３）有害赤潮プランクトンのモニタリング技術の開発・実証および普及とデータ利活用の促進
ア．モニタリング技術の開発・実証

水産研究・教育機構水産技術研究所
坂本節子，外丸裕司
広島大学
小池一彦，小原静夏

1　全体計画

（1）目的

日本沿岸では，これまで赤潮の形成や漁業被害が報告されていなかった新奇有害プランクトンによる漁業被害が発生しており，このようなプランクトンの中には渦鞭毛藻 *Karenia digitata* のように，不定期に発生して漁業被害の原因となってきた種も存在する。しかし，その分布や生態，発生環境，増殖生理特性，毒性などの発生予察の基盤となる情報はほとんど蓄積されていない。その要因として，1) 細胞形態による種同定が難しくモニタリングが困難，2) 発生が不定期であり継続性がないため十分な調査研究がなされていない，3) 原因種の培養株確立や維持が困難で安定した培養条件が把握できていない，など複数の要因が挙げられる。本課題では，*K. digitata* を含む新奇有害プランクトンの分布や生態を把握し，発生リスクを評価する。また，難培養の有害プランクトンについて培養株を確立し，安定して維持培養するための培養条件を明らかにするとともに，安定した培養株が確立できれば基本的な増殖生理特性を室内培養実験で把握し，発生予察に必要な基盤的情報を蓄積する。種同定が困難な種については DNA を標的とした分子検出・同定手法を確立・導入する。

また，分子同定手法の一つである Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法については，有害赤潮原因藻 *Karenia mikimotoi* および *Chattonella* 属の検出試薬がキット化され，赤潮モニタリングにおける種判別や低密度時の検出に活用されつつあるが，この技術をさらに生産者レベルまで普及するためには作業の簡便化や細胞密度レベルの判定技術の開発など，改良が必要である。そこで，本課題では既存の LAMP 法を用いた現場実証試験等を通して検出技術の現場普及に向けた問題点を抽出し，技術改良点を整理する。

2 令和２年度計画及び結果

(1) 目的

全体計画と同じ

(2) 方法

1) 新奇有害プランクトンに関する情報収集（水産技術研，広島大）

過去に日本や中国で繰り返し漁業被害の原因となっているものの，生態や増殖生理特性が分かっていない渦鞭毛藻類 *K. digitata* の生態を解明するため，2015 年より本種が繰り返し発生している福山沿岸を中心として下記の調査を実施した。

①−１ 広島県東部海域（2020 年 1〜12 月，月 1 回）

広島県福山市沿岸に位置する田島漁港および田尻漁港の 2 定点（図 1b）において月 1 回の海洋調査を実施した。本海域における調査は 2018 年 4 月から月 1 回，継続的に実施しているが本報告書では 2020 年 1〜12 月の調査結果を中心に報告する。各定点において，多項目水質計（DS5, Hydrolab または ASTD687, JFE アドバンテック）を用いた水温，塩分，クロロフィル *a* 蛍光値の鉛直的な測定に加え，水深 1 m から bottom-1 m（B-1 m）までを 2 m おきに採水した。採水した試水は，オートアナライザー（SWAAT，BLTEC）による溶存態無機栄養塩濃度（DIN: NO_3+NO_2+NH_4-N, PO_4-P, SiO_2-Si）の測定，*K. digitata* を含む植物プランクトン種または属ごとの細胞数計数を行った。また水深 1，3，5，B-1 m の試水を用いて定量 PCR 法を用いた *K. digitata* の検出を以下の手順で実施した。採水した海水をメンブレンフィルターでろ過してプランクトンを回収した。このときにろ過量は 2020 年 1〜3 月は 100 mL，4〜12 月は 500 mL で，メンブレンフィルターは 2020 年 1〜3 月は目合い 5 μm，4〜12 月は目合い 3 μm のものを使用した。フィルター試料は分析するまでの間，マイクロチューブに入れて-20℃で凍結保存した。フィルター試料に 200 μL の 5% Chelex PBS を添加し，ペッスルホモジナイザーでホモジナイズした。これを 15 分間加熱抽出し，抽出液を遠心分離（10,000 rpm, 1 min）して得られた上清を DNA 粗抽出液とした。定量 PCR には StepOne または StepOnePlus（Thermo Fisher Science）と TaqMan Gene Expression Master Mix（Thermo Fisher Science）を用い，通常のプロトコルに従い反応液を調製した。反応液中のプライマーおよびプローブの終濃度はそれぞれ 0.9 μM および 0.25 μM とした。プライマーおよびプローブは下記の配列で作製した：プライマー Kdi-LSU-MGBF: 5’-TCTGGTCGCAGTGCTCTCA-3’，Kdi-LSU-MGBR: 5’-ACCATTTTGTCATCGTACTTATGTCA-3’，プローブ Kdi-LSU-MGBP: 5’-CCTCGGCTCYTCCT-3’。プローブは 5’末端に FAM を標識した Taq-Man MGB プローブとした。PCR 反応はプレヒート 95 ℃-10 min の後，95 ℃-15 sec と 60 ℃-1 min の PCR 反応を 40 サイクルとし，60 ℃反応の間に蛍光値を測定した。検量線には *K. digitata* の rDNA LSU D1-D2 領域を増幅し，精製した PCR 産物から調製した既知 DNA 濃度標品（2×10^1〜2×10^7 copies μL^{-1} の間の 4 段階）を用いた。DNA 濃度から細胞数への換算は，昨年度の検討結果で得られた *K. digitata* 1 細胞当たりの推定コピー数 5,500 copies $cell^{-1}$（坂本ら 2019）を用いて算出した。

