水産研究・教育機構 機関リポジトリ
FRA Japan Fisheries Research and Education Agency Institutional Repository

LAMP法を活用したヤコウチュウに摂食された有害赤潮プランクトンの検出

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2024-08-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 北辻, さほ, 紫加田, 知幸, 坂本, 節子, 中山, 奈津子, 永井, 清仁, 鬼塚, 剛, 多田, 邦尚 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2010618

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

原著論文

LAMP法を活用したヤコウチュウに摂食された有害赤潮プランクトンの検出

北辻さほ*1・紫加田知幸*1・坂本節子*1・中山奈津子*1・永井清仁*2・鬼塚　剛*1・多田邦尚*3

Detection of harmful algae grazed by *Noctiluca scintillans* by LAMP method

Saho KITATSUJI, Tomoyuki SHIKATA, Setsuko SAKAMOTO, Natsuko NAKAYAMA, Kiyohito NAGAI, Goh ONITSUKA and Kuninao TADA

Grazing by heterotrophic dinoflagellates often plays an important role in the termination of harmful algal blooms. However, there are no simple methods to detect the ingestion of harmful algae by heterotrophic dinoflagellates in the field. Here, we examined the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method to detect the grazing by *Noctiluca scintillans* on *Karenia mikimotoi* and *Chattonella* spp. in laboratory and field experiments. In the laboratory, the LAMP method detected DNA from *K. mikimotoi* in *N. scintillans* food vacuoles for no longer than 3 h after their ingestion, indicating active grazing by *N. scintillans* in the early diurnal period. In Ago Bay, Japan, we collected *N. scintillans* at intervals of 2–5 h during August 2015, when *K. mikimotoi* and *Chattonella* spp. co-occurred. The LAMP method detected DNA from *K. mikimotoi* and *Chattonella* spp. ingested by *N. scintillans* with high frequency during the daytime. These results show that the LAMP method can detect grazing by *N. scintillans* on harmful algae, and that daytime sampling is optimal to identify active grazing.

キーワード：ヤコウチュウ，有害赤潮プランクトン，LAMP法，摂食
2019年5月12日受付　2019年9月20日受理

従属栄養性プランクトンによる摂食は，有害赤潮プランクトンの衰退の一因となることが知られている(Turner 2006)。現場海域においては，従属栄養性の渦鞭毛藻類が摂食者として有害赤潮プランクトンの衰退に寄与した事例が多数報告されている（Nakamura *et al.* 1996, Matsuyama *et al.* 1999)。ヤコウチュウ（夜光虫；以下，*Noctiluca scintillans*）は従属栄養性の渦鞭毛藻類に分類され，温帯域や亜熱帯域に広く分布し，沿岸域において高密度化することが報告されている（Maclean 1989, Miyaguchi *et al.* 2006, Harrison *et al.* 2011)。本種は植物プランクトンの高密度化と同時，あるいはその衰退時に，その細胞密度が急増する現象が観測されており，本種の摂食行動が赤潮の衰退に関与する可能性が指摘されている(Dela-Cruz *et al.* 2002, Kitatsuji *et al.* 2019)。従って，現場海域で本種と有害赤潮プランクトンの関係を詳細に明らかにすることは，海域の有害赤潮の動態を理解する上で重要である。

従属栄養性プランクトンの摂餌物を解析するために，

*1 国立研究開発法人水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所環境保全研究センター
〒739-0452　広島県廿日市市丸石2-17-5
National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Japan Fisheries Research and Education Agency, 2-17-5 Maruishi, Hatsukaichi-shi, Hiroshima 739-0452, Japan
sahok@affrc.go.jp
*2 (株) ミキモト　真珠研究所
*3 国立大学法人香川大学農学部

これまで様々な手法が提案されてきた。例えば，糞を電子顕微鏡観察することによって摂餌物を特定する手法（Turner 1984），腸管のクロロフィル*a*濃度を測定することによって摂食の有無を判断する手法（Bautista and Harris 1992），ボトル実験により餌料プランクトンの減少速度から摂食速度を推定する手法（Nakamura 1998）などが提案されてきた。しかしながら，電子顕微鏡観察において柔らかい外被を有する生物は化学固定などにより形態が変化しやすく同定が難しいこと，クロロフィル*a*濃度からは種組成の情報が得られないこと，ボトル実験には時間を要し，操作に熟練を要することなど，いずれの手法も無殻の有害赤潮プランクトンへ応用する上では問題点を有する。

近年，動物プランクトンの摂餌物の検出にPCR法が適用されるようになった（Nejstgaard *et al.* 2003，Olsen *et al.* 2014）。定量PCR法を用いてカイアシ類の摂餌物を定量的に解析した事例も複数報告されている（Troedsson *et al.* 2009，Nejstgaard *et al.* 2008，Hu *et al.* 2014，Haley *et al.* 2010）。また，Nishitani *et al.*（2018）は，従属栄養性渦鞭毛藻*Phalacroma mitra*を現場海域から単離してPCR法でrDNAを増幅した後，制限酵素を用いて増幅産物から本種由来のDNAを除去することで，摂餌物由来のDNAを特異的に検出する手法を提案している。

