は0.01%では毒性を示さなかったが、塗料Cからの濃縮液の7-day EC<sub>50</sub>は0.001~0.003%の範囲にあり、試験期間を通じて強い毒性が示された。濃縮液が塩水性甲殻類に及ぼす致死毒性については、最大53%の致死率を示す試料が認められたのみで、試験期間にわたり強い致死影響は認められなかった。塩水性甲殻類は、海産発光細菌や海産藻類に比べると感受性が低かった。



### ② バイオサイド塗料Cからの溶出液中の毒性の原因物質

亜鉛ピリチオンと銅ピリチオンを同時分析するHPLC手法を開発した。塗料Cからの溶出液の濃縮液中には亜鉛ピリチオンは検出されず、銅ピリチオンのみが検出された。濃縮液中の銅ピリチオン濃度は16~46 mg/Lであり、溶出液中の濃度に換算すると0.011~0.031 mg/Lであった。海産発光細菌に対する毒性(60-min EC<sub>50</sub>)は、銅ピリチオンが0.025 mg/L、亜鉛ピリチオンが0.0053 mg/Lであったことから、濃縮液に検出された銅ピリチオンは細菌の発光阻害を生じたと推察された。

溶出液中の濃度を基にして、単位面積当たり、単位時間当たりの銅ピリチオンの溶出速度 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$ ) を算出した。銅ピリチオンの溶出速度は初期に高く、経時的に減少する傾向にあり、3週目以降は2.0~4.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$ の範囲にあった。溶出速度と環境生物への毒性との間には明瞭な



関係は見出せなかった。

### ③ バイオサイドフリー塗料からの溶出液中の有機フッ素化合物の残留

溶出液中の17種類の有機フッ素化合物の残留濃度を表2に示す。13種類のパーフルオロアルキルカルボン酸（PFAC）の中ではPFPeA, PFOA, PFNAが検出され、4種類のパーフルオロアルキルスルホン酸（PFAS）ではL-PFBSが検出された。これら検出された物質は溶出試験に用いたブランク水（ブランク水の原水は淀川水系から取水した神戸市水道）にも検出され、しかも検出された濃度は溶出時間によって増加しなかったことから、塗料に由来する成分とは判断できなかった。以上のことから、本実験条件下では、バイオサイドフリー塗料（AおよびB）から有害な有機フッ素化合物が溶出するとは言えなかった。

表2. バイオサイドフリー塗料AとBからの溶出液中の有機フッ素化合物

		PFAC: perfluoro alkyl carboxylic acid														FAS: perfluoro alkyl sulfonic acid			
		PFBA	PFPeA	PFHxA	PEHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUdA	PFDoA	PFTrDA	PFTeDA	PFHxDA	PFODA	L-PFBS	L-PFHxS	L-PFOS	L-PFDS	
carbon number		C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C16	C18	S4	S6	S8	S10	
Product ion (m/z)		213.2	263	313	362.8	412.8	420.9	502.9	514.8	598.8	614.8	663	712.9	813.2	299	398.9	467.8	565	
test cylinder	exposure (day)	RT (min)	6.18	10.12	12	13.43	14.64	15.8	16.84	17.83	18.85	19.84	20.79	22.45	23.78	12.36	15.22	17.39	19.4
Blank	seawater	ng/L	nd	0.28	nd	nd	0.70	2.9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13	nd	nd	nd
Paint A	1	ng/L	nd	0.25	nd	nd	0.59	2.9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13	nd	nd	nd
Fluoro type	3	ng/L	nd	nd	nd	nd	0.26	2.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	15	nd	nd	nd
	5	ng/L	nd	0.22	nd	nd	0.20	2.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	15	nd	nd	nd
	7	ng/L	nd	0.24	nd	nd	0.99	2.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	20	nd	nd	nd
Paint B	1	ng/L	nd	nd	nd	nd	0.34	2.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12	nd	nd	nd
Silicone type	3	ng/L	nd	0.24	nd	nd	0.46	2.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	18	nd	nd	nd
	5	ng/L	0.25	0.25	nd	nd	nd	2.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	21	nd	nd	nd
	7	ng/L	nd	0.29	nd	nd	0.53	2.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	16	nd	nd	nd

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

緑藻アナアオサが東アジアから世界各地へ移入し、ニュージーランドでは短い期間に全土に拡散し、在来種と区別困難な状態になっていることが明らかになった。また、北米に移入した褐藻ムチモは、日本の津軽海峡の集団に遺伝的に近い、無性繁殖集団に由来することが示されたが、日本で代表的な移入海藻とされていたヒラムチモは在来種であり、本種の世界的な分布は長期にわたる移入により攪乱されていることが示された。これらの結果により、従来の形態比較と分布からだけでは在来種と移入種を区別することは困難だが、各地集団の適切な遺伝子マーカー解析により起源や経路の推定が可能であることが明らかになった。

国際的に標準化された溶出試験方法によって得た試料についてバイオアッセイと化学分析を行い、バイオサイドフリー塗料の環境影響について次の結論を得た。

- ・ 2種類のバイオサイドフリー塗料からの溶出液の濃縮液は、海産発光細菌、海産藻類および甲殻類に対して有意な毒性は示さなかった。
- ・ バイオサイドフリー塗料からの溶出液には、17種類の有機フッ素化合物は認められなかった。
- ・ これに対し、亜酸化銅と亜鉛ピリチオンを活性成分とするバイオサイド塗料からの溶出液の濃縮液は、海産発光細菌および海産藻類に対して強い阻害を示し、甲殻類に対して弱い毒性を示した。濃縮液に検出された銅ピリチオンの濃度は発光細菌に対して毒性を生じる濃度で

あったので、本物質が毒性の本体と考えられた。

- ・ 本実験結果から、2種類のバイオサイドフリー塗料は水環境に対して有害影響を及ぼさないと判断された。

## (2) 地球環境政策への貢献

遺伝子解析を用いた海藻類地域集団の解析により、分布データに基づいて移入種又は在来種と判断されていた種について定説を覆す結果が得られ、また新規移入種が既に広範囲に定着・拡大している例も明らかになるなど、これらの手法の移入生物の検出における有効性が示された。また、船体に頻繁に付着しており大陸間移入のリスクのある種も明らかになり、これらの情報をこれらの船舶の寄港先の研究者などに提供することを計画している。

環境省の中央環境審議会瀬戸内部会における中長期ビジョン検討において、本研究の成果などに基づき、移入海洋生物の優占度を海域環境の指標とする旨の提言を行い、同審議会の検討に貢献した。また北太平洋海域環境・漁業行政にかかわる課題を科学的に解明するための政府間機関である北太平洋海洋科学機構(PICES)において沿岸移入生物に関する情報提供と意見交換を行った。

本研究の成果、特にフジツボ類・海藻類などの船体付着を介した移入の拡大が大きな環境問題であることが新聞報道・論説により広く紹介、問題提起され、今後の施策検討の必要性をアピールできたと考えている。

## 6. 引用文献

- 1) Karlsson, J. and Eklund, B. New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Mar. Poll. Bull.* 49: 456-464. (2004)
- 2) Heesch, S., Broom, J.E.S., Neill, K.F., Farr, T.J., Dalen, J.L. and Nelson, W.A. *Ulva*, *Umbraulva* and *Gemina*: genetic survey of New Zealand taxa reveals diversity and introduced species. *Eur. J. Phycol.* 44: 143-154. (2009)
- 3) Adams, N.M. Checklist of marine algae possibly naturalized in New Zealand. *N. Z. J. Bot.* 21: 1-2. (1983)
- 4) Santalices, B., Ramirez, M.E. and Abbott, I.A. A new species and new records of marine algae from Chile. *Br. Phycol. J.* 24: 73-82. (1989)
- 5) 右田清治・一木明子. 九州西岸に産する *Cutleria multifida* について. *藻類* 10: 77-81. (1962)
- 6) Okamura, H and Mieno, H. Present status of the antifouling systems in Japan: TBT substitutes in Japan. *Antifouling Paint Biocides. The Handbook of Environmental Chemistry. Vol. 5, Part O:* 201-212, Springer. (2006)
- 7) ISO 15181-1. Paints and varnishes-Determination of release rate of biocides from antifouling paints- Part 1: General method for extraction of biocides. (2007)
- 8) ASTM D 1141-98. Standard practice for the preparation of substitute ocean water. (2003)
- 9) Kitayama, T., Kawai, H. and Yoshida, T. Dominance of female gametophytes in field populations of *Cutleria cyrindrica* (Cutleriales, Phaeophyceae) in the Tsugaru Strait, Japan. *Phycologia* 31: 449-461. (1992)
- 10) Miller, K. A., Engle J., Uwai S. and Kawai, H. First report of the Asian seaweed *Sargassum filicinum*

Harvey (Fucales) in California, USA. *Biol. Inv.* 9: 609-613. (2007)

- 11) Turner, D. *Ulva furcellata et multifida*, descriptae. *Journal für die Botanik, Schrader* 1: 300-302, 1 plate. (1801)

## 7. 国際共同研究等の状況

アオサの解析に関して、ニュージーランド国立水圏大気圏研究機構(NIWA)のWendy Nelson博士、同オタゴ大学のJudy Broom博士、韓国・忠南大学Sung Min Boo博士らと、ムチモ・ヒラムチモの解析のためNZ国立水圏大気圏研究機構(NIWA)のWendy Nelson博士、米国カリフォルニア大学バークレー校Kathy Ann Miller博士、仏国ニース大学Alexandre Meinesz博士らと共同研究を実施した。

## 8. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) H. Kawai, S. Shimada, T. Hanyuda, T. Suzuki and Gamagori City Office. Species diversity and seasonal changes of dominant *Ulva* species (Ulvales, Ulvophyceae) in Mikawa Bay, Japan, deduced from ITS2 rDNA region sequences. *Algae*, 22, 221-228. (2007)
- 2) 大塚攻・大谷道夫・Soh, H.Y.・Kim, M.J.・Lee., W.C.・Huang, C.J.・Kimmerer, W.J.・下埜敬紀・羽生田岳昭・川井浩史・上田拓史・山口愛果.「日本の国際貿易港における外来性カイアシ類の出現の有無とバラスト水の関連」日本プランクトン学会報 55, 115-126. (2008)
- 3) 川井浩史・上井進也・羽生田岳昭・嶋田智・Judie Broom・Wendy Nelson・Frederique Viard.「遺伝子マーカーを用いた褐藻ワカメ、緑藻アオサ類移入集団の起源と動態の解析」日本生態学会誌 59: 145-152. (2009)
- 4) Yamaguchi, T., Prabowo, R.E., Ohshiro, Y., Shimono, T., Jones, D., Kawai, H., Otani, M., Oshino, A., Inagawa, S., Akaya, T. and Tamura, I. The introduction to Japan of the Titan barnacle, *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) (Cirripedia: Balanomorpha) and the role of shipping in its translocation. *Biofouling* 25: 325-333. (2009)
- 5) Kogishi, K., Kitayama, T., Miller, K. A., Hanyuda, T. and Kawai, H. Phylogeography of *Cutleria cylindrica* (Cutleriales, Phaeophyceae) in northeastern Asia, and the identity of an introduced population in California. *J. Phycol.*, in press (2010)
- 6) 山口寿之・木内将史・堀越彩香・岡本研・川井浩史: 東京湾の移入種ココポーマアカフジツボ - 2004-2005年の灯浮標サンプルの再同定. *Sessile Organisms* 27(2), 印刷中 (2010)

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 川井浩史・福代康夫「[海洋生物の越境移入と沿岸生態系の攪乱] 特集によせて」海洋と生物 Vol. 29 No. 3. 191-194. 生物研究社 (2007)
- 2) 川井浩史・上井進也・羽生田岳昭・山田味佳・嶋田智・中村規代典.「大型海藻類の大陸間越境移動」海洋と生物 Vol. 29 No. 3. 212-220. 生物研究社 (2007)
- 3) 川井浩史・上井進也・北山太樹・W. Nelson・K. Neill・夫性民「日本のワカメは外国の海に侵

入したか -分子系統地理学的知見-」海藻資源 19: 3-8. (2008)

- 4) 川井浩史「海藻類：世界に広がった日本の海藻」(「海の外来生物」日本プランクトン学会・日本ベントス学会編，東海大学出版会，pp137-150.) (2009)
  - 5) 川井浩史・羽生田岳昭・岡村秀雄・河地正伸・功刀正行・出村幹英「遺伝子マーカーを用いた船体付着藻類の多様性解析と、防汚塗料の違いが付着藻類の種組成に及ぼす影響について」日本マリンエンジニアリング学会誌, 45: 80-90. (2010)
- (2) 口頭発表 (学会)
- 1) Kawai, H., Hanyuda, T., Shimada, S., Suzuki, T., Nakamura, K., Boo, S.M. 16th PICES meeting, Victoria, Canada (2007) Biogeography and trans-ocean introductions of the green algae *Ulva* spp. to and from Japan deduced from identifications based on molecular markers. 26-30 Nov., 2007.
  - 2) 川井浩史・上井進也・羽生田岳昭・Judie Broom・Wendy Nelson. (2008)「遺伝子マーカーを用いた褐藻ワカメ、緑藻アオサ類移入集団の起源と動態の解析」日本生態学会企画集会「侵入の分子生物学」日本生態学会福岡国際会議場。2008年3月14日-17日。
  - 3) 羽生田岳昭・新井章吾・Wendy Nelson・川井浩史. (2008)「緑藻アオサ (*Ulva pertusa*) の越境移入に関する分子生物地理学的研究II」日本藻類学会第32回大会. 2008年3月21-24日。
  - 4) 小岸圭太・羽生田岳昭・北山太樹・Kathy-Ann Miller・新井章吾・Giovanni Furnari・Wendy Nelson・川井浩史. (2008)「褐藻ムチモ、ヒラムチモの系統地理的研究」日本藻類学会第32回大会2008年3月21-24日。
  - 5) Hanyuda, T., Uwai, S., Broom, J., Nelson, W. and Kawai, H. (2008) Origin and dynamics of introduced algal population of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) and *Ulva pertusa* (Ulvophyceae) using molecular makers. PICES, Dalian, China. 28-31 October 2008.
  - 6) 川井浩史. (2008)「日本のワカメは外国の海に侵入したか -分子系統学的知見-」日本海藻協会 2008秋季藻類シンポジウム「国境を越えて移動する海藻」東京、2008年10月10日
  - 7) Yamagishi, T., Hanyuda, T., Takagi, R., Müller, D.G. and Kawai, H. (2008) Structural diversity of the EcOcm3 gene introns in *Ectocarpus* spp. *Ectocarpus* 2008. Oban, Scotland, UK, June 4-8, 2008.
  - 8) 山岸隆博・羽生田岳昭・高木亮典・Müller, D.G.・川井浩史. (2008)「褐藻類シオミドロ *Ectocarpus* spp. における管状マストゴネマ関連遺伝子EcOcm3イントロンの構造的多様性について」日本植物学会第72回大会。2008年9月25-17日
  - 9) Yamaguchi, T., Prabowo, R.E., Ohshiro, Y., Shimono, T., Jones, D., Kawai, H., Otani, M., Oshio, A., Inagawa, S., Akaya, T. Tamura, I. (2008) The introduction to Japan of the titan barnacle, *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854)(Cirripedia: Balanomorpha) and the role of shipping in its translocation. 14<sup>th</sup> International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Satellite Symposium “Current Topics on Barnacle Biology” Kobe, 1 August 2008.
  - 10) Okamura, H., Kawachi, M., Hanyuda, T., and Kawai, H. (2009) Ecotoxicity assessment of new biocide-free antifouling paints. 14th International Symposium on Toxicity Assessment. 62. Metz, France, 30 August-4 September 2009.
  - 11) Yamaguchi, T., Prabowo, R.E., Shimono, T., Kawai, H., Otani, M. (2009) Are the widely separated populations with geographical isolation differentiated genetically? -An instance of the introduction of the Titan barnacle *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) to Japan- The New perspective on

barnacle research -creating for new cirripedology. The Crustacean Society Summer meeting Tokyo, Tokyo, September 2009.

- 12) Kawai, H., Nozawa, T., Hanyuda, T., Ohtani, M., Yamaguchi, T. (2009) Rapid assessment survey using catch-plate. PICES Annual Meeting, Jeju, Korea, 23-28 October, 2009.
- 13) 川井浩史・羽生田岳昭・岡村秀雄・河地正伸・功刀正行・出村幹英・山本憲治 (2009) 「遺伝子マーカーによる船体付着藻類の多様性解析」日本マリンエンジニアリング学会海洋環境研究委員会ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」函館湯ノ川花びしホテル. 2009年11月6日
- 14) 山口寿之・大谷道夫・上田育男・野方康行・川井浩史 (2009) 「ココポーマアカフジツボの日本への移入 —現状—」日本マリンエンジニアリング学会海洋環境研究委員会ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」函館湯ノ川花びしホテル2009年11月6日
- 15) 大谷道夫・山口寿之・川井浩史. (2009) 「船体が運ぶ海洋付着生物とその移入可能性について」日本マリンエンジニアリング学会海洋環境研究委員会ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」函館湯ノ川花びしホテル. 2009年11月6日
- 16) 川井浩史・小岸圭太・羽生田岳昭・新井章吾・北山太樹・Nelson, W.・Meinesz, A.・Tsiamis, K.・Peters, A.F. (2010) 「褐藻ムチモ類、特にヒラムチモ (*Cutleria multifida*) の分子系統学的解析と系統地理」日本藻類学会第34回大会. 筑波. 2010年3月18-21日.

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」を開催し、越境移動問題について4件報告した。2009年11月5-6日、函館。

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞 (H19年7月11日、全国版)
- 2) 神戸新聞 (H20年3月10日)
- 3) 毎日新聞 (H20年7月28日、全国版)
- 4) 日本経済新聞 (H21年1月28日、全国版)
- 5) 朝日新聞 (H21年2月18日、全国版)
- 6) 朝日新聞 (H21年8月16日、全国版)
- 7) 読売新聞 (H21年10月18日、大阪本社版)

(6) その他

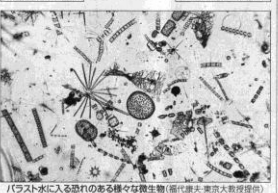
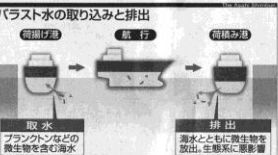
特に記載すべき事項はない。

# 環境 エコロジー

## 海の外来生物「マリンペスト」 「バラスト水」で拡散、生態系乱す

バラスト水による拡散が指摘された主な生物

- 麻痺性貝毒プランクトン（貝類に毒が蓄積、中毒も）
- 赤潮プランクトン（種類により養殖魚介類の死滅も）
- カワハシリガイ類（発電所等の取水管を詰まらせる）
- クシクラゲ類（魚卵などを食べ、漁獲に打撃）
- アオサ類の海藻（在来の海藻・海草類を圧迫）



バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

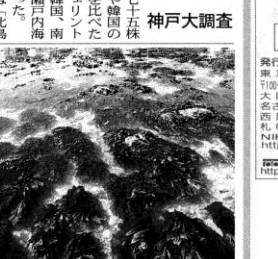
「バラスト水」は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。バラスト水は、船舶が航行中に港から取り込み、航行中に排出する。この過程で、船舶は外来生物を運搬し、排出する可能性がある。

### 日本経済新聞

2009年(平成21年)1月28日(水曜日) 社会 34

#### NZ養殖ロブスター被害 日韓由来ワカメ原因 神戸大調査

ニュージーランドのロブスター養殖場に深刻な被害をもたらしているワカメは、日本や韓国由来のワカメの子孫であることが、神戸大学研究グループのDNA鑑定で明らかになった。調査グループは、ロブスター被害の原因として、日本や韓国由来のワカメが、船舶の排水や漁具を通じてニュージーランドに持ち込まれたと推測している。



ワカメが藻類を埋め尽くすほどに繁殖しているワケレント、神戸大川井浩史教授提供

# 日本経済新聞

1月28日 水曜日

発行所 日本経済新聞社  
東京本社 03-3270-0251  
〒100-8555 東京都千代田区千代田1-9-5  
大阪本社 06-6943-7111  
名古屋支社 052-243-3311  
西部支社 092-473-3300  
札幌支社 011-281-3211  
NIKKEI NET アドレッシング  
http://www.nikkei.co.jp  
印刷 0120-9777-446  
http://www.nikkei4946.com

## 環境の世紀・兵庫から バランス崩壊

ニュージーランドのロブスター養殖場に深刻な被害をもたらしているワカメは、日本や韓国由来のワカメの子孫であることが、神戸大学研究グループのDNA鑑定で明らかになった。調査グループは、ロブスター被害の原因として、日本や韓国由来のワカメが、船舶の排水や漁具を通じてニュージーランドに持ち込まれたと推測している。



ワカメが繁殖するニュージーランド・ニュージーランドの海岸。近年をめぐっては、ワカメが大量に日本に輸出される船が出ている（川井浩史氏提供）

ワカメが繁殖するニュージーランド・ニュージーランドの海岸。近年をめぐっては、ワカメが大量に日本に輸出される船が出ている（川井浩史氏提供）

環境の世紀・兵庫から  
バランス崩壊  
船行けば乱れる生態系  
第2部







D-072 大型船舶のバラスト水・船体付着で越境移動する海洋生物の動態把握と定着の早期検出  
 (2) 有害植物プランクトン移入種の定着・拡散とバラストタンク内堆積物の動態に関する研究

独立行政法人国立環境研究所

生物圏環境研究領域	微生物生態研究室	河地正伸・出村幹英
化学環境研究領域	動態化学研究室	功刀正行

<研究協力機関> 日本郵船 安全環境グループ 舟山純・前田君丈

平成19～21年度合計予算額	34,804千円
(うち、平成19年度予算額)	10,884千円)

※予算額には、間接経費を含む。

[要旨] 日豪航路に就航するバラ積み船「A」を対象として、バラストタンク内試料と船体付着試料の調査を行った。バラストタンク内試料からは、有害種4種を含む24種のプランクトン性種が確認され、船体付着試料からは熱帯・亜熱帯性種を含む28種の付着性種が確認された。両媒体の共通種は、一部のシアノバクテリアと珪藻種のみであった。日本寄港地から確認された48種(有害種13種)のうち、18種(有害種4種)はバラストタンクで検出された種と共通した。船体付着試料から有害種は検出されなかったが、有毒性種を多く含むことが知られるシアノバクテリアを対象として、DGGE解析と主要バンドのDNA配列決定を行い、うち77配列をジーンバンクに登録した。バラストタンク試料は生物密度が希薄で、非生物粒子の占める割合が高く、固定・培養試料で確認できる植物プランクトン種は限られた。そこで越境移動リスクの高い有害植物プランクトン種(*Chattonella* spp., *Heterosigma akashiwo*, *Alexandrium* spp., *Pseudonitzschia* spp.の4種)を対象として、タンク内試料にリアルタイムPCR法を適用した結果、いずれの種も航海後のバラストタンク内堆積物から検出され、リバラストが行われることで、細胞数が激減する一方で、プランクトン種によって排出のされやすさに違いのあること、そして*Alexandrium* spp.と*Pseudonitzschia* spp.は、豪州寄港地で実際に排出されていることを確認できた。*Chattonella*は本調査で初めてバラストタンク内から検出され、培養チャンバー実験でも2ヶ月の航海後の生存率が航海前とほとんど変わらないことから、船舶を介した移動・拡散の可能性が示唆された。*Chattonella*を対象としてマイクロサテライトマーカーによる集団解析や自然試料からの多型検出についても検討した。リアルタイムPCR法は、バラストタンク内から特定生物を高感度かつ高精度に検出でき、試料の収集、処理の標準プロトコルを整備することで専門知識がなくても対象生物を検出できることから、バラスト水を介した海洋生物の動態把握や定着の初期過程の解析等に有効な手段となることが期待される。

[キーワード] 有害植物プランクトン、付着性微細藻、越境移動、リアルタイムPCR、*Chattonella*

## 1. はじめに

船舶を介した海洋生物の移動は、船体付着による移動とバラスト水による移動に大きく分けられる。船体付着は、船体表面の水に接する部分に生物が付着するもので、海藻やフジツボなどがよく知られており<sup>1)</sup>、船足の低下や船舶管理上の問題に加えて、生物の越境移動問題が問題視されている<sup>2)</sup>。船体付着の場合、停泊港での停泊時間とともに付着頻度は高くなることに加えて、航行中にも付着することがある。また一旦船体に付着した生物は船体上で増殖、分布拡大しながら、周りの海域にも拡散することから、越境移動が、航路上で双方向かつ連続的に発生することが危惧されている<sup>2)</sup>。

バラスト水は、大型輸送船舶などが安定して航海するために、重しとして積載する海水のことで、通常、荷下ろし港で荷下ろし時に港湾海水をバラスト水として漲水する。バラスト水は1cm程度のメッシュを通して取り込まれるので、魚や海藻などの大型の海洋生物は入らないとされているが、微小な生物はそのままタンク内に導入されることになる。また大型の海洋生物であっても海藻の切れ端や遊走子、卵や幼生などのサイズの小さなステージの場合、タンク内に取り込まれる可能性がある。荷下ろし港でバラスト水を積載した船舶は航海の後に積荷港に入港し、荷物を積載する過程で、バラスト水を積荷港に排水することになる。オーストラリア、USAなどのように、バラスト水を積載した全ての船に対して、入港前に外洋の特定海域で洋上バラスト水交換（いわゆるリバラスト、外洋水によりバラスト水を置換する処置）を行わせる規制措置を取る国もある。しかしリバラストによりバラスト水が完全に外洋水に置換されるのではないこと（90-99%）、またタンク内には膨大な量の堆積物が残存しており、積荷港で排出される可能性があること、そしてリバラスト海域に点在する島嶼生態系にバラスト水中の沿岸海洋生物が影響を及ぼす可能性についても否定できないといった問題が依然として残されている。生物の移動に関して、バラスト水の場合は、荷下ろし港（バラスト水を漲水）からリバラスト海域（バラスト水を外洋水と置換）や積荷積載港（バラスト水を排水）への一方向的な移動と見ることができる。その一方で、コンテナ船のように、荷物の積み降ろし、荷揚げが同一港で不規則に行われ、それに伴ってバラスト水が同一港内で漲水と排水が繰り返されるケース、また複数の港の海水がバラストタンク内で混合するようなケースも認められている。積荷港の海水に含まれる海洋生物の種類や数も大きく季節変化するなど、様々な越境移動のケースが考えられるのである。

船体付着とバラスト水の問題点は、様々な海洋生物が船舶の移動とともに本来の生息場所でない海域に移送・放出され、定着する可能性のあることである<sup>1)4)</sup>。世界の主要な物量移動の担い手である船舶とともに、世界全体で年間100億トンものバラスト水が移動するという見積もりも出されている<sup>5)</sup>。船体付着の場合、船舶管理の問題から、定期的にクリーニングが行われているが、クリーニングされた後でも、微生物の場合は数時間後に、大型海洋生物の場合でも数日から1週間後には船体への付着が始まるということが指摘されている<sup>6)</sup>。また現時点では、世界のいずれの国においても船体付着生物に対する規制措置はなく、どれほどの生物が船舶を介して世界を行き来しているのか、定性・定量的知見はほとんどないのが現状である。

大型船舶のバラスト水や船体付着を介して越境移動する海洋生物は、多岐にわたる分類群が知られている<sup>2)4)</sup>。大型船舶を介して越境移動する海洋生物の動態について把握し、その定着の早期検出に関する研究テーマを総合的に進めるにあたって、多様な海洋生物の専門家の参加が不可欠である。また外国航路の大型船舶の付着生物やバラスト水の調査を実施すること自体に、様々な

困難や多大な経費が必要なことから、複数の研究グループ（サブグループ）で調査対象とする船を共有し、研究手法、対象生物などを分担する形で、密接な連携のもとで調査研究を実施するのが望ましいと考えられる。本サブテーマでは、主に海洋植物プランクトン及び付着性微細藻類を対象として、バラスト水と船体付着両媒体における動態を調査するとともに、特定有害種について定着の早期検出法の検討について報告する。実際には船体防汚塗料に関わる調査研究やバラストタンク内の海藻類の多様性と生存調査等で他サブテーマと分担協力した。

## 2. 研究目的

植物プランクトンには、大量繁殖する種や有毒性の種が存在しており、それらは有害植物プランクトンとも呼ばれている。大型船舶のバラストタンク内からは、様々な有害植物プランクトンやシストの存在が報告されており<sup>2), 7), 8)</sup>、バラスト水を媒体とする越境移動が懸念されている。一方、船体付着に関しては、主要な構成要素として付着性珪藻の存在が報告されているが<sup>9)</sup>、他の藻類群についての知見はなく、詳細な研究はほとんど行われていないのが現状である。付着性微細藻の中には有毒性の種も数多く含まれており、船体付着を介した越境移動の実情について把握する必要がある。

植物プランクトンと付着性微細藻は、単に生態的に区分されているに過ぎず、近縁種にプランクトン性種と付着性種が認められたり、同一種であっても、核相等の違いによりプランクトンステージと付着性ステージに分かれたりする種が存在する。また付着性の種であっても、実際には海水中を漂うことがあり、港湾海水やバラストタンク内からも様々な付着性微細藻が検出されることがある<sup>2)</sup>。こうした多様な藻類群のうち、ここでは特に環境問題の原因種として移動リスクの高い有害植物プランクトンや有毒性の付着性微細藻の種を主な対象としている。

様々な海洋生物が、船舶のバラスト水や船体付着により越境移動することが懸念されているのだが、移入種として定着したかどうかを判断するには、それらが移動先の環境に適応し、現地の他の競合種との競争や捕食者の存在下で生存・増殖を繰り返し、更に移入環境下での経年的な存在が確認される必要がある。少数の集団が移入した場合、遺伝的多様性の低下も大きな問題となる可能性がある。しかしながら目視で存在が確認できるベントス・海藻類と違って、顕微鏡でしか確認できない植物プランクトンの移入と定着を正確に把握するのは困難を伴う。定期的なモニタリングを長期にわたり実施するのはそのための一つの手段であるが、監視できる海域には限りがあること、また正確な種の同定には、専門的な知識と技術と経験が必要である。植物プランクトン等の微細藻類を対象として、短期間にしかも定量的に移入と定着の状況を把握する方法が必要とされている。

本研究では、有害植物プランクトンや有毒性の付着性微細藻の種や関連種を主な対象として、「船体付着」と「バラスト水（タンク内の堆積物を含む）」という二つの異なる移動媒体による越境移動の現状について把握すること、そして定着の早期検出を可能とする手法の確立について検討することを目的としている。また有害植物プランクトンの中でも国内外の水産業に被害をもたらす、国内の他の海域や世界各地への広域化が懸念されている *Chattonella* に特に注目し、高精度のDNAマーカーを使うことにより、その拡散と定着の状況を明らかにすることを目的とした研究も実施している。人為的に移動・拡散した海洋生物の起源地の推定や移動経路の把握には、高精度のDNAマーカーを用いた集団の遺伝的多様性解析は有効な手段の一つであるが、植物プランク

トンの場合、解析に先だって培養株が未確立であるため、詳細な研究を実施する上での障害となることも多い。海底堆積物やバラスト水など環境試料中に含まれる移入種の遺伝的多型を直接明らかにし、効率よく迅速に集団解析を実施するための手法開発も併せて行った。

### 3. 研究方法

#### (1) バラストタンクと船体付着物由来の微細藻類

本調査では、船会社の協力により、日本ーオーストラリア間を航行するバラ積み船「A」を対象として（図1）、バラストタンク内及び船体付着の生物量と種構成に関する調査を行った（調査年月：2007年9月、10月、12月、2008年1月、3月、6月、8月、9月、10月、11月、2009年1月、9月、10月、11月）。バラ積み船船首のバラストタンク（FPT）の最下層で、バラスト水及びバラストタンク内堆積物を採取する（図2）とともに、国内寄港地港内の海水及び港湾堆積物を採取した。同船のタンク最下層ではバラスト水排水後も常に水深10-30cmのバラスト水が堆積物とともに残存していた。またタンク内の温度とクロロフィルの変化を2007年9月下旬から2008年3月上旬までの約5ヶ月間、連続的にモニタリングした（図1）。本船は規制により、日本の港湾で漲水したバラスト水を太平洋航行中に、外洋海水と入れ替えるリバラストを実施している（バラスト水と外洋水との交換率は約95%を3回）。またオーストラリアでは、数日～10日程度沖合で停泊して積載順を待つことがあり、こうした停泊時に様々な付着生物が船体表面に付着すると考えられた。

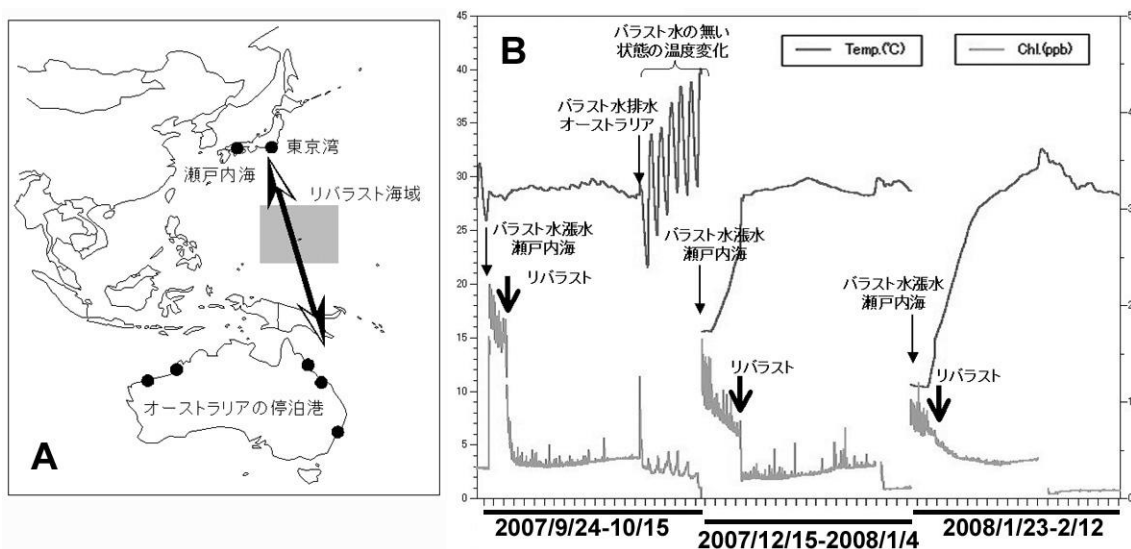


図1. A. 調査対象としたバラ積み船の航路図。B. バラストタンク内のクロロフィル変化と温度変化。

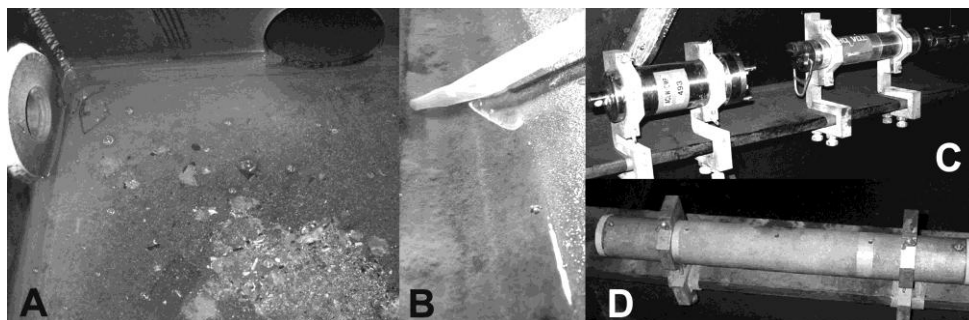


図2. A. バラストタンク内の堆積物とバラスト水。B. 堆積物の採取の様子。C. タンク内に設置したセンサー類。D. タンク内に設置した培養チャンバー（金属筒内に培養試料を梱包して生存率の変化を調査）。



図3. A. ドック入り中の調査船舶、☆と○の異なる部位で塗料試験を実施。B. 付着試料の採取に用いたメラミンフォーム素材スポンジ。C. 付着試料の培養の様子（約2ヶ月後の培養試料）。

船体付着物は図3Aに示す部分からダイバーが採取した。船体表面をメラミンフォーム素材スポンジ（図3）で直接擦り取ることで得られた試料および別途採取された海藻やフジツボ等の大型生物を基物試料として用いた。これらの付着試料をグルタルアルデヒドによる固定（最終濃度2.5%）、ESM培地による培養処理（図3B、C）、そしてDNA抽出を行った。観察には光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて行い、植物プランクトン及び付着性藻類の種構成について調査・記録した。形態観察で同定の困難な種に関しては、マイクロピペット法により細胞分離して培養株を確立して、18SrDNAの配列情報を決定して相同性比較による分類群の特定を行った。

## （2）リアルタイムPCR法を用いた有害植物プランクトンの検出と定量化

リアルタイムPCR用の試料は、採取した堆積物から1試料につき3回のサブサンプリングを行った。堆積物を遠心し、上清を取り除いた後、それぞれ湿重量を測定した後、各サブサンプルについて土壌DNA抽出キット（NIPPONGENE）を用いて堆積物中の全DNA抽出を行った。細胞数の推定のための検量線作成用試料として、*Chattonella antiqua* (DEM-124)、*Heterosigma akashiwo* (DEM-47)、*Alexandrium catenella* (NIES-675)の培養株について、6段階の細胞密度希釈系列を作成し、各々をDneasy Plant Mini kit (QIAGEN)によりDNA抽出した。またリバラスト時とオーストラリア寄港地で排出されたバラスト水は、船員の協力で初期、中期、後期と3回の異なるタイミングで採取、冷暗所に保管してもらい、日本寄港時に1.0 $\mu$ m孔径のポリカーボネートフィルターでそれぞれ1Lをろ過して急速乾燥保存した。その後、実験室でフィルターから直接DNA抽出キット（MP Biomedicals）を用いて抽出を行い、リアルタイムPCR解析用試料に供した。

PCR増幅と解析は、Real-Time PCR装置（Thermal Cycler Dice Real Time System TP800, TaKaRa）を用いた。特異的プライマーセットとして、*Chattonella* spp.には本研究で開発した、F: 5'-CCCTTGTTTCCTTCGGGAAG-3', R: 5'-CTCAACGGTTGTATCTCG-3'（ITSの部分配列で100bp弱を増幅）、*Heterosigma akashiwo* はKamikawa et al. (2007)<sup>10)</sup>において開発されたF: 5'-GCTCGCCACTTCTCTTCGG-3', R: 5'-GTGTCATCGTGAAGATCGC-3'（18SrDNAの部分配列で100bp弱を増幅）、*Alexandrium* spp. はGalluzzi et al. (2004)<sup>11)</sup>において開発されたF: 5'-YGATGAAGAATGCAGCAAMATG-3', R: 5'-CAAGCAHACCTTCAAGMATATCC-3'（ITSの部分配列で100bp弱を増幅）を用いた。PCRの反応試薬組成は、SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) 10 $\mu$ L、Forward primer (10 $\mu$ M) 0.8 $\mu$ L、Reverse primer (10 $\mu$ M) 0.8 $\mu$ L、DNA テンプレート2 $\mu$ L、滅菌水6.4 $\mu$ L計20 $\mu$ Lで、反応条件は、Thermal Cycler Dice Real Time Systemの標準プロトコールに従い、初期変性95 $^{\circ}$ C (10s)の後、95 $^{\circ}$ C (5s)-60 $^{\circ}$ C (30s)を50サイクル、そして特異的断片解析に95 $^{\circ}$ C (15s)-60 $^{\circ}$ C (30s)-95 $^{\circ}$ C (15s)でPCR反応を行った。検量線の作成（Crossing Point法）と細胞密度の算定には、

