

## 北海道沿岸における麻痺性貝毒原因生物 2 種の分布実態にもとづく名称変更の提案 (資料)

宮園 章<sup>\*1</sup>, 長井 敏<sup>2</sup>, 金 康司郎<sup>3</sup>, 正城利紀<sup>4</sup>, 北山安信<sup>5</sup>, 小林和馬<sup>5</sup>, 船木周平<sup>6</sup>, 佐野晃平<sup>7</sup>

<sup>1</sup>北海道立総合研究機構水産研究本部中央水産試験場, <sup>2</sup>水産研究教育機構水産技術研究所,  
<sup>3</sup>旧石狩地区水産技術普及指導所, <sup>4</sup>網走東部地区水産技術普及指導所,  
<sup>5</sup>釧路地区水産技術普及指導所, <sup>6</sup>旧日高地区水産技術普及指導所静内支所,  
<sup>7</sup>渡島地区水産技術普及指導所

Proposal for renaming based on the distribution of two species causing paralytic shellfish poisoning along the Hokkaido coast (note)

AKIRA MIYAZONO<sup>\*1</sup>, SATOSHI NAGAI<sup>2</sup>, KOJIRO KON<sup>3</sup>, TOSHIKI MASAKI<sup>4</sup>, YASUNOBU KITAYAMA<sup>5</sup>,  
KAZUMA KOBAYASHI<sup>5</sup>, SHUHEI FUNAKI<sup>6</sup> and KOHEI SANO<sup>7</sup>

- <sup>1</sup> Central Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, *Yoichi, Hokkaido, 046-8555*,  
<sup>2</sup> Fisheries Technology Institute (Yokohama Station), Japan Fisheries Research and Education Agency, *Yokohama, Kanagawa 236-8648*,  
<sup>3</sup> Formerly of Ishikari Fisheries Technical Guidance Office, Ishikari General Subprefectural Bureau, Hokkaido Government, *Atsuta, Hokkaido 061-3601*,  
<sup>4</sup> Abashiri-Toubu Fisheries Technical Guidance Office, Okhotuk General Subprefectural Bureau, Hokkaido Government, *Abashiri, Hokkaido 093-8585*,  
<sup>5</sup> Kushiro Fisheries Technical Guidance Office, Kushiro General Subprefectural Bureau, Hokkaido Government, *Akkeshi, Hokkaido 088-1118*,  
<sup>6</sup> Formerly of Shizunai Fisheries Technical Guidance Office, Hidaka General Subprefectural Bureau, Hokkaido Government, *Shizunai, Hokkaido 056-0005*,  
<sup>7</sup> Oshima Fisheries Technical Guidance Office, Oshima General Subprefectural Bureau, Hokkaido Government, *Hakodate, Hokkaido 041-8558, Japan*.

キーワード: *Alexandrium catenella* (Group I), *Alexandrium tamarense* species complex, *Alexandrium pacificum* (Group IV), 分子生物学的分類, LAMP法

北海道では麻痺性貝毒原因プランクトンモニタリングが1970年代後半から実施されている(宮園ら, 2020)。麻痺性貝毒の原因プランクトンは形態に基づく種判別が行われ、従来知見の整理・新たな発見によって分類学的見直しが行われてきた。*Alexandrium*属についても種名変更がたびたび行われてきた。*Alexandrium*属は当初*Gonyaulax*属だったが、*Protogonyaulax*属を経て*Alexandrium*属へと名称変更された。北海道に出現する種は形態的な分類体系に従い、腹孔の有無により*Alexandrium tamarense* species

complex (旧*A. tamarense*) と*Alexandrium tamarense* species complex (旧*A. catenella*) を区別して種の同定を行っている(宮園ら, 2020)。ところが、近年の分子生物学的分類体系による検討の結果、旧*A. tamarense*と旧*A. catenella*は*Alexandrium tamarense* species complexに属するものの、形態に基づく種判別が困難なため正確な種同定には遺伝子配列の情報が必要であると整理された(John *et al.*, 2014; Litaker *et al.*, 2018; 坂本, 2020)。夏池ら(2022)は函館湾と噴火湾における*A. pacificum* (Group IV) (旧*A.*