しかしながら，PCR法には高価な機器や特別な試薬が必要となる。近年，サーマルサイクラーや定量PCR装置のような高価な機器を必要とせず，迅速かつ簡易に精確な遺伝子増幅を行う手法として，loop-mediated isothermal amplification（LAMP）法が医療分野や農業分野などで広く活用されている（Notomi *et al.* 2000，Fukuta *et al.* 2003，Imai *et al.* 2006，Mori and Notomi 2009）。LAMP法は①全ての反応が等温で進行する，②核酸の増幅効率が極めて高く，1時間以内の反応で大量の増幅産物を得ることができる，③極めて高い反応特異性を持つ，④夾雑物が多く含まれる試料でも良好な核酸増幅反応が得られる，などの特長を有している。そのため，LAMP法は有害赤潮や貝毒の原因プランクトンを高感度に検出する方法として，水産研究分野で広く活用されている（Zhang *et al.* 2009，坂本ら2011，坂本ら2012，Nagai and Itakura 2012，Nagai *et al.* 2012，Nagai 2013）。

そこで，本研究では，まず室内実験でLAMP法を活用して*N. scintillans*が摂食した有害赤潮プランクトンを検出可能であることを明らかにし，次に現場海域で本手法を試用して，*N. scintillans*の摂食による有害赤潮プランクトンへの影響を把握するための適切な調査方法の適用条件を見出すことを目的とした。

材料と方法

供試生物　*Karenia mikimotoi*は2013年7月に広島湾から単離した培養株（13HBKm2）または2014年6月に佐伯湾から単離した培養株（Km69-9ax）を供した。継代培養は，改変SWM-3培地（以降，培地，紫加田ら2011），光強度200 μmol photons m^{-2} s^{-1}（12hL：12hDサイクル），20°Cの条件で行い，実験には対数増殖期の培養株を供した。*N. scintillans*は2015年3月または2019年3月に広島湾で採集し，光強度10 μmol photons m^{-2} s^{-1}（12hL：12hDサイクル），20°Cで，*Dunaliella tertiolecta*（NIES-2258）を給餌し，1週間ごとに継代しながら培養した。*N. scintillans*は実験前に，ガラス繊維ろ紙（GF/C, Whatman）によりろ過後，オートクレーブ滅菌した海水中に移し，24時間絶食させた。

***N. scintillans*に摂食された摂餌物由来DNAの抽出**　2 mLの培地に懸濁した20細胞の*N. scintillans*をパスツールピペットで6穴マイクロプレートの3穴に単離して合計60細胞準備し，それぞれに5 mLの*K. mikimotoi*培養液（対数増殖期，10,000 cells mL^{-1}）を接種して，*N. scintillans*の培養条件と同条件下で1時間摂食させた。その後培地で洗浄し，1 mLに定容した*N. scintillans*細胞懸濁液に対して4 mLの99.5%エタノール（以下，エタノール）を添加して固定し，4°Cで保存した。*N. scintillans*により摂食された餌は食胞中で消化されることが知られており，食胞の有無で摂食活動を行った細胞を光学顕微鏡下で識別できる（高山1977）。そこで，エタノール固定試料の中から光学顕微鏡下（×40；IX71，OLYMPUS）で食胞を有する*N. scintillans*を，パスツールピペットを用いて分離し，氷上に置かれた0.5 mLマイクロチューブに移した。リン酸緩衝食塩水（PBS）またはトリス－EDTA緩衝液（TE，pH 8.0）を100 μL添加後，99.9°Cで15分間加熱抽出することによりDNA粗抽出液を得た。

LAMP法による*K. mikimotoi*および*Chattonella* spp.の検出　LAMP法には表1に示す*K. mikimotoi*および*Chattonella* spp.のプライマーを使用し，反応液は表2に示す組成で調製した。なお，*Chattonella* spp.のプライマーは*C. marina*，*C. antiqua*および*C. ovata*を検出することが確認されている（坂本ら2012）。LAMPの反応は，*K. mikimotoi*および*Chattonella* spp.の検出ではそれぞれ64°Cおよび65°Cで30分間行い，反応の間，等温増幅蛍光測定装置（Genie®II，OptiGene社）を用いて蛍光検出することにより増幅産物を経時的に観察するとともに，その結果をもとに反応終了後に会合曲線解析（Annealing curve analysis）を行うことでその反応特異性を確認した。

***N. scintillans*細胞内における*K. mikimotoi*のDNA分解時間の把握**　摂餌物のDNAは時間とともに*N. scintillans*の細胞内で消化される。そこで，*K. mikimotoi*について*N. scintillans*細胞内におけるDNA分解時間の検討を行った。前述の方法（*N. scintillans*に摂食された摂餌物由来DNAの抽出）で420細胞の*N. scintillans*を5枚の6穴プレート（合計21穴）に分注し，*K. mikimotoi*を1時間摂食させた。摂食後直ちに*N. scintillans*を培地で洗浄し，5 mLの培地を入れた6穴マイクロプレートに20細胞ずつ単離して，