Thermal Cycler Dice Real Time System Software ver. 2.10 (TaKaRa) を使用した。

(3) マイクロサテライトマーカーを用いた *Chattonella* の集団解析

*Chattonella antiqua* 4集団、*C. marina* 4集団を集団解析に用いた。集団名と解析に用いた株数を表1に示す。

表1. 解析に用いた集団と株数

	東京湾 (TK)	瀬戸内海 (ST)	浦ノ内湾 (UR)	有明海 (AR)	八代海 (YT)	鹿児島湾 (KG)
<i>C. antiqua</i>	-	41	22	11	66	-
<i>C. marina</i>	28	31	-	11	-	35

集団の遺伝的多様性把握には、Demura et al. (2007)<sup>12)</sup>において開発されたマイクロサテライトマーカーを用いた。集団の遺伝的多様性指数と集団間の遺伝的分化指数の算出には、解析ソフト ARLEQUIN ver.3.1、地理的距離と遺伝的分化との相関には、解析ソフトIBD、集団間の遺伝的距離の算出と分岐図作成には、Populations ver. 1.2.30 (<http://bioinformatics.org>)を用いた。各集団特異的遺伝子型数は、観察値を株数で割った値を用いた。また環境DNA試料を用いた集団解析には、日豪間を行き来するバラ積み船の寄港地である瀬戸内海港湾 (2008/3/12採取)、ニュージーランド・ウエリントン (2008/11/12採取)、そして東京湾富津岬南の調査地点 (2008/8/18採取)で採取した海底表層堆積物を用いた。上述の方法により堆積物からの全DNA抽出を行い、各堆積物中の *Chattonella* のシスト密度をリアルタイムPCRにより測定した。次にDNA抽出試料から1 $\mu$ Lずつ、8本のサブサンプリング試料を作成し、各々をマイクロサテライトマーカーChamo76 (F: 5'-GCGACAATCCCAAGAATAACGG -3', R: 5'-GACTTGAGCAAGGTTGGCTGAG -3')を用いて、Demura et al. (2007)<sup>10)</sup>と同じ条件でPCRを行い、フラグメント解析装置で増幅断片データの測定、解析を行った。各サブサンプルで確認された全ての増幅断片を集団内の多型として扱った。

#### 4. 結果・考察

##### (1) バラストタンクと船体付着物由来の微細藻類

バラストタンク内のバラスト水および堆積物から少なくともプランクトン性の微細藻18種、付着性種6種の生息をこれまでに確認した (表2)。この中で有害植物プランクトンとして問題になる種は渦鞭毛藻の *Alexandrium* spp.、*Heterocapsa* sp.、ラフィド藻の *Fibrocapsa japonica*、*Heterosigma akashiwo* の4種、またIMOの基準でLグループ (最小サイズ(minimum dimension)が50 $\mu$ m以上) として規制の対象となりうる種が4種、Sグループ (最小サイズ(minimum dimension)が10~50 $\mu$ m) として規制の対象となりうる種が19種確認された。一方、港湾試料(海水や堆積物)からは、*Phaeocystis*、*Dinophysis*、*Chattonella* といった様々な分類群で構成される有害種13種を含む植物プランクトンを確認できた。これと比較して、バラストタンク内試料で確認できる種類数は明らかに少ない。以前の報告で指摘したように<sup>2)</sup>、バラストタンク内環境下で生存可能な種類は、栄養細胞自体が耐久性をもつ場合、あるいはシストのような耐久性をもつ細胞状態で堆積物中に存在するような種類に限定されるようである。一方で、バラストタンク内の堆積物には金属が高濃度に含まれており、種によっては生存や増殖が阻害される場合があること、また非生物由来の懸濁物が大部分である堆積物から細胞を検出して、種を同定するには限界のあることから、実際に含まれる生物群を過小に見積もっている可能性がある。

船体付着試料からは、少なくとも28種の付着性微細藻種を確認した(表2)。付着性微細藻種の中で出現頻度が最も高く、種類数も多かったのは、シアノバクテリアと珪藻で、一部の種はバラスタタンク由来の微細藻と共通した。プラシノ藻の*Prasinococcus* sp.、ハプト藻の*Ochrosphaera* sp.、ピングオ藻の*Glossomastix chrysolasta*、ペラゴ藻の*Sarcinochrysis marina*、クロララクニオン藻といった熱帯・亜熱帯域で確認される種の存在が確認された(図4)。これらの種は、非鞭毛性の球形の細胞形で、細胞外に粘質物を分泌、基物に強固に付着する性質をもつことで共通していた。形態的特徴に加えて、18SrDNA配列のホモロジー解析結果に基づいて同定を行った。微細藻類の船体付着に関する過去の報告では、珪藻とシアノバクテリアに所属するごく僅かの種が報告されているに過ぎないが、1航路であっても様々な分類群からなる多種多様な生物種の存在が本調査から明らかになった。有害種として知られるような種は、船体付着試料中からは検出されていない。一方で多数の付着性シアノバクテリア(図5)が確認された点については考慮する必要がある。これらの船体付着物由来のシアノバクテリアは、いずれも海水ベースの培地で増殖したことから、沿岸性の種と考えられる。沿岸性シアノバクテリアに関する分類学的研究はそれほど多くなく、種を正確に特定するのは困難な状況にあるが、沿岸性シアノバクテリアの一部の種について毒性や様々な生理活性物質に関する報告がなされており<sup>13)</sup>、有毒性種が船体に付着している可能性も十分に考えられた。

船体付着防止策の検討に関連する調査として、同バラ積み船を用いた候補塗料のパッチテストを実施している(サブテーマ(1)参照)。現在も進行中の調査であり、ここでは付着性微細藻への影響について予備的な調査を行った。表1の船体付着試料由来の藻類で、0709を付記した種はドック前の船体付着試料で存在が確認された種、そして0712はドック入りして船体クリーニングが行われてから約3週間後の船体付着試料において存在が確認された種である。また「\*」を付けた種はバイオサイド混入ペイントでも増殖が確認された種である。ドック入り前は28種で、ドックでクリーニング後に確認されたのは13種である。ドック入り前の方でより多様な分類群に所属するより多くの種が確認された。一般に海水中での経過時間が長ければ長くなるほど付着生物の種の多様性とバイオマスが増大する<sup>14)</sup>。これに加えて、予備的な調査から、フジツボや海藻など大型の付着性生物に特異的に付着する微細藻の存在が示唆されており、より多様な付着基物が船体上で形成されることも付着性微細藻の多様性を増やす要因になっているのではないかと考えている。バイオサイドフリーペイントとバイオサイド混入ペイントで塗り分けた部位の検査では、どちらからも大型付着生物は確認されなかったが、メラミンフォーム素材スポンジで採取した付着試料からは、付着性微細藻だけでなく多数の海藻幼体が確認された。またバイオサイド混入ペイントでは、確認された種数及び生物量ともに少なく、より高い付着阻害効果を示した。

バラスタタンク内堆積物試料と船体付着試料について、分子生態学的手法の一つであるDGGE法(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)による遺伝子レベルの解析も行った(図6)。シアノバクテリア及び真核藻類の葉緑体に特異的な16SrDNA用プライマーセットで増幅したDNA断片をDGGEで泳動することで、DNA断片のゲル泳動パターンに基づく多様性解析を行った。DNA断片のパターン解析から、培養処理を行うことにより複数のサンプルで共通する特定の種が増えること(例えば図6, バンド1-2, 1-20, 1-21, 4-E, 4-6等)、バンドパターンのクラスター解析結果(未掲載)から付着試料由来のサンプル、バラスタタンク内サンプルが各々まとまる傾向のあることなどが明らかになった。遺伝子レベルの解析でも、バイオサイド混入ペイントにおいて、明らかに生物多

様性が低くなることが示された。船体付着試料からは、有害種は検出されなかったが、有毒性種を多く含むシアノバクテリアについては、DGGEバンドパターンの解析に加えて、主要バンドのDNA配列を決定、BLASTによるホモロジー検索を行い、得られた生物情報と航海情報等とともに、潜在的移入種リストとしてジーンバンクへの登録を行った結果の一部を表3にまとめて示す。

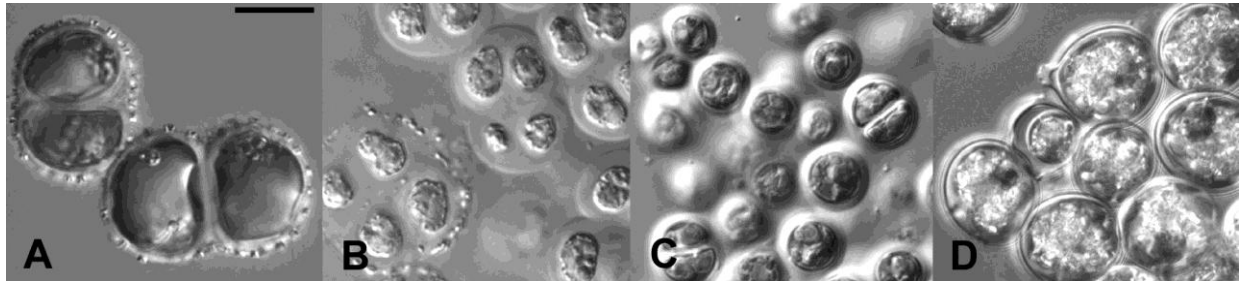


図4. 船体付着試料から確認された亜熱帯・熱帯域に生息する付着性微細藻。A. *Ochrosphaera* sp., B. *Sarcinochrysis marina*, C. *Glossomastix chrysolasta*, D. クロララクニオン藻。スケールバー：10 $\mu$ m。

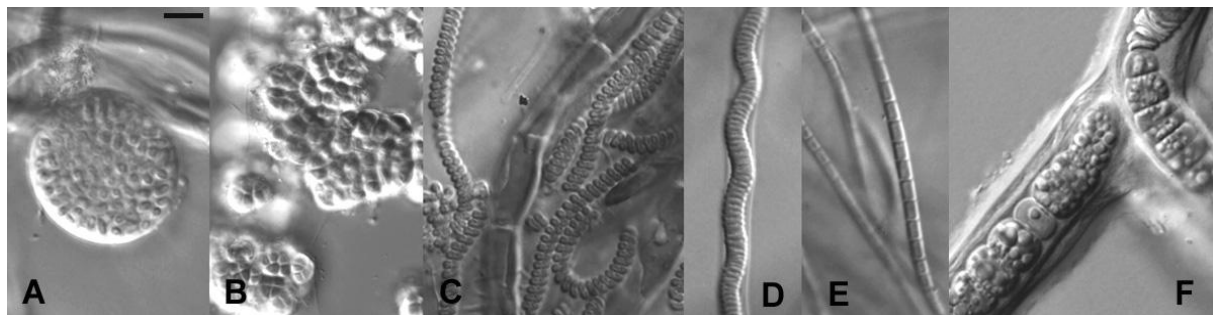


図5. 船体付着試料から確認されたシアノバクテリアの一部の種。A. 密集した球状の細胞塊を形成するシアノバクテリア, B. *Dermocarpa* sp., C. *Spirulina* sp., D. *Lyngbya* sp., E. *Oscillatoria* sp., F. *Scytonema* sp.。スケールバー：10 $\mu$ m。

表2. バラストタンク内で生存<sup>\*1)</sup>が確認された主要な藻類群（有害種は太字で記述）

バラストタンクと港湾試料は、0709（瀬戸内海港湾）、0710（瀬戸内海港湾）、0712（東京湾）、0801（瀬戸内海港湾）で採取。船体付着試料は0709と0712でのみ採取。全て同じバラ積み船を使用。同船は2007年11月にフィリピン港湾でドック入りして、船体及びバラストタンクのクリーニングを実施。

分類群	バラストタンク試料(サイズ幅 <sup>*2)</sup> 、採取年月)	船体付着試料(試料年月) *はバイオサイド混入ペイントで増殖した種		港湾海水試料(試料年月)
シアノバクテリア	<i>Dermocarpa</i> spp. (S-L; 0709, 0710, 0712, 0801), <i>Oscillatoria</i> spp.(S; 0709, 0712, 0801), <i>Phormidium</i> spp. (S; 0709), <i>Synechococcus</i> spp. (SS; 0709, 0710, 0712, 080)	<i>Akaryochloris</i> sp. (0709), <i>Aphanothece</i> sp. (0709), <i>Scytonema</i> sp. (0709), <i>Dermocarpa</i> spp. (0709, 0712*), <i>Lyngbya</i> spp. (0709), <i>Oscillatoria</i> spp. (0709, 0712*), <i>Phormidium</i> spp. (0709, 0712), <i>Spirulina</i> sp. (0709, 0712), <i>Synechococcus</i> spp. (single cell) (0709, 0712), <i>Synechococcus</i> spp. (colonial)(0709, 0712)		<i>Dermocarpa</i> spp. (0709, 0710, 0712, 0801), <i>Oscillatoria</i> spp. (0709, 0712, 0801), <i>Phormidium</i> spp. (0709, <i>Synechococcus</i> spp. (0709, 0710, 0712, 0801)
緑藻	<i>Nanochloris</i> spp. (SS; 0709), <i>Cladophora</i> spp. (S-L; 0709), <i>Ulva</i> spp. (S-L; 0709)	<i>Chlamydomonas</i> sp. (0709), unidentified species (0709), <i>Nanochloris</i> spp. (0709), <i>Cladophora</i> spp. (0709, 0712), <i>Ulva</i> spp. (0709, 0712*)		<i>Nanochloris</i> spp. (0709, 0710, 0712), <i>Ulva</i> spp. (0709)
プラシノ藻	<i>Pycnococcus</i> sp. (SS; 0709)	<i>Prasinococcus</i> sp. (0709)	<i>Mantoniella squamata</i> (0709, 0712), <i>Micromonas pusilla</i> (0709, 0712), <i>Pterosperma cristatum</i> (0712), <i>Pyramimonas</i> spp. (0709, 0712)	
渦鞭毛藻	<b><i>Alexandrium</i> spp.</b> (S; 0709), <i>Gymnodinium</i> spp. (S; 0709), <b><i>Heterocapsa</i> sp.</b> (S; 0709), <i>Pfiesteria</i> like	<i>Pfiesteria</i> like sp. (0709, 0712)	<b><i>Alexandrium</i> spp.</b> (0709), <b><i>Cochlodinium</i> sp.</b> (0709), <b><i>Dinophysis acuminata</i></b> (0709), <i>Gymnodinium</i> spp. (0709, 0712), <b><i>Heterocapsa</i> sp.</b> (0709), <b><i>Karenia mikimotoi</i></b> (0709),	



	species (SS; 0709, 0710, 0712)		<i>Pfiesteria</i> like species (0709, 0710, 0712), <i>Prorocentrum dentatum</i> (0709), <i>P. micans</i> (0709, 0712), <i>P. minimum</i> (0712), <i>Scrippsiella</i> spp. (0709, 0712)
ハプト藻		<i>Ochrosphaera</i> sp. (0709)	<i>Chrysochromulina hirta</i> (0709, 0710, 0712), <i>C. spinifera</i> (0712), <i>C. spp.</i> (0709, 0710, 0712), <i>Emiliania huxleyi</i> (0709, 0712), <i>Gephyrocapsa oceanica</i> (all), <i>Phaeocystis pouchetii</i> (0709, 0712), <i>Prymnesium parvum</i> (0712)
ラフィド藻	<i>Fibrocapsa japonica</i> (S; 0709), <i>Heterosigma akashiwo</i> (S; 0709, 0801)		<i>Chattonella marina</i> (0709), <i>Fibrocapsa japonica</i> (0709, 0710), <i>Heterosigma akashiwo</i> (0709, 0712)
珪藻	<i>Amphopra</i> spp. (S; 0709), <i>Asterionella glacialis</i> (S; 0712, 0801), <i>Chaetoceros</i> spp. (S; 0709, 0801), <i>Coscinodiscus</i> spp. (S-L; 0801), <i>Cyclotella striata</i> (S; 0709), <i>Diploneis</i> spp. (S; 0709), <i>Nitzschia</i> spp. (SS-S; 0709, 0712), <i>Paralia sulcata</i> (S; 0709, 0801), <i>Skeletonema costatum</i> (S; 0709, 0712, 0801)	<i>Amphopra</i> spp. (0709, 0712), <i>Cyclotella striata</i> (0709), <i>Cylindrotheca</i> sp. (0709, 0712), <i>Diploneis</i> spp. (0709), <i>Gyrosigma</i> sp. (0709), <i>Navicula</i> spp. (0709, 0712*)	<i>Asterionella glacialis</i> (0709, 0712), <i>Chaetoceros curvisetus</i> (0709, 0712), <i>C. debilis</i> (0709, 0712), <i>C. spp.</i> (all), <i>Coscinodiscus</i> spp. (all), <i>Eucampia zodiacus</i> (0709, 0712), <i>Leptocylindrus danicus</i> (0709, 0712), <i>Nitzschia</i> spp. (0709, 0710, 0712), <i>Papiliocellulus elegans</i> (0709, 0712), <i>Paralia sulcata</i> (0709, 0710), <i>Pseudonitzschia</i> spp. (all), <i>Skeletonema costatum</i> (0709, 0710, 0712), <i>Thalassiosira</i> spp. (0709, 0712, 0801)
その他	<i>Ochromonas</i> sp. (SS; 0709)	<i>Ectocarpus</i> spp. (0709, 0712*), <i>Glossomastix chrysoplata</i> (0709), <i>Sarcinochrysis marina</i> (0709), chlorarachiniophyte (0709)	<i>Eutreptiella gymnastica</i> (0709, 0712), <i>Hemiselmis</i> spp. (0709, 0801), <i>Rhinomonas</i> sp. (0709, 0712), <i>Rhodomonas salina</i> (0709)
全種類数 (有害種数)	24種 (4種)	28種 (0種)	48種 (13種)

\*1) 生存状態は培養処理試料での増殖と固定試料の蛍光顕微鏡による自家蛍光の確認で判断した。\*2) 細胞あるいはコロニーの最小サイズ(minimum dimension)が50 $\mu$ m以上: L、10~50 $\mu$ m: S、10 $\mu$ m以下: SSとして表記。

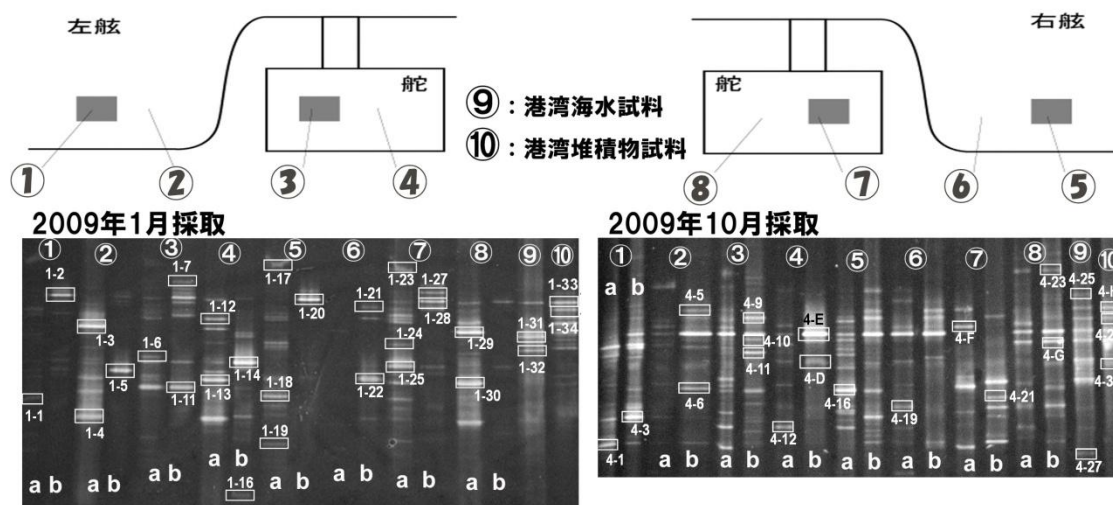


図6. 船体付着試料のDGGE法による解析結果

シアノバクテリアを主な対象とした16SrDNAの増幅断片のDGGEバンドパターンを示す。①、③、⑤、⑦: バイオサイドフリーペイント、②、④、⑥、⑧: バイオサイド混入ペイント。Aは採取直後の試料、bは同サンプルを培養処理した試料。DNA配列を決定したバンドを四角で囲み、番号を記した(表3のホモロジーサーチの結果と共通)。

表3. DGGE法で検出された主要バンドのDNA配列情報(登録番号)とホモロジー検索結果

NO.	登録番号	ホモロジー検索結果	NO.	登録番号	ホモロジー検索結果
1-1	AB559739	Bacterium	1-31	AB559764	Bacterium
1-2	AB559740	<i>Aureoumbra lagunensis</i>	1-32	AB559765	Bacterium
1-3	AB559741	Diatom	1-33	AB559766	Cyanobacterium
1-4	AB559742	Marine bacterium	1-34	AB559767	Phototrophic eukaryote

1-5	AB559743	<i>Pseudoanabaena</i>	4-1	AB559768	Phototrophic eukaryote
1-6	AB559744	Cyanobacterium	4-3	AB559769	Cyanobacterium
1-7	AB559745	<i>Aureoumbra lagunensis</i>	4-5	AB559770	Bacterium
1-11	AB559746	<i>Phormidium persicinum</i>	4-6	AB559771	<i>Phormidium persicinum</i>
1-12	AB559747	Bacterium	4-9	AB559772	<i>Aureoumbra lagunensis</i>
1-13	AB559748	Marine bacterium	4-10	AB559773	<i>Aureoumbra lagunensis</i>
1-14	AB559749	<i>Pseudoanabaena</i>	4-11	AB559774	Diatom
1-16	AB559750	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	4-12	AB559775	Marine Bacterium
1-17	AB559751	Marine Bacterium	4-E	AB559786	Cyanobacterium
1-18	AB559752	Bacterium	4-D	AB559785	Cyanobacterium
1-19	AB559753	Phototrophic eukaryote	4-16	AB559776	Cyanobacterium
1-20	AB559754	<i>Aureoumbra lagunensis</i>	4-19	AB559777	Bacterium
1-21	AB559755	Cyanobacterium	4-F	AB559787	Cyanobacterium
1-22	AB559756	<i>Pseudoanabaena</i>	4-21	AB559778	Cyanobacterium
1-23	AB559757	Marine Bacterium	4-23	AB559779	<i>Amphora coffeaeformis</i>
1-24	AB559758	Bacterium	4-G	AB559788	Cyanobacterium
1-25	AB559759	Cyanobacterium	4-25	AB559781	Cyanobacterium
1-27	AB559760	<i>Aureoumbra lagunensis</i>	4-27	AB559782	Cyanobacterium
1-28	AB559761	Cyanobacterium	4-H	AB559789	Symbiosis cyanobacterium
1-29	AB559762	Diatom	4-29	AB559783	Diatom
1-30	AB559763	Bacterium	4-32	AB559784	Phototrophic eukaryote

(2) リアルタイムPCR法を用いた有害植物プランクトンの検出と定量化

有害植物プランクトンの*Chattonella* spp. (*C. antiqua*, *C. marina*, *C. ovata*の3種を含む)、*Heterosigma akashiwo*, *Alexandrium* spp. (*A. catenella*, *A. tamarense*を含む)、そして*Pseudonitzschia* spp.の4藻類群を対象として、寄港地港湾堆積物およびバラストタンク内堆積物からのリアルタイムPCRによる検出を試みた。いずれの種も日本を始め、世界各地で大量繁殖や水産養殖業への被害を引き起こすことで問題にされており、近年、分布域の拡大が懸念されている<sup>15)</sup>。各標的生物に特異的なプライマーセットの有効性と増幅条件について培養株を用いて検討を行い、6段階の希釈系列から細胞数推定のための検量線を作成し、バラストタンク試料や港湾試料等の各環境試料のDNA抽出を行い、リアルタイムPCR法を用いた解析を行い、細胞密度を推定した。

表4. リアルタイムPCRで検出された有害植物プランクトン4種の細胞密度  
寄港地港湾堆積物、バラ積み船「A」のバラストタンク内堆積物、排出バラスト水中の細胞密度、そして、その他の輸送船舶バラストタンク内堆積物中の細胞密度

試料 (採種年月)	細胞密度 (堆積物はcell/kg、バラスト水はcell/L)			
	<i>Chattonella</i> spp.	<i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Pseudonitzschia</i> spp.
瀬戸内海港湾堆積物 (0709)	2,372	58,558	9,204	248,456
バラストタンク堆積物 (0709)		812	78	31,689
瀬戸内海港湾堆積物 (0710)	828	5,542	1,634	+
バラストタンク堆積物 (0710)	142	4,739	387	
東京湾堆積物 (0712)		392,991	5,913	
バラストタンク堆積物 (0712)		8,026	168	25,145
瀬戸内海港湾堆積物 (0801)	404			+
バラストタンク堆積物 (0801)		3,128	1,226	25,569
瀬戸内海港湾堆積物 (0803)		14,470	3,549	
バラストタンク堆積物 (0803)		6,462		
瀬戸内海港湾堆積物 (0806)	4,255	32,819	429,654	+
バラストタンク堆積物 (0806)		877	263,992	
瀬戸内海港湾堆積物 (0808)		5,092	186	593,538
バラストタンク堆積物 (0808)		3,405	99,627	

リバラスト排水中 (0808)		1.6	0.2	256
オーストラリア排水中 (0808)				
東京湾堆積物 (0809)		380,449	4,439	+
バラストタンク堆積物 (0809)			49,763	
リバラスト排水中 (0809)		1.0		42
オーストラリア排水中 (0809)			0.2	1.4
瀬戸内海港湾堆積物 (0810)	1,183	791	356	+
バラストタンク堆積物 (0810)		3,354	10,231	
瀬戸内海港湾堆積物 (0811)	6,556	283,115	1,434	347,440
バラストタンク堆積物 (0811)		2,716	32,703	
リバラスト排水中 (0809)		2.4	20.9	743.8
東京湾堆積物 (0901)		1,047		1,071
バラストタンク堆積物 (0901)		7,998	70,565	
リバラスト排水中 (0901)			14.0	3.1
オーストラリア排水中 (0901)			2.5	11.2
石炭運搬船 (日-豪0508)		118,165	1,552	154,060
コンテナ船 (欧-アジア0603)		1,464	57	
コンテナ船 (日-米-アジア0601)		9,973	522	8,523
自動車運搬船 (不明0607)	9.9		289	8,485
自動車運搬船 (日-米0607)		1,746	45	

+: 検出できたが非特異的増幅が存在したため、定量化できなかった

表5. バラストタンク内で2ヶ月間培養チャンパー内に保持した堆積物中の生存細胞数の変化  
リアルタイムPCRで検出された有害植物プランクトン3種の細胞密度

試料	<i>Chattonella</i> spp.	<i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>Alexandrium</i> spp.
瀬戸内海港湾堆積物	404*	39,431	4,439
同試料の2ヶ月後	705* (100%)	5,694 (14%)	101 (2%)

\*) 統計的検定では差は認められない

リアルタイムPCRで検出された *Chattonella* spp.、*Heterosigma akashiwo*、*Alexandrium* spp.、*Pseudonitzschia* spp.の堆積物中の細胞密度および実際にリバラスト海域やオーストラリア寄港地で排出されたバラスト水中の細胞密度を表4に示す。いずれの種も航海後のタンク内堆積物から検出されること、そしてリバラストにより、細胞数が激減する一方で、プランクトン種によって排出のされやすさに違いがあり、*Alexandrium*と*Pseudonitzschia*は、豪州寄港地で実際に排出されていることを確認できた。豪州港湾で排出され細胞数は、1隻の総バラスト水量約92,000m<sup>3</sup>あたり最大2.3億細胞に達する見積りが得られた。バラストタンク内に実際に設置して行った培養チャンパー試験では、航海後に*Heterosigma*と*Alexandrium*の生存率が各々14%と2%に減少したのに対して、*Chattonella*の生存率ほとんど変わらなかった。*Heterosigma akashiwo*と*Alexandrium* spp.の場合、調査を行った国内港湾堆積物中の細胞密度も高く、バラストタンクから高頻度に検出された。*Pseudonitzschia* spp.の場合、港湾海水中で季節的な消長を繰り返しており、冷暗所で長期に保管した港湾堆積物からはほとんど検出されないことから、海水由来の栄養細胞が堆積物に紛れ込んでいる可能性が考えられた。また排出されるバラスト水から高頻度に検出されることから、栄養細胞自体がタンク内環境に対して耐性をもち、バラスト水とともに世界各地に越境移動している可能性が示唆された。*Chattonella*の場合、タンク内に設置した培養チャンパー内で2ヶ月間保持された後もほとんど生存率が変化しないという結果が示された(表5)一方で、タンク内から検出される頻度は低い。これは*Chattonella*のシストが小さく、珪藻殻に付着する性質をもつことやまわりの

港湾堆積物に含まれる細胞密度が低いことが原因と考えられる。

*Chattonella* spp.のシストは自然界の堆積物から検出、報告されている<sup>16)</sup>。しかしバラスト水やタンク内堆積物から検出された例はこれまで知られてなく、バラスト水を介した移動が推測されてはいたが、直接的証拠はなかった。今回のリアルタイムPCRによる検出結果は、*Chattonella*がバラスト水を介して越境移動する可能性を強く示唆する結果と言える。*Chattonella*のシストサイズは10 $\mu$ m以下で、付着性の性質をもつことから、顕微鏡による観察それ自体が困難であり、本法はこうした生物の定量的検出に有効な手段と言える。*Alexandrium* spp.に関しては、シストのサイズが大きく、顕微鏡による堆積物の観察から検出可能であり、バラストタンク内からの検出が報告されている<sup>7)</sup>。しかし*Alexandrium*の場合でも、実際には堆積物からシストを検出して計数するのは困難を伴う作業であること、近縁種のシストの識別が困難なこと、計測値が人為的影響を受け易いことなどの問題があり、リアルタイムPCR法は有効な手段となりうる。

リアルタイムPCR法は、原理的には1分子でも標的生物のDNAがあれば検出可能であり、希薄な試料からの高感度かつ定量的検出が特徴である。プライマーの設計次第で、種特異的に、あるいはいくつかの種のまとまりや属レベルの検出といった使い分けも可能で、また一つのDNA試料で複数の配列を同時に解析することも可能である。有害植物プランクトンの多くは堆積物中にシストとして存在することが知られ、シストの有無、またその埋蔵量はその海域における定着の指標となりうる<sup>16)</sup>。リアルタイムPCRを活用することで、顕微鏡による検出の限界を克服でき、より詳細かつ網羅的に特定海域への有害植物プランクトン種の定着について調査することが可能になると考えられる。また試料の収集、処理の標準プロトコールを整備することで専門知識をもたなくても問題となる生物を同手法で検出できることから、バラスト水を介した海洋生物の動態把握や定着の初期過程の解析等に有効な手段となることが期待される。

### (3) マイクロサテライトマーカーを用いた*Chattonella*の集団解析

*C. antiqua*及び*C. marina*各集団の遺伝的多様性指数を図7に示す。全ての集団は同程度の遺伝的多様性を示したが、東京湾集団が既知集団の中で比較的高い値を示した。一方、各集団の特異的遺伝子型数の場合(図8)、*C. marina*の東京湾集団において多数の特異的遺伝子型が確認された。地理的距離と遺伝的分化指数との関係について解析を行った結果、*C. marina*集団では、地理的距離と遺伝的距離の間に正の相関は認められなかった。また鹿児島湾と東京湾集団との類縁性が示唆された(図9)。

有毒渦鞭毛藻*Alexandrium tamarense*のマイクロサテライトマーカーを用いた集団解析では、東北地方と瀬戸内海集団が、地理的距離に対して遺伝的距離が小さく、養殖カキの移動による*A. tamarense*の人為的分布拡散の可能性が推察されている<sup>11)</sup>。鹿児島湾では1977年、東京湾ではごく最近、2008年に初めて*Chattonella*が確認されており、鹿児島湾から東京湾へ*C. marina*が移動した可能性が考えられた。しかし前述の通り、東京湾集団には他の日本の集団にはない特異的な遺伝子型が存在すること、そして遺伝的多様性が比較的高いことから、鹿児島湾集団の一部が移動したとは考えにくい。Roman and Darling (2007)<sup>17)</sup>は、個体の移入とその後の集団内での交配によって遺伝的多様性が増加する可能性について述べている。東京湾の遺伝子型については、更に詳しい調査が必要であるが、東京湾における膨大な海運量を考えると、日本集団だけでなく海外から別の遺伝子型をもつ集団が導入されている可能性についても考慮する必要がある。

高精度のDNAマーカーを用いた集団解析は、人為的に移動・拡散した海洋生物の動態把握に有効な手段の一つといえる。しかし植物プランクトンの場合、解析には培養株の確立が必要である。また季節的な消長を繰り返すような種の場合、解析に必要な材料収集そのものが困難といえる。瀬戸内海、東京湾、そしてニュージーランドのウェリントンの港湾底泥試料中に含まれる *Chattonella* シストをリアルタイムPCRにより解析した結果、瀬戸内海で  $107,000 \pm 34,500$  cells/kg、東京湾で  $333.2 \pm 66.2$  cells/kg、ウェリントンで  $833.5 \pm 556.3$  cells/kgの細胞数が検出された。同試料について、複数のマイクロサテライトマーカーによる増幅を検討した結果、Chamo7等の特定のマーカーによる増幅を確認出来た。これまでに瀬戸内海堆積物から3種類、東京湾堆積物から3種類、ウェリントン堆積物から5種類の多型検出に成功しており、今後、更に条件検討することで、環境DNA試料を用いた集団の多型解析を直接実施できる可能性が示唆された。

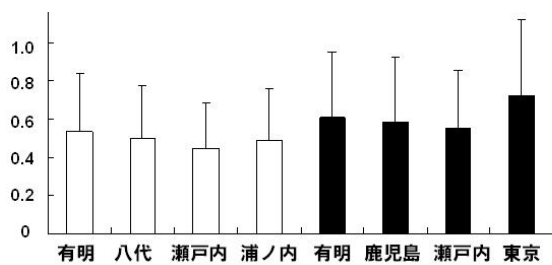


図7. 各集団の遺伝的多様性指数 □: *C. antiqua*、■: *C. marina* バーは標準偏差

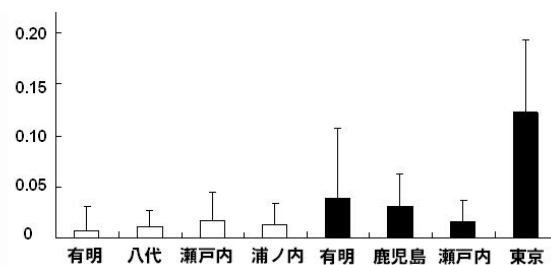


図8. 集団に特異的な遺伝子型数 □: *C. antiqua*、■: *C. marina* バーは標準偏差

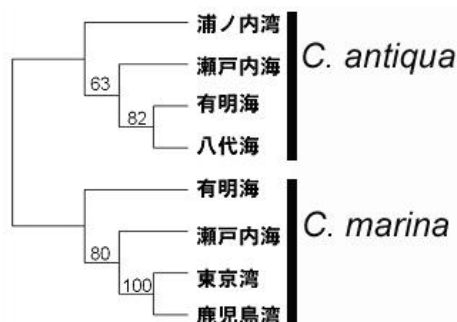


図9. 各集団間の遺伝的類縁関係  
各枝の数字は100回のブートストラップ値(50以上)を示す

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

1) 同一の船舶でバラストタンク内試料と船体付着試料に由来する微細藻多様性が各々調査された例はこれまでになく、両媒体の比較を行う上で有用な知見を得ることができた。バラストタンク内の試料からは、一部の有害植物プランクトンが検出されたが、付着試料からは今のところ有害種は検出されていない。このような両媒体由来の試料を継続的に収集し、有害植物プランクトン等の問題種を対象として、顕微鏡観察及びリアルタイムPCR等の遺伝子レベルの解析を行うことで、定量的に移入と定着の状況を把握することが期待できる。

2) 船体付着試料を採取する際に、メラミンフォーム素材スポンジを用いることで、付着の初期段階の試料を効率よく、定量的に採取できる方法を確認できた。

3) 堆積物からの有害種検出にリアルタイムPCR法を適用することで、各々の標的種を定量的に検出できた。特に *Chattonella* spp. と *Heterosigma akashiwo* は、今回バラストタンク内で初めて存在が

確認され、バラスト水を介して越境移動する可能性を強く示唆する結果が得られた。

## (2) 地球環境政策への貢献

国際海事機構 (International Maritime Organization, IMO) において、船舶による生物広域化への対策として、バラスト水管理条約に続き、船体付着による生物移動の防除が検討され始めており、国土交通省・環境省を中心とした日本代表団も議論に加わり、日本からの情報提供と国際的対策策定に向けて動き始めている。こうした状況の中、実際の船舶を用いて、バラスト水及び船体付着に含まれる生物の実態と移動機構を検討した本研究結果は、日本の現状検討の資料として重要である。

## 6. 引用文献

- 1) 岩崎敬二. 「日本における海産外来生物問題と公的機関の対応」日本プランクトン学会報, 54: 17-24. (2007)
- 2) 河地正伸・出村幹英・ノエルマリエレン・都丸亜希子・大村卓朗. 「バラストタンク内における微生物の動態と越境移動問題」海洋と生物: 29: 204-211. (2007)
- 3) Carlton, J.T. Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms, *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 23: 313-374. (1985)
- 4) Ruiz, G.M., Rawlings, T.K., Dobbs, F.C., Drake, L.A., Mullady, T., Huq, A., Colwell, R.R. Global spread of microorganisms by ships - Ballast water discharged from vessels harbours a cocktail of potential pathogens. *Nature* 408: 49-50. (2000)
- 5) 菊地武晃. 「船舶バラスト水問題とは」海と安全, No. 509: 2-9. (2001)
- 6) Wahl, M. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series* 58: 175-189. (1989)
- 7) Hallegraeff, G.M. and Bolch, C.J. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture, *J. Plankton Res.* 14: 1067-1084. (1992)
- 8) Hamer, J.P., Lucas, I.A.N. and McCollin, T.A. Harmful dinoflagellate resting cysts in ships' ballast tank sediments: potential for introduction into English and Welsh waters, *Phycologia* 40: 246-255. (2001)
- 9) Callow, M.E. Fouling algae from 'In-service' ships. *Botanica Marina* 29: 351-357. (1986)
- 10) Kamikawa, R., Masuda, I., Oyama, K., Yoshimatsu, S., Sako and Y. Genetic variation in mitochondrial genes and intergenic spacer region in harmful algae *Chattonella* species. *Fisheries Science* 73: 871-880. (2007)
- 11) Galluzzi, L., Penna, A., Bertozzini, E., Vila, M., Garcés, E. and Magnani, M. Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Alexandrium minutum* (a dinoflagellate). *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1199-1206. (2004)
- 12) Demura, M., Kawachi, M., Kunugi, M., Nishizawa, T., Kasai, F. and Watanabe, M. M. Development of microsatellite markers for the red tide-forming harmful species *Chattonella antiqua*, *C. marina*, and *C. ovata* (Raphidophyceae). *Mol. Ecol. Notes* 7: 315-317. (2007)

- 13) Codd, G.A., Morrison, L.F. and Metcalf, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 264-272. (2005)
- 14) Evans, L.V. Marine algae and fouling: a review, with particular reference to ship-fouling. *Botanica Marina* 24: 167-171. (1981)
- 15) Hallegraeff, G.M., Bolch, C.J., Bryan, J. and Koerbin, B. Microalgal spores in ships' ballast water: a danger to aquaculture, In Graneli, E. et al. (eds), *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier, New York, pp. 475-480. (1990)
- 16) Imai, I and Itoh, K. Distribution of dormant cells of *Chattonella* in bottom sediments of Harima-Nada, Eastern Seto Inland Sea, in April 1984. *Bull. Nansei Reg. Fish. Res. Lab.* 19: 43-52. (1985)
- 17) Roman, J. and Darling, J. A. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *TREND in Ecology and Evolution* 22: 454-464. (2007)

## 7. 国際共同研究等の状況

バラスト水により越境移動の可能性のある有害植物プランクトンの収集、保存、多型解析等の研究に関して、Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (USA)の Robert A. Andersen博士およびCawthron Institute (ニュージーランド)のLesley Rhodes博士らと共同で研究を進めている。

## 8. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Demura, M., Noel, M.-H., Kasai, F., Watanabe, M.M. and Kawachi, M. Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* and *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity. *Phycologia* 48: 518-535. (2009)
- 2) Tomaru, A., Kawachi, M., Demura, M. and Fukuyo, Y. Denaturing gradient gel electrophoresis shows that bacterial communities change with mid-ocean ballast water exchange. *Mar. Poll. Bull.* 60: 299-302. (2010)

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 功刀正行・津金正典・金子仁. 「船舶におけるバラストタンクの構造とその物理化学環境」 *海洋と生物*, 29: 195-20 (2007)
- 2) 河地正伸・出村幹英・ノエルマリエレン・都丸亜希子・大村卓朗. 「バラストタンク内における微生物の動態と越境移動問題」 *海洋と生物*, 29: 204-211 (2007)

### (2) 口頭発表(学会)

- 1) 河地正伸・出村幹英・田野井孝子・功刀正行・岡村秀雄・羽生田岳昭・川井浩史. 「大型輸送船舶由来の付着性微細藻類フロラ」 日本藻類学会第32回大会, 東京2008年3月21-24日.

### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

### (4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

1) 朝日新聞（H19年7月11日、全国版、サブテーマ（1）詳細版に記事を掲載）

(6) その他

特に記載すべき事項はない。



D-072 大型船舶のバラスト水・船体付着で越境移動する海洋生物の動態把握と定着の早期検出  
 (3) バラスト水による海産動物の導入・定着に関する研究

広島大学大学院生物圏科学研究科	大塚 攻
<研究協力機関> 広島大学大学院生物圏科学研究科	下埜 敬紀
高知大学総合研究教育センター	上田 拓史
広島大学大学院教育学研究科	富川 光
東京海洋大学	石丸 隆
(株)水土舎	伊東 宏
カナダUniversity of British Columbia	山口 愛果
中華人民共和国 Wenzhou Medical College	Changjiang Huang・Xu Shang
アメリカ合衆国 San Francisco State University	William J. Kimmerer
アメリカ合衆国 University of Washington	Jeffrey R. Cordell
アメリカ合衆国 Smithsonian Institution	T. Chad Walter
大韓民国 Chonnam National University	Ho Young Soh

平成19～21年度合計予算額 14,365千円

(うち、平成21年度予算額 4,290千円)

※予算額は、間接経費を含む。

[要旨] サンフランシスコ湾(SFB)に導入された東アジア原産カイアシ類の潜在的導入元である中国南部厦門及び温州の汽水域において浮遊性カイアシ類の分布を調査した。本汽水域の表面塩分の範囲は約1～20であった。50種が出現し、主要種において塩分10～20及び5～10の間には顕著な群集組成の相違があった。SFBに導入された肉食性2種*Acartiella sinensis*, *Tortanus dextrilobatus*が本水域で確認されたが、塩分1～10に分布の中心があった。一方、同じ塩分範囲に多産する粒子食者*Acartia ohtsukai*, *A. spinicauda*, *Pseudodiaptomus poplesia*, *Mesocyclops aspericornis*は世界のいずれからも移入種としての報告はない。また、日本各地の国際貿易港でカイアシ類相を調査したが、外来種の出現は確認できなかった。このことは貿易統計や生物地理によってある程度の説明が可能である。SFBに定着している東アジア原産カイアシ類3種*Pseudodiaptomus marinus*, *Sinocalanus doerrii*, *Acartiella sinensis*及びオレゴン州、ワシントン州に定着している東アジア産*Pseudodiaptomus inopinus*の導入元をピンポイントで探索するためにmtDNAを用いて、合衆国と日本、韓国、中国の個体群間で遺伝子を比較した。*P. marinus*においては、SFBと遺伝的に類縁があったのは東京湾、大阪港などの個体群であった。一方、韓国南部の個体群は遺伝的に他海域とは異なっていたが種内変異内での差と考えられるのに対して、中国の個体群は本種と近縁の未記載種であることが遺伝的、形態的に確認された。*S. doerrii*, *A. sinensis*では、SFBと中国の個体群間で多くの個体の一つのプロタイプを共有していた。*P. inopinus*については合衆国の個体群の遺伝子解析ができなかったが、東アジアにおいては隠蔽的複数種の存在が指摘された。

[キーワード] カイアシ類、導入、中国、サンフランシスコ湾、mtDNA

## 1. はじめに

東アジア原産の浮遊性カイアシ類の導入、定着が船舶バラスト水を介して南北アメリカ大陸の太平洋側において1960～1990年代に頻繁に起こり、現地の生態系を劇的に変化させた<sup>1-3)</sup>。特に、アメリカ合衆国のカリフォルニア州、オレゴン州、ワシントン州の感潮域では東アジア原産の侵略的外来種によって生態系が激変していることが詳細な研究によって明らかになっている。こうしたバラスト水経由の外來種の導入防止策として、カリフォルニア州では2000年から外洋においてバラスト水を行っていない船舶のサンフランシスコ湾（以下、SFBと略す）への進入は禁止しており、新たな外来種の定着防止に有効であることが実証されている<sup>4)</sup>。

これらの外来浮遊性カイアシ類については、アメリカ合衆国における導入された個体群については、その生態、生態系への影響評価が活発に研究されているが、東アジアにおける導入元の特定及び導入元における生態などの課題が残されている。導入元を特定することは、どのようなベクターで導入されたかを解明する大きな手がかりとなる。このためには導入元と導入先の個体群の遺伝子の比較が最も確実なツールである。導入元での生態を調査することは、外来種の拡散を防止する意味から極めて重要である。また、どの港から持ち出したバラスト水には潜在的な侵略的種が含まれるという予報も可能である<sup>5)</sup>。

以上のような背景により、以下の観点からカイアシ類の調査を行った。1)中国、韓国におけるカイアシ類の分布状況、2)日本の国際貿易港における外来性カイアシ類の出現の有無と国際貿易との関連性、3)アメリカ合衆国に導入された東アジア産カイアシ類の導入元の探索。

## 2. 研究目的

### (1) 中国における汽水性カイアシ類の微細分布に関する研究

アメリカ合衆国太平洋岸の汽水域では東アジア産カイアシ類8種が定着し、元来の生態系が激変しているため<sup>1-3)</sup>、様々な角度から詳しい調査がなされている。一方、導入元である東アジア、特に中国、韓国でのカイアシ類の研究において、分類、生態に関してもかなり不十分な状態である。したがって、本調査では、中国廈門のJiu Long River（九龍江）、温州のOujiang River（甌江）の河口域、韓国南部のGwangyang Bayにおいて姉妹種、近縁種などを厳密に識別して分類学的にも正確な水平分布の情報を把握することを目的とした。

### (2) 日本の国際貿易港における外来性カイアシ類出現の有無と貿易構造との関連に関する研究

日本各地の国際貿易港のカイアシ類相を正確に把握して、国外からのカイアシ類の導入、定着の有無を調査すると同時に、今後起こりうる外来種の導入、定着の早期検出に役立てることを目的とした。本年度は、石狩港、室蘭港、釧路港、苫小牧港、長崎港、佐世保港、那覇港において調査を行った。また、川崎港、名古屋港、大阪港、北九州港においては様々な船舶による貿易統計に基づいて試算したバラスト水の国外への水の持ち出しと国内への持ち込みの量との関連性も調査した。本調査は、国外へカイアシ類が導入された場合には導入元の特定にも有用であろう。

### (3) 東アジア産浮遊性カイアシ類の遺伝的多様性および導入個体群の比較に関する研究

アメリカ合衆国太平洋岸の汽水域に定着している東アジア産カイアシ類8種の導入元については推定されていたが、特定には至っていない。最近のカイアシ類の分子系統学的研究の発展により、これまで汽水～沿岸に普通に分布している主要なカイアシ類とされた中にも複数の隠蔽種が

発見されるようになってきたため、遺伝子も含めた分類学的再検討も必要な状況になっている。分子系統学的手法を用いれば、隠蔽種の発見はもちろん、移入種の導入元を特定することも可能であり、移入種がいつ、どのような船舶、航路で導入されたかを推測することもできる。導入先のアメリカ合衆国SFB及びオレゴン州、導入元の可能性がある日本、韓国、中国から採集された4種*Pseudodiaptomus marinus*（本種は中国からは採集されなかった；後述）、*P. inopinus*、*Acartiella sinensis*、*Sinocalanus doerrii*のミトコンドリア（mt）DNAを比較して、遺伝的多様性を比較した。

### 3. 研究方法

#### （1）中国、韓国における汽水性カイアシ類の微細分布に関する研究

中国での汽水性カイアシ類の微細分布を明らかにするために、南部の都市厦門沖に広がるJiu Long River（九龍江）河口の5定点において2008年9月20日夜間に漁船を備船して調査を実施した。船は約2ノットで走行し、NORPACネット（口径45cm、網目0.3 mm）によって極表層を5分間曳網して、半定量サンプルとした。この時、ネットの口はほぼ半分が水中に浸かるように設置した。サンプルは直ちに99.5%エタノールで固定し、研究室で種まで同定可能な成体のみを全個体計数した。一部の標本は形態観察のためにその後、70%エタノールに移した。採集時には各定点でサリノメーター（YSI 556MPS）によって水温、塩分を、GPSで緯度、経度を記録した。

同様に、温州市を流れるOujiang River（甌江）の3定点で2008年9月17日昼間に船外機付き小型ボートを備船して調査を行った。厦門での備船した漁船と異なり、船速を固定することは困難であったので半定量採集は行わず、各定点でNORPACネット（口径45cm、網目0.3 mm）を用いて斜め曳きを数回行った。

韓国南部Gwangyang Bayの40定点において、汽水性カイアシ類*Acartia*属の同胞2種*Acartia ohtsukai*及び*A. pacifica*の微細分布を明らかにするために、2005年11月～2006年8月にNORPACネット（口径45cm、網目0.2 mm）で定量採集を行い、このサンプルに含まれる2種成体の個体数から密度を算出した。また、採集時には各定点でCTD（Alec Electronics Co., Model ACL1150-DK）によって水温、塩分を記録した。

#### （2）日本の国際貿易港における外来性カイアシ類出現の有無と貿易構造との関連に関する研究

日本の国際貿易港の石狩港、室蘭港、釧路港、苫小牧港、川崎港、名古屋港、大阪港、神戸港、水島港、玉島港、坂出港、北九州港、長崎港、佐世保港、那覇港において2004～2007年の間に採集された浮遊性カイアシ類相の調査を行った。採集は夜間、水中集魚灯を点灯してその周辺を簡易円錐ネット（口径30 cm、網目0.1 mm）によって採集したか、あるいは日中～日没直後に同ネットによって傾斜曳きを行った。これらのサンプルに含まれる浮遊性カイアシ類の成体を種レベルまで同定した。また、川崎港、大阪港、神戸港、北九州港の2005年の港湾統計を用いて各港におけるバラスト水の持ち込み量と持ち出し量を国別、船種別に試算した。

#### （3）東アジア産浮遊性カイアシ類の遺伝的多様性および導入個体群の比較に関する研究

本研究期間中に北米太平洋岸に導入された東アジア産カイアシ類4種*Pseudodiaptomus marinus*（SFB、日本、韓国）、*P. inopinus*（オレゴン州、日本、韓国）、*Acartiella sinensis*（SFB、厦門）、*Sinocalanus doerrii*（SFB、上海）を対象として解析を行った。

*P. marinus*に関しては昨年度からの継続で実験を実施し、徳島港で採集した個体を新たに解析に加えたほか、SFBおよび日本（大阪港、有明海奥部六角川河口）、韓国（Hauei島）で解析個体数を

追加した。また、大阪港と東京湾での解析は、昨年度は複数地点で採集し解析に加えていたが、他の地域集団は、同一日、同一地点で採集した標本のみ解析している。本年度は、条件を統一するため、大阪港と東京湾でも同一日、同一地点で採集した標本のみ解析することとした。*P. inopinus*は中国(温州)、日本(神奈川県多摩川、高知県江の口川、佐賀県六角川)、アメリカ合衆国オレゴン州(Coos River, Yaquina River)で採集した個体について解析を行った。DNA抽出はDNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を使用して行い、抽出したDNAを鋳型として、GeneAmp9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いてPCR法により目的の遺伝子を増幅した。

*P. marinus*はmtDNAのCytb遺伝子の一部領域(400塩基)をプライマー、UCYTB151F: 5'-TGTGGRGCNACYGTWATYACTAA-3'; UCYTB270R: 5'-AANAGGAARTAYCAYTCNGGYTG-3' (Merritt et al., 1998)<sup>5)</sup>を用いて増幅させた。PCRの条件は、initial denaturarionを94°C2分間した後、1サイクルをdenaturation 94°C 30秒、50°C 30秒、72°C 60秒を35サイクル行い、最後にfinal extension 72°C 4分行った。*P. inopinus*はミトコンドリアCOI遺伝子の一部領域(-650塩基)をプライマーL1384COI: 5'-GGTCATGTAATCATAAAGATATTGG-3' (Machida et al., 2004)<sup>6)</sup>; HCO2198-COI: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer et al., 1994)<sup>7)</sup>を用いて増幅させた。PCRの条件は、initial denaturarionを94°C2分間した後、1サイクルをdenaturation 94°C 30秒、50°C 30秒、72°C 60秒を35サイクル行い、最後にfinal extension 72°C 4分行った。

PEG沈殿法 (Lis, 1980)<sup>8)</sup>により精製したPCR産物3.0μLをTemplate DNAとして使用し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンスを行い、エタノール沈殿法によりDNAを精製した後、ジェネティックアナライザ 3130xl (Applied Biosystems)を用いてダイレクトシーケンスを行った。昨年度と同様に、1) 各集団におけるハプロタイプ多様度 (Haplotype diversity, *He*)、2) cytbのハプロタイプネットワーク系統樹の構築、3) 空間分子分散解析 (SAMOVA) を行った。各解析にはTCS v.1.21 (Clement et al., 2000)<sup>9)</sup>、Arlequin v.2.0 (Schneider et al., 2000)<sup>10)</sup>および、SAMOVA v.1.0 (Dupanloup et al., 2002)<sup>11)</sup>を用いた。*P. inopinus*については、最大節約法による分子系統樹の構築と、遺伝的距離 (Uncollected p-distances) をPAUP\*4.0b10 (Swofford, 2002)<sup>12)</sup>を用いて求めた。*Acartiella sinensis*の遺伝子解析もほぼ同様の方法で行ったが、*P. marinus*の解析と異なる点を以下に記載する。抽出したDNAはPCR法によりmtDNAのCOI遺伝子の一部領域をプライマーCOI-K1: 5'-CCNCGDATRAAAYAATATAAG-3', H2612-COI: 5'-AGGCCTAGGAAATGTATMGGGAAA-3'を用いて増幅させた<sup>7)</sup>。PCRの条件は、initial denaturarionを94°Cで2分間した後は、1サイクルdenaturation 94°C 30秒、48°C 30秒、72°C 60秒を35サイクル行い、最後にfinal extension 72°C 4分行った。

データ解析は、*A. sinensis*は遺伝的分化係数 (Population pairwise *Fst*) をArlequin v.2.0<sup>10)</sup>を用いて求めた。*Sinocalanus doerrii*の遺伝子解析もほぼ同様の方法で行ったが、*A. sinensis*の解析と異なる点のみを以下に記載する。抽出したDNAは、PCR法によりミトコンドリアDNAのCOIの一部領域をプライマー、LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'); HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')を用いて増幅させた。PCRにはGeneAmp9700 (Applied Biosystems)を用いた。PCRの条件は、initial denaturarionを94°Cで10分間した後は、1サイクルをdenaturation 94°C 30秒、50°C 30秒、72°C 45秒を35サイクル行い、最後にfinal extension 72°C 4分行った。DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen)により精製したPCR産物3.9 μLをTemplate DNAとして使用し、ABI PRISM Big Dye Terminator V.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)を用いてサイク

ルシーケンスを行い、エタノール沈殿法によりDNA精製後、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いてダイレクトシーケンスを行った。

#### 4. 結果・考察

##### (1) 中国、韓国における汽水性カイアシ類の微細分布に関する研究

本年度に実施したOujiang River (甌江)におけるカイアシ類の分布を表1に示す。出現種は全部で20種、塩分で出現種が異なった。つまり、塩分16.7~4.3まで幅広く出現するもの(5種)、16.7のみに出現するもの(6種)、9.7~4.3の範囲で出現するもの(3種)、4.3のみに出現するもの(6種)であった。この結果は昨年度実施したJiu Long River (九龍江)での結果と類似している(図1)。つまり、塩分10~20の間、さらに1~10の間にもカイアシ類群集組成の相違があることが二つの水域で確認できた。北米に導入、定着が確認されているものは*Tortanus dextrilobatus*、*Acartiella sinensis*の2種であるが、いずれの水域でも塩分が10以下に多く出現していることがわかる。本来、これらの種はアジア大陸の汽水域に固有のもので、日本周辺水域からは出現記録がない。したがって、中国あるいは韓国が北米における導入元であることは示唆されていた。また、日本の国際貿易港は通常、沿岸域に位置しており、このような低塩分の水域には位置していない。これらの2種がアジア大陸、特に中国からバラスト水によって導入されたことをさらに裏付ける結果である。

韓国南部Gwangyang Bayの40定点において実施した暖水性汽水性カイアシ類*Acartia*属の同胞2種*Acartia ohtsukai*及び*A. pacifica*の分布調査では、2種の明瞭な棲み分けを検出できた。つまり*ohtsukai*は湾内の塩分が降雨によって16~30以下になった時期(6、7月)に湾内全域に出現し、*A. pacifica*はその時期には塩分32以上の沖合の水域に出現した。降雨の減少によって湾奥の塩分が32以上になると後者が湾内全域で優占した。両種は水温が12℃以下になると水塊から消滅した。

以上の結果より、バラスト水をいつ、どの水域で採取するかによってバラストタンク内のカイアシ類の群集は大きく異なることが示唆される。特に、バラスト水によって導入されやすいのは塩分10以下に生息する汽水性種である。導入された記録のあるカイアシ類には属する分類群、食性については統一性がないことが指摘されているものの<sup>4)</sup>、今回、北米に導入された記録のある中国産2種はいずれもディアプトムス上科Diptomoideaに属し、肉食性である<sup>2,3,4)</sup>。これらのカイアシ類のバラストタンク内での生残メカニズムが解明されるべきである。また、同胞種でも出現する水温、塩分の範囲はかなり異なるので、導入先での同定には細心の注意が払われるべきである。本年度の遺伝子解析の結果でも、*Pseudodiaptomus inopinus*と報告されていた本邦産個体群は遺伝的には別種の可能性が示唆された。したがって、オレゴン州に導入された種はどの個体群あるいはどの種であるのかを今後、明らかにする。また、昨年度報告したように中国九龍江で採集された*Pseudodiaptomus* sp.は*P. marinus*の同胞種であり、本種が他水域に導入されていないかも今後、精査すべきである。

##### (2) 日本の国際貿易港における外来性カイアシ類出現の有無と貿易構造との関連に関する研究

本年度に実施した石狩港、室蘭港、釧路港、苫小牧港、長崎港、佐世保港、那覇港における浮遊性カイアシ類の成体の出現状況を表2に示す。各港からは5~29種が確認できたが、いずれの港からも外来種(形態種レベル)の出現は確認できなかった。那覇港に出現した*Labidocera* sp.は未記載種であるが、国際貿易とはほとんど関係がない南西諸島の島々などからも採集されているので外来種である可能性は低い。本研究では、これらの港に加えて貿易量の多い名古屋港、川崎港などを含む本邦の貿易港14港を調査したが、外来種(少なくとも形態種レベル)の出現は確認できなかった。

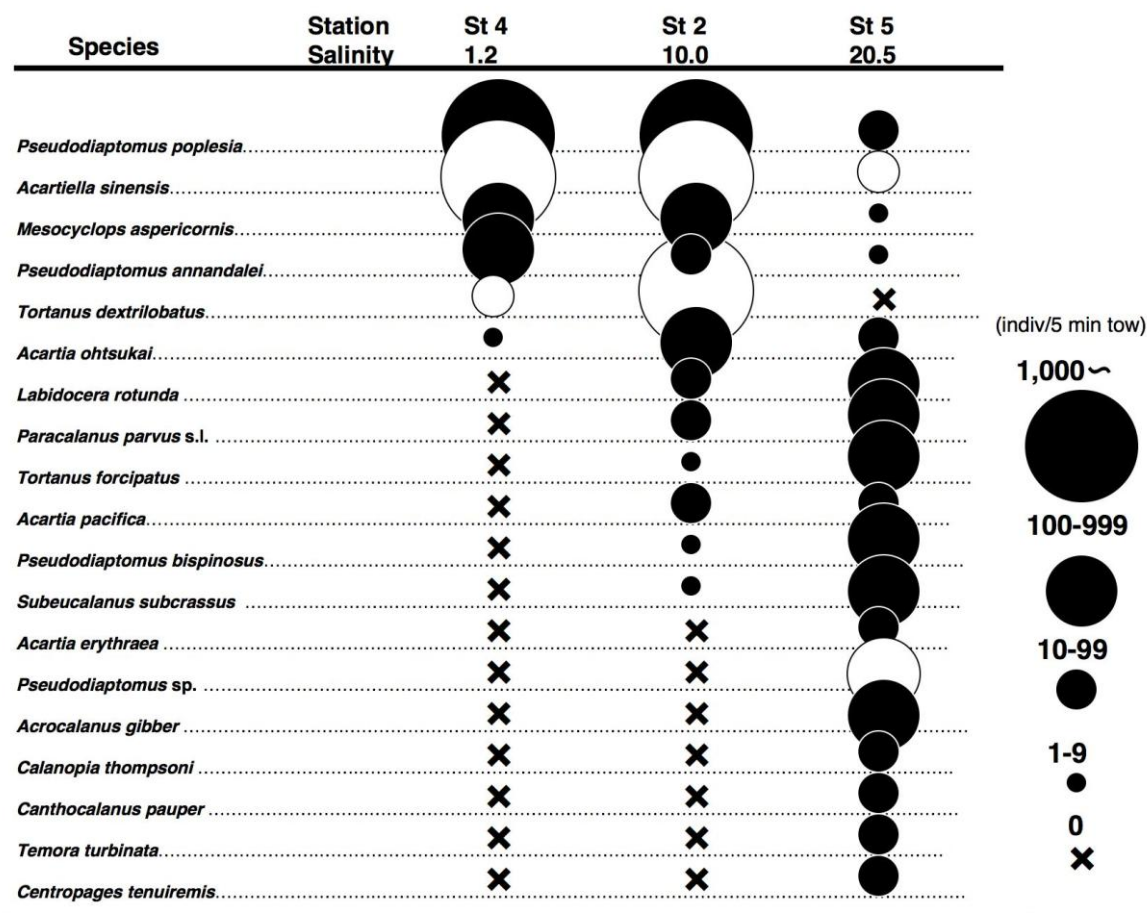


図1. 2008年9月20日における中国Jiu Long River（九龍江）河口域での浮遊性カイアシ類主要種の分布。NORPACネットを表面で5分間曳いた個体数。

川崎港、名古屋港、大阪港、北九州港では2005年の貿易統計から試算した船舶別、国別の年間バラスト水の持ち出し量と持ち込み量を試算した。持ち込み量は約21万トン(大阪港)～約93万トン(名古屋港)、持ち出し量は約80万トン(大阪港)～約2,069万トン(名古屋港)の範囲であった。いずれの港も持ち出し量が持ち込み量より多く、約3.8(大阪港)～22.3(名古屋港)倍であり、東京湾での2001年における試算では、年間持ち込み量は約400万トン、持ち出し量は約7,600万トンで、後者は前者の約19倍に達するとした推定結果と同様の傾向であった。各港でバラスト水の持ち出しおよび持ち込みの主体となる船種が異なり、持ち込みを担うのは、川崎港、名古屋港、大阪港、北九州港でそれぞれ、プロダクトタンカー、コンテナ船、バルカーであった。また、北九州港以外はそれぞれの港へのバラスト水の主要な持ち込み地とそこからの持ち出し地はいずれも中国、韓国であった。名古屋港のある三河湾や東京港、横浜港のある東京湾のような大きな国際貿易港がある海域においてもカイアシ類などの外来性浮遊生物は発見されていない一方、外来性底生生物が多数発見されている。日本に導入される海産底生動物の約68%はバラスト水経由でなく船底付着とする推定を裏付ける証拠であろう。バラストタンク内では取水後一週間程度であれば、最も優占するのは通常、カイアシ類である。したがって、短期間の航海であるならばカイアシ類が導入されている可能性は十分にあるにも関わらず、これまでのところ外来種は発見されていない。2000年以前、サンフランシスコ湾で

はバルカーによる年間60万トン程度の持ち込みにより外来種の導入、定着が起こった(Choi 私信)。バルカーはバラスト水の交換を頻繁に行うタイプの船舶であり、航海中、バラストタンク内で取り込まれたカイアシ

類は生残し、その定着に十分な密度を含んだバラスト水が頻繁に排出されていたと推定される。バラスト水の推定廃棄量では川崎港、名古屋港ではサンフランシスコ湾を上回るが、外来性カイアシ類は発見されていない。今回の名古屋港における結果は、バラスト水をあまり入れ替えないコンテナ船による持ち込みが多いこと、1960年代の終わりごろにコンテナ船が出現するまでは、やはりバラスト水の運用が不定期な一般貨物船によって、現在、コンテナ船が運んでいる貨物が運ばれていたと考えられることから、プラ

表 1. 2008年9月17日における中国Oujiang River (甌江)

河口域での浮遊性カイアシ類の分布。各定点で成体400個体以上カウントして出現率で表示した。

Station	W1	W2	W3
<b>Latitude (N)</b>	<b>27°58'38.7"</b>	<b>27°58'29.3"</b>	<b>27°58'47.5"</b>
<b>Longitude (E)</b>	<b>120°56'06.5"</b>	<b>120°55'32.3"</b>	<b>120°51'47.1"</b>
<b>Water temperature ( °C)</b>	<b>27.6</b>	<b>27.7</b>	<b>27.7</b>
<b>Salinity</b>	<b>16.7</b>	<b>9.7</b>	<b>4.3</b>
<i>Paracalanus serrulus</i>	<b>62.0</b>	<b>8.7</b>	<b>1.5</b>
<i>Acartia spinicauda</i>	<b>10.5</b>	<b>63.4</b>	<b>21.8</b>
<i>Acartia ohtsukai</i>	<b>13.1</b>	<b>24.1</b>	<b>7.5</b>
<i>Paracalanus parvus</i> s.l.	<b>8.6</b>	<b>1.4</b>	<b>8.3</b>
<i>Subeucalanus flemingeri</i>	<b>0.5</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
<i>Centropages dorsispinatus</i>	<b>1.7</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
<i>Centropages sinensis</i>	<b>0.5</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
<i>Labidocera rotunda</i>	<b>1.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
<i>Labidocera sinilobata</i>	<b>1.7</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
<i>Temora turbinata</i>	<b>0.5</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
<i>Pseudodiaptomus annandalei</i>	<b>0.2</b>	<b>0.0</b>	<b>3.4</b>
<i>Mesocyclops leuckarti</i> s.l.	<b>0.0</b>	<b>1.9</b>	<b>18.2</b>
<i>Thermocyclops mongolicus</i>	<b>0.0</b>	<b>0.2</b>	<b>2.2</b>
<i>Thermocyclops hyalinus</i>	<b>0.0</b>	<b>0.2</b>	<b>25.2</b>
<i>Pseudodiaptomus inopinus</i>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>1.5</b>
<i>Acartia tsuensis</i>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>1.5</b>
<i>Sinocalanus sinensis</i>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>7.5</b>
<i>Mongolodiaptomus birulai</i>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.2</b>
<i>Tortanus derjugini</i>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.2</b>
<i>Tortanus dextrilobatus</i>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>1.0</b>
<b>Total</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>

ントンは長期間バラストタンク内に閉じ込められて死滅するケースが多かったと推定できる。一方、北九州港ではバルカーによるバラスト水の持ち込みが今回の調査港の中では最も多く18万トンに達するが、東アジアより遠方で別な気候帯あるいは異なる季節である場所から寄港するので、やはりタンク内で死滅してしまうため外来性カイアシ類の発見がないかもしれない。日本の場合、近隣アジアからのバラスト水の持ち込みが多いが、東アジアの汽水～沿岸域には広域に分布するカイアシ類が多く知られており、中国や韓国からバラスト水によってカイアシ類の導入、定着が起こっても形態レベルでは検出できないことを意味する(隠蔽的導入)。

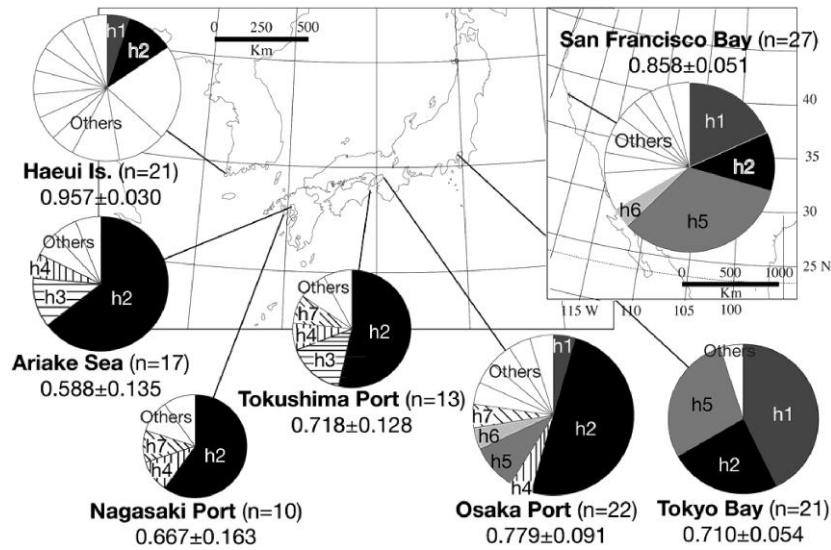


図2. *Pseudodiptomus marinus*各集団におけるハプロタイプ組成とハプロタイプ多様度。

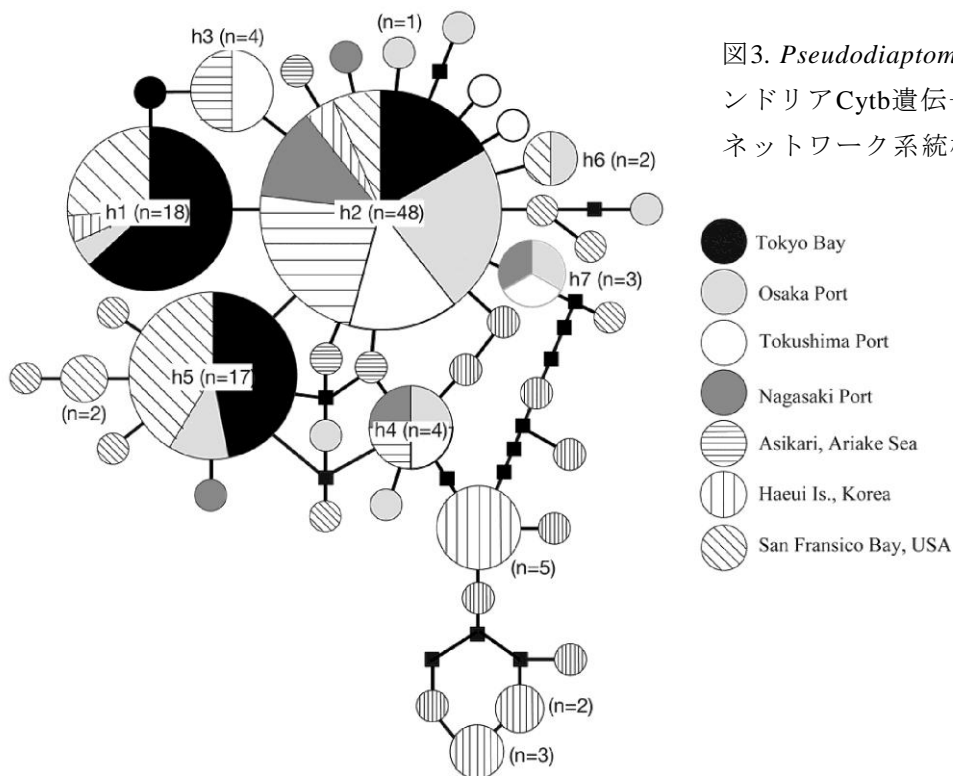


図3. *Pseudodiptomus marinus*のミトコンドリアCytb遺伝子のハプロタイプネットワーク系統樹。

### (3) 東アジア産浮遊性カイアシ類の遺伝的多様性および導入個体群の比較に関する研究

#### 1) *Pseudodiptomus marinus*

cytb遺伝子の一部領域では、7箇所から総数で39ハプロタイプを検出した。地域集団別に見ると、東京湾の羽田沖から4 (n=21)、大阪港から11 (n=22)、徳島港から6 (n=13)、有明海(芦刈)から6 (n=17)、長崎港から5 (n=10)、韓国(ハエウイ島)から13 (n=21)、そしてSFBから12 (n=27)ハプロタイプが検出された。地域集団ごとのハプロタイプ組成とハプロタイプネットワークを図2、3に示す。韓国で検出された13ハプロタイプの中で、h1、h2は日本やサンフランシスコ湾の集団からも検出されたが、これら以外は韓国固有のハプロタイプであった(図2)。また、cytb遺伝子のハプ



ロタイプネットワークにおいても、これら韓国固有のハプロタイプの大半が、日本とSFBの集団で見られたハプロタイプとは離れた位置にあることが示された(図3)。従って、韓国の集団の遺伝的構造は、日本の各地域集団や(?) SFBの遺伝的構造と異なることが推察される。日本とSFBからは合わせて28ハプロタイプが検出されたが、そのうち4ハプロタイプが、日本とSFBの両方で検出された(この中の2ハプロタイプは韓国でも検出したもの)。その中で、ハプロタイプh2は日本の全ての地域に分布し、その検出頻度は日本では全てで高

表2. 石狩港、釧路港、室蘭港、苫小牧港、長崎港、佐世保港、那覇港における浮遊性カイアシ類。カイアシ類成体中の割合: +: <10%; ++: 10~40%; +++: >50%を示す。

Port	Ishikari	Kushiro	Muroran	Tomakomai	Nagasaki	Sasebo
Date	Jun. 9, 2008	Jul. 1, 2008	Aug. 5, 2008	Aug. 5, 2008	Jun. 26, 2008	Jun. 28, 2008
Water temperature(°C)	14.3	11	22	22	21.3	21.9
Salinity (PSU)	32	30	33	31	31.3	31.7
<b>CALANOIDA</b>						
<i>Acartia bispinosa</i>						
<i>Acartia fossae</i>						
<i>Acartia hudsonica</i>	++			+		
<i>Acartia longiremis</i>	+	+++		+		
<i>Acartia omorii</i>					+++	
<i>Acartia tumida</i>		+				
<i>Acartia sinjiensis</i>						++
<i>Acrocalanus</i> sp.						
<i>Calanopia thompsoni</i>						
<i>Canthocalanus pauper</i>						
<i>Candacia ethiopia</i>						
<i>Centropages orsinii</i>						
<i>Clausocalanus furcatus</i>						
<i>Labidocera bataviae</i>						
<i>Labidocera</i> sp.						
<i>Pseudocalanus newmani</i>	+	++				
<i>Paracalanus aculeatus</i>						
<i>Paracalanus parvus</i> l.			++	++	++	++
<i>Paracalanus crassirostris</i>						
<i>Pseudodiaptomus galleti</i>						
<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	+					
<i>Eurytemora pacifica</i>	+		+	+		
<i>Tortanus digitalis</i>						
<i>Tortanus komachi</i>	+		+			
<i>Tortanus longipes</i>						
<i>Temora turbinata</i>						
<i>Undinula vulgaris</i>						
<b>CYCLOPOIDA</b>						
<i>Oithona atlantica</i>			+	+		
<i>Oithona aruensis</i>						
<i>Oithona davisae</i>					+	
<i>Oithona dissimilis</i>						
<i>Oithona nana</i>					++	
<i>Oithona oculata</i>						
<i>Oithona plumifera</i>						
<i>Oithona similis</i>	++	++	+++	+++		++
<i>Oithona simplex</i>						
<b>HARPACTICOIDA</b>						
<i>Euterpina acutifrons</i>						
<i>Microsetella norvegica</i>						
<b>POECILOSTOMATOIDA</b>						
<i>Corycaeus affinis</i>				+		
<i>Corycaeus crassiusculus</i>						
<i>Farranula concinna</i>						
<i>Oncaea media</i>						
<i>Oncaea venusta typica</i>						
<i>Oncaea venusta venella</i>						
<b>MONSTRILLOIDA</b>						
<i>Cymbasoma</i> sp.		+				
<b>Total number of species</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>3</b>

く、主要なハプロタイプであった。ハプロタイプh1とh5は東京湾、大阪港とSFBで検出された。東京

湾とSFBでは共に検出頻度が高い傾向を示した一方、大阪港ではそれらはいずれも低かった（ただし、大阪港では主要なハプロタイプh2以外、h1とh4を含む全てのハプロタイプで検出頻度は低い傾向を示した（多くても2個体））。ハプロタイプh6の検出頻度は低かったものの、大阪港とSFBでそれぞれ1個体ずつ観察された（図2）。また、SFBでは検出され、日本と韓国のいずれの地域集団でも検出されていないハプロタイプが観察された（図3）。

韓国の集団のハプロタイプ多様度 ( $H_e$ ) は0.96を示し、今回採集した中で一番高い値を示した（図2）。また日本の各地域集団のハプロタイプ多様度 ( $H_e$ )の範囲は最小0.59（有明海）～最大0.78（大阪港）を示した一方、SFBでは0.86で、SFBの集団は韓国の集団ほど高くはないが、日本の集団よりも高い値を示す結果となった（図2）。SAMOVA解析の結果（表3）、推察された7地域集団の最適な分類方法は、まとまりの数を3つまたは4つに分け、その際の組み合わせを、前者では①ハエウイ島（韓国）、②長崎港、③東京湾、大阪港、徳島港、有明海（芦刈）、SFB、後者では①ハエウイ島（韓国）、②東京湾、③大阪港、徳島港、有明海（芦刈）、長崎港、④SFBとした場合である。

前者の場合はSFBの個体群は東京湾、大阪港、徳島港、有明海との類縁を示唆する。後者では、SFB集団の遺伝構造がどの集団とも類似していないことを示すものである。その理由としては、SFBのハプロタイプ多様度が高い値を示したことも併せると、日本の色々な地域集団から個体が導入されたことによって、SFB集団の遺伝構造が独特なものになったということが考えられる。いずれにせよ、少なくともハエウイ島（韓国）とSFB間と、ハエウイ島と日本の各地域集団間における*P. marinus*の現在の遺伝的交流は乏しいことが示された一方で、SFBの個体群は東京湾、大阪港が導入元となっている可能性が強く示唆されたのである。また、日本からSFBへの*P. marinus*の導入は一回のみの出来事ではなく、少なくとも東京湾と大阪港の両地域から独立して行われた複数回の事象であったことが示唆された（さらにこの地域以外から導入された可能性も示唆された）。