*catenella*) と *A. catenella* (Group I) (旧 *A. tamarensis*) の最近の出現状況をPCR検査によって明らかにし、当該海域での両種の出現時期には重複がないことを確認した。一方、北海道の貝毒原因プランクトンモニタリングでは形態学的分類体系に従った「旧 *A. tamarensis*」および「旧 *A. catenella*」の名称を使用しており、こうした新旧混在する名称の扱いが続くことは望ましくない (坂本, 2020)。そこで、北海道の貝毒原因プランクトンモニタリングにおける *Alexandrium tamarensis* species complex に属する2種の取り扱いを検討するために、函館湾と噴火湾を除くモニタリング海域において両種の出現状況を分子生物学的手法で把握したので報告する。

### 試料及び方法

**沿岸調査** 調査地点は貝毒プランクトンモニタリング地点のうち噴火湾海域を除く、旧 *A. tamarensis* が出現する海域の代表5地点である (図1)。日本海側にはこれまで *Alexandrium tamarensis* species complex は出現してこなかったが、2005年以降調査されている石狩湾の浜益では近年、旧 *A. catenella* の出現報告がある (2022年10月13日10 m層20 cells L<sup>-1</sup>, 2021年7月13日0, 10, 30 m層40-140 cells

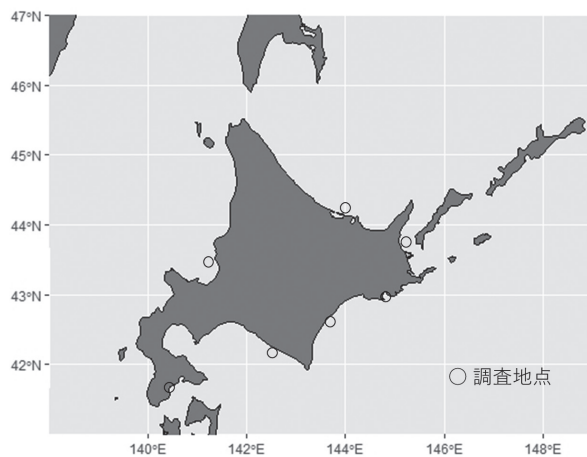


図1 調査地点。

L<sup>-1</sup>) ことから、調査地点に加えた。調査時期については表1に示した。担当指導所が貝毒プランクトンモニタリング時に各層採水サンプルを遮光ポリビンに各1 Lを採取し、クール宅急便にて北海道立総合研究機構中央水産試験場に送付した。太平洋中部海域については2022年に行われた十勝港における *Karenia* 調査で得たDNA分析用凍結フィルタサンプルのうち、旧 *A. tamarensis* が出現した6サンプルを使用した (表1)。

採取した海水約1 Lを実験室においてニュークリポアフィルター (φ47 mm, 目合5 μm, ワットマン) で濾過したのち、フィルターを折りたたみながら定性濾紙で水気を切り、フィルターに捕集された粒子を1.5 mLマイクロチューブに入れて-40 °C以下で凍結保存した。

125 °Cで加熱滅菌処理したハサミとピンセットを用いて凍結フィルターを裁断し、滅菌した2 mLマイクロチューブに入れた。これに5 % Chelex溶液250 μLを添加後、ベッスル (アズワン, ビオラモホジナイザーベッスル) をつけたハンディホモジナイザー (ニッピ, パワーマッシャー) で1分間ホモジナイズした。ベッスルに付着した液は250 μLの5 % Chelex溶液でチューブに洗い入れた。チューブをボルテクスミキサー (TAITEC, S-100) で攪拌し、ブロックヒーター (アズワン, MyBL-10) を用いて97 °Cで20分間加熱した。氷冷後、高速遠心 (11,000 rpm, 3 min) ののち、上澄み (DNA抽出液) を1.5 mLチューブに移し、次の分析まで凍結保存した。