なお，地図およびグラフの作成には Ocean Data View を使用した（Schlitzer 2018）。

①-2 広島湾西部海域（広島湾）および山口県油谷湾（2020 年 1〜12 月，月 1 回）

福山沿岸との比較対照海域として広島湾の 1 定点と山口県油谷湾の 1 定点にて 2020 年 1〜12 月まで月 1 回の海洋観測を実施した（図 1a）。本海域における調査も昨年度から継続的に実施しているが，本報告書では 2020 年 1〜12 月の調査結果を中心に報告する。広島湾ではバケツによる表層（0 m）採水，およびニスキン採水器による 2 m, B-1 m，油谷湾ではバケツによる表層（0 m）採水のみを行い，*K. digitata* の細胞数計数および定量 PCR 法を用いた *K. digitata* の検出を前述の方法に従い実施した。なお，定量 PCR のための海水ろ過量は油谷湾，広島湾ともに 500 mL とし，フィルターの目合いは 3 μm で実施した。

また，油谷湾の 4 月の海水試料については目合い 3 μm フィルターで海水 500 mL をろ過した後，ろ液全量を目合い 0.2 μm フィルターでろ過し，0.2〜3 μm 画分の粒子についても定量 PCR 分析することにより，*K. digitata* が 3 μm の目合いを通過するか検討した。5 月以降は海

水 500 mL を直接目合い 0.2 μm フィルターでろ過した試料について分析した。さらに，海水ろ過量を 1 L に増やすことによる検出感度への影響についても比較検討した。

②瀬戸内海広域調査（2020 年 10 月）

過去に広島県東部海域で *K. digitata* が高密度で出現した 10 月に瀬戸内海中央部から東部にかけて広域調査を行った。調査は 2020 年 10 月 21〜23 日に図 1c に示した 8 定点（St. 1〜8）にて実施した。定点は広島県竹原市沖から大阪湾西部にかけて本州沿岸を網羅的に観測できるように，かつ 1 級河川がある海域では河口近くに定点を設定した。各点において表層水をバケツで採取し，船上にて光学顕微鏡下で試料 1 mL を検鏡し *K. digitata* の有無を確認した。また定量 PCR 法を用いた *K. digitata* の検出を前述のとおり実施した。なお, ろ過量は 500 mL, メンブレンフィルターの目合いは 3 μm のものを使用した。

2) 渦鞭毛藻類 *Alexandrium leei* の簡易分子同定手法の検討（水産技術研）

2017 年 4 月に高知県浦ノ内湾で *A. leei* の赤潮が発生し，漁業被害が発生した。本種は魚毒性を持つことが知られており，日本における赤潮の発生はまれであるものの，東南アジアで広く分布して，漁業被害の報告も複数ある。日本では天草や沖縄で本種の出現は確認されているが，その分布域はほとんどわかっていない。本種の種同定は細胞の鎧版の配列とその形態により行われるが，正確な種同定には知識や経験が必要であり，発生時に，より簡便な方法で本種の同定・確認ができることが望まれる。また，分布域を明らかにすることができれば本種の潜在的な発生リスクを把握できる。そこで，今年度は LAMP 法を用いた本種の簡易遺伝子検査法を検討し，発生時の種名確定診断に活用できる体制を整備した。

Shikata et al. (2020)において報告されている高知県野見湾産 *A. leei* （Al_KOCHI 株）の rDNA LSU D1-D2 領域の配列（Accession No. LC474142）を基に本種に特異的な配列を抽出し，Primer Explorer Ver.5（FUJIITSU Solutions）を用いてループプライマーを含む 6 本の LAMP 法プライマーを設計，作製した。次に，作製したプライマーを用いて LAMP 法による検出の至適反応温度や反応時間を検討した。また，検出の種特異性を確認するため，*Alexandrium* 属を中心とした他種渦鞭毛藻の DNA 粗抽出液を調製し，作製したプライマーでの反応の有無を確認した。これらの検討には 5% Chelex PBS 加熱抽出法で抽出した DNA 粗抽出液を用いた。すなわち，集藻したプランクトン試料に 5% Chelex PBS を添加，ペレットペッスルによる細胞破砕後，加熱抽出（97℃, 10 分），遠心分離（10,000 rpm, 1 分）により得られた上清を分析に用いた。また，分析にはリアルタイム濁度検出器（Loopamp LA-200，栄研化学）および Loopamp DNA 増幅試薬キット（栄研化学）を用いた。ポジティブコントロールとして *A. leei* の rDNA LSU D1-D2 領域を増幅し，精製した PCR 産物を調製した。測定した DNA 濃度と分子量から DNA コピー数を算出し，既知コピー濃度のポジティブコントロール標品を作製した。

(3) 結果及び考察

1) 新奇有害プランクトンに関する情報収集（水産技術研，広島大）

①−1 月例港調査：広島県東部海域（2020 年 1〜12 月，月 1 回）

2020 年 1〜12 月の調査期間中，光学顕微鏡下での試水 1 mL 検鏡では *K. digitata* の細胞を確認できなかった。定量 PCR 法によって得られた試水 100 または 500 mL 中の本種細胞密度

を 1 L 中に換算した結果を図 2 に示した。2020 年 1〜9 月までは両定点で本種は検出されなかった一方で，10〜12 月は両点ともに *K. digitata* が検出された。細胞密度は 0.49〜13.14 cells L^{-1}（平均 5.48 cells L^{-1}）と通常の 1 mL 検鏡では確認できないほどに低密度であった。最大細胞密度は 10 月田島港の水深 3 m で，10・11 月は同程度，12 月には大きく減少した。