表1. *Karenia mikimotoi*および*Chattonella* spp.検出のためのプライマー塩基配列

種	プライマー	濃度 (μM)	塩基配列	長さ (mer)	文献
Karenia mikimotoi	F3	5	GCGATACTGCTTCTCGCC	18	坂本ほか（2011）
	B3	5	CGTTCTAATGTCAAGGACA	19	
	FIP	40	AGGACATTCAGTCACTCGGGCATGTCAACGTCAGTTCAT	39	
	BIP	40	CTCTGTGTGTCTGGTAGCACAACAACCTTCATGCAGAGC	39	
	LF	20	GTCCTTAGAGTTTTCCTCAA	20	
	LB	20	CTGCTTCATGTGCTTGCCT	19	
Chattonella spp.	F3	5	TGTGAGCTGGATGCTTCTG	19	坂本ほか（未発表）
	B3	5	CGTGTTTCAAGACGGGGTA	19	
	FIP	40	AACAGGAGAGTAACAAGCAGGCCTCTCTGTCGTGGCTTGGA	41	
	BIP	40	CTGTCCTACTGCTTGCAGTGTTGTCAGGATCCTGACCTTGC	41	
	LB	20	GTTGCAGTGATTGGACTG	18	

表2. LAMP法に用いた反応液の組成

種	反応液	添加量 (μL)
Karenia mikimotoi	超純水	2
	プライマー（表1のプライマーを1μLずつ混合）	6
	反応試薬（Isothermal Master Mix, OptiGene社）	15
	DNA抽出液	2
Chattonella spp.	超純水	3
	プライマー（表1のプライマーを1μLずつ混合）	5
	反応試薬（Isothermal Master Mix, OptiGene社）	15
	DNA抽出液	2

引き続き*N. scintillans*の培養と同条件下で培養した。*N. scintillans*を培地に移してから0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6時間経過後にパスツールピペットで*N. scintillans*を50細胞以上分離して，エタノールを5mL入れた6穴マイクロプレートに移して固定した。固定試料より前述の方法(*N. scintillans*に摂食された摂餌物由来DNAの抽出）に準じて*N. scintillans*を単離し，DNAを抽出した。得られたDNA抽出液を前述の方法（LAMP法による*K. mikimotoi*および*Chattonella* spp.の検出）に準じてLAMP法により分析した。また，光学顕微鏡下（IX71, OLYMPUS）で*N. scintillans*を50細胞以上観察し，食胞が形成されている細胞の割合を算出した。

N. scintillansの摂食リズムの把握　従属栄養性プランクトンの摂食には日周リズムがあることが知られている(Mackas and Bohrer 1976)。そこで，*N. scintillans*の摂食速度の日周性を把握し，現場における適切なサンプリング時刻を設定することを目的として，本実験を実施した。実験区には1mLの培地に懸濁させた*N. scintillans*10細胞を，対照区には1mLの培地のみを12穴マイクロプレートに分注し，3mLの*K. mikimotoi*培養液（対数増殖期，1,000cells mL^{-1}）を接種して，1時間培養した。実験区および対照区は3連とし，培養条件は，温度20°C，光強度約100μmol photons m^{-2} s^{-1}，6：00～18：00を明期，18：00～6：00を暗期とした。培養前後の*K. mikimotoi*細胞密度を光学顕微鏡下（IX71, OLYMPUS）で計数した。1時間の摂食実験を，9時から翌日の9時まで2時間おきに13回繰り返した。

*N. scintillans*の摂食速度はNakamura（1998）に従い，*K. mikimotoi*細胞密度の減少量を摂食量として算出した。実験区の*K. mikimotoi*細胞密度の平均値C_{Km}（cells mL^{-1}）は$C_{Km} = (C_{tg} - C_0) / ln (C_{tg}/C_0)$で求められ，ここで$C_0$は実験開始時の，$C_{tg}$は実験区における実験終了時の*K. mikimotoi*細胞密度（cells mL^{-1}）を示す。*N. scintillans*の濾水速度F_{Ns}（mL grazer^{-1} h^{-1}；*N. scintillans*をgrazerと表す）は$F_{Ns} = V/NT (lnC_t - lnC_{tg})$となり，ここで$V$は培養量（mL），$N$は接種した*N. scintillans*の細胞数（cells），Tは実験時間（h），C_tは対照区における実験終了時の*K. mikimotoi*細胞密度（cells mL^{-1}）をそれぞれ示す。*N. scintillans*の摂食速度G（cells grazer^{-1} h^{-1}）は$G = C_{Km} F_{Ns}$により求めた。