今回適用した分子生物学的手法は従来の遺伝子増幅法に比べて簡易、迅速な増幅法として開発されたLAMP法である (牛久保, 2004)。LAMP法はLoop-mediated isothermal amplification methodの略記であり、①すべての反応が等温で進行する、②増幅効率が極めて高く大量の増幅産物を得ることができる、③極めて高い特異性を持つなどの特徴がある。また、本法では標的とするDNAの有無を定性的に検査することができるが、定量的な情報は得られない。DNAサンプルのうちLAMP法の分析に供したのは貝毒原因プランクトンモニタリングの検鏡作業によって旧 *Alexandrium tamarensis* が検出された試料で

表1 *Alexandrium tamarensis* species complexの分子生物学的検討のためのサンプリング計画

海区	場所	年	月	深さ (m)	サンプル数	採集機関
石狩湾	浜益	2023	7月~10月	0,10,20,30	16	石狩地区水産技術普及指導所
オホーツク海	常呂	2023	6月~7月	0,10,20,30	16	網走東部地区水産技術普及指導所
根室海峡	標津	2023	6月~7月	0,5,10,15	8	根室地区水指標津支所
太平洋東部	厚岸	2023	5月~8月	0,5,10,13	16	釧路地区水産技術普及指導所
太平洋中部	十勝港	2022	7月~9月	0 - 8	5	十勝地区水産技術普及指導所
太平洋西部	静内	2023	5月~6月	0,10,20,30	16	日高地区水指静内支所
津軽海峡	知内	2023	5月~8月	0,10,20	12	函館地区水産技術普及指導所

表2 貝毒原因プランクトンモニタリングで旧*Alexandrium tamarense*と同一とされたサンプルのLAMP法による種類同定結果

No.	海区	場所	採集月日	採集深度 (m)	細胞密度 (cells/L)	AC DNA	AP DNA	No.	海区	場所	採集月日	採集深度 (m)	細胞密度 (cells/L)	AC DNA	AP DNA
1	根室海峡	標津	2023/6/13	0	130	○	×	18	太平洋中部	十勝港	2022/9/5	0	600	○	×
2	根室海峡	標津	2023/6/13	5	70	○	×	19	太平洋西部	静内	2023/5/8	0	40	○	×
3	根室海峡	標津	2023/6/13	10	20	○	×	20	太平洋西部	静内	2023/5/22	0	1840	○	×
4	太平洋東部	厚岸	2023/5/25	0	250	○	×	21	太平洋西部	静内	2023/6/1	0	660	○	×
5	太平洋東部	厚岸	2023/5/25	5	240	○	×	22	太平洋西部	静内	2023/6/1	20	10	×	×
6	太平洋東部	厚岸	2023/5/25	10	210	○	×	23	太平洋西部	静内	2023/6/12	0	2500	○	×
7	太平洋東部	厚岸	2023/6/22	13	270	○	×	24	太平洋西部	静内	2023/6/12	10	930	○	×
8	太平洋東部	厚岸	2023/6/22	0	10	○	×	25	太平洋西部	静内	2023/6/12	20	100	○	×
9	太平洋東部	厚岸	2023/6/22	5	170	○	×	26	津軽海峡	知内	2023/5/16	0	10	○	×
10	太平洋東部	厚岸	2023/6/22	10	100	○	×	27	津軽海峡	知内	2023/5/16	10	30	○	×
11	太平洋東部	厚岸	2023/7/19	0	30	○	○	28	津軽海峡	知内	2023/5/16	20	10	○	×
12	太平洋東部	厚岸	2023/7/19	5	60	○	○	29	津軽海峡	知内	2023/6/1	0	430	○	×
13	太平洋東部	厚岸	2023/7/19	10	20	○	×	30	津軽海峡	知内	2023/6/1	10	120	○	○
14	太平洋中部	十勝港	2022/7/21	0	21900	○	○	31	オホーツク海	常呂	2023/6/5	10	10	○	×
15	太平洋中部	十勝港	2022/7/27	0	200	○	○	32	オホーツク海	常呂	2023/6/5	20	10	○	×
16	太平洋中部	十勝港	2022/8/5	0	300	○	×	33	オホーツク海	常呂	2023/6/20	10	10	○	×
17	太平洋中部	十勝港	2022/8/31	0	200	○	×								