2018，2019 年には LAMP 法によって本種の検出を実施し，初夏（6〜7 月）と秋・冬（9〜翌 1 月）に本種が検出されている。2020 年は初夏に本種は検出されなかったが，そもそも 2018，2019 年ともに初夏で検出された際には水柱全体ではなく，底層でのみ検出されていることから，本海域において *K. digitata* は初夏には小規模に，秋には時として高密度に出現する傾向があることが示唆された。またこれまでの調査結果から，本海域において *K. digitata* は初夏と秋に出現することが明らかになったが，それ以外の時期にぱったりと出現しなくなる空白の期間がある。繰り返し発生がみられることからシストの存在が疑われる。そこで，本年度は試験的に 2020 年 4〜9 月までの両港の泥試料を用いて，最確数（MPN）法による発芽可能なシストの検出を試みたが，いずれも本種は検出されなかった。発生の空白期間，本種はシストによって生残するのか，また別の方法によって生き残るのかについては，引き続き来年度以降の課題とした。

また，調査期間中の田島漁港，田尻漁港の水温，塩分，クロロフィル *a* 蛍光値，溶存態無機栄養塩濃度（DIN，PO_4-P，SiO_2-Si）の鉛直プロファイルを図 3 に示した。6 月は調査機器の故障によって，水温，塩分，クロロフィル *a* 蛍光値の 3 項目は観測できなかった。水温は 10.2〜31.3 ℃で推移し，両港ともに 2 月で最も低く，8 月で最も高かった。塩分はどちらの港でも 5 月から 7 月にかけて低下し 7 月に最低値を記録し，その後 12 月にかけて徐々に上昇した。また水深が浅く近くに芦田川（図 1b）の河口が位置する田尻漁港でより低塩分であった。クロロフィル *a* 蛍光値は両港ともに低塩分であった 7 月に高い傾向があり，田尻漁港では 5〜8 月の表層で特に高い値を示した。相対的に田尻漁港の方が田島漁港よりも年間を通して値が高く，植物プランクトンが高密度に出現していた。溶存態無機栄養塩濃度（DIN, PO_4-P, SiO_2-Si）のうち，DIN は 11 月に，PO_4-P は 8，11 月に，SiO_2-Si は 7，8 月に高濃度であった一方で，1〜7 月は DIN と PO_4-P が，1〜3 月には SiO_2-Si が低濃度であった。

次に，定量 PCR 法による *K. digitata* の検出結果（図 2）と水質環境の結果（図 3）を比較した。*K. digitata* は水温 11.4〜21.1 ℃の間で検出された。2018，2019 年は 12.0〜26.7 ℃で検出されており，本種は 27 ℃を超える高水温下や 11 ℃を下回るような低水温下では出現しにくいことが示唆された。また本種は塩分 30.2〜32.0 で検出された。2018，2019 年は 29.6〜32.7 で検出されており，これまでの出現塩分帯と一致した。さらにクロロフィル *a* 蛍光値と本種の検出結果を比較すると，田島漁港ではクロロフィル *a* 蛍光値が 1.23〜5.51 µg L^{-1}，田尻漁港では 1.56〜27.39 µg L^{-1} と，クロロフィル *a* 蛍光値が低いときにも高いときにも本種は検出された。これは 2018，2019 年の結果と一致する。また栄養塩濃度と *K. digitata* の検出結果を比較すると，両港ともに本種が検出された 10〜12 月は 1 年の中で比較的 DIN と PO_4-P が高かった。本海域においてこれまで赤潮の形成と漁業被害が報告されているのは 10〜11 月であり（Yang et al. 2000，岩野 2017），2018，2019 年もこの時期に本種が検出されていることから，比較的栄養塩が豊富な時期に多く出現している可能性はあると考えられる。また図 4 は珪藻類と非珪藻類（渦鞭毛藻類，ラフィド藻類，珪質鞭毛藻類）の鉛直分布を示している。*K. digitata* が検出された 10〜12 月に特に多く出現していた他の植物プランクトンは，珪藻類 *Skeletonema*

属，*Pseudo-nitzschia* 属，*Chaetoceros* 属，渦鞭毛藻類 *Akashiwo sanguinea* であった。ただし，これらの種が高密度に出現している場合だけでなく，植物プランクトンが低密度な場合（10月の田島漁港）にも *K. digitata* が同程度に検出されており，*K. digitata* と他の植物プランクトンとの関係については明確な考察が得られなかった。

①-2 月例港調査：山口県油谷湾および広島湾

調査期間中，光学顕微鏡下での試水 1 mL 検鏡では全試料で *K. digitata* を確認できなかった。定量 PCR 分析によって得られた油谷湾および広島湾の *K. digitata* 細胞密度の季節変動を図 5 に示す。本種は，油谷湾では 4〜5 月および 11〜12 月に発生が認められた。細胞密度は 3.6〜113 cells L^{-1} で，最高細胞密度は 12 月であった。また，広島湾では 11〜12 月の 2 m および B-1 m 層で 2.8〜8.9 cells L^{-1} の極低密度の *K. digitata* の発生が認められた。2019 年の調査では，油谷湾における *K. digitata* の発生は 6〜8 月にのみ観察されたが，今年度は 4〜5 月と 11〜12 月の 2 回発生が認められ，昨年と発生時期が異なった。山口県長門市沿岸では 2015 年には 6 月に本種の赤潮が発生しており，2018 年には 12 月に本種の赤潮が発生している。本調査の結果からも春から初夏および秋季から初冬にかけて本種の発生を警戒する必要があることが示された。

一方，広島湾では 2018 年および 2019 年には 10〜11 月に本種が検出されており，2020 年もほぼ同期間の 11〜12 月に本種が検出されたことから，本種は周期的，季節的に発生していることが明らかとなった。