天然試料へのLAMP法の適用　LAMP法を用いた*N. scintillans*細胞内の有害赤潮プランクトン検出法を現場に適用し，天然海域における摂食動態の日周性を調べた。調査は，2015年8月10日16：00～11日16：00に，三重県の英虞湾における調査定点（34°17.7′N，136°50.4′E；水深約8m）で*N. scintillans*の採集を2～5時間おきに11回実施した。当時，英虞湾では*K. mikimotoi*および*Chattonella* spp.が混合赤潮を形成していた（三重県ホームページ，http://www.pref.mie.lg.jp/suigi/hp/78550017262.htm)。*N. scintillans*は小型のプランクトンネット（口径45cm，目合い100μm）による海底直上1mから表層までの鉛直曳きにより採集した。得られた*N. scintillans*は目合い330μmのプランクトンネット上で，滅菌ろ過海水を用いて洗浄し，エタノール（最終濃度約80%）で固定して4°Cで保存した。また，光学顕微鏡（×40；IX71，OLYMPUS）で食胞を有する*N. scintillans*細胞の割合を300細胞以上計数して求めた。食胞が認められる細胞を，パスツールピペットを用いてエタノールで洗浄しながら単離し，0.5mL容のマイクロチューブに1cellずつ入れて，14検体作製した。11回の調査で得られた固定サンプルについて14検体ずつ作製し，これを前述の

LAMP法（LAMP法による*K. mikimotoi*および*Chattonella* spp.の検出）により*K. mikimotoi*および*Chattonella* spp.を検出した。また，食胞が認められる細胞の割合とLAMP法で陽性となった細胞の割合を乗じることによって，各時刻において*K. mikimotoi* および*Chattonella* spp.を摂食した細胞の割合を算出した。

結　果

N. scintillans細胞内におけるK. mikimotoiのDNA分解時間の把握　*K. mikimotoi*を摂食した*N. scintillans*は食胞内に摂餌物が認められた（図1）。図2に*N. scintillans*の食胞保有率およびLAMP法による*K. mikimotoi*の検出率を示す。*N. scintillans*の食胞保有率は，1時間後までは70～72%だったが，2時間後に56%に減少し，その後6時間後まで変化しなかった（図2）。一方で，摂食直後の*N. scintillans*からの*K. mikimotoi*検出率は100%だったが，15分後には40%，2時間後には10%に低下し，3時間後以降は検出されなくなった。

N. scintillansの摂食リズムの把握　*N. scintillans*による*K. mikimotoi*の摂食速度は49～560 cells grazer^{-1} h^{-1}の範囲で推移した（図3）。摂食速度は明期の11：00～17：00に減少し，暗期の19：00～1：00までは低いレベルで推移したが，暗期の終わりから明期の初めの3：00～5：00に上昇し，7：00～9：00まで高いレベルを維持した（図3）。また，*N. scintillans*は暗期の21:00～3:00に，全体の1～3割の細胞が分裂中であった。

天然試料へのLAMP法の適用　食胞を有する*N. scintillans*は全ての時間帯で認められ，5～38%で推移した（図4a）。LAMP法によって得られた，食胞を保有する*N. scintillans*が*K. mikimotoi*を摂食していた割合は10：00に最高値（79%）を示し，他の時間帯では21～50%の範囲で推移した（図4b）。また，全体のうち*K. mikimotoi*を摂食していた*N. scintillans*の割合は1～30%の範囲で推移し，10:00に最大となった（図4b）。一方，*N. scintillans*に摂食された*Chattonella* spp.は12：00～16：00の間のみで検出され，全体のうち*Chattonella* spp.を摂食していた*N. scintillans*の割合は7.1～21.4%の範囲で推移した（図4c）。*Chattonella* spp.を摂食した*N. scintillans*の割合は，0.5～3.2%と調査期間中一貫して低かった（図4c）。

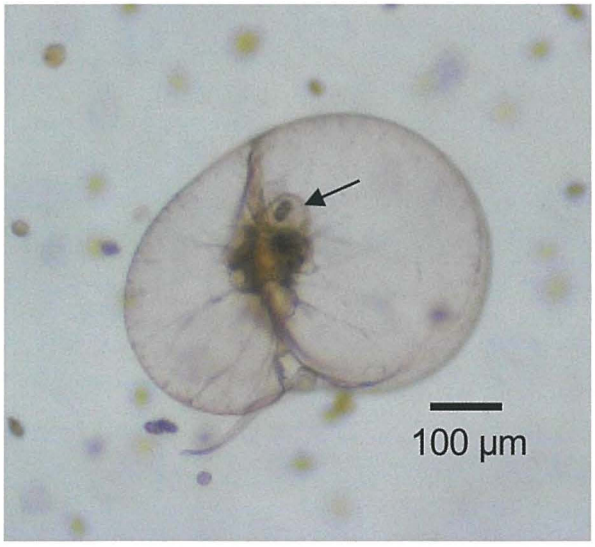

図1.　*Karenia mikimotoi*を摂食した*Noctiluca scintillans*，矢印は食胞を示す

考　察

本研究により，LAMP法を用いることで，*N. scintillans*細胞内の有害赤潮プランクトンの簡易検出が可能であることが示された。従属栄養性プランクトンの食胞および