ある(表2)。33サンプルについて、Nagai (2013) の報告と同じプライマーを用いて、LAMP法による*A. catenella* (Group I) と*A. pacificum* (Group IV) の検出を行った。分析は*A. catenella* (Group I) シリーズと*A. pacificum* (Group IV) シリーズで別々に行った。以下の操作は試薬類、サンプルをクラッシュアイスで冷却した環境下で行った。

反応液MIXの調整：DNA増幅キット(共栄化学, Loopamp)と6種類のプライマー(業者作成：50 μMから適宜希釈)および蛍光・目視検出試薬(共栄化学, Loopamp)を表3に示す容量で1.5 mLマイクロチューブにとり、ボルテックスミキサーで攪拌ののち高速小型遠心機(アズワン, Mini Centrifuge)で1秒処理した。今回は40サンプル分をまとめて作成した。プライマーの希釈は環境からの汚染を最小限にするため、クリーンベンチ内で行い、希釈にはオートクレーブ滅菌したミリQ水を使用した。

分析するDNAサンプルとネガティブコントロール(dH<sub>2</sub>O)、ポジティブコントロール(*A. catenella* (Group I), *A. pacificum* (Group IV) の培養株から作成したDNAサン

プル)を用意したのち、蓋付8連マイクロチューブ(容量0.2 mL)にLAMP反応液MIX 23 μLを分注した。そこに、分析サンプル2 μLを加え、残りのチューブにネガティブコントロール、ポジティブコントロールをそれぞれ2 μL加えた。8連チューブの蓋をしっかりと閉じて、前述同様の攪拌と1秒間の遠心処理ののち、62 °Cで1時間反応させた。

陽性反応では溶液が緑色に発色するため、反応後のチューブの写真を撮影し、結果を記録した。

### 結果

結果は表2と図2に示した。*A. catenella* (Group I) はNo. 22を除くサンプルで検出された。このことは北海道における旧*A. tamarense*はほとんどが*A. catenella* (Group I) であることを示している。他方、*A. pacificum* (Group IV) はNo. 11, 12, 14, 15, 30で検出された。No. 11, 12は厚岸湾の

表3 LAMP法の反応混合液を作成するための試薬の混合量

reagent	×1 sample (μL)	×10 samples (μL)	備考
2X Reaction mix	12.5	125	Loopamp：市販のキット試薬
FIP primer (40μM)	1	10	希釈 from 50μM to 40 μM
BIP primer (40μM)	1	10	希釈 from 50μM to 40 μM
F3 primer (5μM)	1	10	希釈 from 50μM to 5 μM
B3 primer (5μM)	1	10	希釈 from 50μM to 5 μM
Loop primer-F (20μM)	1	10	希釈 from 50μM to 20 μM
Loop primer-R (20μM)	1	10	希釈 from 50μM to 20 μM
BST DNA Polymerase	1	10	Loopamp：市販のキット試薬
Fluorescent reagent	1	10	市販の試薬
dH <sub>2</sub> O	2.5	25	Loopamp：市販のキット試薬
LAMP reaction mix	23	230	