本年度の油谷湾の調査では *K. digitata* の定量 PCR 実施における海水ろ過量およびフィルター目合いの検出への影響についても検討した。まず，4 月の海水試料で 500 mL を目合い 3 μm のフィルターでろ過後，ろ液全量を目合い 0.2 μm のフィルターでろ過し，それぞれのフィルターに回収された粒子中の *K. digitata* を定量した。0.2〜3μm 画分では全体量の 2.8%の本種 DNA が検出されたが，ほとんどの細胞は 3 μm で捕集できていると考えられた。次に海水ろ過量を 1 L に増やした場合，およびろ過量は 500 mL でフィルター目合いを 0.2 μm にした場合について，比較検討した。結果を図 6 に示す。フィルター目合い 3 μm で海水ろ過量を 500 mL から 1 L にした場合は，500 mL では検出できなかった 9〜10 月にも極低密度（6.0〜6.5 cells L^{-1}）の *K. digitata* が検出できた。しかしながら，比較的高密度に発生していた 12 月の試料ではろ過量を 1 L にしたときの方が, 500 mL で実施した時よりも検出細胞密度は減少した。フィルター目合い 0.2 μm でろ過した場合は，1 試料で検出感度が上がったものの，それ以外ではフィルター目合い 3 μm の場合に比べて検出感度が大幅に減少した（10〜40%）。本結果から，ろ過量を増やすことにより検出感度が上がる可能性がある一方，比較的細胞密度がある試料を過小評価する可能性があることから 500 mL 程度で十分と判断されること，フィルターの目合いは小さくすることで回収率が上がる場合もあるが，細胞へのダメージを抑えることが難しく，逆に検出感度を下げることになる可能性があり，ことが分かった。

②瀬戸内海広域調査（2020 年 10 月）

光学顕微鏡下での試水 1 mL 検鏡では全点で *K. digitata* を確認できなかった。定量 PCR 法によって得られた試水 500 mL 中の本種細胞密度を 1 L 中に換算した結果を図 7 に示した。定量 PCR 法では 8 定点すべてで本種が検出され，1.37〜182.86 cells L^{-1} であった。最も細胞密度

が低かったのは St. 1 の広島県竹原市沖，最も細胞密度が高かったのは一級河川揖保川の河口近くに設定した St. 6（兵庫県姫路市沖）であった。月 1 回の調査を実施した広島県福山市田尻港に近い定点 St. 2 では 59.40 cells L^{-1} と同時期の田尻港（2.59～10.94 cells L^{-1}）よりも高密度に出現していた。なお，採水した表層水の水温は 22.0～23.2 ℃であった。本種の細胞密度は定点間の細胞密度の差が最大で 100 倍以上異なった。このような調査点による違いをもたらした要因は不明であるものの，これまで調査してきた広島県沿岸だけでなく瀬戸内海中央部から東部にかけた広い範囲でこの時期（10 月）に本種が低密度ながら出現していることが明らかになった。

以上の調査結果から，*Karenia digitata* の発生時期が主に秋季から初冬であること，海域によっては春から初夏にも発生が認められること，秋季には瀬戸内海のかなり広域で分布が認められること，夏季および冬季に検出限界以下となる時期があることが明らかとなった。また，発生時の環境としては水温 11.4～26.7 ℃，塩分 29.6～32.7 で認められること，および比較的栄養塩が豊富な時期に多く出現している可能性が示された。一方，今後の課題として，本種が同じ海域で周期的に発生するためのシードポピュレーションの由来，シスト存在の有無，および本種の大規模発生につながる環境要因については残されており，さらなる調査が必要である。

2) 渦鞭毛藻類 *Alexandrium leei* の簡易分子同定手法の検討（水産技術研）

表 1 に rDNA LSU D1-D2 領域に設計した *A. leei* の LAMP 法プライマー配列を示す。設計，作製したプライマーおよび精製した *A. leei* の rDNA LSU D1-D2 領域の PCR 産物（2×10^5 copies μL^{-1}）を用いて LAMP 法の反応至適温度を調べた結果，至適温度は 62℃であった（図 8）。この時の検出時間は 24.4 分であった。次に，*A. leei*（Al_KOCHI 株）の細胞抽出液（0.002, 0.02, 0.2, 2, 10, 100, 1000 cells 200 μL^{-1} 抽出液），および DNA コピー濃度既知の PCR 産物（2×10^1～2×10^6 copies μL^{-1} の間の 6 段階の濃度）を用いて検出限界を調べた。その結果，細胞抽出液では 0.2 cells 200 μL^{-1} 以上（1 細胞を 1 mL の溶媒で抽出した場合に相当），精製 PCR 産物では 2×10^4 copies μL^{-1} 以上で確実かつ安定して検出できることを確認した（図 9）。次に，検出の種特異性について確認した結果を表 2 に示す。作製したプライマーでは *A. leei*（2 株）を検出し，日本沿岸で広く発生している *Alexandrium catenella* や *A. pacificum* を含む近縁 5 種の *Alexandrium* および *Pyrodinium bahamense* や *K. mikimotoi* など 4 種の有害渦鞭毛藻では遺伝子の増幅反応がみられなかったことから，*A. leei* を種特異的に検出できていると判断した。以上の結果から，LAMP 法を用いて *A. leei* を種特異的かつ高感度，短時間に検出する手法を確立できた。

Alexandrium leei は rDNA の分子系統解析結果から日本を含む東アジアタイプとシンガポール・マレーシア沿岸に出現している東南アジアタイプ，および南シナ海に発生しているタイプの 3 つのグループに分けられる(Shikata et al. 2020)。このうち東アジアタイプと東南アジアタイプの配列は最も近縁となる。本研究で設計した LAMP 法プライマーは日本沿岸で分離された東アジアタイプの遺伝子配列を標的として設計され，プライマー上には東南アジアタイプの配列との間にある変異が計 3 塩基含まれている（表 1）。本プライマーでは東アジアと東南アジアの両タイプの *A. leei* を検出できる可能性はあるものの，プライマーAleei-LAMP-BIP