## 2) *Pseudodiaptomus inopinus*

オレゴン州の2カ所から採集したサンプルはいずれもPCR法によるミトコンドリアCOI遺伝子の増幅を行うことが出来なかった。これについては採集した後の処理か、あるいは保存状態が悪かったことが原因として考えられ、今後、解析を行う予定である。

温州（17個体）、日本産（多摩川（16個体）、江の口川（2個体）、六角川（2個体））で採集した標本についてはミトコンドリアCOI遺伝子の一部領域（-625塩基）を決定することが出来た。これらにEyun et al., 2007<sup>13)</sup>で報告されている*P. marinus*, *P. nihonkaiensis*, *P. poplesia*, *P. sp.*, *P. inopinus*を加え、最大節約法（MP法）とベイズ法による分子系統樹を構築した（図4）。その結果、MP法とベイズ法のいずれでも、温州産17個体と、日本産20個体はそれぞれ高いブートストラップ値で単系統性が示された。しかしながら、温州産のサンプルはEyun et al. (2007)<sup>13)</sup>で解析された*P. inopinus*ではなく*P. sp.*とブートストラップ値、事後確率がそれぞれ100、1.0で同一のクレードを形成し、このクレードと日本産20個体のクレードがブートストラップ値、事後確率97、1.0で姉妹群を形成する結果となった。さらに、このクレードの外側にEyun et al. (2007)<sup>13)</sup>で解析された*P. inopinus*が分岐する形となった。また、遺伝的距離（表4）は、温州産17個体間は0～1.1%、日本産20個体間は0～5.1%で種内変異レベルであるのに対して、温州産と日本産との間では14.4～15.7%であった。*P. koreanus*と*P. nihonkaiensis*間では23.8%、*P. poplesia*と*P. koreanus*間では17.9%の違いが見られることから、温州産と日本産のサ

ンプルは種間レベルの違いであることが推察される。また、温州産と *P. sp.* との間は、3.4~4.2%であった。

つまり、中国の温州と日本で採集したものは、① *P. inopinus* ではないこと、② 互いに別種であること、③ 温州産のものは *P. sp.* であること、の3点が示唆された。今後、新たにオレゴン州などで採集を行い、それが、温州産、日本産、或いはデータベースに登録されている *P. inopinus* のどれと一致するのかについて、詳細な形態観察および遺伝子による解析から明らかにする予定である。

### 3) *Acartiella sinensis*

mtDNAのCOI遺伝子の一部領域(905 bp)では、厦門から6ハプロタイプ、SFBから9ハプロタイプ、あわせて14ハプロタイプを検出した。厦門とSFBの両地域が共有するハプロタイプは、両地域ともに検出頻度が一番高かったハプロタイプh1の1ハプロタイプのみであった(厦門では14個体中6個体、SFBでは17個体中9個体)(図5)。遺伝的分化係数の値は両者が遺伝的には有意に分化していることを示し、ハプロタイプ多様度  $H_e$  が両者とも高い値を示したことから(厦門  $0.791 \pm 0.089$ ; SFB  $0.787 \pm 0.101$ )、SFB産は厦門からも導入された可能性はあるものの、中国あるいは別な海域から独立して複数回、導入された可能性を示唆する。

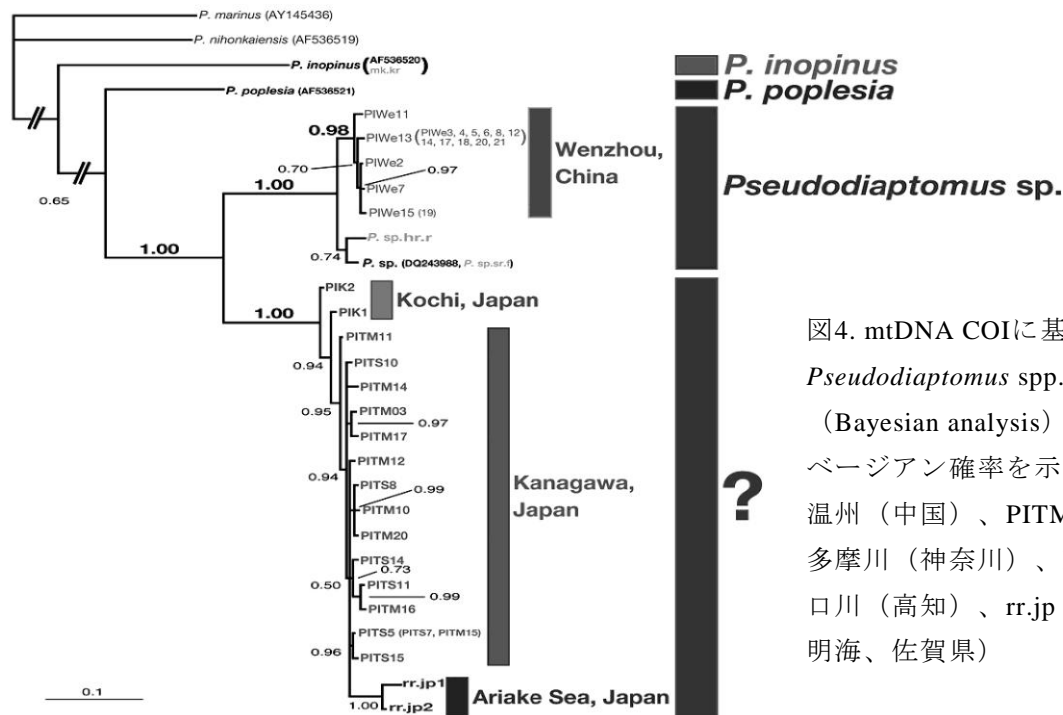


図4. mtDNA COIに基づく *Pseudodiptomus* spp. の系統樹 (Bayesian analysis)。数値はベージアン確率を示す。PIWe: 温州(中国)、PITM, PITS: 多摩川(神奈川県)、PIK: 江ノ口川(高知)、rr.jp: 六角川(有明海、佐賀県)

### 4) *Sinocalanus doerrii*

mtDNAのCOI遺伝子の一部領域(569bp)では、上海から8ハプロタイプ、SFBから6ハプロタイプ、あわせて13ハプロタイプを検出した。上海とSFBの両地域が共有するハプロタイプは、1ハプロタイプのみであった(上海、SFBそれぞれでは1個体)(図6)。遺伝的分化係数の値は両者が遺伝的には有意に分化していないことを示し、ハプロタイプ多様度  $H_e$  が両者とも高い値を示した(上海  $1.000 \pm 0.063$ ; SFB  $0.641 \pm 0.150$ )。SFB産は上海から導入された可能性のあることを示唆した。

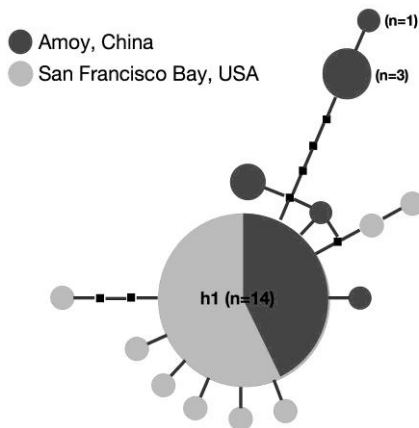


図5. *Acartiella sinensis*のmtDNA COI (905bp)の比較によるハプロタイプのネットワーク系統樹。各円はハプロタイプ、その大きさは各ハプロタイプの相対的個体数 (nは調査個体数) を示す。

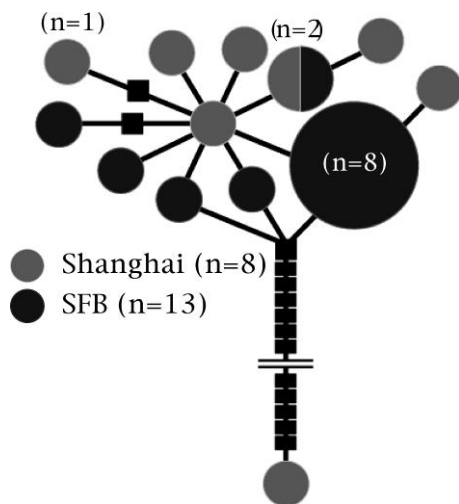


図6. *Sinocalanus doerrii*のmtDNA COI (569bp)の比較によるハプロタイプのネットワーク系統樹。各円はハプロタイプ、その大きさは各ハプロタイプの相対的個体数 (nは調査個体数) を示す。

表3. *Pseudodiaptomus marinus*の SAMOVA解析結果. K= 1-6, initial condition = 150.

K			$\Phi_{sc}$	$\Phi_{st}$	$\Phi_{ct}$
2	g.1.	Haeui Is.	0.06914	0.53234	0.49761
	g.2.	Ariake Sea, Tokyo Bay, Nagasaki Port, Osaka Port, Tokushima Port & SFB	P= 0.00000 ± 0.00000	P= 0.00000 ± 0.00000	P= 0.13392 ± 0.01096
3	g.1.	Haeui Is.	0.08002	0.44498	0.39670
	g.2.	Nagasaki Port,	P= 0.00000 ±	P= 0.00000 ±	P= 0.04888 ±
	g.3.	Ariake Sea, Tokyo Bay, Osaka Port, Tokushima Port & SFB	0.00000	0.00000	0.00654
4	g.1.	Haeui Is.	-0.03493	0.34214	0.36434
	g.2.	SFB	P= 0.00000 ±	P= 0.00000 ±	P= 0.02639 ±
	g.3.	Tokyo Bay	0.00000	0.00000	0.00439
	g.4.	Ariake Sea, Nagasaki Port, Osaka Port & Tokushima Port			
5	g.1.	Haeui Is.	-0.05098	0.30979	0.34327
	g.2.	Osaka Port	P= 0.00000±	P= 0.00000 ±	P= 0.6549 ±
	g.3.	SFB	0.00000	0.00000	0.00821
	g.4.	Tokyo Bay			
	g.5.	Ariake Sea, Nagasaki Port & Tokushima Port			

表4. mtDNA COI (625bp)に基づく*Pseudodiaptomus* spp.の遺伝的距離。

	1	2	3	4	5	6	7
1. PITS, PITM, PIK, rr.jp	0-5.1						
2. PIWe	14.4-15.7	0-1.1					
3. <i>P. inopinus</i>	19.5-20.8	21.6-22.4	0				
4. <i>Pseudodiaptomus</i> sp.	15.0-16.4	3.4-4.2	21.4-21.9	2.6			
5. <i>P. poplesia</i>	17.3-18.9	18.7-19.2	19.8	17.9-10.0	-		
6. <i>P. nihonkaiensis</i>	22.7-24.6	23.8-24.2	23.0	23.8-24.6	21.8	-	
7. <i>P. marinus</i>	23.2-25.4	26.1-26.7	21.9	27.4	21.9	20.0	-

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

SFBに導入された東アジア産の侵略的カイアシ類3種の遺伝子と導入元の可能性のある中国、日本、韓国の個体群の遺伝子を世界に先駆けて比較した。いずれの種も導入先と導入元の個体群の遺伝子には共有されるハプロタイプが存在することが判明したが、全ハプロタイプが完全に一致するケースはなかった。これは複数の遺伝的に異なる個体群からの導入を示唆する。

*Pseudodiaptomus marinus*については東京湾、大阪港などが導入元である可能性が示唆された。本種の中国産隠蔽的姉妹種の存在を明らかにしたこともプランクトン学的視点から大きな研究成果である。九龍江、甌江河口の本調査により、分類学的な整理および分布に関する多くの新知見が得られた。多くの種の導入元となっている東アジアにおける動物プランクトンの正確な情報を入手できた科学的意味は大きい。また、導入元において侵略的移入種が元来どのような水塊に生息しているかを知る貴重なデータでもある。日本の貿易港から外来種が発見されなかった事実と貿易構造との関連を明らかにした点も評価されよう。

### (2) 地球環境政策への貢献

侵略的外来種として、北米で在来種を駆逐して生態系を攪乱している東アジア産カイアシ類*Pseudodiaptomus marinus*の導入元が東京湾、大阪港などである可能性を指摘できたの大きな研究成果である。また、北米で侵略的外来種となっている多くの種が中国の汽水域、塩分1~10の水域に生息していることを明らかにした点も大きな発見である。一方、日本の港湾には外来種が出現しなかったことは特筆すべきである。貿易構造上、日本には外来種の侵入が起こりにくいことを示唆する。東アジアにおいては同一種でも遺伝的分化が進んでおり、隠蔽種の存在も指摘された。このような結果から、実際に東アジアから世界各地に導入されたものがどのような種か、どのような個体群であるのかは遺伝子解析を行わねばならないことを本研究は強く示唆する。一般向けの啓蒙書「海の外来生物—人間によって攪乱された地球の海（東海大学出版会、2009年）」を編集、出版できたことは意義深い。本書によって一般の日本人の意識を海産外来種の存在、どのようにして外来種が導入されるか、そのメカニズムにも目を向けさせる教育的効果があるであろう。

## 6. 引用文献

- 1) Kimmerer, W.J., Gartside, E. and Oris, J.J. Predation by an introduced clam as the likely cause of substantial declines in zooplankton of San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 113: 81-93. (1994)
- 2) Orsi, J.J. and Ohtsuka, S. Introduction of the Asian copepods *Acartiella siensis*, *Tortanus dextrilobatus* (Copepoda: Calanoida), and *Limnoithona tetraspina* (Copepoda: Cyclopoida) to the San Francisco

- estuary, California. *Plankton Biol. Ecol.* 46: 128-131. (1999)
- 3) Bollens, S.M., Cordell, J.R., Avent, S. and Hooff, R. Zooplankton invasions: a brief review, plus two case studies from the northeast Pacific Ocean. *Hydrobiologia* 480: 87-110. (2002)
  - 4) 大塚攻・大谷道夫・H.Y. Soh・M. Kim・W. Lee・C. Huang・W.J. Kimmerer・下埜敬紀・羽生田岳昭・川井浩史・上田拓史・山口愛果. 「日本の国際貿易港における外来性カイアシ類の出現の有無とバラスト水との関連」 *日本プランクトン学会報* 55: 115-126. (2008)
  - 5) Merritt, T.S.J., Shi, L., Chase, M.C., Rex, M.A., Etter, R.J. and Quattro, J.M. Universal cytochrome *b* primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7: 7-11. (1998)
  - 6) Machida, R., Masaki, U., Miyabe, Nishida, M. and Nishida, S. Large-scale gene rearrangements in the mitochondrial genomes of two calanoid copepods *Eucalanus bungii* and *Neocalanus cristatus* (Crustacea), with notes on new versatile primers for the srRNA and COI genes. *Gene* 332: 71-78. (2004)
  - 7) Lis, J.T. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods Enzymol.* 65: 347-353. (1980)
  - 8) Folmer, O., Black, M., Hoech, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294-299. (1994)
  - 9) Clement, M., Posada, D. and Crandall, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657-1659. (2000)
  - 10) Schneider S., Roessli, D. and Excoffier L. Arlequin ver. 2.000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University to Geneva, Switzerland. (2000)
  - 11) Dupanloup, I., Schneider, S. and Excoffier, L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11: 2571-2581. (2002)
  - 12) Swofford, D.L. PAUP\*: *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*, version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, MA. (2002)
  - 13) Eyun, S.I., Lee, Y.H., Suh, H.L., Kim, S. and Soh, H.Y. Genetic identification and molecular phylogeny of Pseudodiaptomus species (Calanoida, Pseudodiaptomidae) in Korean waters. *Zool. Sci.* 24: 265-271. (2007)

## 7. 国際共同研究等の状況

案件：SFBに導入された東アジア産カイアシ類の遺伝子による導入元探索

カウンターパート氏名(所属)：W. J. Kimmerer (San Francisco State University, USA) ; C. Huang、X. Shang (Wenzhou Medical College, China) ; H. Y. Soh (Chonnam National University, Korea) ; J. R. Cordell (University of Washington)

参加・連携状況：SFB産外来性カイアシ類の採集、情報提供、遺伝子解析についてはKimmerer教授、オレゴ州産外来性カイアシ類の採集についてはCordell博士、中国、韓国産カイアシ類採集ではHuang教授、Shang助手、Soh博士の協力を得た。

国際的な位置づけ：導入元、導入先のカイアシ類の遺伝子比較を同時に実施している点で世界的な先駆的研究である。

## 8. 研究成果の発表状況

## (1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 大塚攻・大谷道夫・Soh, H.Y.・Kim, M.・Lee, W.・Huang, C.・Kimmerer, W.J.・下埜敬紀・羽生田岳昭・川井浩史・上田拓史・山口愛果.「日本の国際貿易港における外来性カイアシ類の出現の有無とバラスト水との関連」日本プランクトン学会報, 55: 115-126. (2008)
- 2) Seong, Y.M., Ohtsuka, S., Ueda, H. and Soh, H.Y. *Acartia (Odontacartia) ohtsukai* Ueda and Bucklin, 2006 (Copepoda, Calanoida, Acartiidae): first record of its occurrence in Korean waters and habitat segregation from its sibling species *A. pacifica* Steuer, 1915. *Zootaxa* 1841: 61-64. (2008)
- 3) 大塚攻・谷村篤・町田龍二・西田周平.「浮遊性カイアシ類の両極および反赤道分布について」化石, 85: 6-13. (2009)
- 4) Ohtsuka, S., Tomikawa, K., Shang, X.A. new species of *Hemicyclops* (Crustacea: Copepoda: Cyclopoida) found in plankton at the mouth of the Jiulong River, southern China. *Species Diversity* 15: in press (2010)

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 大塚攻・駒井智幸.「甲殻亜門」(石川良輔編「節足動物の多様性と系統」)裳華房、東京、pp.172-268. (2008)
- 2) 大塚攻.「外来種はなぜ増えるか？」(日本プランクトン学会・日本ベントス学会編「海の外来生物」)東海大学出版会、東京、pp. 28-29. (2009)
- 3) 大塚攻・広海十朗.「小さき侵略的外来種：カイアシ類」(日本プランクトン学会・日本ベントス学会編「海の外来生物」)東海大学出版会、東京、pp. 124-134. (2009)
- 4) 松岡數充・大塚攻.「シストと休眠卵」(日本プランクトン学会・日本ベントス学会編「海の外来生物」)東海大学出版会、東京、pp. 120-121. (2009)
- 5) Kimmerer, W.J. (大塚攻 翻訳)「サンフランシスコ湾の悲劇：外来種に席卷された感潮域」(日本プランクトン学会・日本ベントス学会編「海の外来生物」)東海大学出版会、東京、pp. 20-27. (2009)

## (2) 口頭発表（学会）

- 1) 坂口穂子・上田拓史・大塚攻・田中克・徐浩榮・尹良湖. (2007)「日本と韓国の汽水性カイアシ類相の比較」日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会. 横浜市. 2007年9月23日、
- 2) Seong, Y.M., Ohtsuka, S., Ueda, H. and Soh, H.Y. (2008) *Acartia (Odontacartia) ohtsukai* Ueda and Bucklin, 2006 (Copepoda, Calanoida, Acartiidae): first record of its occurrence in Korean waters and habitat segregation from its sibling species. International Conference on Copepoda, Pattaya, Thailand, 13-19 July 2008.
- 3) 下埜敬紀・大塚攻・Soh, H.Y.・Shang, X.・Huang, C.・Kimmerer, W.J.・伊東宏・石丸隆・羽生田岳昭・川井浩史. (2009)「サンフランシスコ湾に導入された東アジア原産カイアシ類の導入元の遺伝的探索」日本動物分類学会. 名古屋市. 2009年6月13-14日
- 4) Shimono, T., Ohtsuka, S., Soh, H.Y., Shang, X., Huang, C., Kimmerer, W.J., Yamaguchi, A., Itoh, H., Lee, W., Ueda, H., Ishimaru, T., Hanyuda, T. and Kawai, H. (2009) Possible origins of planktonic

copepods introduced from East Asia to San Francisco Bay, based on a molecular analysis. The Crustacean Society Summer Meeting, Tokyo, 20-23, September 2009.

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

大塚攻、講演会「世界に広がる外来種—今、何が問題なのか—」（2008年1月25日、広島大学総合博物館、一般市民など約40名）

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。



D-072 大型船舶のバラスト水・船体付着で越境移動する海洋生物の動態把握と定着の早期検出  
 (4) バラスト水および船体付着がフジツボ類の越境移動に及ぼす影響

(株)海洋生態研究所

大谷道夫

平成19～21年度合計予算額 11,648千円  
 (うち、平成21年度予算額 3,588千円)

※予算額には、間接経費を含む。

[要旨] バラスト水および船体付着がフジツボ類の越境移動に及ぼす影響を評価するためモデル開発を行なった。開発はHayesらが2005年に発表したモデルを基礎とし環境類似性および船舶の寄港数に関する項に改良を加えた。モデル計算の結果、H20年度の成果により中部日本の港の場合は、移入は東アジアからの船舶がもたらす可能性が高いことが示されたが、今年度は東アジアに就航する二隻の船舶の船体を調査した結果、移入可能性が高いと判断されたフジツボ種はいずれの船体からも発見されなかった。むしろ、移入危険性の高い種は、近年日本に移入したと考えられる *Megabalanus coccopoma* (ココポーマアカフジツボ) も含め、オーストラリア航路に就航するバルカーの船体から数多く発見された。このため、今年度は同航路に就航する船舶に付着するフジツボの移入可能性と移入経路についての検討を行った。とりわけ、移入実績を持つココポーマアカフジツボの多くが成熟サイズに達し、多くの抱卵個体が見られたことは、船体に付着して移動するフジツボが移入先で幼生を放出し、そこへ移入する能力を持つことを意味する。また、移入経路は、船舶の寄港数が多く、長い沖待ちがあるオーストラリア東南部の港が有力であることも明らかになった。これらの結果を基に越境移動を防ぐ方法を検討した結果、防汚塗料開発の他、水中船体洗浄による船体からのフジツボ除去を考える場合、除去のタイミングはドライドック出渠後の積算停泊期間が2ヶ月半に達する以前に実施することが効果的であることが明らかになった。

[キーワード] 船体付着、フジツボ、移入種、移入経路、リスクアセスメント

## 1. はじめに

海産外来種の移入を考える上で、船舶が重要な移入手段のひとつであることは言を待たない。船舶がかかわる移入手段にはバラスト水と船体付着があることが知られるが、このうちバラスト水はゼブラガイの移入手段として知られたことから多くの注目を集め、2004年にIMOで採択されたバラスト水条約として結実した。その一方で船体付着は、それによる移入を防ぐ対策を講ずるための提案文書が2007年に至りようやくIMOのMEPC委員会へ提出され、2008年のBLG小委員会コレスポネンスグループと2009年のワーキンググループの結成を経て、具体的な取り組みが開始されようとしている。しかし、どの船舶の船体付着がどのように移入に関わっているかを明らかにし、それをどのように評価するかなど、具体的な取り組みが充分に行われているとは言えない状況にある。それはわが国も例外ではなく、移入を水際で防ぐためには、どのような航路に就航するどのような船舶の船体が移入をもたらす上で危険性が高いかを明らかにし、そのような船体付着を防ぐにはどうすればよいかについての検討を行うことが急務であるとされている。

## 2. 研究目的

19年度は水島港に入港した、本プロジェクト共通の調査対象船「A」（主としてオーストラリアと極東アジアを航行するバラ積み運搬船）の船体に付着するフジツボの存在を確認し、川崎港へ移入する可能性についてモデルを使って推定した。しかし、川崎港に入港する船は「A」だけでなく多くの船舶が世界各地からやって来ることがわかっている。そこで20年度は川崎港へやってくる船舶の仕出地すべてを対象に、それらの港周辺に分布するフジツボが川崎港へ移入する可能性を推定した。その結果東アジアからの移入が有力と言う結果になった。そこで21年度は東アジア航路の船舶の船体付着実態調査の結果を用いてモデルの妥当性の再検討を行い、同時に船体に付着したフジツボが幼生を放出する可能性についても検討した。さらに、移入可能性が高い種に注意を払うだけでなく、船舶がドライドック出渠後どれくらいの期間で船体の生物汚損が生ずるかを明らかにし、効果的な船体洗浄時期の推定などを行ってフジツボ類の越境移動を防ぐ方法についても検討することを目的とした。

## 3. 研究方法

### (1) IP計算

Hayes et al. (2005)<sup>1)</sup> を修正した以下の式を用いて計算を行った。初項を Visit score、第二項を Ballast score と言う。

$$IP = \frac{1}{c} \left\{ \sum_{j=1}^m \left( \frac{v_j \cdot ES(t)_j \cdot ES(s)_j}{t} \right) + \sum_{j=1}^m \left( \frac{b_j \cdot ES(t)_j \cdot ES(s)_j}{t} \right) \right\} \dots \dots (1)$$

<i>IP</i> : 種毎の移入可能性	<i>t</i> : 航海日数
<i>v</i> : 川崎港へ入港する船舶の数	<i>j</i> : 外来種候補が生息する地域
<i>ES(t)</i> : 水温から見た環境類似性	<i>c</i> : 川崎港へやって来るすべての地域の船舶数とバラスト排出量から計算される定数
<i>ES(s)</i> : 塩分から見た環境類似性	
<i>b</i> : 川崎港で排出されるバラスト水の量	

### (2) 環境類似性の検討

昨年度（20年度）は環境類似性として川崎港と仕出地の水温差、塩分差から以下の式で計算した結果を用いた。

$$ES(t) = 1 - \left( \frac{d}{30} \right) \quad ES(s) = 1 - \left( \frac{d}{50} \right)$$

しかし、この方法では水温差や塩分差はいずれも線形評価になってしまうこともあって、中間温帯に属する川崎港への移入可能性が高い種に熱帯、亜熱帯に棲息する種が多く含まれる結果となってしまった。そこで、今年度は、Gollasch (2002)<sup>2)</sup> を参考に、気候帯の差と塩分帯の差として表現することとした。この考えはGollasch (2002)<sup>2)</sup> の提唱に拠るもので、移出地と移入地が同一気候帯ないし同一塩分帯同士である場合に移入可能性が最も高く、それらのゾーンがずれるほど

移入可能性が減少するとする考えである。ただ、その減少の仕方は非線形であると仮定し、シグモイド曲線を用いてゾーン間の差をシグモイド値で表すこととした。従って、環境類似性というよりは移入のし易さを表す指数となっている。

オーストラリアの各仕出港が属する気候帯についてはOtani et al. (2007)<sup>3)</sup>を参考にして決定し、塩分は、Lloyds Register/Fairplay (2007-2008)<sup>4)</sup>に記載された港ごとの比重から以下の状態方程式を用いて塩分への換算を行った。さらにそれをベニスシステム<sup>5)</sup>に従って表1のように塩分帯に区分し、それぞれの塩分帯ごとに1~5までのスコアを与えた。

$$S = \frac{\rho - a_0 - a_1 \cdot t + a_2 \cdot t^2}{b_0 - b_1 \cdot t + b_2 \cdot t^2}$$

$$\begin{aligned} S: & \text{塩分} \quad \rho: \text{比重} \\ a_0 = & 999.84259 \quad a_1 = 0.06794 \quad a_2 = -0.00915 \\ b_0 = & 8.24493 \quad b_1 = -0.00409 \quad b_2 = 0.00008 \end{aligned}$$

なお、気候帯については表2のようにまとめ、それぞれの気候帯ごとにスコアを与えた。

表1 塩分帯区分と各区分のスコア

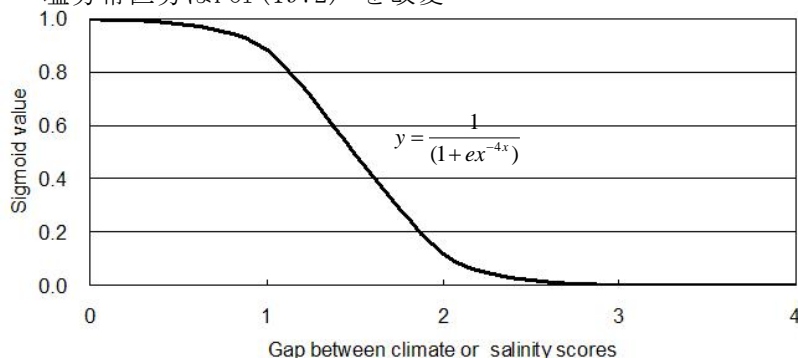
塩分帯	塩分範囲	スコア
Oligohaline	(0.5~<5)	1
Mesohaline	(5~<18)	2
Polyhaline	(18~<34)	3
Euhaline	(30~<40)	4
Hyperhaline	( ≥40)	5

表2 気候帯区分とスコア

気候帯	スコア
寒帯	1
亜寒帯	2
冷温帯	3
中間温帯	4
暖温帯	5
亜熱帯	6
熱帯	7

これらのスコアを用いて仕出地と仕向地の気候帯、塩分帯の差を求め、シグモイド曲線からシグモイド値を求めてそれぞれ環境類似性の値として(1)式に代入しIP計算を行なった。シグモイド曲線と、各ゾーン間の差のシグモイド値は図1のとおりである。

塩分帯区分はPor (1972)<sup>5)</sup>を改変



スコアの差	シグモイド値
0	0.997527377
1	0.880797078
2	0.119202922
3	0.119202922
4	0.000045400

図1 ゾーン間の差のシグモイド値を求めるためのシグモイド曲線と求めたシグモイド値

### (3) 停泊数 ( $v_j$ ) の検討

船体付着は、主に船舶の停泊時に起こると考えられるので、停泊日数が長い船舶は短い船舶

に比べて船体付着が多くなる。停泊日数は船種によって異なるが、今回行なったIP計算のうち、Visit score ((1)式の初項)に関する部分には船種による停泊日数の違いが反映されていない。そこで、先に計算されたVisit scoreに船種による停泊日数の違いを反映させるため、式を一部改変して新たにVisit scoreの計算を行った。改変した計算式は以下に示すとおりである。式中の船種ごとの停泊指数は、表3に示すとおりである。停泊指数は最も停泊日数が長いバルクキャリアー(石炭船)を1とし、他の貨物船のそれはバルクキャリアー(石炭船)に対する停泊日数の割合とした。なお、停泊日数は海外からフジツボが川崎港へ持ち込まれることを想定し、外国港での停泊日数としたが、バルクキャリアーはオーストラリアでは長期滞船があるため、停泊指数を計算するに当たって、サブテーマ(7)で調査されたバルクキャリアーの停泊日数データ(津金ら 2010)<sup>6)</sup>を用いた他、他の船舶の停泊日数算定に当たって同サブテーマグループから情報と協力を得た。

$$V_s = \frac{(v_1 \cdot c_1 + v_2 \cdot c_2 + \dots + v_n \cdot c_n) \cdot ES(t) \cdot ES(s)}{t}$$

$V_s$ : Visit score  
 $v_i$ : 船種ごとの船舶の寄港数  
 $c_i$ : 船種ごとの停泊指数(表2)  
 $ES(t)$ : 水温から見た環境類似性  
 $ES(s)$ : 塩分から見た環境類似性  
 $t$ : 航海日数(日)

表3 船種別に見た外国港での停泊日数と停泊指数(コンテナ船は国内港)  
(単位:日)

船種	沖待日数	着岸日数	停泊日数合計	指数
バルクキャリアー(石炭)	6.96	2.23	9.19	1.000
バルクキャリアー(鉄鉱)	1.62	2.78	4.40	2.292
一般貨物船	0.88	2.75	3.63	1.891
バルクキャリアー(穀物)	1.06	2.35	3.41	1.776
原油タンカー	1.40	1.93	3.33	1.734
LPGタンカー	1.14	1.52	2.66	1.385
LNGタンカー	1.24	1.15	2.39	1.245
製品タンカー	0.69	1.23	1.92	1.000
その他タンカー	0.69	1.23	1.92	1.000
自動車専用船	0.34	0.69	1.03	0.536
コンテナ船*	—	0.37	0.37	0.193

\*: 神戸港(2005-2007)の係留実績による

#### (4) IP計算の対象としたフジツボ

IP計算の対象としたフジツボは、Newman and Ross (1976)<sup>7)</sup>、Jones et al. (1990)<sup>8)</sup>、Ruiyu and Xianqiu(eds) (2007)<sup>9)</sup>が掲げたフジツボ類の中から、化石種と船体に付着しそうなカメフジツボ類(Chelonibiidae)、サンゴフジツボ類(Pyrogomatidae)、カイメンフジツボ類(Acastinae)などや、川崎港および周辺ですでに分布記録があるタテジマフジツボ(*Amphibalanus amphitrite*)など[山口(1983)<sup>10)</sup>、山口(1989)<sup>11)</sup>、堀越・岡本(2005)<sup>12)</sup>参照]を除いたオーストラリアに棲息する41種である。なお、フジツボの分布決定に当たってはサブテーマ(5)で明らかになったココポーアカフジツボの分布も利用した。

## (5) 船体調査

IP計算に用いたフジツボが実際に船舶で輸送され、移入機会を有するかを確認するため、数隻の船舶の船体調査を行った。対象とした船舶は3船で、それらの調査期日は表4に示す。

表4 船体調査を行った船舶と調査時期一覧

船種	就航航路	調査年月日
バルクキャリア ー（鉄鉱石船）	主に豪州北西岸	2007年 9月 22日
		2007年12月 14日
		2008年 9月 8日
		2009年 1月 6日
		2009年10月 23日
カーフェリー	青島ー下関	2008年 2月 20日
一般貨物船	インド洋、東アジア	2009年 9月 13日

## 4. 結果・考察

## (1) IP からみたフジツボ類の移入可能性

表5 東アジア航路船舶で発見されたフジツボ

No.	Ships' type	General	
		Car Ferry	Cargo
Sampling date	08/02/07	09/09/13	
Sampling port	Aioi	Innoshima	East Asia and Indian Ocean
Main shipping route	Quingdao	Ocean	
1	<i>Conchoderma auritum</i>	X	
2	<i>Chthamalus challengeri</i>	X	
3	<i>Tetraclitella pilsbryi</i>	X	
4	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	X	
5	<i>Amphibalanus eburneus</i>	X	
6	<i>Amphibalanus improvisus</i>	X	
7	<i>Amphibalanus reticulatus</i>	X	X
8	<i>Amphibalanus cf. cirratus</i>	X	
9	<i>Amphibalanus poecilotheca</i>		X
10	<i>Fistulobalanus albicostatus</i>	X	
11	<i>Fistulobalanus kondakovi</i>	X	X
12	<i>Balanus trigonus</i>	X	
13	<i>Striatobalanus amaryllis</i> *	X	
14	<i>Megabalanus rosa</i>	X	
15	<i>Megabalanus volcano</i>	X	X
Total		14	4

注) 表5、6中、\* を付した種はIP>0.5で移入危険性が高いと判断される種

表6 豪州航路船舶で発見されたフジツボ

No.	Ships' type	Bulkers	
		Bulker	Bulker
Sampling date	2007/9/22	09/10/23	
Sampling port	Mizushima	Fukuyama	
Main shipping route	NW, E & SE coast of AUS	NW coast of AUS	
1	<i>Lepas anserifera</i>	X	
2	<i>Chthamalus challengeri</i>	X	
3	<i>Chthamalus moro</i>		X
4	<i>Austrobalanus imperator</i> *	X	
5	<i>Tesseropora rosea</i> *	X	
6	<i>Yamaguchiella coerulescens</i>	X	X
7	<i>Tetraclita japonica</i>	X	X
8	<i>Tetraclita squamosa</i>	X	
9	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	X	X
10	<i>Amphibalanus eburneus</i>	X	
11	<i>Amphibalanus improvisus</i>	X	
12	<i>Amphibalanus reticulatus</i>	X	X
13	<i>Amphibalanus poecilotheca</i>		X
14	<i>Fistulobalanus albicostatus</i>	X	X
15	<i>Amphibalanus sp.</i>		X
16	<i>Balanus trigonus</i>	X	X
17	<i>Striatobalanus amaryllis</i> *	X	X
18	<i>Striatobalanus tenuis</i>		X
19	<i>Balanus sp.</i>	X	
20	<i>Megabalanus validus</i>	X	
21	<i>Megabalanus coccopoma</i> *	X	X
22	<i>Megabalanus rosa</i>	X	X
23	<i>Megabalanus tintinnabulum</i> *		X
24	<i>Megabalanus volcano</i>	X	X
25	<i>Megabalanus ajax</i>	X	
26	<i>Megabalanus occator</i>	X	X
Total		21	16

前年度(20年度)の結果では、サクラフジツボ(*Striatobalanus amaryllis*)、*Megabalanus tintinnabulum*、ミナミクロフジツボ (*Tetraclita squamosa*) の移入可能性が最も高く、その移出先としては、東アジアの亜熱帯、中間温帯および冷温帯にある港が推定候補地として挙げられた。

オーストラリアから輸送されると推定されるフジツボ41種のIPを求めると、図2に示すように *Megabalanus tintinnabulum* の移入可能性が最も高く、ついでサクラフジツボ(*Striatobalanus amaryllis*)、*Amphibalanus variegatus* の順となった。これら3種を含めIPが0.5を超え比較的高い値を示したフジツボの中で、日本へ移入した実績を持つ種はココポーマアカフジツボただ1種であった。

しかし、東アジアのこれらの気候帯に寄港する船舶を調査したところ、表5に示すように、これら移入可能性が高いフジツボは、サクラフジツボを除いてまったく確認されなかった。移入危険性の高いこれらの種は、近年日本に移入したと考えられる *Megabalanus coccopoma* (ココポーマアカフジツボ) も含め、オーストラリア航路に就航するバルカーの船体から数多く発見されたため(表6)、オーストラリアは生物地域としては東アジアほど Visit score が高くないが、実際にフジツボが輸送されている事実を踏まえ、同航路に就航する船舶に付着するフジツボの移入可能性と移入経路についての検討することとした。

## (2) ココポーマアカフジツボの移入可能性と移入経路

比較的高いIPが高い種の中ですでに日本への移入実績を持つココポーマアカフジツボを対象に、船舶によって輸送された本種が、日本に移入する条件を備えているか、移入が起こるとすればその経路はどこかを検討した。なお、今後バラスト水条約が発効し、効果的な処理装置が稼働すればバラスト水は大幅に減少する可能性があることを考慮し、移入経路の推定には船体付着による移入可能性の高さを表す Visit score のみを用いた。

ココポーマアカフジツボの船体上での生存率は75.5%でIPが高いフジツボの中では三番目に高い値を示した(図3)。また、抱卵率はほぼおなじ時期に採集された2007年と2009年を比べると、2009年の方が28.9%で4.0%の2007年に比べると高く、発眼卵もみられるなど発生も進んだ状態にあった(図4)。船体での生残率が高くその3割近くが抱卵し、発眼個体も見られたことは、本種が船体付着によって移入する可能性が十分にあることを示唆する。ココポーマアカフジツボの移入経路は、図5に示すように、生物地域としてはII、IV、XIII、Xからの可能性が高い。とりわけ生物地域XのVisit scoreが高く、ここから本種が移入する可能性が最も高いと推察される。ここには石炭積出港であるニューカッスルがあるが、サブテーマ(7)に示されるように、本種の移出地がオーストラリアだとすると、沖待ちを含む停泊期間が長い同港が最も有力な候補となる。これに次ぐのが生物地域IIであり、ここにはDampierやPort Headlandなどの鉄鉱石の積出港があって、これらの港も移出候補地と考えられる。