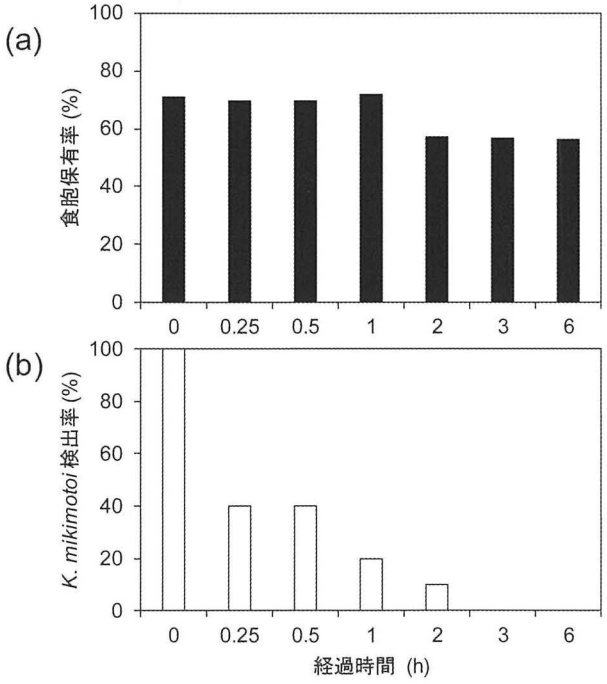

図2.　*Karenia mikimotoi* を摂食させた*Noctiluca scintillans*（$n > 50$）の食胞保有率（a）および食胞が認められた*N. scintillans*（$n = 10$）のLAMP法による*K. mikimotoi*検出率（b），摂食させた後，ろ過海水に移してから0～6時間経過した時点で固定し，分析した

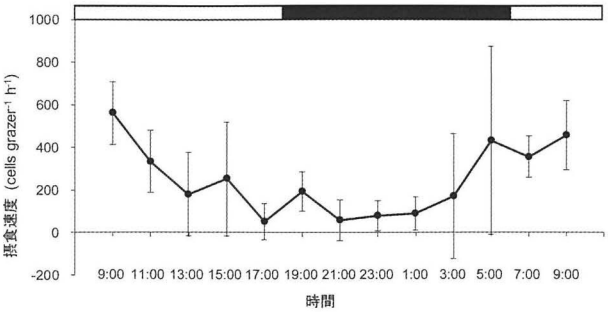

図3.　*Karenia mikimotoi*に対する*Noctiluca scintillans*の摂食速度の日変化，上部の白色部分は明期，黒色部分は暗期を示す

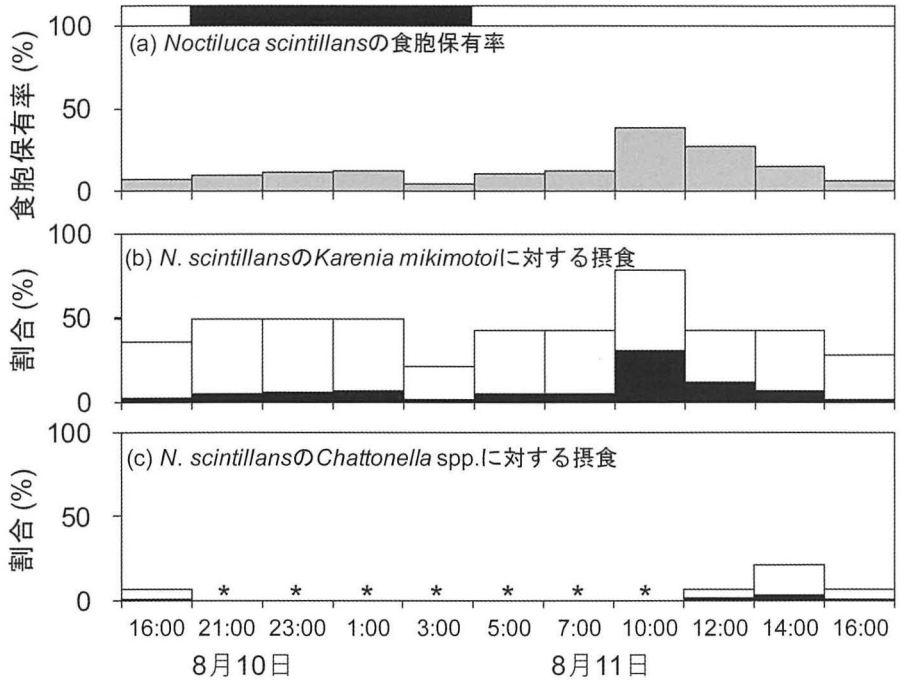

図4. 2015年8月10～11日の英虞湾における*Noctiluca scintillans*の食胞保有率（a），食胞を保有している*N. scintillans*（各時刻において$n = 14$）が*Karenia mikimotoi*を摂食していた割合（白）および全体のうち*K. mikimotoi*を摂食していた割合（黒）（b），食胞を保有している*N. scintillans*（各時刻において$n = 14$）が*Chattonella* spp.を摂食していた割合（白）および全体のうち*Chattonella* spp.を摂食していた割合（黒）（c）
*は検出されず。全体のうち*K. mikimotoi*あるいは*Chattonella* spp.を摂食していた割合（黒）は*N. scintillans*の食胞保有率（a）に*N. scintillans*（$n = 14$）が*K. mikimotoi*あるいは*Chattonella* spp.を摂食していた割合（b，cの白）を乗じて算出した
上部の白色部分は昼間，黒色部分は夜間を示す