の配列の 3’側にある変異塩基 G（東南アジアタイプではこの塩基が C）の存在により，東南アジアタイプの *A. leei* は検出されにくい（反応が遅れる）ことが推測される。この問題はこのプライマーの変異位置の塩基をミックス塩基（G or C = S）として合成することで解消できる。今後東南アジアタイプの細胞が日本沿岸に出現した際には考慮する必要がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，山口県油谷湾での調査海水をご提供いただいた山口県水産研究センター外海研究部・木原浩志氏，南部智秀氏，広島湾での採水にご協力いただいた県立広島大学・内藤佳奈子氏，高知県野見湾における調査海水試料をご提供いただいた高知県水産試験場・谷口越則氏に厚く御礼申し上げる。

引用文献

岩野英樹．2014 年夏季に周防灘大分県海域で確認された有害渦鞭毛藻 *Karenia digitata* の出現時の環境特性と魚貝類への影響．大分県農林水検セ研報（水産）2017；**6**: 67-78.

坂本節子，外丸裕司，小池一彦．３）有害赤潮プランクトンのモニタリング技術の開発・実証および普及とデータ利活用の促進　① モニタリング技術の開発・実証，平成 30 年度漁場環境・改善推進事業「赤潮被害防止対策技術の開発」報告書，赤潮共同研究機関，水産庁，東京．2019；317-325.

Schlitzer R. Ocean Data View. 2018: https://odv.awi.de.

Shikata T, Taniguchi E, Sakamoto S, Kitatsuji S, Yamasaki Y, Yoshida M, Oikawa H. Phylogeny, growth and toxicity of the noxious red-tide dinoflagellate *Alexandrium leei* in Japan. Regional Studies in Marine Science, 2020; 36, 101265.

Yang ZB, Takayama H, Matsuoka K, Hodgkiss IJ. *Karenia digitata* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new harmful algal bloom species from coastal waters of west Japan and Hong Kong. *Phycologia*, 2000; **39**: 463-470.

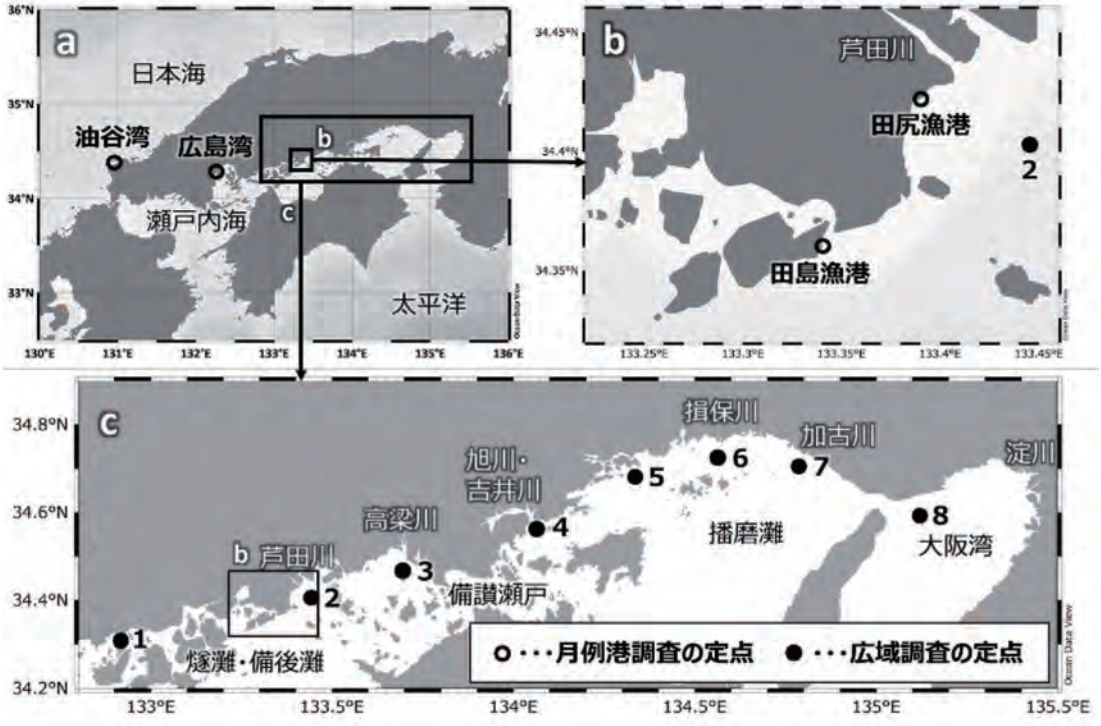

図 1．調査定点． 瀬戸内海全域（a）と広島県福山市沿岸域（b），瀬戸内海中央部から東部海域（c）．調査定点は白丸または黒丸で示した．観測定点に近い一級河川も図中に記した．

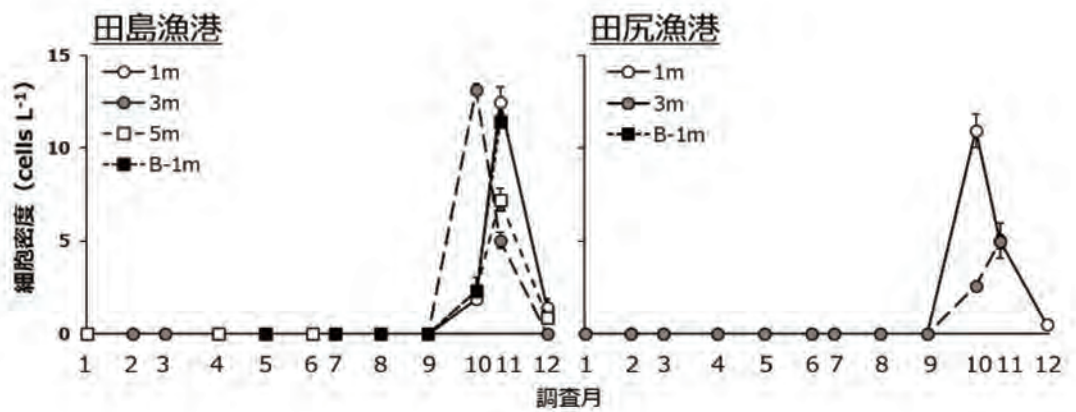

図 2．定量 PCR 法による 2020 年 1～12 月の田島漁港（左図）および田尻漁港（右図）における *Karenia digitata* の細胞密度の季節変化（試水 1 L あたりに換算）．