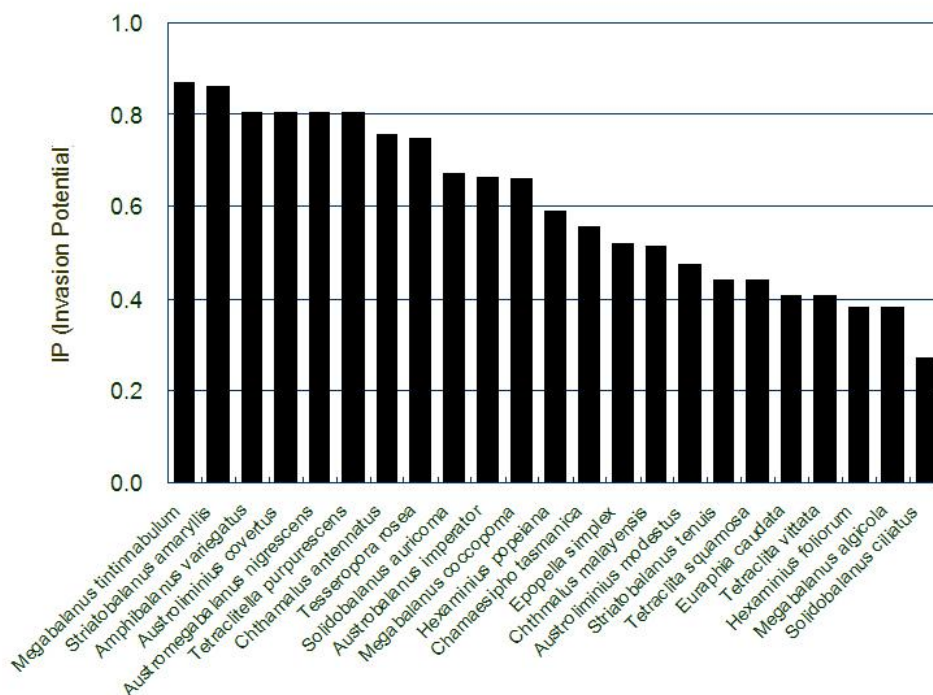


図2 オーストラリアに分布し、船舶で輸送される可能性があるフジツボの川崎港への移入可能性 (IP)

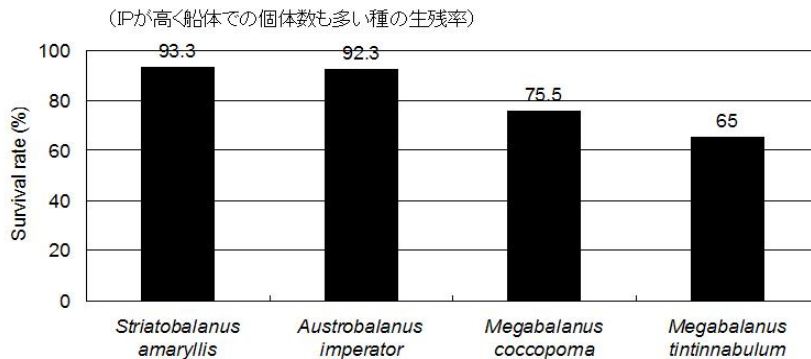


図3 IPが高い種の船体上での生残

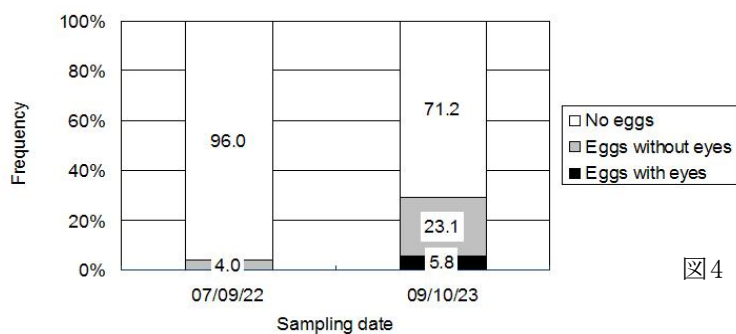


図4 バルクキャリアー船体に付着した *Megabalanus coccopoma*の抱卵率

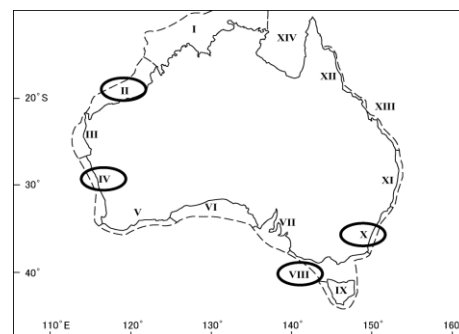
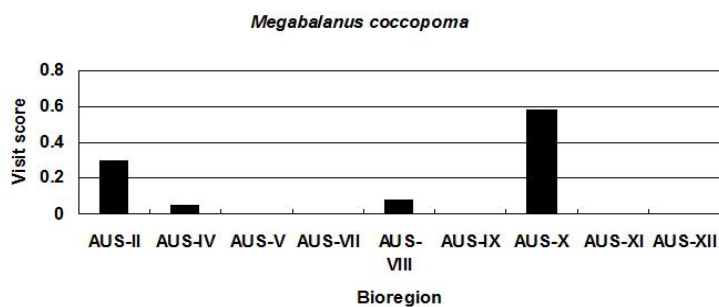


図5 ココポーマアカフジツボのオーストラリアにおける生物地域別Visit score (左) と各生物地域のオーストラリア大陸での位置 (右) は本種の移出候補生物地域

ただ、ココポーマアカフジツボは、すでに日本でも分布が知られているので<sup>13)</sup>、船体に付着した本種が日本起源のものかオーストラリア起源のものを確定する必要がある。そこで、調査したバルクキャリアー船体に付着した本種の大きさから付着時期を推定し、それをもとに付着地の推定を行った。船体に付着した本種の大きさは殻底径で表した(図6)。

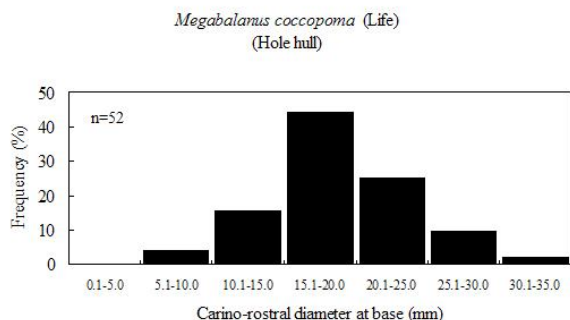


図6 バルクキャリアーの船体に付着したココポーマアカフジツボの殻底径 (mm) の分布

表6 バルクキャリアーの寄港地と最後のドックからの積算停泊期間 (日) および最終寄港地からの積算停泊期間 (日)

寄港地	入港日	出港日	停泊日数	最後のドラ (09/10/23) イドック後の 積算停泊期	から遡った 積算停泊日数
Chiba	2008/12/24	2009/1/10	17	137	105
Port Headland	2009/1/21	2009/1/30	9	146	96
Fukuyama	2009/2/12	2009/2/22	10	156	86
Dampier	2009/3/5	2009/3/21	16	172	70
Qingdao	2009/4/1	2009/4/12	11	183	59
Port Walcott	2009/4/23	2009/4/26	3	186	56
Yantai	2009/5/8	2009/5/12	4	190	52
Tubarao	2009/6/16	2009/6/18	2	192	50
Zhangjiagang	2009/7/24	2009/8/18	25	217	25
Dampier	2009/8/26	2009/8/31	5	222	20
Mizushima	2009/9/12	2009/9/18	6	228	14
Port Headland	2009/9/28	2009/10/4	6	234	8
Fukuyama	2009/10/16	2009/10/24	8	242	0

ココポーマアカフジツボの殻底径の平均は22mm、モードは15.1~20.0mmにあり、15mm以上の



個体が80.7%を占める。本種はアカフジツボ (*Megabalanus rosa*) の例<sup>14)</sup> やフロリダにおけるココポーアアカフジツボの成長記録<sup>15)</sup> から、付着後2.5~3ヶ月程度で平均22mmに達すると推定される。フジツボは航海中ほとんど摂餌できないので、摂餌可能な停泊期間中に成長すると考えると、付着後の成長に要する期間として積算停泊期間を考慮する必要がある。すなわち最後に調査を行った港から積算停泊期間で2.5~3ヶ月遡った港で本種は付着した可能性が高い。従って、ココポーアアカフジツボがこのサイズに達するまでに本船が寄港した港を見ると、表6に示すように、最後の港である福山港から遡った積算停泊期間で2.5~3ヶ月にあたるのは、四角で囲んだPort Headland、福山、Dampierの各港である。これまでのところ福山港では船体調査と同時にこなった岸壁調査から本種は確認されておらず、また福山周辺海域の航路ブイ調査(サブテーマ(5))からも確認されていない。Port HeadlandとDampierについては、本種の確認はないが、*M. rosa*と*M. tintinnabulum*が確認されており<sup>16)</sup>、さらにオーストラリアでは、本種と*M. rosa*の分類が混乱していること(Housie私信)を考慮すると、本種がこれらの二つの港のどちらかないし両方に分布する可能性は高い。すなわち本種はPort HeadlandとDampierの両方はどちらか片方で付着した可能性が高いこととなる。

### (3) 船体付着による移入防止対策の検討

#### 1) 船体生物汚損の防止

船体の生物汚損を防ぐため、オーストラリア船主協会はあらかじめ船体に施す生物付着防止対策についてガイドラインを作成した<sup>17)</sup>。船体はどこでも等しく汚損が起こるわけではないので、汚損が激しい船体部位ごとに生物汚損を防ぐ対策が示されている。

しかし、これらの対策によっても、船体の生物付着を防ぐことは容易ではないため、現在は運行中にダイバーによる水中船体洗浄を行って船体汚損生物の除去を行なうことが行われている。ただ、この方法には、除去物が周囲の環境へ影響をおよぼす可能性も指摘されており、これを制限する国や地方政府がすでに存在し、IMOでも現在この方法の是非について討議を行っている。

#### 2) 水中船体洗浄を効果的に行なう時期

水中船体洗浄は、付着生物が付着後成長して船体汚損が激しくなってから行なうよりも、汚損が生じ始めた初期に行なう方が除去を行ないやすい。その時期に関しては、現在IMOにあるMEPCのBLG小委員会のコレスポネンスグループで議論されているが、概ね「目に見える付着生物があらわれ始めたとき」に行なうことが望ましいと言うことで一致している。しかしこれまで、この「目に見える時期」がいつになるかの議論はあまり行なわれてこなかった。そこで本研究では船体の継続調査を通してその時期を推定し、効果的な水中船体洗浄時期を探ることとした。本研究においては調査対象船「A」の船体調査を継続して4回行なった。外航船の船体汚損を調査したGollasch (2002)<sup>2)</sup>に見るように、船体汚損生物の多くはフジツボであるためフジツボのみを対象とした。それぞれの調査時におけるフジツボ付着状況は図7に示す。その結果、フジツボの付着が認められ始めるのは、ドライドック出渠後2ヶ月半くらいからであり、4ヶ月半も過ぎると、それ以後とほとんど変わらなくなってしまう。そこで、水中船体洗浄を行なう時期としては、ドライドック出渠後積算停泊期間で2ヶ月半を目安に行なうことが最も効果的と思われる。しかし船体汚損の状況は、船の種類、その船の航路などによっても違ってくるので、今回のバルクキャリアーの数値がそのまま使えるわけではない。あくまでも大まかな目安として捉え、船種ごと、航路ごとに資料を整えたうえで、それぞれの船にあった水中船体洗浄時期を決める必要があると考える。

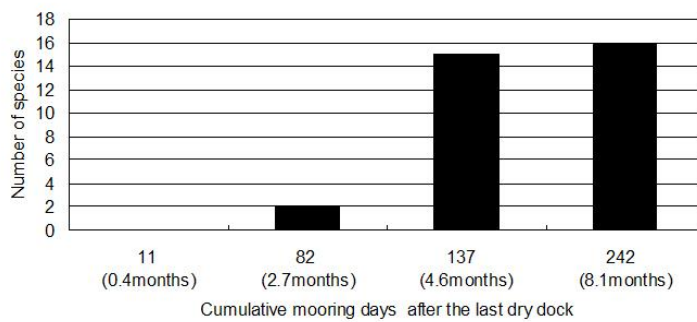


図7 調査対象船舶の船体上から得られたドライドック出渠後のフジツボ種類数の変遷

#### (4) 今後の展開

今回のリスクアセスメントにより、どの海域からどのような手段によってどのような種が持ち込まれる可能性が高いかを予測する方法のひとつを提示した。しかし、移入リスクを判断する上では、このほかにも次のような項目を検証する必要がある。

- ・汚損が少ない船は汚損が多い船より移入リスクは低いと言えるか（航路や船速、航海時間）を考慮しなければならない。
- ・船舶のメンテナンスの時期や期間はどのように移入リスクに関係するか。
- ・移入種候補が移入・定着し、害生物となる危険性をどのように評価するか。

このような検証を経た上で個々の船舶が持つ移入リスクを評価する方法を確立する必要があるが、実際の船舶調査に基づく船体汚損と外来種に関する情報はきわめて限られており、今後このような情報を収集し、わが国の状況に合ったリスク管理手法の開発を行なうことが求められている。

### 5. 本研究により得られた成果

#### (1) 科学的意義

これまでわが国へ移入した海洋生物はさまざまな手段によって移入したと推定されている。しかし船舶の船体も含め、それが実際に移入種とその候補を運んでいることを実証した研究はなかった。これは移入過程の入り口が明らかになっていないことを意味し、移入種はそれが持ち込まれた後、海岸で発見されてはじめて移入種として認識されることになる。これは移入種対策が遅れる原因であり、そのため被害が拡大する恐れがある。従って移入過程の入り口を明らかにし、どの種が移入種になる可能性が高いかを前もって予測をすることが、移入種による被害を未然に防ぐ上で重要なこととなる。このような意味では、昨年度、実際に国際航路に就航する貨物船の動態を港湾統計をもとに推計する手段を開発し、それをもとに移入可能性があるフジツボを推定する手法を開発した意義は大きいと考える。さらに今年度は、それら船体に付着して輸送されるフジツボが高い確率で船体上で生存、抱卵していることが確認され、船体付着生物が移入に対して大きな貢献をする様子も明らかにされた。さらに言えば、この手法はフジツボのみならずどの生物群にも使える汎用性を持っており、諸外国で大きな被害をもたらした外来種の、日本への新たな移入を防ぐ手段を探るための道具として用いることも可能である。さらに、船体付着調査を継続することにより、移入を防ぐための効果的な船体洗浄時期もある程度明らかにすることができた。このような手法の開発は、日本では海洋生物の移入に関してはこれまでほとんど行われてこなかったことであり、今回の調査のひとつの成果である。

## (2) 地球環境政策への貢献

今回の調査によって、船体に付着して運ばれるフジツボ類のうちどの種が移入種候補として重要か、そしてその種は世界のどこからどのような種類の船舶によって運ばれて来る可能性が高いかが川崎港の例で明らかになった。この成果は次のような政策へ貢献するものと期待される。IMOでは、バラスト水管理条約を2004年に採択し、さらに船体付着による越境移動を防ぐ施策策定の議論が始まっている(BLG 14/9)<sup>18)</sup>。しかしその議論はすべての船舶を等価に扱う方向に進みつつあり、移入生物を運ぶ危険性が少ない船舶にまで高リスクな船舶と同等の対策が要求される可能性がある。このような方向性は多くの船舶が稼動している現在では、例えばBLGで検討されている水中船体洗浄については、それを実施できる機器やダイバーの数が限られているためすべての船舶で同時に実施することは出できず、現実味を持たない議論に陥ってしまう危険性がある。そこで本研究によって得られた成果をIMOの場に持ち込み、船舶ごとの移入リスク評価を行えば効率的な移入リスク低減が可能となるため、船体付着が引き起こす移入種問題解決への国際的な取り組みへ積極的な提言が出来るものと期待される。さらに、港湾サイドにおいても、今回の手法がその港における移入リスクの高い船舶抽出に有効な手段となると考えられることから、入港船舶の種類や航路に応じた適切な移入防止策を策定する上で重要な機能を果たすものと期待される。

## 6. 引用文献

- 1) Hayes, K., Sliwa, C., Migus, S., McEnulty, F., Funstan, P. National priority pests: Part II. Ranking of Australian marine pests. An independent report undertaken for the Department of Environment and Heritage by CSIRO Marine Research. 1-93. (2005).
- 2) Gollasch, S. The importance of ship hull fouling as a vector of species introductions into the North Sea. *Biofouling*, 18: 105-121. (2002)
- 3) Otani, M., Oumi, T., Uwai, S., Hanyuda, T., Prabowo, R. E., Yamaguchi T., Kawai, H. Occurrence and diversity of barnacles on international ships visiting Osaka Bay, Japan, and the risk of their introduction. *Biofoul.* 23: 277-286. (2007)
- 4) Lloyds Register/Fairplay Ports and Terminal Guide 2007-2008. Lloyds Register/Fairplay, Surrey, United Kingdom (2008)
- 5) Por, F.D. Hydrobiological notes on the high-salinity waters of the Sinai Peninsula. *Marine Biology*, 14: 111-119. (1972)
- 6) 津金正典・金子仁・伊藤格. 「長期滞船の船体汚損に与える影響に関する研究」日本航海学会論文集, (2010, 印刷中)
- 7) Newman, W.A. and Ross, A. Revision of the Balanomorph barnacles; including a catalog of the species. *San Diego Society of Natural History, Memoir* 9: 1-107. (1976)
- 8) Jones, D.S., Anderson, J.T., Anderson, D.T. Checklist of the Australian Cirripedia. *Technical Report of the Australian Museum* 3: 1-38. (1990)
- 9) Ruiyu, L. and Xianqiu, R. (eds). *Fauna Sinica. Invertebrata* 42. Crustacea, Cirripedia, Thoracica. Science Press, Beijing. 633pp. (2007)
- 10) 山口寿之. 「神奈川県潮間帯フジツボ群集-その1-」*神奈川自然誌資料*, 3: 63-64. (1983)
- 11) 山口寿之. 外国から日本に移住したフジツボ類、特に地理的分布および生態の変化. *神奈川自*

然誌資料 10: 17-32. (1989)

- 12) 堀越彩香・岡本研. アミメフジツボ、東京湾で初確認. *Sessile Organisms* 22(2): 47-50. (2005)
- 13) Yamaguchi, T., Prabowo, R.E., Ohshiro, Y., Shimono, T., Jones, D., Kawai, H., Otani, M., Oshino, A., Inagawa, S., Akaya, T. and Tamura, I. The introduction to Japan of the Titan barnacle, *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) (Cirripedia: Balanomorpha) and the role of shipping in its translocation. *Biofouling* 25: 325-333. (2009)
- 14) 伊藤信夫・梶原武「アカフジツボの生態-I. 平塚沖観測塔における付着期, 成長, 死亡および垂直分」付着生物研究, 7: 31-40. (1988)
- 15) Anonymous. New marine invader to watch for! Aqua-notes, University of Florida, 6 (2006)
- 16) Huisman, J.M., Jones, D.S., Wells, F.E. and Burton, T. Introduced marine biota in Western Australian waters. *Records of the Western Australian Museum* 25: 1-44. (2008)
- 17) Australian Shipowners Association. Assessment of introduced marine pest risks associated with niche areas in commercial shipping. Draft Final Report. 1-24. (2007)
- 18) BLG 14/9. Development of international measures for minimizing the transfer of invasive aquatic species through bio-fouling of ships. Submitted to International Maritime Organisation's Sub-Committee on Bulk Liquids and Gases, 14<sup>th</sup> Session, Agenda item 9. November 2009. (2009)

#### 7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

#### 8. 研究成果の発表状況

##### (1) 誌上発表

- 1) Yamaguchi, T., Prabowo, R.E., Ohshiro, Y., Shimono, T., Jones, D., Kawai, H., Otani, M., Oshino, A., Inagawa, S., Akaya, T. and Tamura, I. The introduction to Japan of the Titan barnacle, *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) (Cirripedia: Balanomorpha) and the role of shipping in its translocation. *Biofouling* 25: 325-333. (2009)

##### (2) 口頭発表 (学会)

- 1) 大谷道夫・山口寿之・川井浩史. (2009)「船体が運ぶ海洋付着生物とその移入可能性について」日本マリンエンジニアリング学会ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」. 函館. 2009年11月5-6日

##### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

##### (4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない。

##### (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

##### (6) その他

特に記載すべき事項はない。

D-072 大型船舶のバラスト水・船体付着で越境移動する海洋生物の動態把握と定着の早期検出  
(5) 分子マーカーを利用したフジツボ類の起源・移動経路の解明に関する研究

千葉大学大学院理学研究科 地球生命圏科学専攻地球科学コース 山口 寿之

平成19～21年度合計予算額 14,560千円  
(うち、平成21年度予算額 4,485千円)  
※予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 大西洋で広く外来種として知られていたココポーマアカフジツボ *Megabalanus coccopoma* (Darwin)が日本国内にてオーストラリアと日本との間の鉄鉱石運搬船に付着を初めて確認した。本種は原産国パナマ以外で太平洋に初めてとなるオーストラリア・シドニーおよび日本国内各地にその分布を確認し、そのことを国際誌に報告した。日本国内、パナマ、ブラジル・リオデジャネイロ、シドニーおよび日豪間の鉄鉱石運搬船に付着した集団のミトコンドリアDNA COI BF2-BR2 遺伝子の塩基配列は、遠隔地間にも関わらず高い遺伝的類似性(遺伝的差異4%以下程度)を示し、遠隔地の集団間での遺伝子交流の存在を推定させた。本種が大型船舶の船底に大量に付着し、かつ頻繁に遠隔地に運ばれ、そこで遺伝子交流していると推定した。同様に外来種タテジマフジツボにも遠隔地集団間で高い遺伝的類似性が見い出された。

キタアメリカフジツボ *Balanus glandula* のmtDNA COI遺伝子の遺伝的構造(3つのハプロタイプの頻度)解析から日本国内に移入した集団は米国・カナダ国境付近の北米西岸の集団が船によって運び込まれたことを明らかにした。

ズージャンフジツボ *Balanus zhujiangensis* を本研究で初めて外来種と認識した。また分子生物学的特徴からそれらは日本集団、インドネシア集団とそれらの混合集団とに区分され、さらに西太平洋の集団を解析することにより、日本集団の起源を明らかにすることができる。

また外来種が日本の多くの港湾に知られるようになり、歴史的なフジツボ類を含む沿岸生物相に大きな生態学的な変化を与えはじめていることも明らかになった。

[キーワード] 外来種、ココポーマアカフジツボ、タテジマフジツボ類、キタアメリカフジツボ、ズージャンフジツボ

## 1. はじめに

フジツボ類は、海洋生物の中で船舶の海上輸送の発展に伴い、外国の種類が船底付着を通じて頻繁に日本国内に持ち込まれている。フジツボ類は代表的な移入生物として知られ、日本国内では、すでにタテジマフジツボ*Amphibalanus amphitrite*、アメリカフジツボ*Amphibalanus ebruneus*、ヨーロッパフジツボ*Amphibalanus improvisus*、アカシマフジツボ*Amphibalanus venustus*、キタアメリカフジツボ*Balanus glandula*などの他、この研究において移入種であることが初めて確認されたココポーマアカフジツボ*Megabalanus coccopoma*、ズージャンフジツボ*Balanus zhujiangensis*などが、多くの港湾に知られるようになり、歴史的なフジツボ類を含む沿岸生物相に大きな生態学的な変化を与えはじめている。

## 2. 研究目的

この研究は、日本国内に移入したフジツボ類の起源と移入経路・過程を、形態分類学および分子マーカーを用いた分子生物学的手法により明らかにすることを目的として実施した。

## 3. 研究方法

- 日本に移入した外来フジツボ類の生息地、生態をまとめ、サンプルを採集する。
- フジツボ類の原産国などでの分布、生態を調査し、サンプルを採集する。
- 日本と外国集団のmtDNA COI2の塩基配列を調べ、移入種の起源や分散過程を解明する。
- 主にココポーマアカフジツボ、タテジマフジツボ、キタアメリカフジツボおよびズージャンフジツボを研究対象とした。

## 4. 結果・考察

### (1) ココポーマアカフジツボ*Megabalanus coccopoma*について

もともと中南米東太平洋岸（パナマ太平洋岸など）に生息していた本種が、以下のように主に1880年代には外来種として大西洋に広く分布するようになった。日本で本種が最初に確認されたのは、本研究において2007年9月22日に岡山県水島港での日豪間の貨物船（船舶A）の船底から採集した標本に基づく。日本には*Megabalanus*属の固有種であるオオアカフジツボ*M. volcano*、アカフジツボ*M. rosa*とは形態的に、分子生物学的に明らかに異なる分類群として認識された（図1, 2）。

1875年、西インド洋・モーリシャス、Innocenti (2006)<sup>1)</sup>がフローレンス大学自然史博物館収蔵標本で確認。

1930年代、フランス・ルアーブル (Le Havre)港の船底、Nilsson-Cantell (1932)<sup>2)</sup>

1970年代、南ブラジル、Lacombe and Monteiro (1974)<sup>3)</sup>

1976, 1977年、オランダ・Terschelling沖、Buizer (1978, 1980)<sup>4,5)</sup>が*Balanus perforatus*と間違っ  
て同定したが、Wolff (2005)<sup>6)</sup>はココポーマアカフジツボと認識した。

2000年代、ベルギー海岸、Kerckhof and Cattrijsse (2001)<sup>7)</sup>、Kerckhofら (2007)<sup>8)</sup>

2002~2006年、メキシコ湾岸、北米・北フロリダ、ジョージア、北カロライナ州、Masterson (2007)<sup>9)</sup>

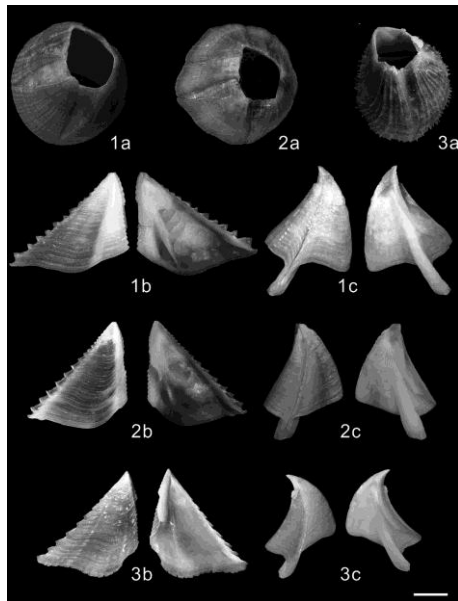


図1. 1.外来種ココポーマアカフジツボ、2.日本の固有種アカフジツボ、3.同オオアカフジツボ、a.周殻（スケール0.5cm）、b.楯板（スケール0.1cm）、c.背板（スケール0.1cm）。Yamaguchi et al. (2009)<sup>10</sup>を引用。

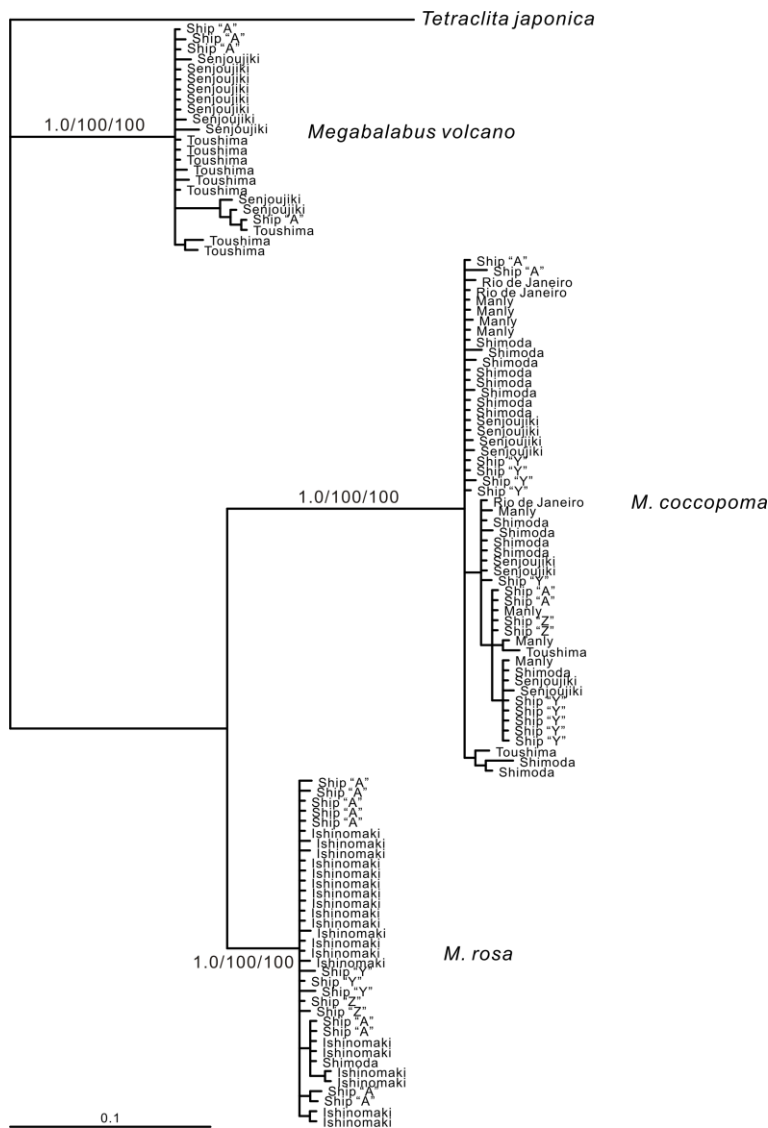


図2. 外来種ココポーマアカフジツボ、日本の固有種アカフジツボ、同オオアカフジツボのアルファベット表記の地域個体の mtDNA COI BF2-BR2の塩基配列に基づく系統樹。Yamaguchi et al. (2009)<sup>10</sup>を引用。分子生物学的にそれぞれが独立した系統的關係(クレード)をなす。

ココポーアカフジツボはパナマ周辺の東太平洋岸に知られる他、太平洋では歴史的に知られていなかった。日本およびオーストラリア東部に外来種として生息することを、この研究で初めて明らかにした<sup>10)</sup>。それらの生息地の調査をパナマ太平洋岸、オーストラリアで実施し、オーストラリア東海岸（シドニー、ニューキャッスル）においてその分散（分布）を確認したが、同北海岸（ダーウィン）、同西海岸（ブルーム、ポートヘッドランド、ダンピア、パース）では分散は確認されなかった。そこで、オーストラリア東海岸において詳細な分布・生態の調査を行うとともに、地域集団標本を採集し、分子マーカーを用いた解析により集団の分散を明らかにした。

ブラジル・リオデジャネイロの標本を入手し、その他は本研究の調査で採集したパナマ、オーストラリア・シドニー、日本・白浜（和歌山）と千畳敷（伊豆）、日豪間定期貨物船の船底（日本・岡山、神戸、千葉）集団を対象にmtDNA COI BF2-BR2の塩基配列を調べた。得られた塩基配列から分子系統樹（図2、3）を作成し、ハプロタイプネットワーク（図4）を作成し、遠く離れた地域集団間に分散した地域集団間・個体間の塩基数の違いを調べたところ、塩基対383のうち最大でわずか14塩基対（4%以下）の違いであった。

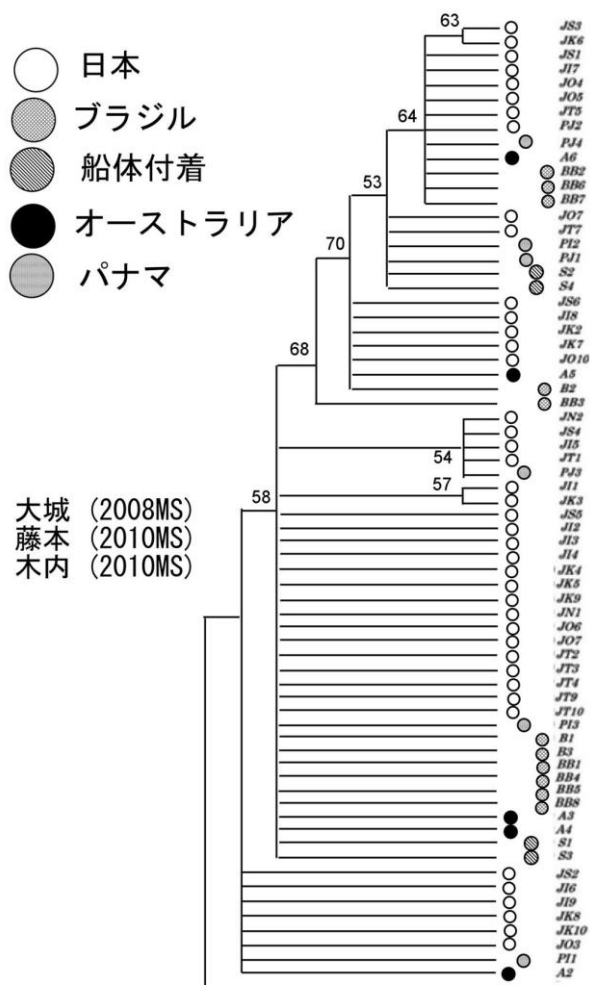


図3. ココポーアカフジツボ5集団の日本（JI:瀬戸内海伊予灘沖（灯浮標）, JK:鹿島沖（灯浮標）, JN:東北（三陸海岸）, JO:大阪湾（灯浮標）, JT:東京湾（灯浮標）, JS:静岡県南伊豆町千畳敷）、パナマ（PI: Isla Framingo West, Panama City, PJ: Jetty of Taboga, Panama City）、ブラジル（B: Rio de Janeiro, BB: Brandao Island, Riviera Bay, Rio de Janeiro）、オーストラリア（A: Manly, Sydney）、主に日豪間の鉄鉱石運搬船（貨物船A、岡山県水島港にて船底から採集）のmtDNA COI BF2-BR2 383塩基対の最尤法による系統図、地域集団ごとのまとまりを作らない、つまり地域特有な遺伝的特性を持たないことを示す<sup>16-18)</sup>。

太平洋の東西に離れたココポーアカフジツボの遠隔集団間であっても遺伝的変異が極めて小さいことは、一般的な理解から異なる遺伝的特徴を示した。つまり世界的に広く分散した集団間で変異が小さくなるような遺伝子交流が生じていることを示唆した。ココポーアカフジツボの



幼生が船体付着による大量な集団の移出・入を繰り返し遠隔地集団間でも遺伝子交流が頻繁に生じている結果と推定した。

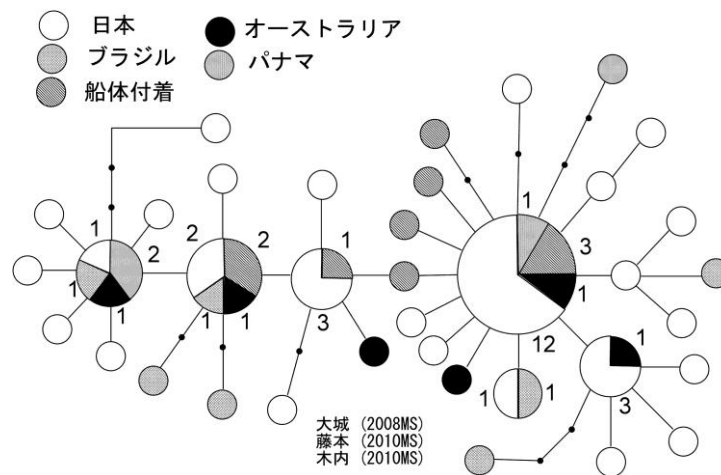


図4. 調査対象船「A」（船体付着、岡山県水島港にて採集）を含む日本、オーストラリア、ブラジル、パナマからの5集団のmtDNA COIによるハプロタイプネットワーク<sup>16-19)</sup>

[分布] ココポーアカフジツボが日本に既に定着していることを示したが、その分布を調べた。海岸での調査と本種が船体付着する生態的特徴を考慮して、船舶の出入りする港に設置された航路ブイ（灯浮標）の調査を、海上保安庁第二（石巻）、三（横浜・袖ヶ浦）、五（神戸・大阪）、六（広島）、七（門司・下関）管区海上保安本部の協力の下に実施し、あわせて各海域における養殖筏、定置網などへの付着状況も調査した。

その結果、日本の北限は岩手県三陸海岸越喜来湾（ホタテ養殖筏）であることが分かった。また東京湾のほぼ全域の灯浮標、相模湾全域の定置網、大阪湾・瀬戸内海東部の灯浮標に蔓延しており、瀬戸内海では愛媛県伊予灘を西限とし、高知県室戸岬（定置網：1981年7月27日浦氏採集）、九州・宮崎日南海岸にも分布し、南限は志布志湾、鹿児島湾であることを確認した（2010年3月）<sup>11)</sup>。種子島の調査も行ったが、その確かな分布を確認できなかった。結論として今回の調査で確認できたココポーアカフジツボの日本における生息場は全部で155地点に達し、ほぼ日本中の内湾から外洋がココポーアカフジツボに汚染されていることが明らかになった（図5）。

[移入の歴史] 1978年8月11日に千葉港に入港した出光石油タンカー徳山丸の船底から採集された標本（山口の採集品）が記録上の最古になる（図6左図）。しかしそれは日本国内への定着とは言えない。日本国内で幼生が付着した定着は、浦氏採集の1981年7月27日に高知県室戸岬定置網からの標本が現時点での定着記録として最古になる（図6右図）。

[繁殖（付着）時期など] 房総半島南房総市高崎漁港で秋9月から翌年2月の半年間漁港沖海上に設置したわかめ養殖用のブイとロープに、ココポーアカフジツボを確認した（図7）。幼生がブイに付着し、速い成長により半年で成体の大きさにまで達し、性的に成熟した個体を確認できた。ほとんどがココポーアカフジツボで、その期間に繁殖期を迎える夏のオオアカフジツボは皆無で、冬のアカフジツボ<sup>12)</sup>はわずかししか付着が確認できなかった。東京湾の灯浮標では年間を通してココポーアカフジツボの付着直後の若齢個体が観察できるので、それらの繁殖期は、ほぼ通年におよぶものと思われる。つまりココポーアカフジツボは日本に固有種のオオアカフジツボ

(繁殖期7-9月) とアカフジツボ (繁殖期11-2月) と異なり、年間を通じ繁殖期をもち、多数の新規加入個体を生産している可能性があることが分かった。

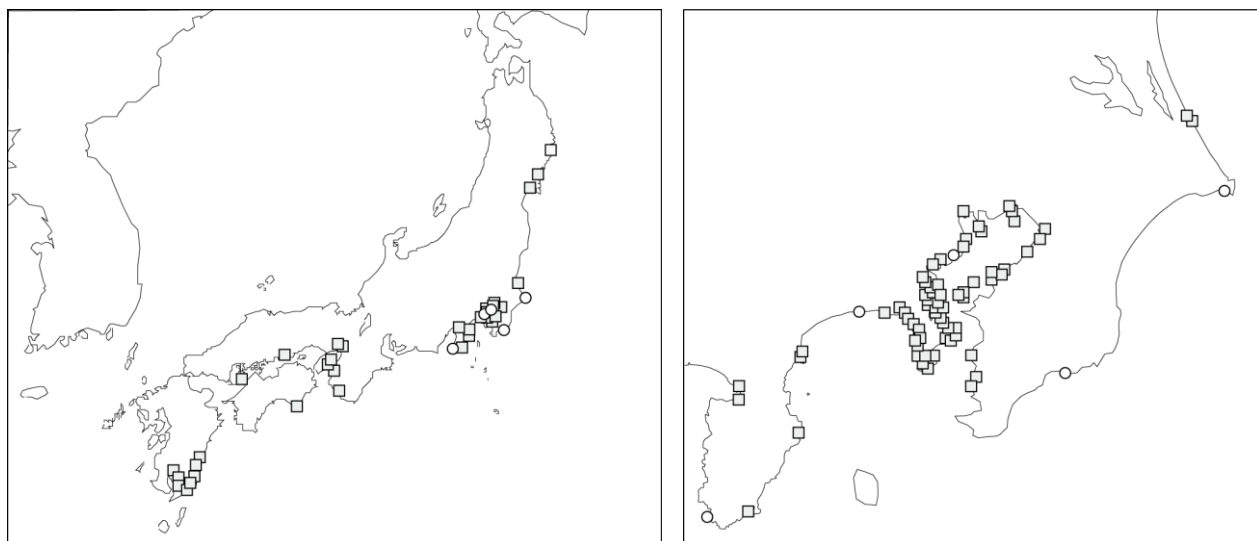


図5. ココポーマアカフジツボの日本国内の分布 (左図)、東京湾近郊での分布 (右図)。□灯浮標、漁具など浮遊物体に付着、○岩礁や人工構造物に付着。北限：岩手県越喜来湾、南限：鹿児島県内之浦湾。