腸管内から摂餌物の遺伝子を検出する場合，DNAの消化分解を止めるために，液体窒素による瞬間凍結や（Nejstgaard *et al.* 2008，Wang *et al.* 2016），現場海水から単離した従属栄養性プランクトンを直接DNA抽出バッファーに投入する（Nishitani *et al.* 2018）といった方法が利用されている。一方で，本研究ではDurbin *et al.*（2011）が用いたエタノール固定法を採用し，*K. mikimotoi*や*Chattonella* spp.の検出に成功した。また，LAMP法はDNA抽出物中に含まれる夾雑物に反応が影響されにくく，反応の種特異性が高い（吉野ら2006）。この特徴は*N. scintillans*の粗抽出物から標的とする有害赤潮プランクトンの検出に貢献した可能性がある。

ただし，カイアシ類において，摂食後2～4時間以上経過すると摂食物（*Alexandrium fundyense*）をPCR法で検出することが困難となることが報告されているように（Haley *et al.* 2010），捕食者のDNA消化は検出結果に大きな影響を与えることは念頭におく必要がある。LAMP法による*N. scintillans*細胞内の有害赤潮プランクトン*K. mikimotoi*の検出率は，摂食15分後以降急速に減少し，3時間後には検出されなくなった（図2）。従って，本手法による検出結果は，採集時から3時間程度前までの摂食状況を示していると考えられる。DNAの抽出溶媒量は本研究では100μLとしたが，溶媒量を減少させてDNA抽出濃度を増加させることにより*K. mikimotoi*の検出時間が長くなる可能性はある。検出精度を上げるためには，この点が今後の技術的な検討課題と考える。

動物プランクトンの摂食リズムは様々な生物種で観察されている。カイアシ類は夜間活発に摂餌するが（Mackas and Bohrer 1976），従属栄養性渦鞭毛藻*Gyrodinium dominans*および*Oxyrrhis marina*の摂食速度は夜間よりも昼間のほうが圧倒的に高い（Arias *et al.* 2017）。本研究では，*N. scintillans*の摂食速度は明期開始直前から明期中盤にかけて高くなることを室内実験で明らかにした（図3）。さらに，英虞湾において*N. scintillans*の*K. mikimotoi*および*Chattonella* spp.の摂食率は夜間よりも昼間に上昇することを確認した（図4）。これらのことを踏まえると，野外において*N. scintillans*の摂食動態をLAMP法により経日的に追跡する場合，本種の摂食を確実に捕らえることができる午前中に実施することが推奨される。

*N. scintillans*は昼間表層に多く分布し，深度が深くなるにつれて指数関数的に減少する傾向がある（Kimor 1979，Kiørboe and Titelman 1998，Miyaguchi *et al.* 2006）。一方で，*K. mikimotoi*や*Chattonella* spp.などの有害赤潮プランクトンは夜明け前に海面へと上昇し，夕方から夜間にかけて底層へと下降する日周鉛直移動を示すことが知られている（Koizumi *et al.* 1996，Amano *et al.* 1998，Shikata *et al.* 2017）。よって，*N. scintillans*は*K. mikimotoi*や*Chattonella* spp.などの有害赤潮プランクトン

と昼間に遭遇しやすくなることが推察される。Shikata *et al.*（未発表）によると，英虞湾における本調査と同日に *K. mikimotoi* および *Chattonella* spp.の鉛直分布調査を実施したところ，両種とも終日5m以深に分布し，夜間は海底付近に集積し，昼間は上昇していた。実際，本研究の野外調査においても *K. mikimotoi* および *Chattonella* spp.の摂食率は昼間に上昇した（図4, 5）。このことから，*N. scintillans* による有害赤潮プランクトンの摂食状況を正確に解析するためには，有害赤潮プランクトンの鉛直分布を考慮することが重要な要件であると考えられる。

以上のように，本研究ではLAMP法を活用することで，有害赤潮プランクトンに対する *N. scintillans* の摂食状況を確認可能であることが明らかにされた。また，本手法は化学固定などにより形態が変化しやすい無殻の有害赤潮プランクトンに対する摂食の有無の確認にも有効な手段であることが示された。今後，本手法を用いて，深度別，時間別における *N. scintillans* の摂食状況のデータ等が蓄積されれば，有害赤潮プランクトンの消長における *N. scintillans* の役割がより明らかになると期待される。

謝　辞

英虞湾での調査にご協力くださったミキモト真珠研究所の郷譲治研究員，岡野翔研究員に感謝する。また，本研究を遂行するにあってご指導頂いた香川大学瀬戸内圏研究センターの本城凡夫教授および一見和彦教授，香川大学農学部の山口一岩准教授に感謝の意を表する。

文　献

Amano K, Watanabe M, Kohata K, Harada S (1998) Conditions necessary for *Chattonella antiqua* red tide outbreaks. *Limnol. Oceanogr.*, **43**, 117 - 128.