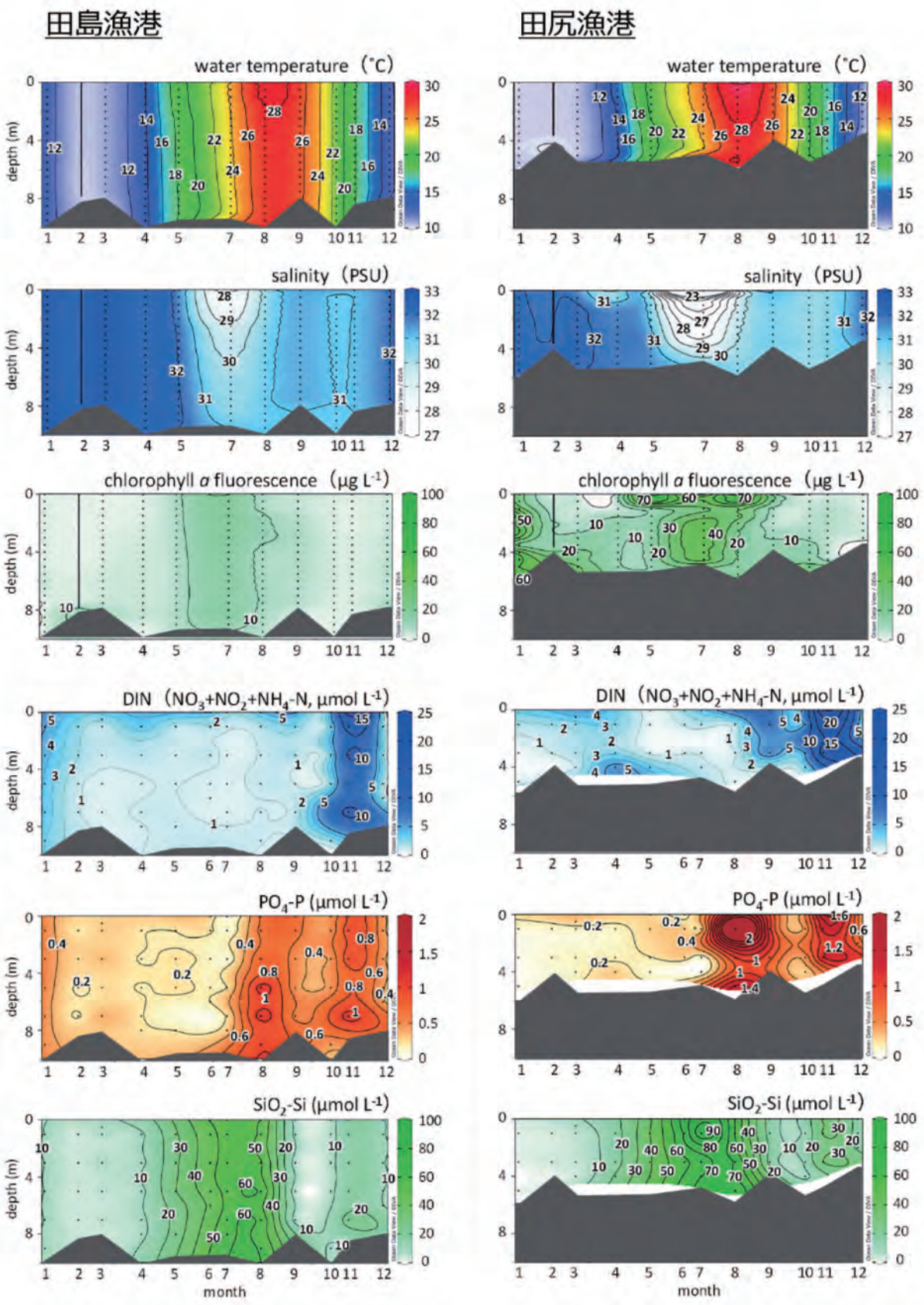

図 3. 2020 年 1～12 月の田島漁港（左）および田尻漁港（右）における水温，塩分，クロロフィル *a* 蛍光値，溶存態無機栄養塩濃度（DIN，PO_4-P，SiO_2-Si）の鉛直プロファイル．