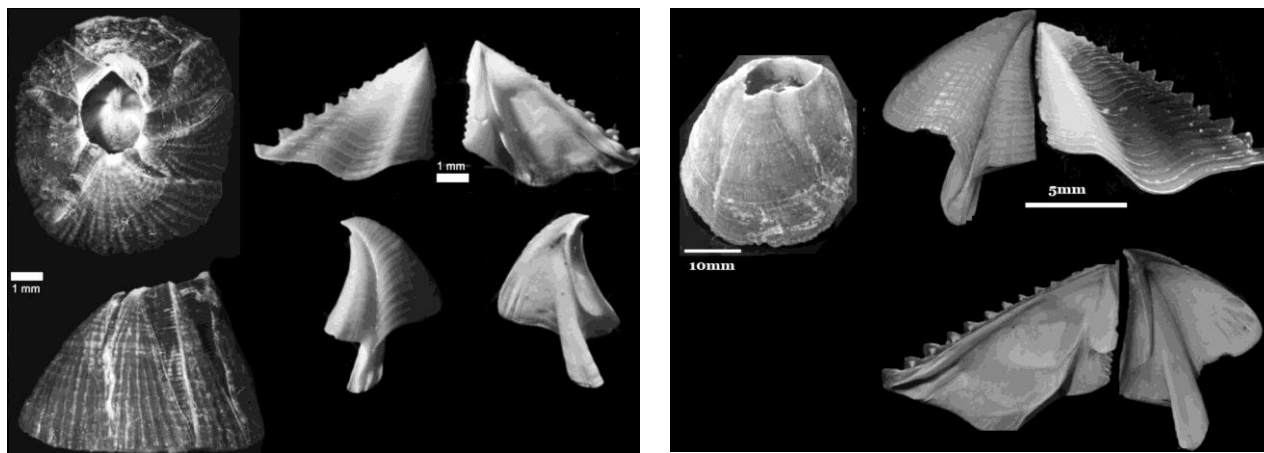


図6. 左図：1978年8月11日千葉港に入港したタンカー (出光興産徳山丸) の船底から日本国内で採集された最古のココポーマアカフジツボ、日本への定着は無いと思われる。右図：日本に定着した最古のココポーマアカフジツボ。1981年7月27日室戸岬定置網から浦吉徳氏採集。



図7. 千葉県南房総市高崎漁港でのわかめ養殖用ブイに付着したココポーマアカフジツボ。養殖期間は2008年9月から2009年2月。付着後半年で成熟する急速な成長が認められた。

[生息環境] 外洋に面した岩礁潮間帯から内湾域に適応したココポーマアカフジツボは、日本に固有種であるオオアカフジツボ（主に外海潮間帯岩礁）とアカフジツボ（主にブイなどの浮遊物体）に比べて、生息環境が広い<sup>11)</sup>。

これまで長い間その存在を確認出来なかったのは、アカフジツボに類似していたために誤認されたことによる。しかし日本に約30年前に移入済みだったことが明らかになった。

その他、海洋研究開発機構の船舶「なつしま」、「よこすか」にも付着が確認された。日本から海外にも分散している可能性もある。

ココポーマアカフジツボが広い生息環境に適応し、長い繁殖時期をもち、速い成長などの外来種としての特性を持つことが分かった。

## (2) 外来種タテジマフジツボの分子生物学的特徴

外来種ココポーマアカフジツボがmtDNA COI BF2-BR2の塩基配列に地域的な変異（地理的遺伝的変異）が著しく小さい。その分子生物学的特性が外来種に普遍的であるのか否かを、タテジマフジツボ類の4種で検証した。すなわち世界的な分布域を獲得した外来種タテジマフジツボ *A. amphitrite*、主として西太平洋に現的に生息するシロスジフジツボ *F. albicostatus*、サラサフジツボ *A. reticulatus*、ドロフジツボ *F. kondakovi* で検証した。

地域的に広範囲に分布する同じ種の自然集団間では、地理的距離に近いほど遺伝的組成が類似し、逆に地理的に遠いほど遺伝的に異なる。地理的な距離に応じて遺伝的差異が決まる（例、Sotka *et al.* 2004）<sup>13)</sup>。遠隔地の地域集団では、遺伝子交流が少なくなるという理由で、分子生物学的に異なる。

日本の固有種で内湾フジツボ類のシロスジフジツボ、ドロフジツボ、サラサフジツボを分析すると、地域ごとに遺伝的な違いが認められる（図8）。外来種タテジマフジツボは日本と西太平洋の各地の集団間でmtDNA COI遺伝子の塩基配列を比較したら地域間の遺伝的差異が少ない（図9）。タテジマフジツボで認められた地域間の遺伝的変異が少ないのは、外来種ココポーマアカフジツボにも認められた<sup>10)</sup>。

以上の遺伝的特性は、人為的に頻りに遺伝子流入が認められる外来種に特有なものと理解することが出来る。大型船の船体付着による大量な付着生物の人為的な移動が外来種に遺伝的差異の少ない集団を遠隔地の集団にもたらしことになる。この特徴は船体付着によって運ばれる外来種の遺伝的モデルと成り得る可能性はあるが、もう少し詳細に調べる必要がある。

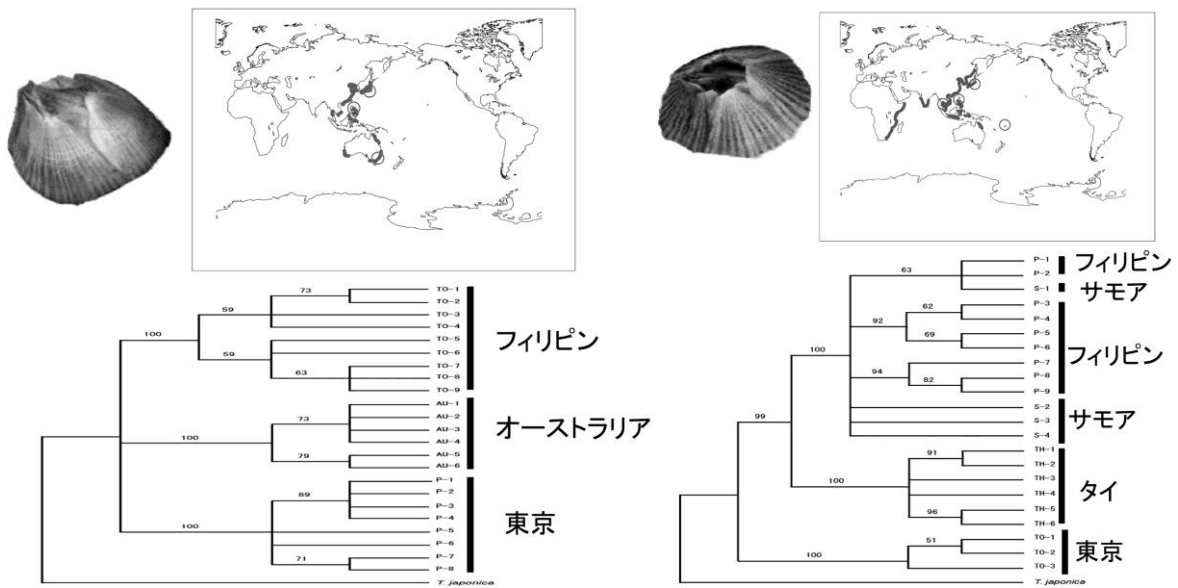


図8. フジツボ類のmtDNA COI遺伝子を用いた地域集団間の比較。左図：ドロフジツボのCOI遺伝子433塩基対を用いた東京、シドニー（オーストラリア）、マニラ（フィリピン）の3集団は9つの塩基が違う。右図：サラサフジツボのCOI遺伝子407塩基対を用い東京、マニラ（フィリピン）、サモア、タイの4集団は4つの塩基が違う<sup>16)</sup>。

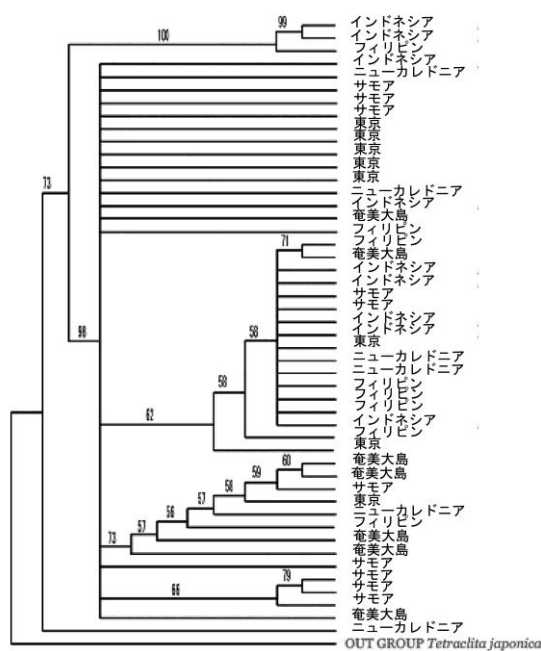


図9. タテジマフジツボのmtDNA COI遺伝子を用いた地域間の比較。東京、奄美大島、ジャワ島（インドネシア）、ニューカレドニア、マニラ（フィリピン）、サモア集団のCOI遺伝子384塩基対を用いた比較で、5集団間に類似性が高く、地域性を示す遺伝的違いは無い<sup>16)</sup>。

(3) キタアメリカフジツボ *Balanus glandula* Darwinについて

本種 (図10) の日本での分布は、山口の同定に基づき外来種として本州から北海道日高までの地域に分布することが初めて報告され、それらの移入経路として当時北海道南東岸知られないことを理由に、北米西岸から材木運搬船の船体付着に伴い日本に移住した可能性が指摘された<sup>14)</sup>。

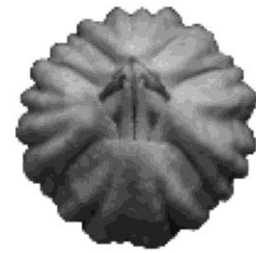
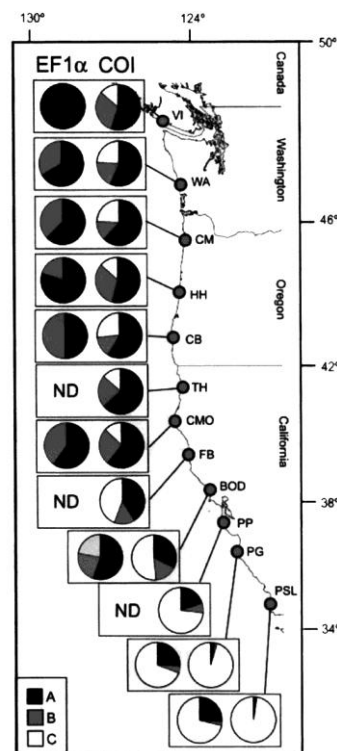


図10. キタアメリカフジツボ  
*Balanus glandula*



図11. 北米西岸におけるキタアメリカフジツボのCOI遺伝子の系統図と遺伝的構造。三本の太い縦線部分の塩基置換で3つのハプロタイプA、B、Cに区分される。ハプロタイプA、B、Cの頻度分布が中央の図に示されている。南ほどCタイプ (白○) が多く、北ほどAタイプ (黒●) が多い遺伝子勾配が認められる<sup>13)</sup>。



Sotka et al. (2004)<sup>13)</sup>は、北米西岸のキタアメリカフジツボの地理的分布と遺伝的勾配についての研究を行った。北米西岸のアラスカからカリフォルニア南部までの広い地域のキタアメリカフジツボのミトコンドリアDNAの塩基配列を用い、北米大陸西岸のキタアメリカフジツボをハプロタイプA、B、Cの3つのグループに分け、カナダのバンクーバーからカリフォルニア南部にかけての12地点での集団内のハプロタイプの頻度分布を示し、それらの個体群間に遺伝的勾配の存在を明らかにした (図11)。ハプロタイプ頻度は、カリフォルニア南部で9割以上の個体がハプロタイ

プCであるのに対して、北に行くほどハプロタイプCの頻度は減少し、カリフォルニア北部からカナダにかけては、3つのハプロタイプが混在し、北米西岸では南ほどハプロタイプCが多く、北に向かって減少する遺伝的勾配が認められた<sup>13)</sup>。

自然分散の可能性が無いわけではないが、日本から千島列島、アリューシャン列島、アラスカへの集団標本やその遺伝子情報は存在しない。キタアメリカフジツボの日本集団のハプロタイプ頻度は大槌から歯舞までの集団でほぼ等しく、それは北米メンドシノ岬からバンクーバー島にかけての集団のハプロタイプ頻度に酷似するので、日本集団は少なくともカリフォルニア北部より北の地域から（図12）、船により移入したと考えるのが妥当である<sup>20)</sup>。

日本は約10年前から八戸港とシアトル、バンクーバーを結ぶ月一回の定期航路が開設されているということがあげられる。

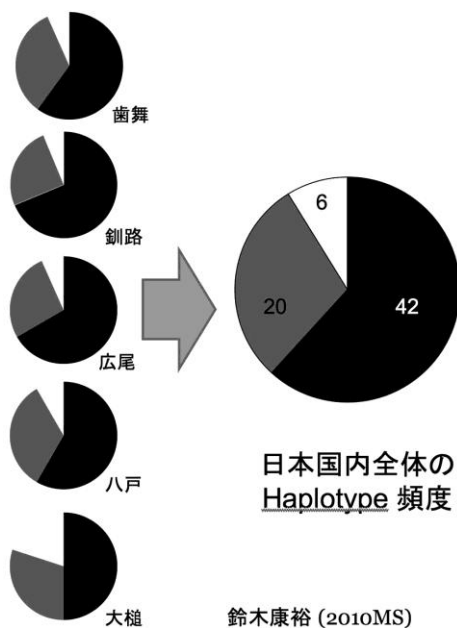


図12. 北海道-三陸海岸間の太平洋岸におけるキタアメリカフジツボのmtDNA COI BF2-BR2 遺伝子のハプロタイプ A, B, C 頻度の平均は、中央の円グラフに示され、それは北米メンドシノ岬からバンクーバー島に至る集団のハプロタイプ頻度に酷似する<sup>20)</sup>。

#### (4) ズージャンフジツボ *Balanus zhujianensis* Ren について

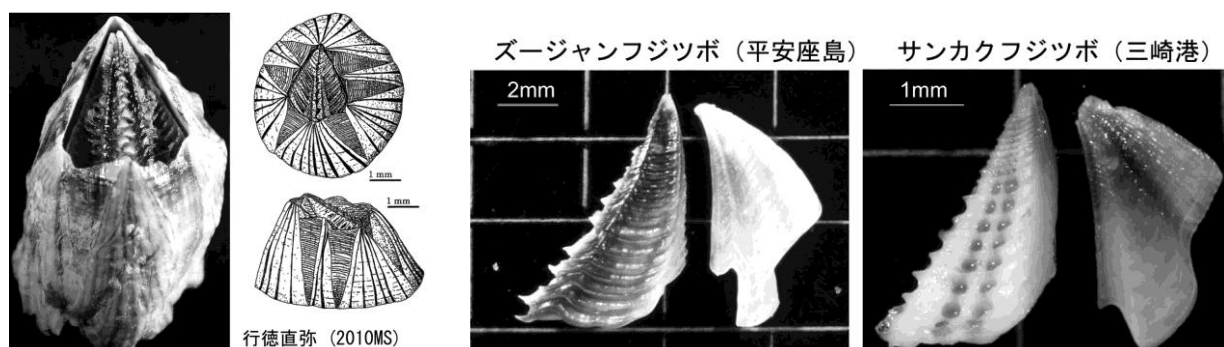


図13. 最新の外来種となるズージャンフジツボ（左図）、右図：ズージャンフジツボの蓋板の成長線間に一列の溝がある。類似の形態的特徴はサンカクフジツボ（溝は二列以上）に認められる。背板は細く長い距をもつズージャンフジツボと違ってサンカクフジツボは太い距をもつ。

ズージャンフジツボは、Ren(1989)<sup>15)</sup>が香港の西側に位置するZhujiang River河口（中国・深川）で浮遊物体に付着していた3個体に基づいて記載した（図13）。Ren(1989)は河口域を生息場と想像した。しかしその後香港及び深川の調査で再び採集されることがなく、ズージャン川河口域で2009年8月の山口の調査にも関わらずズージャンフジツボを採集できなかった。そこが生息場ではなく、外海から運ばれた可能性がある。

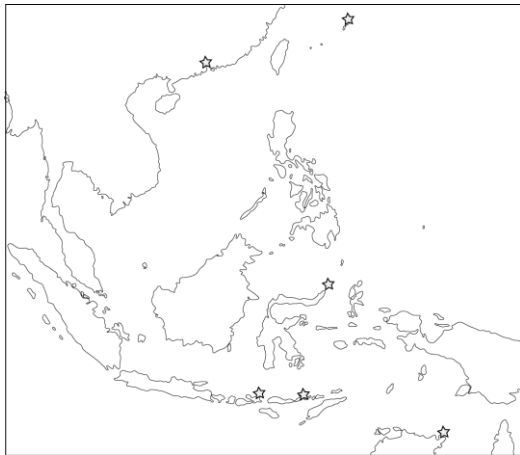


図14. ズージャンフジツボの地理的分布。模式地は香港の西のズージャン川の流域（しかしそれは生息場ではないと思われる、本文参照）。オーストラリア北部、インドネシアや日本に数カ所の分布を確認している。

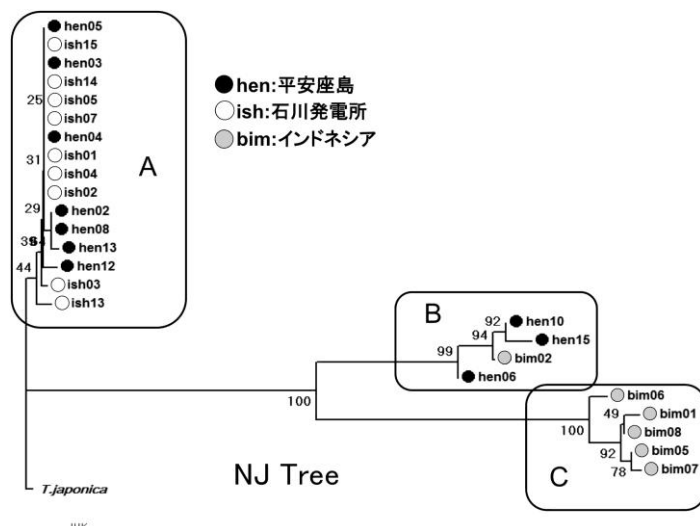


図15. ズージャンフジツボのmtDNA COI 3-6遺伝子を用いて、地域集団の遺伝的特性を解析。3つのハプロタイプA、B、Cに区分され、Aハプロタイプは日本国内の集団、Bハプロタイプはインドネシア・ビマ集団と日本の沖縄集団の一部から構成され、Cハプロタイプはインドネシア・ビマ集団だけから構成される。外群をクロフジツボ *Tetralita japonica* とした<sup>21)</sup>。

日本で、山口らが沖縄の外海に面する海岸の潮下帯から本種を採集し、外来種として認定した。その発見は、ズージャン川河口域以外からの最初の報告になる。その生息環境はRen(1989)<sup>15)</sup>が報告したそれとは著しく異なっていた。

山口は2009年12月インドネシア・ビマ島の外洋に面した海域でズージャンフジツボの生息を確認し、採集した。その外海のハビタットは、Ren(1989)<sup>15)</sup>の記載したそれと著しく異なる。ズージャン川以外の生息環境は外海性の環境であり、同様の外海性の環境は、オーストラリア・ダーウィン近郊、インドネシア・スラウェシ島マナドやスンバワ島、にも知られ（図14）、また深海研究開発機構「よこすか」の船底などにも確認された。

インドネシアおよび沖縄金湾周辺の標本を用いて分子マーカーCOI遺伝子により解析した。遺伝的に地域的な3つのハプロタイプに分けられ、基本的には沖縄集団とインドネシア集団とに分けられたが、もう1つのハプロタイプは両集団の遺伝的な混合が認められた（図15）。

日本集団とインドネシア集団とは遺伝的に独立した集団として存在していた。両者は遺伝的に混在する集団を形成しつつある<sup>21)</sup>。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

1) 生物の自然分散による生物集団の遺伝的組成と人間活動による人為的な分散によるそれとに違いがあることを指摘した。生物の遠隔地への移住は、パイオニアとなる小集団の移住によるボトルネック効果により通常の地理的種分化と異なり、進化の強い引き金になり、遺伝的多様性の起源となる。集団間の遺伝的特性が地理的に異なるなどの性質が認められるのが一般的な理解であった。移住は、移住集団のサイズが移住先の集団の遺伝子組成に大きく関係することが知られていた。ココポーマアカフジツボの事例は、遠隔地の集団間での極端な遺伝的類似性を生じた。つまり、少数個体の分散という自然分散とは異なり、大量の付着生物が大型船舶の船体付着を通じて頻繁に運ばれるため、遠隔地であっても移住先集団は移住元の集団と潜在的に類似の遺伝子組成を持つ可能性が高い。すなわち、移住集団が船体付着という人為的理由から十分大きな集団のサイズで、かつ頻繁な移入があれば、移住前と移住後の集団間では大きな遺伝的な差異が生じないことを示唆する。すなわち、人為的な移住では本来の地理的隔離により生じる多様性（遺伝的変異）が、減少する（失われる）傾向にあることが判った。

2) オーストラリア東海岸に歴史的に存在した固有種 *M. linzei* が、外来種ココポーマアカフジツボと入れ替わる現象は、外来種が固有種を排斥するという現象と理解される。

### (2) 地球環境政策への貢献

有用な固有種が排斥されるような外来種の移入は、地域経済のみならず、地球環境にとって大きな問題をもたらす。主に外来種の移入制限を行っている陸上生物だけでなく、海洋生物にも国内の地球環境政策がおよぶことの必要性を指摘したい。

## 6. 引用文献

- 1) Innocenti, G. Collections of the Natural History Museum, Zoological section «La Specola» of the University of Florence. XXIII. Crustacea, Class Maxillopoda, Subclass Thecostraca, Infraclass Cirripedia, *Atti Soc. tosc. Sci. nat., Mem., Serie B* 113: 1-11. (2006)
- 2) Nilsson-Cantell, C.A. Cirripedien aus Japan. *Ark. Zool.* 24A(4): 1-29. (1932)
- 3) Lacombe, D., Monteiro W. Balanídeos como Indicadores de Poluição na Baía de Guanabara. Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro*, 34: 633-644. (1974)
- 4) Buizer, D.A.G. First autochthonous records of *Balanus perforatus* Bruguière (Cirripedia Balanomorpha) and *Conchoderma auritum* (L.) (Cirripedia Lepadomorpha) in the coastal waters of The Netherlands. *Zoöl. Bijdr., Leiden*, 23: 34-37. (1978)
- 5) Buizer, D.A.G. *Balanus tintinnabulum* (L., 1758) autochthonous in The Netherlands with notes on size and growth of other operculate barnacles (Cirripedia, Balanomorpha). *Bull. Zoöl. Mus., Univ.*



- Amsterdam* 7: 149-154. (1980)
- 6) Wolff, W.J. Non-indigenous marine and estuarine species in the Netherlands. *Zool. Med. Leiden* 79 (1) 31.iii.2005: 1-116. (2005)
- 7) Kerckhof, F. and Cattrijsse, A. Exotic Cirripedia (Balanomorpha) from buoys off the Belgian coast. *Senckenbergiana marit* 31: 245-254. (2001)
- 8) Kerckhof, F., Haelters, J. and Gollasch, S. Alien species in the marine and brackish ecosystem: the situation in Belgian waters, *Aquatic Invasions* 2: 243-257. (2007)
- 9) Masterson, J. Web report of the Smithsonian Marine Station at Fort Pierce  
<[http://www.sms.si.edu/irlspec/Megabalanus\\_coccopoma.htm](http://www.sms.si.edu/irlspec/Megabalanus_coccopoma.htm)> page last updated: December 1, (2007).
- 10) Yamaguchi, T., Prabowo, R.E. Ohshiro, Y., Shimono, T., Jones, D., Kawai, H., Otani, M., Oshino, A., Inagawa, S., Akaya, T. and Tamura, I. The introduction to Japan of the Titan barnacle, *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) (Cirripedia: Balanomorpha) and the role of shipping in its translocation. *Biofouling* 25: 325-333. (2009)
- 11) 山口寿之・木内将史・堀越彩香・岡本研・川井浩史東京湾の移入種ココポーマアカフジツボー 2004-2005年の灯浮標サンプルの再同定. *Sessile Organisms* 27(2): In Press (2010)
- 12) Yamaguchi, T. On *Megabalanus* (Cirripedia, Thoracica) of Japan. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 21: 115-140. (1973)
- 13) Sotka, E., Wares, J.P., Barth, J.A., Grosberg, R.K. and Palumbi, S.R. Strong genetic cline and geographic variation in gene flow in the rocky Intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Marine Ecology* 13: 2143-2156. (2004)
- 14) Kado, R. Invasion of Japanese shores by the NE Pacific barnacle *Balanus glandula* and its ecological and biogeographical impact. *Marine Ecology Progress Series* 249: 207-214. (2003)
- 15) Ren, X. Two new species and one new record of CirripediaThoracica from South China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica* 20: 466-473. (1989)
- その他に、以下の千葉大学大学院理学研究科・修士論文、同・理学部卒業論文を引用した。
- 16) 稲川奨 (2007修士論文MS) 「タテジマフジツボ種群4種の地域集団間の遺伝的変異」
- 17) 大城祐 (2008卒論MS) 「*Megabalanus coccopoma*の移入とミトコンドリアDNA(COI遺伝子)を用いた集団の遺伝的特徴」
- 18) 藤本顕 (2010卒論MS) 「ココポーマアカフジツボのパナマ、ブラジル、オーストラリア、日本集団の遺伝的変異」
- 19) 木内将史 (2010卒論MS) 「ミトコンドリアDNAを用いたアカフジツボ属の種間関係の再検討」
- 20) 鈴木康裕 (2010卒論MS) 「キタアメリカフジツボの日本国内での地理的変異」
- 21) 行徳直弥 (2010卒論MS) 「ズージャンフジツボの系統関係と地理的変異」

## 7. 国際共同研究等の状況

特記すべきことは無い。

## 8. 研究成果の発表状況

## (1) 誌上発表 &lt;論文 (査読あり)&gt;

- 1) Yamaguchi, T., Prabowo, R.E., Ohshiro, Y., Shimono, T., Jones, D., Kawai, H., Otani, M., Oshino, A., Inagawa, S., Akaya, T. and Tamura, I. The introduction to Japan of the Titan barnacle, *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) (Cirripedia: Balanomorpha) and the role of shipping in its translocation. *Biofouling* 25: 325-333. (2009)

## その他誌上発表 &lt;論文 (査読なし)&gt;

- 1) 山口寿之. 「4章新たな外来フジツボ：最新情報」 pp.49-71. (「日本プランクトン学会・日本ベントス学会編「海の外来生物、人間によって攪乱された地球の海」」東海大学出版会, (2009)

## (2) 口頭発表 (学会)

- 1) 大城祐・山口寿之. (2008) 「新たな外来フジツボ類について」日本付着生物学会. 東京海洋大学 2008年4月1日.
- 2) Yamaguchi, T., Prabowo, R.E., Ohshiro, Y., Shimono, T., Jones, D., Kawai, H., Otani, M., Oshio, A., Inagawa, S., Akaya, T. Tamura, I. (2008) The introduction to Japan of the titan barnacle, *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854)(Cirripedia: Balanomorpha) and the role of shipping in its translocation. 14<sup>th</sup> International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Satellite Symposium “Current Topics on Barnacle Biology” Kobe, 1 August 2008.
- 3) 大谷道夫・山口寿之・川井浩史. (2008) 「船体に付着したフジツボ類を用いた移入リスクアセスメントの試み」日本ベントス学会. 2008年4月1日.
- 4) 山口寿之・大谷道夫・植田育男・川井浩史・山田和洋・平本隆輔・藤本顕・寺澤弘貴. (2009) 「その後の*Megabalanus coccopoma*の国内分布など」日本付着生物学会. 東京海洋大学. 2009年3月31日.
- 5) 山口寿之・大谷道夫・植田育男・川井浩史・山田和洋・平本隆輔・藤本顕・寺澤弘貴. (2009) 「外来種となる*Megabalanus coccopoma*の日本集団の遺伝的特性と国内分布」日本動物分類学会. 名古屋港水族館. 2009年6月13日.
- 6) Yamaguchi, T., Prabowo, R.E., Shimono, T., Kawai, H., Otani, M. (2009) Are the widely separated populations with geographical isolation differentiated genetically? -An instance of the introduction of the Titan barnacle *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) to Japan- The New perspective on barnacle research -creating for new cirripedology. The Crustacean Society Summer meeting Tokyo, Tokyo, September 2009.
- 7) 大谷道夫・山口寿之・川井浩史. (2009) 「船体が運ぶ海洋付着生物とその移入可能性について」日本マリンエンジニアリング学会海洋環境研究委員会ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」函館湯ノ川花びしホテル. 2009年11月6日
- 8) 山口寿之・大谷道夫・植田育男・野方靖行・川井浩史. (2009) 「ココポーアカフジツボの日本への移入—現状—」日本マリンエンジニアリング学会海洋環境研究委員会ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」函館湯ノ川花びしホテル. 2009年11月6日
- 9) 山口寿之・大谷道夫・植田育男・浦吉徳・野方靖行・川井浩史. (2010) 「ココポーアカフジツボの日本での分布—歴史と現状—」日本付着生物学会東京海洋大学. 2010年3月31日

(3) 出願特許

特記すべきことは無い。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

- 1) 山口寿之「分散、移住などによる生物進化-深海熱水噴出孔や浅海フジツボ群集を例に-」日本古生物学会シンポジウム「パレオバイオロジーから地球生命科学へ」2009.06.26@千葉大学けやき会館.

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞（2009年2月18日、全国版：サブグループ（1）報告書参照）
- 2) 静岡新聞（2009年8月9日、地方紙）
- 3) 読売新聞（2009年10月18日、地方紙）

(6) その他

特記すべきことは無い。

D-072 大型船舶のバラスト水・船体付着で越境移動する海洋生物の動態把握と定着の早期検出  
 (6) バラスト水管理条約批准後のバラスト水による生物移動量の推定

東京大学 アジア生物資源環境研究センター	福代康夫
<研究協力機関> (社) 日本海難防止協会	二ノ倉彰一
(株) エム・オー・マリンコンサルティング	和氣惇・松井博・佐藤雅彦
(株) 水圏科学コンサルタント	吉田勝美・久城圭
東京大学 アジア生物資源環境研究センター	大村卓朗・長濱幸生

平成19～21年度合計予算額 17,681千円  
 (うち、平成21年度予算額 5,071千円)

※予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 海運活動による生物広域化には、バラスト水を介する機構と、船底などに付着して運ばれる機構との2つがある。これらの対策としては、前者には国際海事機構 (IMO) で2004年に採択されたバラスト水管理条約、後者には今秋IMOで採択される生物船体付着対策ガイドラインがある。前者はすでに26カ国が批准し、条約成立まであと1-2年と予想されるようになっており、さらに各国でバラスト水管理システムの開発と条約批准の動きが活発になると思われる。一方、後者はガイドライン策定が進んでおり、2010年秋のIMOの第61回海洋環境保護委員会 (MEPC61) において最終化される予定になっている。このように、海運による生物移動を防ぐための国際的体制は整いつつあり、数年内には海運による生物広域化問題は回避できると考えられる。

上記国際的規制の設定に協力すると同時に、規制の有効性を検証する目的で、現在就航中の2隻の船舶のバラストタンクに堆積物捕集装置を設置してタンク内の生物量を推定し、さらにバラスト水処理システム導入後の生物混入と生残の可能性についても検討した。長期にわたる観察の結果、この捕集器により捕集された堆積物の乾重量は、航路およびバラスト水の漲水地によって異なり、0.022-0.326g/L、あるいは0.008-1.830g/Lであった。この堆積物から発芽した植物プランクトンは珪藻類が大半で、その多くはバラスト水管理条約の規制対象の大きさよりも小さい種であった。また、継続的に発生する種があり、一度でも取り込まれるとタンク内に潜伏し、条件がそろえば再び増殖を開始すると考えられた。就航中の船のタンク内には微細藻類や細菌が生息しているが、これらの生物の殺滅処理は、堆積物のため処理に用いられる活性物質の働きが弱まるので難しいと考えられた。すなわち堆積物が多いと、現在のバラスト水処理システムでは漲水前にタンク内にいる生物を殺滅することが困難であるため、今後は生物量だけでなく、沈澱堆積物量を減らす工夫も必要で、そのことをIMOなどに強く呼びかけることが大事と思われた。

[キーワード] バラスト水、セディメントトラップ、植物プランクトン、バラスト水処理装置、バラスト水管理条約

## 1. はじめに

バラスト水管理条約（International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments）は2004年2月にIMO（International Maritime Organization：世界海事機構）によって採択され、加盟各国はその批准に向け努力を行っているところである。平成22年5月9日現在、条約は24カ国が批准し、その合計商船船舶腹量は23.29%になっている。条約の成立には30カ国以上が条約を批准し、かつ合計商船船舶腹量が世界の35%以上という条件があり、未だにこの条件には達していない。批准にとって最も重要な要件は、国際航路に従事するさまざまな船種・大きさの船舶に設置できる装置が作られることで、そうなればすべての船舶にその装置を搭載することを要求できるようになる、しかし、未だに批准していない国が多いということは、十分な種類と数の装置がないと判断する国が多いということである。それだけでなく、既存船・新造船すべてを改修できるだけの数のドックが足りないことや、搭載された装置の性能、すなわち排出バラスト水中の生物量を迅速に測定する技術がないことなども批准をためらわせている原因となっている。

このような状況の中でも、新たな装置は少しずつできており、そのプランクトン殺滅性能も公表されている数少ないデータから類推する範囲であるが、間違いなく向上している。IMOのMEPC（Marine Environment Protection Committee：海洋環境保護委員会）に出席している各国代表と個人的な意見交換をしている範囲では、多くの人が、数年内に、より多くの国が批准し条約の成立要件が満たされると考えている。また、同時に装置の稼働によってバラスト水で移送される生物量も大きく減ることが期待されている。ただ、この点はより厳密な解析が必要であり、現在の条約が生物広域化防止のために充分であるのか、それとも成立後すぐに改正を考えなければならないような不十分なものであるかきちんと見極める必要がある。本研究はこのような、将来的課題にも備えられるように考慮して調査研究をおこなった。

なお、IMOのMEPCにおいては、バラスト水管理条約に関する審議が一段落した2008年10月の第58期会合以降に、MEPC付属のBLG小委員会（ばら積み貨物、液体、ガス小委員会）において、船体に付着して移動拡散する可能性のある生物に対する規制の方策に関する審議が行われ、2010年9月のMEPC第61期会合で規制の基準となるガイドラインが採択されることとなった。このガイドラインは、バラスト水管理条約と同様に数年内に強制力のある条約にするという考え方もIMO内では一般的である。このあたりの情報も、船舶による生物広域化の防止を考える上で重要であるので、バラスト水関連情報同様に、積極的に情報を収集した。

## 2. 研究目的

バラスト水管理条約批准後のバラスト水による生物移動量の推定をするために、IMOなどで討議されているバラスト水管理システムの性能およびその評価等に関する情報を収集するとともに、バラスト水処理装置装備後の船舶に実際に運び込まれている生物量に関する把握を試みた。

具体的には、IMOで討議されているバラスト水管理条約とそのガイドラインの詳細について最新の情報を収集し、特にそこに定められる試料採集法や生物定量法、生死判定法などについての確かな方法に関する情報も集めた。そして、それらの情報をもとに、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するように努めた。さらに、バラスト水以外で船が生物を運んでいる可能性がある船体付着生物の問題についてもIMOなどにおける提案や討議に関する情

報を集めた。

一方、バラスト水管理システム装備後の船舶に実際に運び込まれている生物量を推定するために、バラスト水処理装置装備船のバラスト水試料を収集し、バラスト処理水中の生物量を計数した。本観察結果は、バラスト水管理システム性能評価に貢献するものである。また、国際航路に従事する船舶のバラストタンクに沈殿物捕集器を設置して、バラスト水処理装置では殺滅が困難である沈殿物とともにタンク内に混入する可能性のある生物量の計量を行った。この際には、バラスト水処理条約（特にD-2基準）に定められた生物の大きさに関する基準と生死判定を踏まえて計数を行い、実際に条約に則った計数値と、通常の生物学的調査における計数値の差にも留意した。

### 3. 研究方法

#### (1) バラスト水管理条約批准後のバラスト水による生物移動量の推定

IMOのMEPCやその小委員会であるBLGの会合に日本代表団の一員として参加し、わが国を含め各国で開発しているバラスト水処理装置の性能、ならびにその性能の測定方法について情報を収集し、排出バラスト水中の生物量推定の資料とした。

#### (2) 沈殿物捕集器によるタンク内混入生物量の計量

バラスト水管理システムで殺滅が困難と考えられている、タンク内に混入後速やかにタンク底に沈殿する原生生物のシストや胞子を含む堆積物を、沈殿物捕集器（図 1）により採取した。本研究に用いた沈殿物捕集器は、長期間継続してバラストタンク内に設置するために本体の材質は錆び等に強いステンレス製（SUS316）とした。また、毎航海ごとにサンプルボトルを回収するため、出来る限り部品を少なく、部品の結合は全てねじ込み式とし、細かい部品を少なくした物を特注で作製した。沈殿物捕集器は、航路および運行年数の異なる船舶、すなわちバラスト水の経験する環境が異なる船舶間で比較を行うために、主に日本－中国および東南アジア間を航行する船舶A（載貨重量：DW=77,509 t）と主に日本－東南アジア間を航行する船舶B（載貨重量：DW=71,122 t）の二隻のばら積み船に設置した。また、両船舶ともに航海ごとに寄港地は異なっていた。両船舶への沈殿物捕集器の設置は、2007年4月に実施し、得られた沈殿物サンプルは毎航海ごとに採取し、その後ただちに船内において冷蔵保存した。こうして得られた沈殿物サンプルは、ある程度のサンプル数がたまったところで日本国内の港へ寄航した際に、寄港地から大学へと送り、その後実験に用いるまで冷暗所（4℃）にて保存した。