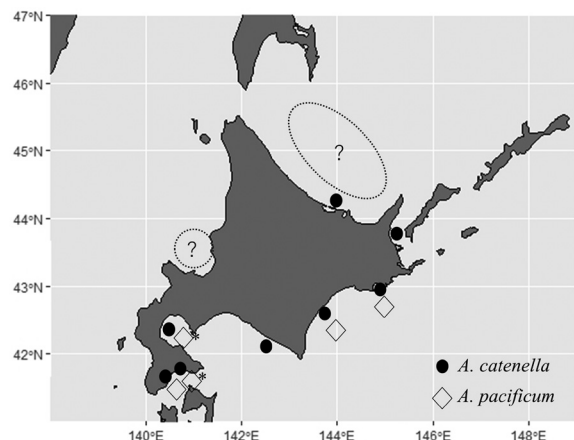


図2 LAMP法による*A. catenella* (Group I) と*A. pacificum* (Group IV) の出現状況。\*は夏池ら(2022)から引用。「?」は今後の要調査エリアを示す。

7月19日水深0 m, 5 mのサンプルであり, 同日の水深10 mのサンプル (No.13) からは検出されなかった。No.14, 15は十勝港の7月21, 27日のサンプルである。No.30は知内の6月1日水深10 mのサンプルであった。夏池ら (2022) によれば, 噴火湾には*A. catenella* (Group I) が主に春に出現し, 高水温年の秋には*A. pacificum* (Group IV) が出現することがある。また, 函館湾には*A. pacificum* (Group IV) と*A. catenella* (Group I) が出現し, 両種の出現時期は重複しないことを報告している。しかし, 太平洋東部の厚岸, 太平洋中部の十勝港および津軽海峡の知内では両種が同時かつ同所的に出現することがあることが明らかとなった。

これらの結果を踏まえると, 北海道の貝毒プランクトンモニタリングにおいては道東, 津軽海峡における「旧*A. tamarensis*」という扱いは誤りであることになる。他方, オホーツク海に*A. catenella* (Group I) が出現しなかったことについては沿岸の宗谷暖流域よりも沖合における分布状況を確認する必要がある。また, 日本海側に出現する旧*A. catenella* (Group I) の確認ができていないなどの課題が残った。

以上の結果から, 令和7 (2025) 年度の以降の貝毒原因プランクトンモニタリングにおいては, 従前の名称である「旧*A. tamarensis*」を「Atsc : *Alexandrium tamarensis* species complex」に変更することを提案したい。

## 文 献

- John U, Litaker RW, Montresor M, Murray S, Brosnahan ML, Anderson DM. Formal revision of the *Alexandrium tamarensis* species complex (Dinophyceae) taxonomy: The introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. *Protist* 2014 ; 165 : 779-804.
- Litaker RW, Fraga S, Montresor M, Brosnahan ML, Anderson DM, Hoppenrath M, Murray S, Wolny J, John U, Sampedro N, *et al.*. A practical guide to new nomenclature for species within the “*Alexandrium tamarensis* species complex”. *Harmful Algae News* 2018 ; 61 : 13-15.
- 宮園 章, 嶋田 宏, 品田晃良, 夏池真史. 北海道海域における麻痺性貝毒原因プランクトン発生と二枚貝毒化. *月刊海洋* 2020 ; 52 : 165-170.
- Nagai Satoshi. Species specific detection of six *Alexandrium* species from single vegetative cells by a loop-mediated isothermal amplification method. *DNA Testing* 2013 ; 5 : 33-46.
- 夏池真史, 金森誠, 前田高志, 嶋田宏, 坂本節子. 函館湾および噴火湾における有毒渦鞭毛藻*Alexandrium pacificum*および*A. catenella* (Group I)の2018年から2020年の出現状況. *日本プランクトン学会報* 2022;69(1):1-10.
- 坂本節子. *Alexandrium*属における分類と種名変更の現状と課題. *月刊海洋*2020 ; 52 : 200-204.
- 牛久保宏. LAMP法の原理－遺伝子の簡易・迅速な増幅法－. *ウイルス* 2004 ; 54(1) : 107-112.