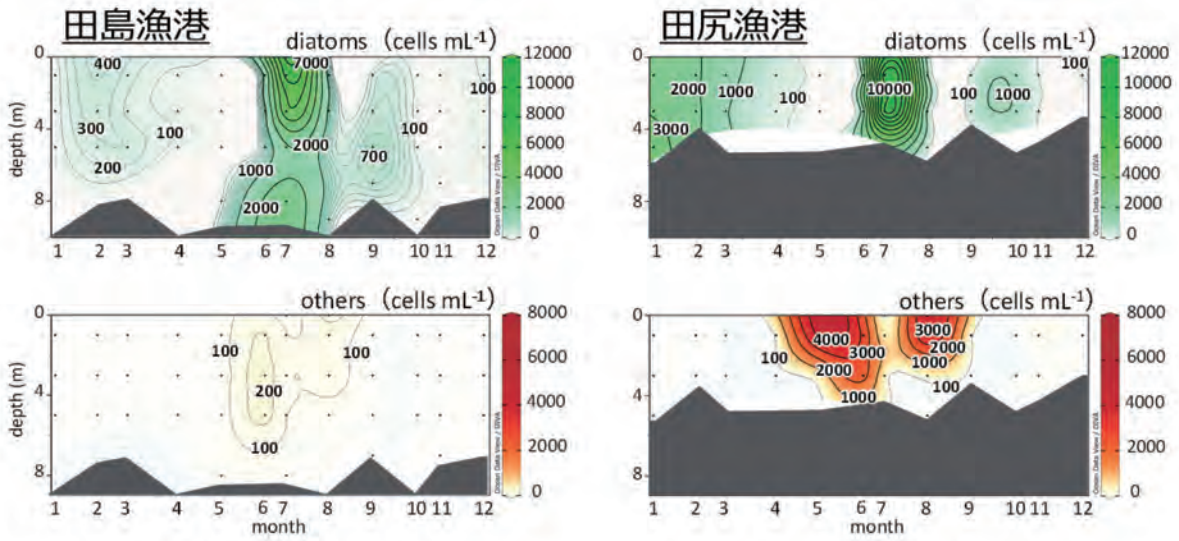

図 4. 2020 年 1～12 月の田島漁港（左）および田尻漁港（右）における珪藻類（diatoms）と非珪藻類（others，渦鞭毛藻類＋ラフィド藻類＋珪質鞭毛藻類）の鉛直プロファイル.

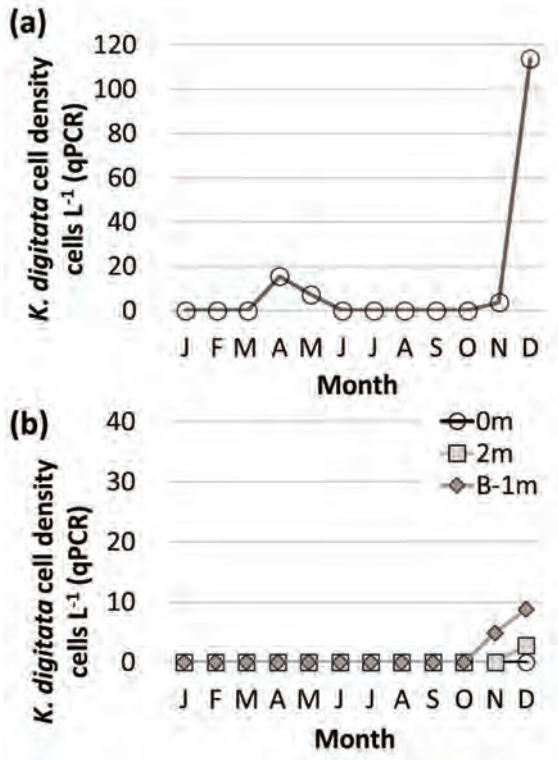

図 5. 定量 PCR 法による 2020 年 1～12 月の山口県油谷湾(a)および広島湾(b)における *Karenia digitata* の細胞密度の季節変化(試水 1 L あたりに換算).

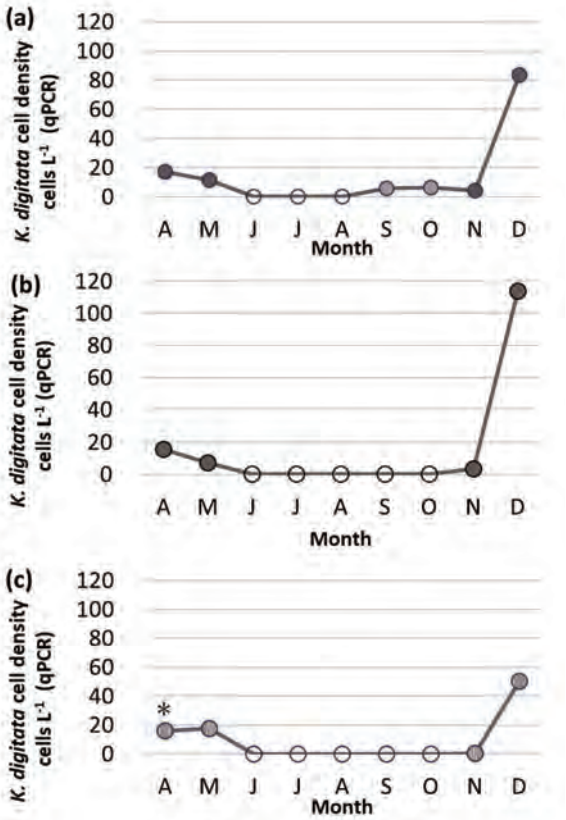

図 6. 定量 PCR における海水ろ過量およびフィルター目合いによる *Karenia digitata* 検出定量への影響.（上）試水ろ過量 1 L-フィルター目合い 3 µm,（中）試水ろ過量 500 mL-フィルター目合い 3 µm,（下）3 µm 通過試水ろ液 500 mL-フィルター目合い 0.2 µm.
○:非検出(<0.01 cells L^{-1})。