図 1. 作成した沈殿物捕集器（右）バラストタンク内に設置された沈殿物捕集器（約2年設置後）

沈殿物サンプルは、乾燥重量の測定と発芽実験に供した。乾燥重量は以下の手順で求めた。沈殿物サンプルは、あらかじめ乾燥させ秤量したGF/Fフィルター（A）によく攪拌した後に濾過捕集され、その後フィルターフォルダーに取り移し、乾燥機内（50℃）で乾燥し、秤量した（B）。秤量値BからAを差し引いた値を乾燥重量（g/L）とした。

発芽実験は、水温 4条件（15, 20, 25, 30℃）、照度 100  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、塩分 30、の条件で、培地には改変T1培地<sup>1)</sup>を用いた。培養期間は、約1ヵ月間で、この期間中少なくとも1週間に2回顕微鏡でD-2基準に留意して観察を行った。

### （3）船上試験によるバラスト水中の生物の量と質の変化

船上試験を実施するためにバラスト水処理管理システムを装備した船舶からバラスト水試料を採取した。船上試験はバラスト水処理管理システムの性能試験の概要を定めたガイドライン（G8）に従い実施した。バラスト水試料は、バラスト水排出基準（規則D-2）で規定されている最小サイズ50 $\mu\text{m}$ 以上の生物（Lサイズグループ）と10 $\mu\text{m}$ 以上で50 $\mu\text{m}$ 未満の生物（Sサイズグループ）のそれぞれの試料を採取した。Lサイズグループは1回あたり1 $\text{m}^3$ の水を(株)アムコが開発した試験水濃縮装置(Defigor)を用いて約1Lに濃縮したものを船内で採取し、その後研究室へ持ち帰り、一辺35 $\mu\text{m}$ の目合いのネット地(TIXX-35)で作られた柄付き小型ネットを用いてさらに濃縮後、試料の全量中の生きている生物について光学顕微鏡を用いて観察した。SグループはDefigorのSサイズグループおよびバクテリアの試料採取用弁から1回あたり1Lの水を採取し、その後研究室へ持ち帰り、一辺7 $\mu\text{m}$ の目合いのネット地(NY7-HD Super)で作られた柄付き小型ネットを用いてさらに濃縮後、原水相当少なくとも100ml分以上の試料中の生きている生物を光学顕微鏡を用いて観察および計数した。得られた試料は、漲水時にバラスト水処理装置で処理する前の前期・中期・後期の3種類と、排水時に処理後の前期・中期・後期の3種類、および対照タンクからバラスト水排水時に前期・中期・後期の3種類の、合わせて9種類である。

### （4）船舶の航行に関連した要因による生物移動・分布拡散に関する国際動向の調査

#### 1) バラスト水に混入する生物の移動規制に関する国際動向

バラスト水管理条約の各国の批准状況を調べるとともに、条約に追加して国内法などで規制をする可能性のある米国などの情報をIMOのMEPCやBLGにおける会議で収集した。

#### 2) 船体付着生物の移動規制に関する国際動向

IMOのMEPCにおいては、バラスト水管理条約に関する審議が一段落した2008年10月の第58期会合以降に、船体に付着して移動拡散する可能性のある生物に対する規制の方策に関する審議がなされた。この船体付着生物は「2001年の船舶の有害な防汚方法の規制に関する国が計画条約」(AFS条約)により、有機スズ系化合物などの有害化合物を含んだ船体塗料が使用禁止となったあと、急激に増加したともいわれており、その対策策定が焦眉の急となっている。そこで、移動規制に関する情報をIMOにおいて収集した。

## 4. 結果・考察

### （1）バラスト水管理条約批准後のバラスト水による生物移動量の推定

現在日本を始め、ノルウェー、ドイツ、韓国など多くの国がバラスト水処理装置の開発を進めており、すでにいくつかの装置は国の承認を得、実際に船舶に搭載できるようになっている。現

在各国で考案され、試験が始められている装置は30種類あるが、それらの大部分が活性物質といわれる薬品を細菌の殺滅のため漲水時に混入させる方法を取っている。しかし、そのままでは排水時まで薬品が残存する可能性があり、二次被害さえ発生することも考えられた。そこで、排水時に何らかの方法で当初混入させた活性物質を吸着あるいは分解して、無力化することが行われている。

装置の効力、すなわち生物の殺滅能力に関しては、薬剤を使うものが多くなってきた関係もあって、下限10ミクロンの大きさの生物ということではなく、バラスト水に混入した細菌以上の大きさの生物をすべて殺せるような装置ができてきている。ただ、この点は未だに装置の性能判定方法が国によって異なる状況であり、絶対的な性能比較ができない。第13および14回BLGで統一解釈（Uniform Implementation）のための協議が始まったが、各国とも異なる装置の開発を支援しているため、まだまだ統一まで時間がかかるようである。

なお、米国はバラスト水管理条約とは独自に、あるいは条約への追加要件として、条約よりも大幅に厳しい規制を実施するように考えているが、その厳しい規制を船舶が遵守しているか否かを調べる検査方法が決められないため、実施ができないでいる。例えば、カリフォルニア州法では排出バラスト水中に含まれてよいウイルスの量を1 mL当たり100個体としているが、この数字はあまりにも非現実的であり、沿岸警備隊も検査方法を見つけ出せないでいる。

また、実際に商品化されたバラスト水処理装置の進捗状況に伴い各国政府も批准の準備を徐々に進めており、2010年5月9日現在24カ国が批准し、その合計商船船腹量も23.29%となっている。この値は、条約成立に要する30カ国、35%にはまだたりていないが、2012年頃までには成立するのではないかと考えている海運関係者は多い。しかし、寄港国が実施するバラスト水処理システムの性能評価の具体的方法が定まっておらず、それが批准の障害になっている。

各国がバラスト水管理条約を批准し、条約が成立すると、国際航海に従事するすべての船舶はバラスト水管理装置を遅くとも2017年までに装備しなければならない。装置を搭載することにより、バラスト水に混入する生物は激減すると考えられる。

## （2）沈殿物捕集器によるタンク内混入生物量の計量

特注で制作した沈殿物捕集器は、両船舶において約2年間設置したままであったが、本体に腐食等は確認されず、また船体への影響も確認されなかった。また作成した捕集器は、試料回収を依頼した船員らにも面倒な作業を依頼する必要の無いことから、機能および操作性に優れた物であることが確認された。沈殿物捕集器によって得られたサンプルは、日本ー中国および東南アジア間を航行する船舶Aから19試料を、日本ー東南アジア間を航行する船舶Bから11試料を得ることができた。堆積物量は航海ごとに異なり、船舶Aの乾燥重量は0.022～0.326 g/L（平均0.157 g/L）であり、船舶Bの乾燥重量は0.008～1.830 g/L（平均0.740 g/L）であった（図2）。二隻の船舶間でこのような差が出たのは、船舶Bは既に長期間運行されており、バラストタンクの底に堆積物が既に存在し、その再懸濁の影響が大きいものと考えられた。

二隻の船舶から得た堆積物試料を用いた発芽実験において、発芽・成長した微細藻類の種類と最小サイズを調べた（表1）。いずれの船舶の堆積物試料からも珪藻類と渦鞭毛藻類と繊毛虫類が確認された。船舶Aからは32種の珪藻類と4種の渦鞭毛藻類と2種の繊毛虫類の計38種が確認された。バラスト水排出基準（規則D-2）で規定されている大きさの区分、すなわち最小サイズ50μm以上の生物（Lサイズグループ）と10μm以上で50μm未満の生物（Sサイズグループ）という区分に



基づいて最小サイズを測定し、大きさごとのグループ分けを検討したところ、Lサイズグループが1種、Sサイズグループが12種、Sサイズグループより小さいグループ（規制対象外の大きさ）が25種確認された。すなわち発芽・増殖が確認された生物の過半数の種が、バラスト水管理条約の規制対象外の大きさであることが明らかとなった。また二航海以上連続で発芽が確認された種は16種であり、発芽・増殖が確認された種の約半数を占め、そのうち12種はSサイズグループより小さいグループ、すなわちバラスト水管理条約の規制対象外の大きさの生物であった。さらにその16種のなかでも繊毛虫 *Euplotes* sp.、珪藻類 *Helicotheca tamesis*、*Navicula* sp.1、Diatom 1の計4種は5航海以上の試料から連続して発芽が確認された。以上から、バラストタンク内で数ヶ月以上にわたって、休眠細胞あるいは栄養細胞の状態で生存あるいは潜伏することが可能な種の存在が明らかになった。これらの種は、ひとたびバラストタンクへ取り込まれたら、バラストタンクを介して様々な地域へ移動する可能性が高いと考えられた。また、これらの種は、*Euplotes* sp.を除きバラスト水管理条約の規制対象外の大きさの生物であるので、条約発効後も分布域を拡大する可能性が高いものと推測された。

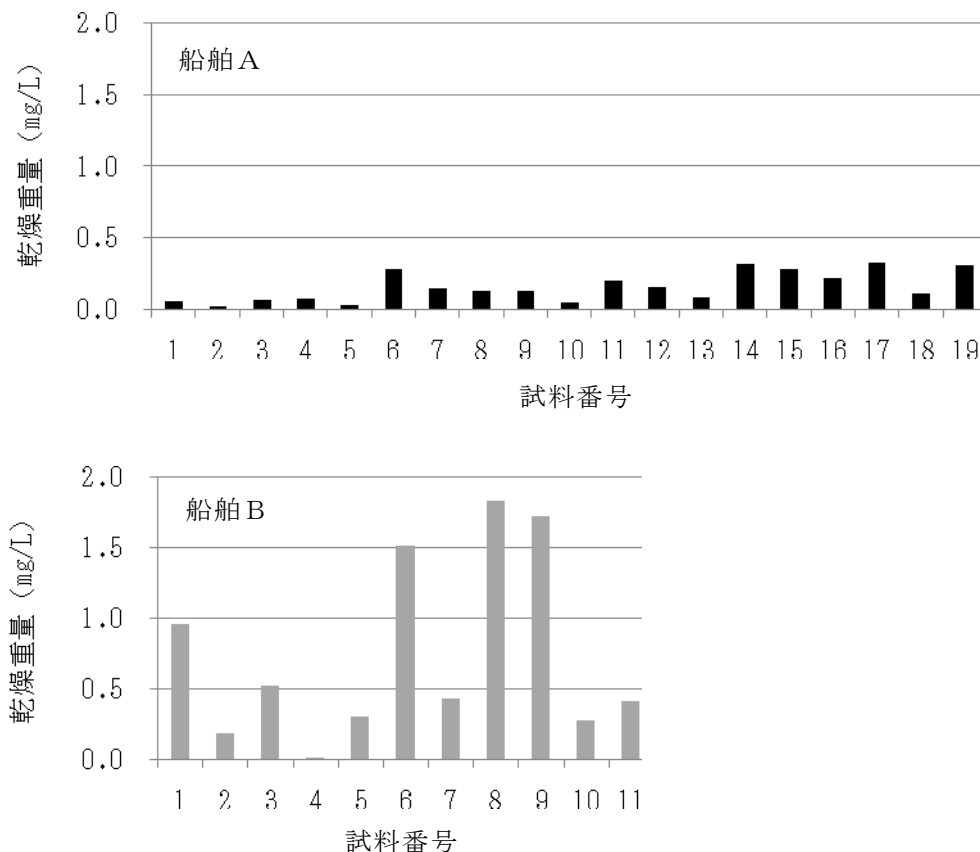


図 2. 堆積物捕集器によって得られた堆積物量

船舶Bからは、Lサイズグループは確認されず、Sサイズグループが3種、Sサイズより小さいグループが3種、発芽・増殖が確認された。本船舶で発生した生物の種数が堆積物量が多いにも関わらず、船舶Aよりも少ない原因は本船舶のサンプルが赤褐色であったことからサンプル中にバラストタンクなどの錆が含まれており、この錆の影響により生物の生残に大きな影響が出たもの

と考えられる。すなわち生物の生残には、バラストタンク内の錆びあるいは腐食等の状況も大きな影響を及ぼすことが明らかになった。

表 1. 発芽実験結果 (○: 発芽、-: 発芽未観察)

船舶 A		試料番号																		
生物区分	種名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
L	<i>Ditylum brightwellii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-
S	<i>Bellerochea horologicalis</i>	○	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	<i>Biddulphia longicruris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-
S	<i>Isthmia nervosa</i>	-	-	-	-	-	○	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	<i>Lauderia borealis</i>	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-
S	<i>Melosira nummuloides</i>	-	-	○	-	-	-	○	-	○	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	<i>Odontella sinensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	○
S	<i>Paralia sulcata</i>	○	-	○	○	-	○	○	-	-	-	○	○	-	○	○	○	-	-	-
S	<i>Podosira stelliger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	○	-	-	-	-	-	○
S	<i>Thalassiosira pacifica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-
S	Dinoflagellate 1	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○
S	<i>Euplotes</i> sp.	-	-	-	-	-	-	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Achnanthes</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	○	○	-	-	○
以下	<i>Amphora</i> sp.	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	○	-	-	○	-	-	-	-
以下	<i>Biddulphia aurita</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Campylosira</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Cerataulina</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Chaetoceros debilis</i>	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Chaetoceros decipiens</i>	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Chaetoceros paradoxus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Chaetoceros pseudocurvisetus</i>	○	○	-	-	-	○	-	-	-	-	○	○	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Coscinodiscus</i> sp.	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Cyclotella</i> sp.	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	Diatom 1	-	-	-	-	-	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Helicotheca tamesis</i>	-	-	-	-	-	-	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Leptocylindrus</i> sp.	-	-	-	-	-	○	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Navicula</i> sp. 1	○	○	○	○	○	○	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Navicula</i> sp. 2	-	-	-	-	-	○	○	-	○	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-
以下	<i>Navicula</i> sp. 3	-	-	-	-	-	○	-	○	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-

S 以下	<i>Navicula</i> sp. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-
S 以下	<i>Paralia sulcata</i>	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 以下	<i>Synedra</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 以下	<i>Thalassiosira</i> sp. 1	-	-	-	-	-	○	-	-	○	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 以下	<i>Gymnodinium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	○	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 以下	<i>Heterocapsa rotundata</i>	-	-	-	○	-	-	○	-	-	○	○	-	-	-	-	○	-	-	-
S 以下	<i>Vorticella</i> sp.	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 船舶 B

生物区分	種名	試料番号										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S	<i>Paralia sulcata</i>	-	-	-	-	-	○	-	○	-	-	-
S	<i>Euplotes</i> sp.	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-
S	<i>Polychaeta</i> sp. Larva	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-
S 以下	<i>Cyclotella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-
S 以下	<i>Navicula</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-
S 以下	<i>Gymnodinium</i> sp.	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-

## (3) 船上試験によるバラスト水中の生物の量と質の変化

バラスト水管理システムを積んだ船舶は船上試験の要求事項である、バラスト水漲水、保管、排水の一連の作業を実施した。LグループとSグループそれぞれ9種類の試料を得て、光学顕微鏡観察した。得られた試料は、以下の4回の船上試験である：①釜山漲水-香港排水、②釜山漲水-上海排水、③塩田漲水-香港排水、④香港漲水-高雄排水。バラスト水管理システムで処理した後の試料においては、一部の試料を除いて生きた生物は観察されなかった。また生きた生物が確認された試料における細胞密度は、バラスト水管理条約で定められている基準値以下であった。この結果は、バラスト水処理装置が排出基準値（D-2基準）をみたすものであった。しかしながら、本研究で試料を得た船上試験の①は無効試験であった。バラスト水管理システムの承認のためのガイドライン G8の処理装置性能評価には、船上試験の有効基準が記されている。各サイクルの試験は、漲水時の水生生物濃度がD-2基準のD-2.1規定値（Lグループ：10個体未満/1m<sup>3</sup>、Sサイズグループ：10個体未満/1ml）の10倍以上で、かつ排水時の未処理バラスト水を保管するバラストタンク（以下、対照タンク）の水生生物濃度がD-2.1規定値以上である場合のみ有効試験とみなされる。すなわち、本研究の観察結果によると処理前の前期・中期・後期の試料中の個体数は10個体/mLであり、D-2.1基準の10倍以上（100個体/mL）をみたしていなかった。船上試験①以外の試験は、全て船上試験の有効基準を満たすものであった（表2）。すなわち、本研究で試料を得ることが出来たバラスト水管理システムは、ガイドラインG8の処理装置性能評価基準を満たす装置であることが明らかになった。また同じ試料条件区において、試料採取の時間的な違いによって生物の密度が大きく異なることが明らかとなった。これはバラストタンク内で生物が不均一に分布していることを示すものであり、バラストタンクからの試料採取の難しさを示す結果となった。

表 2. 船上試験の結果（船上試験で得られた試料中で生きていた生物の種類と個体数）

① 山漲水-香港排水		L グループ		S グループ	
		種数	個体数/t	種数	個体数/ml
漲水	処理前・前期	14	20,200	28	5
漲水	処理前・中期	20	37,300	29	3
漲水	処理前・後期	18	19,850	24	2
排水	処理後・前期	0	0	0	0
排水	処理後・中期	0	0	0	0
排水	処理後・後期	0	0	0	0
排水	対照区排水時・前期	7	500	1	1 以下
排水	対照区排水時・中期	15	790	4	1 以下
排水	対照区排水時・後期	9	850	4	1 以下

② 釜山漲水-上海排水		L グループ		S グループ	
		種数	個体数/t	種数	個体数/ml
漲水	処理前・前期	13	8,900	8	107
漲水	処理前・中期	17	7,050	9	103
漲水	処理前・後期	17	6,100	10	110
排水	処理後・前期	0	0	0	1 以下
排水	処理後・中期	0	0	0	1 以下
排水	処理後・後期	0	0	0	0
排水	対照区排水時・前期	7	290	8	69
排水	対照区排水時・中期	7	120	10	152
排水	対照区排水時・後期	4	90	11	96

③ 塩田漲水-香港排水		L グループ		S グループ	
		種数	個体数/t	種数	個体数/ml
漲水	処理前・前期	15	23,150	8	350
漲水	処理前・中期	13	15,150	5	210
漲水	処理前・後期	13	27,500	7	207
排水	処理後・前期	0	0	0	0
排水	処理後・中期	0	0	0	1 以下
排水	処理後・後期	0	0	0	0
排水	対照区排水時・前期	12	736	3	103
排水	対照区排水時・中期	22	2,993	3	103
排水	対照区排水時・後期	18	21,512	4	67

④ 香港漲水-高雄排水		L グループ		S グループ	
		種数	個体数/t	種数	個体数/ml
漲水	処理前・前期	8	18,850	4	567
漲水	処理前・中期	11	27,650	3	560
漲水	処理前・後期	9	28,000	4	313
排水	処理後・前期	0	0	0	1 以下
排水	処理後・中期	0	0	0	0
排水	処理後・後期	0	0	0	0
排水	対照区排水時・前期	14	942	2	77
排水	対照区排水時・中期	7	374	2	17
排水	対照区排水時・後期	13	586	2	17

## (4) 船舶の航行に関連した要因による生物移動・分布拡散に関する国際動向の調査

## 1) バラスト水に混入する生物の移動規制に関する国際動向

バラスト水による水生生物の移動と防除のために、IMOは2004年にバラスト水管理条約を採択

し、続いて条約実施のために必要な各種の基準を具体的に取り決めた14種のガイドラインが2008年10月に成文化された。この条約の成立のためには、合計商船船腹量が35%以上となる30ヶ国以上の国での批准が必要になる。各国が批准する際に考慮する最も大きな要素は、船舶に搭載してバラスト水中の生物を的確に殺滅できる処理装置の開発状況であった。これまでにバラスト水処理装置の開発が進み、すでに国の承認を得、実際に船舶に搭載できるようになっている、すなわち商品化されている装置も世界に5種類以上でてきた。これに伴い各国政府も批准の準備を徐々に進めており、2008年12月末では批准国は17カ国（合計商船船腹量15.35%）であったが、2009年2月末では18カ国が批准し、その合計商船船腹量は15.36%、その約1年後の2009年12月末現在では合計21カ国が批准し、22.63%の合計商船船腹量となり、2010年5月9日現在では24カ国が批准し23.29%の合計商船船腹量となってきており、着々と条約成立要件に向かっていているようである。この批准国数などは、条約成立に要する30カ国、35%にはまだまだたりないが2012年頃までには成立するのではないかと考えている海運関係者は多い。

条約では、D-2基準の適用日が記されている。D-2基準の適用日は、船舶のバラスト量や建造時期によって異なるが、最初にバラスト水処理装置によるバラスト水処理が適用されるのは、2009年以降に起工されたバラスト水タンク容量が5,000t未満の船舶とされていた。しかし、これまでのところ30カ国以上が条約を批准し、かつ合計商船船腹量が世界の35%以上という条約発効条件が満たされていないために適用日の変更が2009年3月のBLGにおいて議論された。その結果、バラスト水容積が1,500m<sup>3</sup>以上、5,000m<sup>3</sup>以下の船舶については、2014年の検査基準日以後の最初の間接検査または、更新検査のどちらか早い方の検査までに、D-2基準をみたさなければならないと解釈する提案があり、反対意見がなく、BLGは合意した。

バラスト水管理条約には、バラスト水交換とバラスト水処理という2つの対策が記されている。現在世界中のほとんどの船がバラスト水交換を実施しているが、バラスト水管理条約が発効した場合、バラスト水交換は暫定的な対策となり、バラスト水処理装置の搭載が義務付けられる。ただし現在の条約にある、2009年度から建造する船に対する装置搭載義務は、2011年末を越えない2回目の年次検査まで搭載を猶予することがIMOで決議されている。これは、搭載できるバラスト水処理装置がなかったためで、現在は商品化された装置があるため、2011年以降建造船には適用延期はないと考えられる。

## 2) 船体付着生物の移動規制に関する国際動向

今までニュージーランドを議長とする通信部会（コレスポネンスグループ、会期と会期の間にメール等により情報交換を行う部会）で船体付着による生物移動に関する対策が議論されてきた。現在のBLG/MEPC/IMOの議論の方向性はつぎのようである。

- ①船体に塗布する塗料の性能を向上させる。ただ、現在の研磨型の塗料に一般に使われている、銅や亜鉛を含んだ成分は将来禁止される可能性があり、性能向上には困難な点も多い。すなわち、生物の付着を完全に防除できる塗料はないと考えられる。
- ②付着生物が多く付く部位に限って局所的に、金属等を含んだ毒性の高い塗料を使用する。ただし、AFS条約（2001年の船舶の有害な防汚方法の規制に関する国際条約）との関連で、そのような塗料が限定的とはいえ、使用可能となるかどうか流動的な部分もある。
- ③シーチェストなど生物の多く付く船体表面の凹所には、薬剤をより有効に使用する。
- ④定期的な船底掃除を奨励する。使用する船底生物掻き落とし用の水中ロボットなどの性能を上

げるとともに、掻き落とした生物を含む「ゴミ」を水中に撒き散らさないように装置を改良する。

これらのうち第4点の水中ロボットによる清掃は禁止をしている国もあり、今後議論の分かれるところである。禁止をすれば、ドック入りするまで掻き落としできずに、付着物が多くなる。一方、禁止している国をそのままにして、水中清掃を認めると、その清掃した港湾のみに多くの生物が侵入する可能性が高まる。性能のいい水中清掃ロボットを頻繁に使用させることが、生物侵入を防ぐ公平な手段であるかどうか論点の中心になる。

なお、水中ロボットの性能向上に関連して、IMOではまだ議論になっていないが、国内では、掻き落とした生物を拡散させないようにするため、現在用いられている0.5mmの目合いの網地による捕集を、0.3mmの網地による捕集に改良する工夫がなされている。生物リスクなどの観点からみると、フジツボなどの生物の付着初期個体は0.5mmと0.3mmの間の大きさにあることがあり、この網地の改良は意味ある可能性が大きい。細菌などすべての生物を掻き落とした後、逃さないようにすることは不可能であるが、現実的な対策として今後議論されるものと思われる。

生物が船体に付着して移動することに対しては、世界的に同一基準で対策を立てようという目的で、IMOでガイドライン策定が進んでおり、今年9月に開催されるMEPC61において最終化される。また、このガイドラインは将来の条約化をにらんだものである。そこに盛り込まれた対策としては、船底塗料の改良と水中掻き落とし装置の利用による付着生物量の減量化を目指すというものであるが、実施基準・方法などまだまだ各国間の意見の隔りがある。ガイドラインはあくまで各国が守るべき、あるいは船舶に要求する最低限の基準と理解している国が多いが、実施する場合の判断すべきことに科学的に決めにくいことが多い。たとえば、清掃を行わないでいいClean shipと、汚れているとされるDirty shipの区別として、ある生物の付着量といった生物量を基準にすると、船体の付着生物量をいつも監視しなければならなくなり現実的ではなくなってしまう。船底掻き落とし後、ある航路に従事した船舶は何カ月以内に再度掻き落としをしなければならないといった、生物量ではない基準を用いる配慮が現実的な規制・条約を作る場合には必要と考えられてきている。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

沈殿物捕集器をバラストタンクに設置することにより、海底堆積物などとともに多くの微細な生物がタンク内に混入することが分かったが、その生物の大きさは条約による規制の対象にはならない可能性が認められた。発芽実験の結果から、バラストタンク内の堆積物には、生きた微細藻類が30種以上存在することが明らかになった。そのうちの4種は航海をまたいで、数ヶ月間バラストタンク内で生存することが明らかになった。またバラストタンク内には、条約の対象外となる大きさの生物も多く生息していることが明らかになった。今後、バラスト水処理装置を装備した船における生物量を、バラスト水条約の基準ならびに科学的な生物移動という基準で、別な観点から見ていくことが必要なことが明らかになった。

### (2) 地球環境政策への貢献

本研究の成果により、バラスト水管理システムを装備することで、バラスト水で移送される生物量を大きく減らし得ることが示された。すなわちバラスト水管理条約がバラスト水で移送される生物量をも減らす上で有効であることが示された。その一方で、バラストタンク内には条約の

対象外となる生物も多く生息していることが明らかになり、生物移動を根本的に防除するには現条約の対象生物の範囲を拡大する必要があることを、IMOなどの国際機関への提案文書として我が国から報告し、今後の条約等の改正などに役立てることが必要と考えられた。バラスト水管理条約は、全ての生物を対象としたものではない形で作られているためやむをえないことであるが、生物広域化を真に防止するためには全ての生物を対象とすることが必要であることは言うまでもない。今後、様々な航路で実際にバラスト水処理装置を装備した船舶の調査を行えば、この点がより明確になると思われる。

IMOなどで討議されているバラスト水管理システムの性能およびその評価等に関する情報を収集したことで、現在各国で考案され、試験が始められている装置の大部分が活性物質といわれる薬品を細菌の殺滅のため漲水時に混入させる方法を取っていることがわかった。しかし活性物質を使う方法では、排水時まで薬品が残存する可能性があり、二次被害の発生も考えられた。そこで、排水時に何らかの方法で当初混入させた活性物質を吸着あるいは分解して、無力化することが行われている。すなわちバラスト水処理装置で処理後に、バラストタンク内に入る水に含まれる活性物質の濃度は低いことが予想される。発芽実験の結果などから、既存の船のバラストタンク内には微細藻類や細菌が生息していることは明らかである。これらの生物は堆積物が活性物質の働きを弱めることや、活性物質の濃度が低くなることが予測されることから、殺滅処理が難しいことが考えられる。すなわち、現在承認されている装置も含めて、バラスト水管理システムでは、すでにバラストタンク内で生息している生物の移送を防ぐことが困難であり、今後は生物量だけでなく、沈澱堆積物量を減らす工夫も必要であり、そのこともIMOなどに文書を提出するほか、議場で口頭講演を行い、各国に強く呼びかけて理解を求めることが大事と思われた。

なお、バラスト水管理条約に関連した国内法は、IMOの審議に中心となって対応している国土交通省が策定するため、従来から環境省は議論への参加すら極めて消極的であった。しかし今回の調査結果をより有効に生かすには、環境省から船舶内で起こっている生物量に関する科学的事実と、それに対応する条約の不十分さを環境省から起草した提案文書としてIMOに報告すべきであると考えられる。

## 6. 引用文献

- 1) Omura, T., Ishimaru, T., Fukuyo, Y. Physiological characteristics of two varieties of *Pyrodinium bahamense*. Fisheries Science, 68, suppl. I: 523-524. (2002).

## 7. 国際共同研究等の状況

国際海洋開発評議会（International Council for Exploitation of the Sea: ICES）は大西洋を中心に研究を行う欧米の研究者が参加する国際機関であるが、そこにバラスト水管理条約に関連した研究活動を行う2つの作業部会「バラスト水その他の船舶起源の生物移動機構（Ballast and Other Ship Vector: BOSV）」と「海洋生物の意図的移動（Intentional Transfer of Marine Organisms: ITMO）」がある。この両作業部会は毎年1回参加各国で研究討論会を開催しているが、そこから招待を受けて会議に参加し、バラスト水中の生物量測定技術、生物生死判定技術などについて意見交換を行った。また、バラスト水管理条約に関しても、科学的な面からその有効性について検討を加えた。その成果は事項研究発表の査読あり学術誌日本プランクトン学会報などに発表されている。

## 8. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 福代康夫・都丸亜希子・大村卓朗. 「バラスト水管理条約とその問題点」 日本プランクトン学会報. 54: 50-54. (2007)

<その他誌上発表（査読あり）>

- 1) Gollasch, S., David, M., Voigt, M., Dragsund, E., Hewitt, C., Fukuyo, Y. Critical review of the IMO international convention on the management of ships' ballast water and sediments Harmful Algae 6: 585-600. (2007)

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 川井浩史・福代康夫「海洋生物の越境移入と沿岸生態系の攪乱」特集によせて「越境移入の動態把握をめざした研究とバラスト水管理条約」海洋と生物, 29: 191-194. (2007)
- 2) 河地正伸・出村幹英・ノエル マリエレン・都丸亜希子・大村卓朗「バラストタンク内における微生物の動態と越境移動問題について」海洋と生物, 29: 204-211. (2007)
- 3) 福代康夫「バラスト水規制とバラスト水処理装置の開発事例」 「第1講バラスト水管理条約とバラスト水管理システム」(株)エヌ・ティー・エス 3-7. (2008)
- 4) 大村卓朗・福代康夫「第3講バラスト水中の生物計数と処理装置の性能評価 ～バラスト水管理システム承認の際の生物分析方法も含めて～」 「バラスト水規制とバラスト水処理装置の開発事例」(株)エヌ・ティー・エス 27-56. (2008)
- 5) 福代康夫「13章バラスト水による導入の特徴」日本ベントス学会編「海の外来生物」東海大学出版会, 195-203. (2009)
- 6) 福代康夫、華山伸一、久野勝秀「16章バラスト水管理条約」日本ベントス学会編「海の外来生物」東海大学出版会, 235-244. (2009)

### (2) 口頭発表（学会）

特に記載すべき事項はない。

### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

### (4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

### (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

### (6) その他

- 1) セミナー“バラスト水規制とバラスト水処理装置の開発事例”で、『バラスト水中の生物係数と処理装置の性能評価～バラスト水管理システム承認の際の生物分析方法も含めて～』に関する発表を行った（2008年1月29日東京全国家電会館、発表者 大村卓朗）
- 2) セミナー“バラスト水規制と処理技術・装置の最新動向”で『バラスト水中の生物係数と処理装置の性能評価～バラスト水管理システム承認の際の生物分析方法も含めて～』に関する講演を行った（2010年3月10日東京新御茶ノ水総評会館、発表者 大村卓朗）



D-072 大型船舶のバラスト水・船体付着で越境移動する海洋生物の動態把握と定着の早期検出  
(7) 海運による国際物流に伴う生物フロー解析とバラスト水および船体付着管理手法に関する研究

東海大学 海洋学部 航海学科 航海専攻

金子仁・津金正典

<研究協力機関>

東海大学 船舶管理室 荒木直行

東海大学 望星丸 河内尚・野陳朋樹・藤村涼

平成19～21年度合計予算額 10,889千円

(うち、平成21年度予算額 3,349千円)

※予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 商船では省エネルギーの観点から生物の船体付着防止を行っているが、ドック時またUWC(Under Water Cleaning)時に必ず海洋生物の付着がみられる。今後、付着防止の観点から船体管理を実施するとなると厳しい管理が必要となる。付着する動物の種類では環形動物と節足動物が約90%を占め、この割合は船体外板とニッチ部では同程度である。また、それら付着生物にヨコエビ、ワレカラなどが住みついており、一緒に移動される可能性が大きい。最初に付着する部位は防汚されていない、また塗装の剥離場所であることが分かった。この場所にフジツボ等が付着すると生物を誘引し、付着が助長することから早期に付着を発見し、取り除くことが必要である。付着防止は塗装によることが大きい、船体構造上および塗装施工法の理由で塗装が完全とはならない、また運航にともなって必ず塗装が衰耗・剥離する部位があり、その部位には他の付着防止方法が必要である。その部位に界面活性剤を注入した実験を行ったが付着防止効果があることを実証した。また、一般的に船舶で塗装されない部位に塗装を施した実験を行い、付着防止効果があることを実証した。付着は港湾での船舶の停泊日数と大きな関係があると考えられている。豪州の石炭積み出し港湾の滞船状況を調査すると共に、寄港石炭船の運航データの解析を行い停泊期間と出港後の船速から付着状況を分析する簡単な指標値を提案した。また、長期停泊中の付着防止対策として、1週間程度毎に短期航海をすることが有効であることを確認した。さらに、液化天然ガス運搬船、コンテナ船の停泊日数を調査し、石炭船と比較し長期滞船の影響の受けにくい船種であることを確認した。海運による海洋生物の移動を防止するためには、マクロ的見地からは長期滞船を発生させない貿易形態を構築することや停泊を極力短縮するための港湾施設能力の拡充が重要かつ必要である。ミクロ的には船体付着を防止することであるが、港湾設備、船体構造、船体整備方法、具体的付着防止技術等を含め総合的な付着防止管理手法について提言した。

[キーワード] 船体保全、船体付着生物、付着防止技術、海運、長期滞船

## 1. はじめに

海運の物流量の伸びは、船の移動に伴う海洋生物(生物)移動量の増加となり、固有生態系の攪乱が懸念されていることから、現在、IMO(国際海事機関)では、船体による生物の移動を減らすためのガイドラインの研究・議論を行っているところである<sup>1)</sup>。しかしながら海運の貿易実態からの生物移動の研究および積極的に船舶による移動防止のための管理に関する研究は少ないと思われる。

## 2. 研究目的

わが国の海運事業活動との関係で生物移動の発生要因を考察し、また塗装を含む付着防止技術および船舶運航の特徴の調査等から海運による生物移動管理手法を策定しようとするものである。

## 3. 研究方法

### (1) 海運における総合的な海洋生物移動管理手法の策定に関する研究

海洋生物の移動を防止するには先ず、船体に生物を付着させないことである。そこで、外航商船の船体メンテナンスの状況、船体への生物の付着状況、付着防止技術調査、塗装および塗装以外の付着防止技術の実船実験等からの情報を得て総合的な海運による生物移動管理手法を策定することとした。船体メンテナンス状況の調査については外航船会社、造船会社へのヒアリングおよび東海大学の調査研修船「望星丸」の調査で行った。付着状況の調査は外航船会社へのヒアリング、運航データの入手、外航船および「望星丸」の観察で実施した。付着防止技術調査は造船所、電力会社研究所および塗装会社へのヒアリングにて実施した。塗装による付着防止技術に関しては、望星丸の無塗装部位への塗装による実験、塗装以外の付着防止技術の調査は、望星丸のバウスラストンネルに界面活性剤の注入実験を行うことで実施した。

### (2) 海運における国際物流に伴う生物フロー解析調査

海運における国際物流に伴う生物フローは、船舶の移動に大きく影響を受ける。国際貿易の進展に伴い船舶隻数が増加し移動域も拡大していることから生物フローは、ワールドワイドの視点で考える必要がある。中でも船舶の長期滞船は、船体付着を大幅に進行させ生物フローに大きな影響を及ぼすのでその実態把握および停泊日数と付着との関係を把握することは重要である。本研究では、まず、日本との貿易量が多く豪州を対象として船体付着の関係する長期滞船の発生しやすい主要石炭輸出港の入出港船データを入手し石炭船の滞船状況を明らかにし、次に豪州航路の石炭船の運航データを船社から入手し整理の上、停泊日数と付着状況の関係を分析し船体付着の進行度を表す指標を作成することとした。また、船体付着防止対策として実施している短期航海の効果について作成した指標を用いて評価を行うこととした。さらに、液化天然ガス運搬船(LNG船)、コンテナ船の運航及び停泊の状況を明らかにし、石炭船と停泊状況の差異をから船体付着影響について調べることにした。

## 4. 結果・考察

### (1) 海運における総合的な海洋生物移動管理手法の策定に関する研究

#### 1) 外航商船における海洋生物付着防止の管理の現状

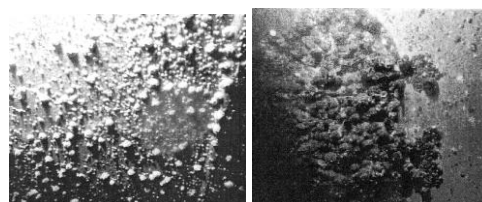
外航商船では海洋生物(生物)の船体付着防止方法(付着防止)は専らAF塗料(塗装)による管理であ

る。以下①～⑦に船体塗装の管理状況についてまとめる。

①船社では燃料費の軽減の観点から船体の塗装に関して厳しく管理しているが、生物の付着防止の観点からではない。塗装の評価は、ドック時とUWC時に汚損状況を把握すること、また燃料消費データから性能を評価しているが塗装の種類により2倍以上の性能の差がある。②塗装では性能の良い塗料の選択、塗装膜厚さなどで管理しているがそれでも生物が付着している。付着が激しくなった場合はUWCを実施している。③付着の多い船体部位は塗装されていない部位、航海中に消耗・剥げ易い部位、ドック中に塗り難い部位である。④シーチェストの冷却水取水入口格子に付着するが、詰まりで吸入量が減った場合のみ掃除。⑤塗装の防汚剤では銅入りの性能が良く船社では銅入りを採用する傾向にある。銅フリーの塗装は長期の停泊船において性能不足との結果が出ている。⑥防汚剤の溶出がないシリコンベースの塗装が環境に良いので試験的に利用されてきているが、高価、衝撃に弱いという欠点がある。また、船速の遅いバルカーでは利用が難しいといわれている。⑦豪州港での荷役待ちの長期滞船時は付着防止策として、できる限り短時間運航(Short Navigation)を実施している。

表1 バラ積み船「A」の船体部位別生物付着状況

年月日	船側	船尾	ロープガード	プロペラ	舵	船底	シーチェスト
2001/7/20	海藻	-	-	海藻	海藻	付着なし	付着なし
2003/4/8	付着なし	-	-	海藻 フジツボ	海藻 フジツボ	フジツボ	-
2003/10/7	海藻 フジツボ	-	-	海藻	海藻	フジツボ	-
2005/9/30	海藻 スライム	海藻	-	-	-	-	フジツボ
2006/11/18	海藻 フジツボ	フジツボ	フジツボ	フジツボ	フジツボ	フジツボ	フジツボ
2007/1/13	海藻 フジツボ	海藻 フジツボ	-	海藻	海藻	海藻 フジツボ	海藻 フジツボ



a) 船首

b) シーチェスト格子

図1 バラ積み船「A」の生物付着写真

表2 外航C社所有船の生物付着状況

船名・要目等	船体部署		
	Flat Bottom	Vertical	Boot Top
A丸 Bulk Carrier 72,000 DWT 30ヶ月仕様塗装	ゴカイとフジツボ幼虫が前面に付着。前回入渠より32ヶ月。	塗膜剥離箇所にフジツボ付着。	AFを塗っているため、スライム等の付着なし。
B丸 Ore Carrier 83,000 DWT 30ヶ月仕様塗装	一般的にスライム付着。前回入渠より32ヶ月。	船首部のメカニカルダメージ、塗膜剥離が多く、スライム、フジツボ付着。	付着少ない。
C丸 Bulk Carrier 74,000 DWT 30ヶ月仕様塗装	フジツボの幼虫が全面に付着。前回入渠より24ヶ月。	スプレーパターン上に軽度のスライム。船尾フレーム周りにフジツボ付着。	付着なし。
D丸 Bulk Carrier 168,000 DWT 30ヶ月仕様塗装	付着なし。前回入渠より35ヶ月。	一般的にスライム付着。	水線にアオサ付着。
E丸 Bulk Carrier 144,000 DWT 30ヶ月仕様塗装	消耗、剥がれ、盤木部にフジツボ幼虫。前回入渠より32ヶ月。	消耗、剥がれ部にフジツボ、スライム、アオノリが付着。	水線下部にスライム付着。