Arias A, Saiz E, Calbet A (2017) Diel feeding rhythms in marine microzooplankton: effects of prey concentration, prey condition, and grazer nutritional history. *Mar. biol.*, **164**, 205.

Bautista B, Harris RP (1992) Copepod gut contents, ingestion rates and grazing impact on phytoplankton in relation to size structure of zooplankton and phytoplankton during a spring bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **82**, 41 - 50.

Dela-Cruz J, Ajani P, Lee R, Pritchard T, Suthers I (2002) Temporal abundance patterns of the red tide dinoflagellate *Noctiluca scintillans* along the southeast coast of Australia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **236**, 75 - 88.

Durbin EG, Casas MC, Rynearson TA (2011) Copepod feeding and digestion rates using prey DNA and qPCR. *J. Plankton Res.*, **34**, 72 - 82.

Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y (2003) Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Arch. Virol.*, **148**, 1713 - 1720.

Haley ST, Juhl AR, Keafer BA, Anderson DM, Dyhrman ST (2010) Detecting copepod grazing on low-concentration populations of *Alexandrium fundyense* using PCR identification of ingested prey. *J. Plankton Res.*, **33**, 927 - 936.

Harrison PJ, Furuya K, Glibert PM, Xu J, Liui HB, Yin K, Lee JHW, Anderson DM, Gowen R, Al-azri AR, Ho AYT (2011) Geographical distribution of red and green *Noctiluca scintillans*. *Chin. J. Oceanol. Limn.*, **29**, 807 - 831.

Hu S, Guo Z, Li T, Carpenter EJ, Liu S, Lin S (2014) Detecting *in situ* copepod diet diversity using molecular technique: development of a copepod/symbiotic ciliate-excluding eukaryote-inclusive PCR protocol. *PloS one*, **9**, e103528.

Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Tashiro M, Odagiri T (2006) Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*, **24**, 6679 - 6682.

Kimor B (1979) Predation by *Noctiluca miliaris* Souriray on *Acartia tonsa* Dana eggs in the inshore waters of southern California. *Limnol.* Oceanogr., **24**, 568 - 572.

Kiørboe T, J Titelman (1998) Feeding, prey selection and prey encounter mechanisms in the heterotrophic dinoflagellate *Noctiluca scintillans*. *J. Plankton Res.*, **20**, 1615 - 1636.

Kitatsuji S, Yamaguchi H, Asahi T, Ichimi K, Onitsuka G, Tada K (2019) Does *Noctiluca scintillans* end the diatom bloom in coastal water? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **510**, 10 - 14.

Koizumi Y, Uchida T, Honjo T (1996) Diurnal vertical migration of *Gymnodinium mikimotoi* during a red tide in Hoketsu Bay, Japan. *J. Plankton Res.*, **18**, 289 - 294.

Mackas D, Bohrer R (1976) Fluorescence analysis of zooplankton gut contents and an investigation of diel feeding patterns. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **25**, 77 - 85.

Maclean JL (1989) Indo-Pacific Red Tides, 1985 - 1988. *Mar. Poll. Bull.*, **20**, 304 - 310.

Matsuyama Y, Miyamoto M, Kotani Y (1999) Grazing impacts of the heterotrophic dinoflagellate *Polykrikos kofoidii* on a bloom of *Gymnodinium catenatum*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **17**, 91 - 98.

Miyaguchi H, Fujiki T, Kikuchi T, Kuwahara VS, Toda T (2006) Relationship between the bloom of *Noctiluca scintillans* and environmental factors in the coastal waters of Sagami Bay, Japan. *J. Plankton Res.*, **28**, 313 - 324.

Mori Y, Notomi T (2009) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) : a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.*, **15**, 62 - 69.

Nagai S, Itakura S (2012) Specific detection of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* from single vegetative cells by a loop-mediated isothermal amplification method. *Marine Genomics*, **7**, 43 - 49.

Nagai S, Yamamoto K, Hata N, Itakura S (2012) Study of DNA extraction methods for use in loop-mediated isothermal amplification detection of single resting cysts in the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. catenella*. *Marine Genomics*, **7**, 51 - 56.

Nagai S (2013) Species-Specific detection of six *Alexandrium* species

from single vegetative cells by a loop-mediated isothermal amplification method. *DNA Testing*, **5**, 33 - 46.

Nakamura Y (1998) Biomass, feeding and production of *Noctiluca scintillans* in the Seto Inland Sea, Japan. *J. Plankton Res.*, **20**, 2213 - 2222.

Nakamura Y, Suzuki S, Hiromi J (1996) Development and collapse of a *Gymnodinium mikimotoi red* tide in the Seto Inland Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, **10**, 131 - 137.