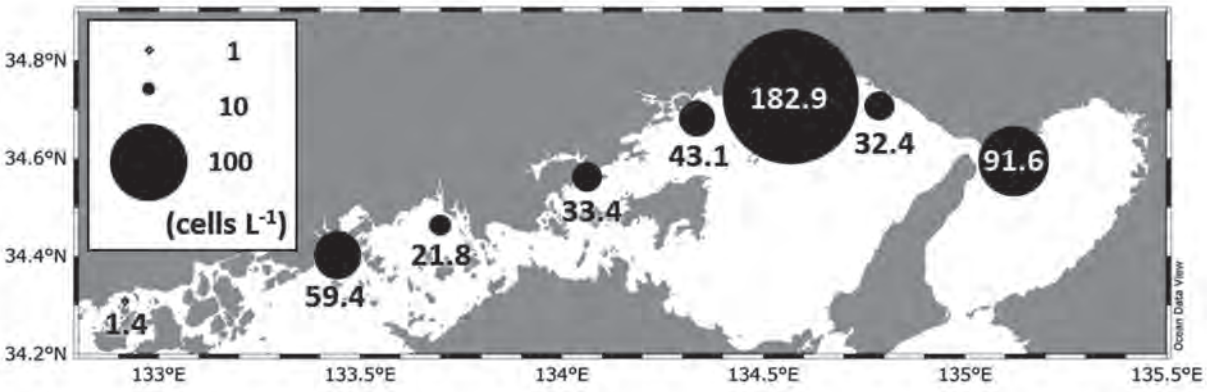

図 7. 2020 年 10 月の瀬戸内海広域調査 St. 1～St. 8（図 1c）において定量 PCR 法により得られた *Karenia digitata* の細胞密度（試水 1 L あたりに換算）.

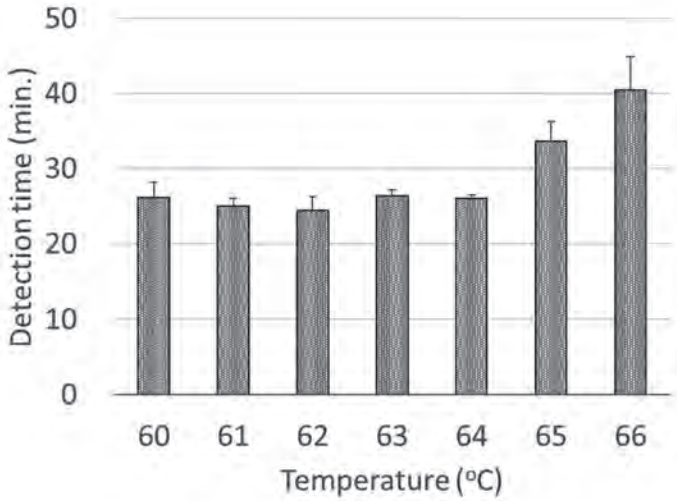

図 8. *Alexandrium leei* を検出対象とした LAMP 法の反応至適温度

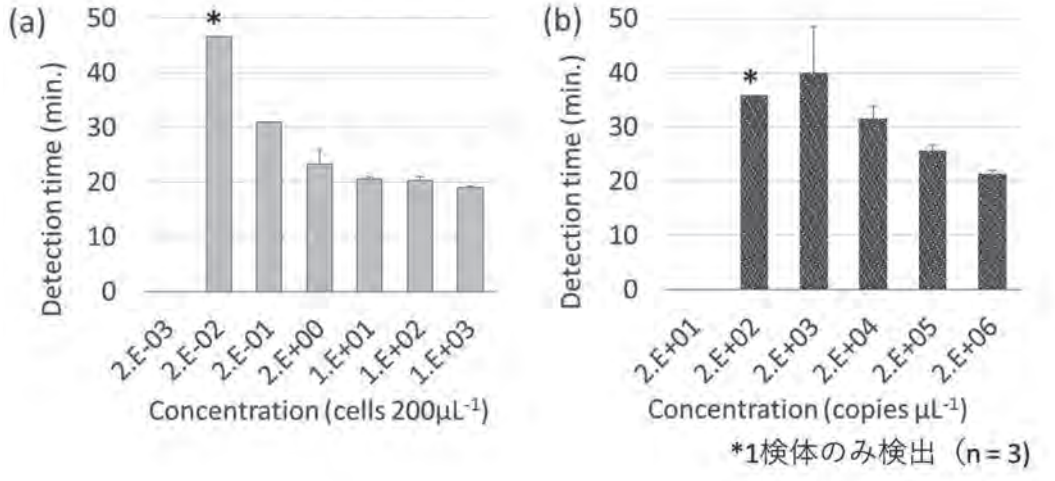

図 9. *Alexandrium leei* を検出対象とした LAMP 法の検出限界.（a）細胞粗抽出液,（b）精製 PCR 産物（既知コピー数濃度）

表 1. *Alexandrium leei* を検出対象とした LAMP 法プライマーの塩基配列

Primer name	Sequence (5'-3')	Length (bp)
Aleei-LAMP-F3	GCAAACAAGTACCATGAGG	19
Aleei-LAMP-B3	ACATGAATAATGATTTCAAGTAGC	24
Aleei-LAMP-FIP	TT**C**TGCACATGTCTGTTTGC-TGAAAAGGACTTTGAAAAGAGAA	43
Aleei-LAMP-BIP	GT**G**AGACTGCTGCATTCCT-AAGCTGGTGTTCAA**G**GC	36
Aleei-LAMP-LF	TGCTCAACAATTTCAGGCTCTT	22
Aleei-LAMP-LB	CCTGCAGATTGTGTGTGGAA	20

*太字の塩基は，東南アジアタイプの *A. leei* の配列との間に変異がある塩基を示す。

表 2. *Alexandrium leei* を検出対象とした LAMP 法による検出の種特異性.
+は LAMP 法陽性, -は陰性と判定された試料を示す.

Species	Strain	Concentration (cells 200μL^{-1})	LAMP
Alexandrium leei	AI_KOCHI	100	+
	20ALKocA1	100	+
Alexandrium tamiyavanichii	BAT-AL1	1000	-
Alexandrium catenella	18AL09OS	1000	-
Alexandrium ostenfeldii	Aos Mix-2	1000	-
Alexandrium fraterculus	Afra05UWA	1000	-
Alexandrium pacificum	AC02FU-B6	1000	-
Pyrodinium bahamense	PB02	1000	-
Heterocapsa circularisquama	HC09	1000	-
Gonyaulax polygramma	GP02	1000	-
Karenia mikimotoi	KM02	1000	-