## 2) 商船における海洋生物の付着状況

日豪航路のバラ積み船「A」について付着状況を調査した。表1はUWC時の付着状況であるが、毎回付着している状況である。図1は2007年1月の船首およびニッチ部(半閉鎖区域)であるシーチェスト格子の写真である。日豪航路の大型運搬船「A」についても調査を行ったが同じ状況であった。表2は外航C社の所有船5隻のドック時の付着状況である。5隻とも付着しているのが分かる。原因は、塗装の消耗・剥離・メカニカルダメージおよび盤木部等の塗装不良等である。

## 3) 望星丸における海洋生物の船体付着状況

a) 船体への付着状況の時系列調査：2007年から2009年、毎年11月のDry ドック時、ドック～ドック間では清水港での係岸中にダイバーを入れて調査を行った。1月、2月、4月の観察では、船体の一部に少数が付着していたが、7月では既に多くの生物の付着が観察された。わが国では一般にフジツボ類の節足動物は春に孵化し、春頃から付着すると考えられるが、本船でも5月頃から本格的

な付着が始まると考える。しかしながら望星丸の調査では強弱はあるが一年中付着するので付着防止には、一年中対策が必要である。観察から最初に付着するのは、防汚がされていない部位や塗装剥離部位であることが分かった。またドライドック後35日(1月)に船体にバイオフィームが付着していたが本船の運航時に剥離していた。

#### b) 越境移動の可能性のある海

洋生物種：2009年10月26日の係岸時、2009年11月16日のドック時に船体において、生物の付着が激しい16ヶ所をスクレーパーで擦り生物を採取した。採取場所は船体外板とニッチ部のバウスラスタ、ロープガード、船尾シールである。生物の分析

表3 船体外板の付着状況

門	綱	目	科	学名	個体数 (個)	割合 (%)
環形動物	多毛	ケヤリムシ目	ケヤリ	Sabella sp.	2193	55.09
節足動物	甲殻	等脚(有扇亜目)	コツムシ	Dynoides dentisinus	1337	33.58
原索動物	ホヤ	-	-	ASCIDIACEA	393	9.87
扁形動物	渦虫	多岐腸	-	Polycladida	26	0.65
触手動物	苔虫	唇口	モングチコケムシ	Cryptosulidae	15	0.38
紐形動物	-	-	-	NEMERTINEA	11	0.28
腔腸動物	花虫	イソギンチャク	-	Actinaria	3	0.08
軟体動物	二枚貝	カキ目	イタボガキ	Ostreidae	2	0.05
棘皮動物	蛇尾	顎蛇尾	チビクモヒトデ	Ophiactidae	1	0.03
合 計					3981	100.00

対象は1mmメッシュのフィルタリング後に残った生物である。船体外板の13個所から採取した生物の分類群別個体数の割合(%)は環形動物(55.1%)、節足動物(33.6%)、原索動物(9.9%)、扁形動物(0.65%)、触手動物(0.4%)、紐形動物(0.3%)、腔腸動物(0.1%)、軟体動物(0.05%)、棘皮動物(0.03%)であった(表3参照)。植物では緑藻植物(アオノリ属、アオサ属)が採取された。また、ニッチ部の生物の分析では、動物の門での個体数の割合(%)は環形動物(54.8%)、節足動物(38.4%)、原索動物(3.4%)、軟体動物(2.2%)、扁形動物(0.8%)、腔腸動物(0.2%)、触手動物(0.2%)、紐形動物(0.05%)、棘皮動物(0.002%)であった。以上より、①動物の種類では環形動物と節足動物が約90%を占めること、②船体外板とニッチ部では生物相とその個体数の割合が類似していること(ただしニッチ部では大型の軟体動物(二枚貝)が多い)、③そして船体にはカンザシゴカイ、フジツボ、二枚貝、ホヤ、アオサ等の付着生物に加えて、ヨコエビ、ワレカラなど棲息しており、同様に船舶で移動している状況が明らかになった。

#### 4) 船体への生物の付着の原因

a) 船体構造と塗装のメンテナンス面における付着の原因：あるメンテナンス期間塗装が完全であれば付着は防止できると考えるが、船体構造上および塗装方法の理由で塗装が完全とはならない部位があることが望星丸の3年間のドック時の付着状況の実態調査から判明した。その原因は、①アンカーチェーン等による「塗装のメカニカルダメージ」、②プロペラ等の「無塗装(無防汚対策)」、③ドックでの「塗装作業時に塗装吹きつけが完全にできない」、④船体の「突起部・複雑な構造等の物理的な形から塗膜形成が難しい」、⑤「塗装の下地処理不良または劣化による剥離」、⑥航海中に「流速による剥離・衰耗」、⑦ドック時での「メンテナンス作業により塗装が剥離」に分類できた。これらの原因を取り除くことが全般的な付着防止対策となる。

b) 生物の付着メカニズム：大型海洋生物の船体への付着過程として、①船体に有機物が付着、②有機物をめがけて海洋中の細菌が付着しバイオフィームを形成、③その後、カンザシゴカイ、フジツボ等の大型生物が付着、の順が考えられている。望星丸では長期停泊時に船体に膜状のバイオフィームが付着することが観察されている。初期の場合、船体に固着していないので、船が動くことにより剥がれ落ちた。このことから長期停泊時はバイオフィームの船体への強度な

付着を防止することが必要であり、船舶をShort Navigationすること、プロペラを回して水流をつくるのが通常できる運用面での方法と考える。

フジツボの付着防止策を考える場合、その生活環を知ることは重要である。秋田県立大の岡野らはフジツボの付着のメカニズムの研究を行っているが、浮遊キプリス幼生が20分程度で基盤に固着するとしている<sup>2)</sup>。このことからキプリス幼生が付着するチャンスをつくらないということが付着防止に有効である。また、フジツボの幼生はフジツボが付着しているところに誘引され群生する性質があるので1個体でも付着させないということが付着防止対策となる。

### 5) 界面活性剤による付着防止実験

船体への付着防止策は塗装の技術向上によるところが大きい。しかしながら前述のように塗装のみでは限界がある。そこで、塗装とその他の技術を併用することが考えられる。表4は塗装以外の有望と思われる付着防止技術であるが、今後の開発が待たれる。今回、界面活性剤

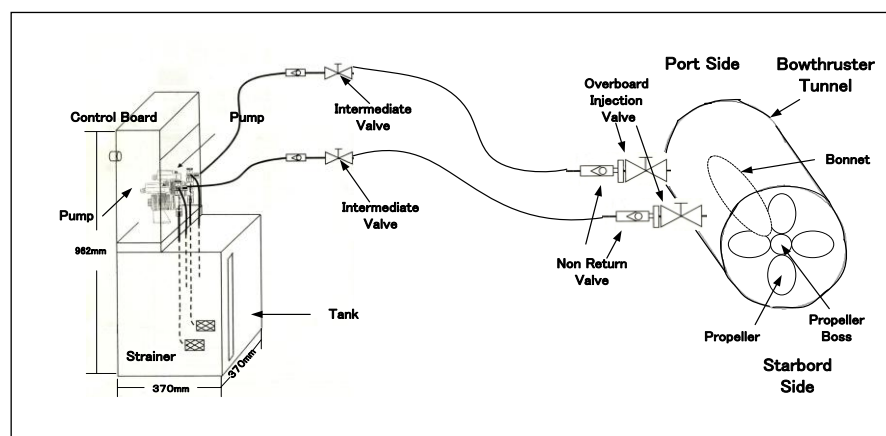


図2 界面活性剤注入システム全体図

に関して実験を行い、効果検証を行った結果について、以下に紹介する。まず2007年11月のドックでバウスラスタートンネル内(トンネル)に界面活性剤(本剤)を注入するシステムを搭載し、2008年の港内停泊中に時間当たり41.3ml注入し付着防止効果を検証した。2009年度は経済性を考慮して濃度を2008年度の半分にして実験を行い、その影響を調べた。図2に船内に設置した界面活性剤注入システム(本システム)全体図を示す。注入装置の液タンクに入った界面活性剤(本剤)はポンプで吸引され、中間弁からトンネル壁に設置された2箇所の弁を通り注入孔からトンネル内に注入される。なお、船体の構造上必ずしも注入孔は最適な最下部の位置にすることはできず、トンネルの垂直方向の上部25%の位置となった。使用する本剤は脂肪族カチオン界面活性剤(日本油化工業(株)販売。商品名、ユニシエルV7α)であり本剤が生物の付着活動を妨げると考えられている。毒性データは、0.5ppmの場合、24時間で生分解、経口毒性(マウス)LD50は約2,500mg/kg、そして魚毒性(ヒメダカ)LC50(48時間)は1.5mg/lとなっている。本システムの運転状況は、2008年度は1月の出渠後から2008年11月15日まで、また2009年度は1月の出渠後から2009年11月15日までが稼働である。

図3に界面活性剤の使用していない実験前(2007年)と使用した実験後(2008年)の写真を示す。実験前はトンネル壁全体、バウスラスターボス部(ボス)の付着が激しかったが、実験後は主にボス部に付着が残るのみとなった。2007年のボス部の生物の種類は、カンザシゴカイ、ウズマキゴカイ、コケムシ、フジツボ、カイメン、ムラサキイガイ、ミドリイガイ、イタボガキであった。2008年

表4 塗装以外の生物付着防止技術

技術名	
水中クリーニング(UWC)	エアバブル(マイクロバブル)
高流速	塩素
高温水処理	次亜塩素酸
淡水処理	過酸化水素水
紫外線照射	オゾン
レーザー照射	無酸素雰囲気(N <sub>2</sub> 、CO <sub>2</sub> )
超音波	銅イオン
電撃処理	界面活性剤

の同部の種類は、カンザシゴカイ、フジツボ、イタボガキ、サメハダホシムシ、ゴカイであり、実験後の種類数は減少していた。また、本剤を注入したボス部と注入がない船尾シールロープガード(ロープガード)の生物を剥取り1個体当たりの湿重量(g/個)を比較した。カンザシゴカイとフジツボの湿重量では前者は1/3、後者は1/6の湿重量となっていた。図4は2009年度に本剤の濃度を半分にした結果の写真である。2008年より明らかに付着が進んでいることが分かる。ボス部の生物を20cm角に剥ぎ取り2008年度と比較した。全体の生物個体数(個)では2.4倍、湿重量(g)では8.9倍、1個体当たりの湿重量(g/個)では3.7倍であった。特に個体数が多い環形動物(カンザシゴカイ)では全体の個体数では1.3倍、湿重量では1.9倍、1個体当たりの湿重量では1.5倍であった。また、節足動物(フジツボ)では全個体数では6.0倍、湿重量では10.9倍、1個体当たりの湿重量では1.8倍であった。このように濃度を半分にした結果、付着が激しくなった。



実験前(2007年) 実験後(2008年)  
図3 生物の付着状況(右舷)



図4 生物の付着状況(2009年)

#### 6) 塗装による付着防止実験

バウスラスターボス、ビルジキール、ロープガード、船尾シール部は一般的に生物が付着しやすい部位である。そこで2009年度に塗装により付着防止が可能かどうか実験を行った。実験結果は以下のとおりである。

バウスラスタープロペラボス部に塗装を施したが、4.1ヶ月後にボス部サイドで剥がれていたが生物の付着はなかった。7.5ヶ月後ではボス部全体の塗装が衰耗しカンザシゴカイ、フジツボが疎らであるが全体的に付着していた。ボス部は回転するので塗装が剥離・衰耗し易いこと、また当部は流速が速くしかも泥を含むということで塗装の衰耗、剥離が生じたと考える。

ビルジキールは右舷と左舷がある。右舷に左舷より付着防止効果が強い塗装を施した。両舷とも4.1ヶ月後に塗装剥離が見られた。特に右舷はメカニカル損傷が発生し衰耗、剥離が激しい。ドックでの目視観察では、防止効果の強い塗装が施されている右舷のビルジキールのフジツボの付着個数は左舷の約1.7倍(去年は1.2倍)であった。剥ぎ取った生物の1個体当りの湿重量で比較すると、右舷は全体平均で4.1倍、カンザシゴカイは右舷と左舷はほぼ同じ、フジツボでは右舷は3.3倍であった。このように防止効果の高い右舷の付着が多い理由として、本船は岸壁に右舷付けが多く、プロペラやバウスラスターを使用した場合に右舷側の水流および巻き上がった泥で塗装の損傷が激しいことと、停泊時は、右舷側は水の流れがなく生物が着きやすいこと、岸壁の生物が孵化した場合に幼生が付着し易いこと等が考えられる。

船尾シールロープガードの内側に2008年度より付着防止効果の高い塗装を施した。1個体当たりの湿重量で比較すると、全体の生物では40%に、カンザシゴカイでは40%に、フジツボでは21%に減少していた。このことから本塗装は2008年度より付着防止効果が高いことが分かる。ただし、水流が激しく、塗装は1年でほとんど剥げ落ちていた。

船尾シール部(シール部)は一般に船舶では無塗装であるが、今回は塗装を施した。シール部は毎年多量のムラサキガイが付着していたが、塗装後は一部を残すのみとなり大幅に減少した。時系列的には、4.1ヶ月目(4月)の観察ではシール部に近接したプロペラ側(無防汚)に多くのカンザシゴカイの付着が見られたがシール部においては塗装の剥離が発生していたが、付着は見られなかった。8ヶ月目(7月)の観察では船尾シール側に若干であるがカンザシゴカイ、フジツボが付着していた。10ヶ月目(9月)ではシール側にカンザシゴカイ、フジツボ、ムラサキガイが付着していた。

## 7) まとめ

商船では省エネルギーの観点から生物の付着防止を行っているが、それでもドック時またUWC時に必ず付着していることを明らかにした。今後、付着防止の観点から船体の管理を実施するとすると厳しい管理が必要となる。

船体に付着する動物の種類では環形動物と節足動物が約90%を占め、この割合は船体外板とニッチ部では同程度である。また、船体にはフジツボ等の付着生物とそれらにヨコエビ、ワレカラなどが住みついており船舶によって移動される可能性が大きいことが分かった。付着時期では、主に国内で航行する望星丸では冬期でも付着することが分かった。特に6月頃に急激に進むと考えられる。最初に付着する部位は防汚がされていない、また塗装の剥離場所であることが分かった。この場所にフジツボ等が付着すると生物を誘引し、付着が助長することから早期に付着を発見し、付着があれば取り除くことが必要である。

船体の付着防止技術は大部分が塗装による。しかしながら、船体構造上および塗装メンテナンス方法の理由で塗装が完全とはならない部位があること、また運航の際に必ず塗装が衰耗・剥離する部分があることを明らかにした。その部位には、他の付着防止技術が必要であるが、今回、塗装が剥離・衰耗され易い部位に界面活性剤を注入し、付着防止効果があることを実証した。塗装による実験でも塗装は効果があることを実証した。しかしながら、流速の速い部位の塗装は剥げ易いことから下地との密着性が重要である。また、付着防止には生物の生活環を知る必要がある。例えば、フジツボのキプリウス幼生は浮遊して定着場所を探すが、その際に船体に定着させない対策が重要である。例えば停泊中に船体の周りに水流をつくることが一つの解決策である。

## 8) 総合的な海洋生物の船体付着防止管理手法の策定

海運による総合的な船体付着防止管理手法として、以下の①～④を提案する。

①塗装の管理を的確に行うことである。その管理内容は、船体には付着防止性能の良い塗装を施す、ドック間で塗装の消耗度を考慮して付着防止の目的から膜厚を決定する、ドックにおいて塗装が厳格に行われているのか確認する(計画通りの膜厚で隅ずみまで塗装されているか、船体のメンテナンスで塗装が剥げていないかを確認する。塗装後に十分な乾燥時間を持つことが必要)、塗装の上に塗装を重ねると塗装が剥げ易いことから、適当な間隔でサンドブラストをかけ古い塗装を落とす、船体構造ではエッジ部は丸みをつけ塗装の剥離を防止する、付着防止対策のとら

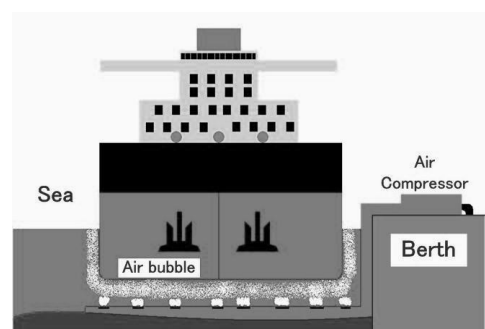


図5 Air bubbleによる付着防止

れていない部位に対して塗装を施す、運航時は適当な間隔で塗装の剥離・衰耗状況を点検する、船体の生物付着量を定量化して付着防止効果を評価する、などである。

②ニッチ部であるバウスラスタートンネル、ソナードーム内、シーチェスト、ロープガード内、舵上部の複雑な構造部および塗装ができない盤木部には界面活性剤を塗装と併用して利用する。

③停泊時に船体回りに水流をつくる。船においてはShort Navigationの実施、また、船底に流速を持たせることで生物が船底に付着するチャンスを阻止することができる。そこで船底に本船から、または港湾設備からAir Bubbleをあてることを提案する(図5参照)。

④定期的な塗装および付着状況のチェックと付着生物の除去を実施する。生物が一旦付着すると付着が助長されることから、早期に付着生物を発見し、除去すること。付着時期が早いのは塗装が施されていない部位、剥離部、衰耗部であるので、常日頃これらの部位を把握し重点的にチェックし対応する必要がある。

## (2) 「海運における国際物流に伴う生物フロー解析調査」

### 1) 豪州石炭積み出し港湾の最近の滞船状況

図6に示すとおり2007年12月以降、滞船は減少傾向にあったが、2009年5月以降から再びニューキャッスル港、ダーリンプルベイ港、グラッドストーン港での沖待ち船が増加しており、当分この状態が継続するものと考えられる。このことは、豪州石炭港湾における長期滞船が船体汚損に与える影響が今後も継続するであることを示唆しており、さらなる船体汚損防止対策の検討が必要であると考えられる。

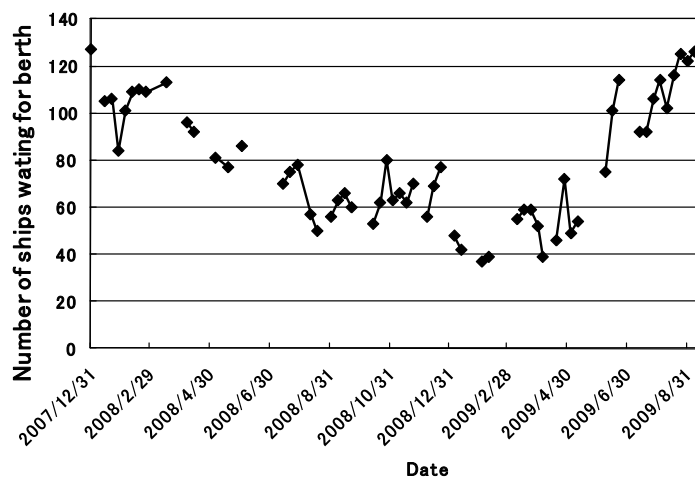


図6 豪州石炭積み出し港湾の滞船状況

### 2) 豪州航路就航の石炭船の船体付着状況

一般に船舶の船体付着は入渠後の経年日数と共に増加すると考えられている。しかしながら、船体付着は船舶が停止するとき、すなわち停泊状態にあるときに特に進行するものと考えられ、長期滞船が発生した場合には船速が著しく低下すると共に燃料消費率が増加することで問題になることが多い。そこで、豪州の石炭港湾に頻繁に寄港する石炭船の燃料消費率に着目し、滞船による船体付着を定量的に把握することを検討した。

船体汚損の進行状態を評価するため豪州航路の復航時における燃料消費量と速力に着目し、次式によりC値(単位時間燃料消費量係数)を計算し、各航海の船体汚損の比較を行った。

$$C = Fc / \{ V^3 \cdot \Delta^{2/3} \cdot t \}$$

表5 対象船の主要目

対象船	船長 (m)	船幅 (m)	深さ (m)	喫水 (m)
A	239.0	43.0	20.5	12.80
B	240.0	43.0	20.5	12.75
C	233.0	43.0	20.5	12.75



Fc : 燃料消費量 (M/T)      V : 対水速力 (Knot)    t : 航進時間 (Hour)      Δ : 排水量 (M/T)

解析対象石炭船 (A・B・C 船) の主要目は表 5 のとおりである。また、対象船の主要航路は、豪州航路で、一部インドネシア (カリマンタン島) 航路に就航している。

出渠後の各船の C 値の変化状態を図 7～図 9 に示す。図中のドックは入渠時期、丸印は SN 実施の航海を示す。各船共に、出渠後の航海数が増加するにつれて C 値が徐々に増加している。時々 C 値が大きく減少する場合があるが、これは UWC を実施した場合である。

図 10～図 12 に 3 船の C 値の増減比率と Short Navigation

(SN) の実施状況を示す。図中の破線の丸印が SN を実施した航海である。

A 船ではハイポイント港を除きニューキャッル港で 15 日以上長期停泊回数が 7 回あり、そのうち 2 回で SN を実施しているがいずれも C 値の増加比率は 1.2 以下であった。一方、SN をせずに長期滞船をしている場合、C 値の増加率 1.2 を超える場合が 1 回、1.4 を超える場合が 1 回あった。また、B 船では 15 日以上長期停泊回数が 8 回あり、そのうち 4 回で SN を実施し、1 回だけ 1.27 のケースがあり残りは 1.2 以下であった。C 船では 15 日以上長期停泊回数が 10 回あり、そのうち 6 回で SN を実施し、1 回だけ 1.2 を超えるケース (1.26) があった。これらの結果から SN を行った場合の C 値の増加率はほぼ 1.2 以下に収ま

っており、SN は大幅な C 値の増加率を抑制する面で効果があったものと考えられる。

3 隻の対象船の解析結果をまとめると以下の通りである。

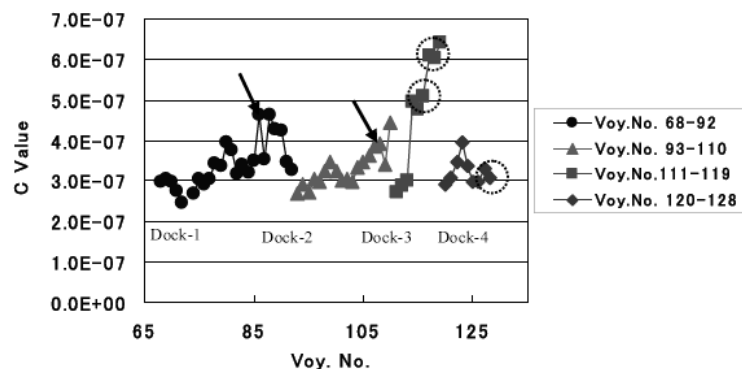


図7 A船のC値

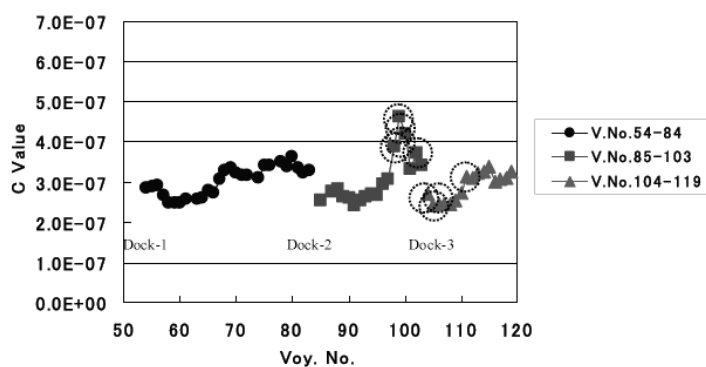


図8 B船のC値

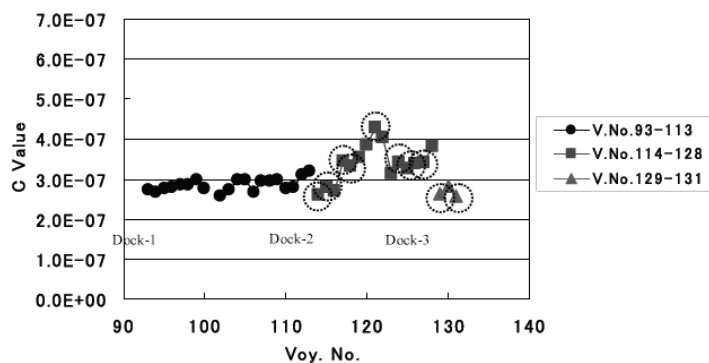


図9 C船のC値

- ・ほぼ同じ排水量の積載状態で、かつ海面が静穏状態のデータを抽出することでC値が船体汚損の進行度の尺度として採用可能であることが再確認された。
- ・長期滞船がない場合には出渠後、航海数が増加するにつれて徐々にC値が上昇し、入渠後再びほぼ当初の値に戻る。

- ・同一船で長期滞船がある場合と無い場合のC値の変化状況について累積停泊日数をベースで比較すると、前者が大きく長期滞船による船体汚損の進行具合が明瞭に確認できる。

- ・長期滞船に遭遇するとC値が増加し、前航に対するC値の増加率はおおむね1.2を超える。

- ・UWCを実施すると一時的にC値は減少するが、すぐに戻る傾向がある。長期滞船中に適当な間隔でShort Navigationを実施することは船体汚損防止上の効果がみられる。

- ・ニューキャッスル港はハイポイント港より船体汚損が進行し易いと考えられる。ただし、ニューキャッスル港とその他の港湾との比較は、長期滞船をしている港湾のデータが得られず評価できなかった。

- ・ニューキャッスル港では9月上旬(水温約18°)、港口に近い水域で長期滞船を行う場合に船体汚損が進みやすいものと推察される。

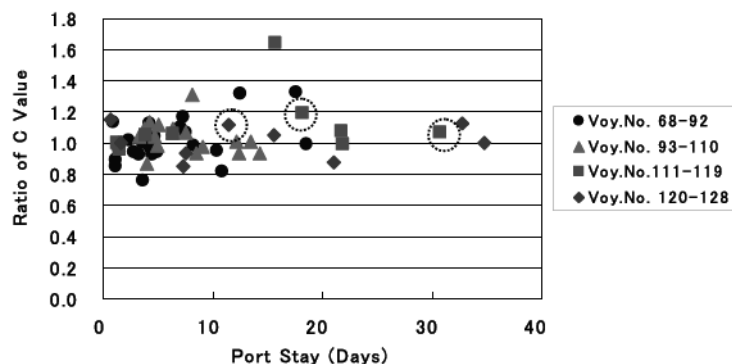


図10 C値の増減率 (A船)

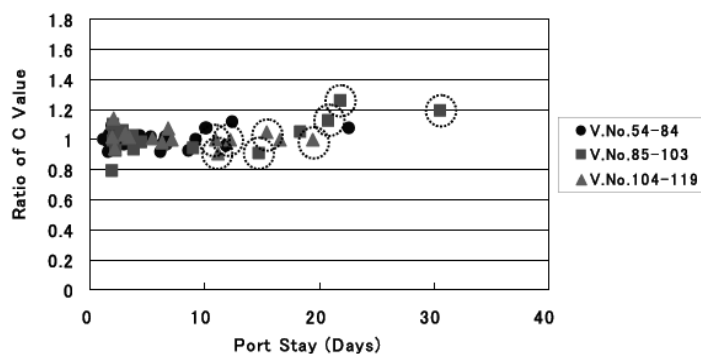


図11 C値の増減率 (B船)

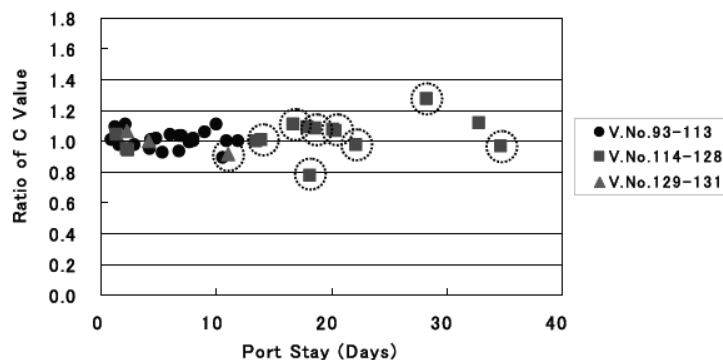


図12 C値の増減率 (C船)

### 3) 船種による停泊状況の違い

LNG船、コンテナ船及び石炭船の停泊状況について比較を行った。図13～図15に3船種の停泊状況の例を示す。各船種、共に状況によっては長期の停泊を余儀なくされることもあるが、その中で石炭船は、積荷港湾の施設の能力不足や寄港船の隻数の集中により長期停泊の頻度が特に多いことが明らかになった。最近では石炭船以外でも鉄鉱石運搬船が西豪州、ブラジル、インドの積荷港湾で長期滞船が問題となっている。

一般にLNG船は、長期輸送契約に基づき積荷港・揚荷港それぞれ1日の停泊で荷役を終了させる停泊期間の短い船種である。図13に示すLNG船の場合、フリー契約になった期間で2回の運航調整による長期停泊が発生している。

コンテナ船は、もともと荷役時間を短縮するというコンセプトで建造されている船種で複数のコンテナ船を同一航路に投入してサービスを行っている。したがって通常は、1港あたり1～2日の停泊期間で運航されている。しかしながら、ときたま配船ローテーションの変更や投入船の変更等の運航調整により長期滞船も発生することもある。

石炭船は、滞船がなければ揚荷港で4～5日、積荷港で2～3日の停泊で運航されるのが一般的であるが、これまでに報告したとおり積荷港（特に豪州）で10日をこえる長期滞船が頻繁に発生している。

#### 4) まとめ

海運における国際物流に伴う生物フローは、船舶の移動に大きく影響を受ける。国際貿易の進展に伴い船舶隻数が増加し移動域も拡大していることから生物フローは、ワ

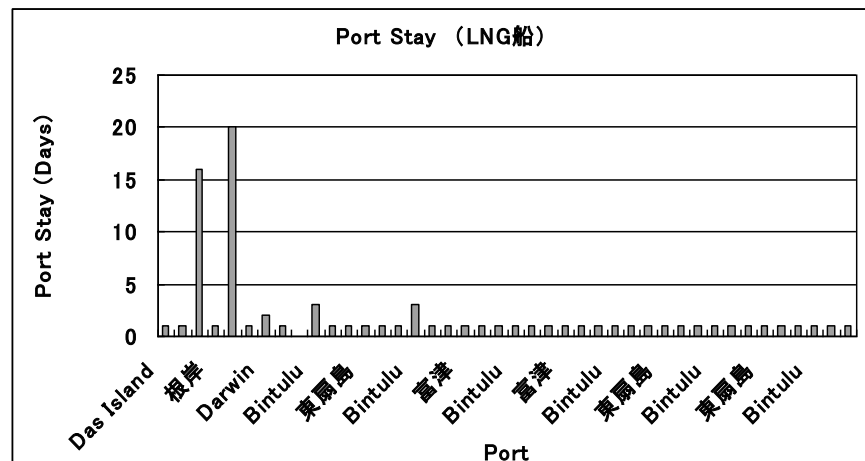


図13 LNG船の停泊状況（例）

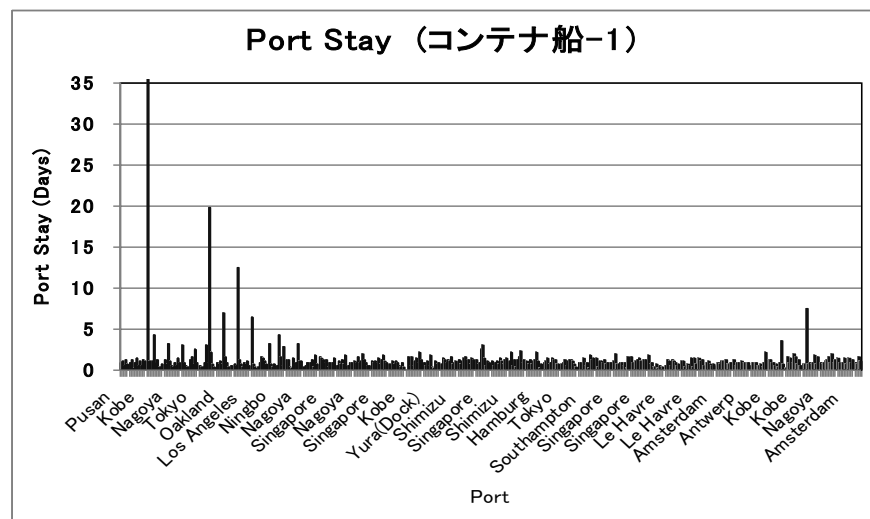


図14 コンテナ船の停泊状況（例）

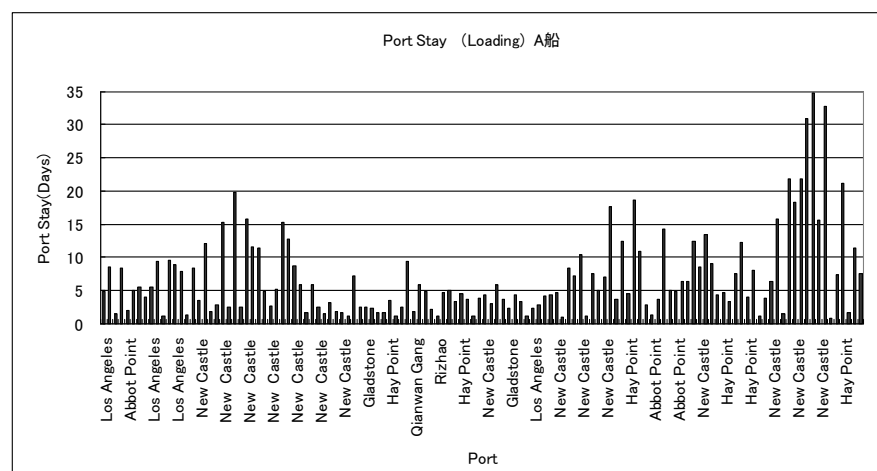


図15 石炭船の停泊状況（積荷港の例）

ワ

ールドワイドの視点で考える必要がある。中でも船舶の長期滞船は、船体付着を大幅に進行させ生物フローに大きな影響を及ぼすことが明らかになった。したがって、生物フローを極力抑えるためにはマクロ的見地からは長期滞船を発生させないような貿易形態を構築することや停泊を極力短縮するための港湾施設能力の拡充が重要かつ必要である。これは1国だけで解決できるものではなく、長期滞船の防止に向けて関係国間の協議・取り組みが必要であると考えられる。特に豪州の石炭積み出し港湾においては、積荷設備の機能向上と内陸輸送能力の向上が望まれる。また、ミクロ的には船舶の船体付着を防止する塗料やバブルによる付着防止法の開発、さらに長期滞船中に船体付着を極力防ぐ船舶運用（Short Navigation、錨地の選定等）の研究・実施が今後の課題であると考えられる。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

船体に付着し移動する生物の種類を調べ生物の移入・出を考える場合に対象とするべき生物種を明らかにした。即ち、船体に付着する動物の種類では環形動物と節足動物が約90%を占め、船体外板とニッチ部では同じような生物が同じような割合で付着していること、船体にはフジツボ等の付着生物とそれらにヨコエビ、ワレカラなどが棲息しており船舶によって移動されていることを明らかにした。

船体に付着し移動する生物のうち浮遊キプリスは20分程度で基盤に固着するという事実が分かった。このことから付着防止は幼生が船体に固着するチャンスをつくらないことであり、今後の付着防止技術の研究の方向を見出した。

豪州の主要石炭積出港において日本向けの石炭船について約3年～4年の周期で長期滞船が発生していることを確認した。最近、特にその滞船日数が長期化し問題となっている。石炭船の運航データの分析から15日以上長期停泊になると船体付着が急激に進行し、国際間の生物移動の原因になる可能性があることが分かった。また、特に長期滞船が激しい船種は石炭船、鉱石運搬船で、コンテナ船やLNG船等は停泊日数が少ないことがわかり、国際間の生物移動を研究する場合、対象船種や滞船の有無が重要な情報となることを明らかにした。さらに、長期滞船中に行う短期航海は、船体付着防止対策として効果があることを定量的に確認した。

生物移動の推定のための手法として遺伝子解析および分類学的解析等によるアプローチ（例えば神戸大の川井、千葉大の山口が実施）があるが、移動の原因の情報として、それらの研究にも貴重な情報を提供できたといえる。

### (2) 地球環境政策への貢献

海運により国境を越えて海洋生物が移動するのを防止するためには、マクロ的見地からは長期滞船を発生させないような貿易形態を構築することや停泊を極力短縮するための港湾施設能力の拡充が重要かつ必要である。これは1国だけで解決できるものではなく、長期滞船の防止に向けて関係国間の協議・取り組みが必要であると考えられる。特に豪州の石炭積み出し港湾においては、積荷設備の機能向上と内陸輸送能力の向上が望まれる。また、ミクロ的には船舶の船体付着を防止することであるが、港湾設備、船体構造、船体整備方法、塗装の限界を補完する付着防止技術を含め具体

的付着防止技術等から成る船体付着防止管理手法について提案した。このようにマクロの見地、ミクロの見地から海洋生物の移動を防止する総合的な海洋生物移動管理手法を提案した。

## 6. 引用文献

- 1) The correspondence group of sub-committee on bulk liquids and gases of IMO: Development of international measures for minimizing the transfer of invasive aquatic species through bio-fouling of ships, 28 November, 2008.
- 2) 秋田県立大学・細胞生物学講座・Web：「フジツボキプリウス幼生の接着剤」

## 7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 8. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 金子仁・津金正典・伊藤格.「界面活性剤による船体への海洋生物付着防止」日本航海学会論文集 121, 77-83. (2009)
- 2) Kaneko, H., Tsugane, M., Kimura, K. and Ito, K. Some consideration on preventing bio-fouling of ships from the fouling situation of Bousei Maru's hull. Proceeding of International Symposium on Ship Design and Construction 2009 –Environmentally Friendly Ship–, Resistance AF1 Section 1-7. (2009)

<その他誌上発表（査読あり）>

- 1) 津金正典・金子仁・伊藤格.「長期滞船が船体汚損に与える影響に関する研究」日本航海学会論文集, 121: 69-76. (2009)
- 2) 津金正典・金子仁・伊藤格.「長期滞船が船体汚損に与える影響に関する研究-II」日本航海学会論文集, 122: 227-233. (2010)

### (2) 口頭発表（学会）

- 1) 金子仁・津金正典・木村貢史. (2009)「船舶への海洋生物付着状況について」日本マリンエンジニアリング学会海洋環境研究委員会ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」函館湯ノ川花びしホテル. 2009年11月6日

### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

### (4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

### (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

### (6) その他

特に記載すべき事項はない。