Nejstgaard JC, Frischer ME, Raule CL, Gruebel R, Kohlberg KE, Verity PG (2003) Molecular detection of algal prey in copepod guts and fecal pellets. *Limnol. Oceanogr-Meth.*, **1**, 29 - 38.

Nejstgaard JC, Frischer ME, Simonelli P, Troedsson C, Brakel M, Adiyaman F, Sazhin AF, Artigas L F (2008) Quantitative PCR to estimate copepod feeding. *Mar. Biol.*, **153**, 565 - 577.

Nishitani G, Kosaka Y, Nagai S, Takano Y, Kim YO, Ishikawa A (2018) An effective method for detecting prey DNA from marine dinoflagellates belonging to the genera Dinophysis and Phalacroma using a combination of PCR and restriction digestion techniques. *Plankton and Benthos Research*, **13**, 90 - 94.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **28**, e63 - e63.

Olsen BR, Troedsson C, Hadziavdic K, Pedersen RB, Rapp HT (2014) A molecular gut content study of *Themisto abyssorum* (Amphipoda) from Arctic hydrothermal vent and cold seep systems. *Mol. Ecol.*, **23**, 3877 - 3889.

坂本節子・山口峰生・紫加田知幸（2011）平成22年度漁場環境・生物多様性保全総合対策委託事業報告書「新奇有害プランクトンに係る発生・増殖機構の解明，モニタリング及び予察技術に関する研究」，独立行政法人水産総合研究センター，長崎大学，広島大学，高知大学，新潟県，pp.4 - 12.

坂本節子・山口峰生・紫加田知幸（2012）平成23年度漁場環境・生物多様性保全総合対策委託事業報告書「新奇有害プランクトンに係る発生・増殖機構の解明，モニタリング及び予察技術に関する研究」，独立行政法人水産総合研究センター，長崎大学，広島大学，高知大学，pp.4 - 11.

紫加田知幸・櫻田清成・城本祐助・小山長久・生地　暢・吉田　誠・大和田紘一（2011）八代海におけるラフィド藻*Chattonella antiqua*の増殖および栄養塩との関係．日水誌，**77**，40 - 52.

Shikata T, Onitsuka G, Abe K, Kitatsuji S, Yufu K, Yoshikawa Y, Honjo T, Miyamura K (2017) Relationships between light environment and subsurface accumulation during the daytime in the red-tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Mar. Biol.*, **164**, 18.

高山晴義（1977）ヤコウチュウ *Noctiluca scintillans*（Macartney）の培養とその観察．日本プランクトン学会報，**24**，159 - 162.

Troedsson C, Simonelli P, Nägele V, Nejstgaard JC, Frischer ME (2009) Quantification of copepod gut content by differential length amplification quantitative PCR (dla-qPCR) . *Mar. Biol.*, **156**, 253 - 259.

Turner JT (1984) Zooplankton feeding ecology: contents of fecal pellets of the copepods *Temora turbinata* and *T. stylifera* from continental shelf and slope waters near the mouth of the Mississippi River. *Mar. Biol.*, **82**, 73 - 83.

Turner JT (2006) 20 Harmful Algae Interactions with Marine Planktonic Grazers. *Ecology of Harmful Algae*, Graneli E, Turner JT (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 259 - 270.

吉野　学・渡　一・小島　禎・池戸正成（2006）LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法によるコイヘルペスウイルスの高感度迅速検出．魚病研究，**41**，19 - 27.

Zhang F, Ma L, Xu Z, Zheng J, Shi Y, Lu Y, Miao Y (2009) Sensitive and rapid detection of *Karenia mikimotoi* (Dinophyceae) by loop-mediated isothermal amplification. *Harmful Algae*, **8**, 839 - 842.

Wang L, Lin X, Goes JI, Lin S (2016) Phylogenetic analyses of three genes of *Pedinomonas noctilucae*, the green endosymbiont of the marine dinoflagellate *Noctiluca scintillans*, reveal its affiliation to the order Marsupiomonadales (Chlorophyta, Pedinophyceae) under the reinstated name *Protoeuglena noctilucae*. *Protist*, **167**, 205 - 216.

LAMP法を活用したヤコウチュウに摂食された有害赤潮プランクトンの検出

北辻さほ・紫加田知幸・坂本節子・中山奈津子・永井清仁・鬼塚　剛・多田邦尚

ヤコウチュウに摂食された有害赤潮プランクトンのLAMP法による検出法を検討した。まず，本手法を用いた室内実験を行い，ヤコウチュウは摂食した*Karenia mikimotoi*のDNAを3時間以内に消化することや明期前半に活発に摂食することを見出した。また，*K. mikimotoi*および*Chattonella* spp.の赤潮発生時，夜間よりも昼間に高い確率でヤコウチュウの細胞内から両種を検出した。以上のことから，結果の解釈に消化や摂食リズムなどを考慮する必要があるが，ヤコウチュウによる有害赤潮プランクトンの摂食解析にLAMP法を適用可能であると考えられた。

水産技術，**12**（1），23－29，2019