

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業

「持続可能な農林水産業推進とフードテック等の振興に対応した未来の食品安全プロジェクトのうち、脂溶性貝毒アザスピロ酸のモニタリング技術の高度化」

令和５年度 研究実績報告書

課題番号	23812757
課題名	脂溶性貝毒アザスピロ酸のモニタリング技術の高度化

研究実施期間	令和５年度～令和９年度（５年間）
代表機関	国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所
研究総括者	松嶋 良次
共同研究機関	国立大学法人 東京大学 大学院農学生命科学研究科
	国立大学法人 高知大学 教育研究部自然科学系農学部門

＜別紙様式2＞研究実績報告書

令和5年度 安全な農畜水産物安定供給のための
包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業
「持続可能な農林水産業推進とフードテック等の振興に対応した未来の食品安全プロジェクト
のうち、脂溶性貝毒アザスピロ酸のモニタリング技術の高度化」
研究実績報告書

I. 研究の進捗状況等

ホタテガイへ培養アザスピロ酸 (AZA) 生産藻類 *Azadinium poporum* の給餌を行い、軟体部を部位ごとに分け各部位のAZAを測定した。ホタテガイにおけるAZA群の分布を明らかにし、AZAの蓄積率を算出した。AZA群の代謝物と推定されるピークを検出した。日本沿岸に出現するアンフィドマ科渦鞭毛藻を定量検出するため、定量PCR (qPCR) 用のプライマーとプローブを作成した。qPCRでのDNA増幅を確認するとともに検量線を作成した。アザスピロ酸産生種を解析対象とする定量メタバーコーディング解析に、適切な遺伝子領域について検討し、28S rDNA D2領域を選定した。本領域のDNA断片を増幅可能なPCRプライマーを開発した。培養したAZA2生産藻類をろ過海水で段階的に希釈し、各希釈段階のAZA2生産藻類を含む海水試料を精製濃縮し、LC/MS/MS分析した。

1. アザスピロ酸の二枚貝の複数種への蓄積特性の解明

ホタテガイへ培養アザスピロ酸 (AZA) 生産藻類 *Azadinium poporum* の給餌を行い、軟体部を部位 (閉殻筋、外套膜、生殖巣、鰓、中腸腺) ごとに分け各部位のAZAを測定した。ホタテガイにおけるAZA群の分布を明らかにし、給餌した *Az. poporum* の毒量から蓄積率を算出した。LC/MS/MS分析によりホタテガイにおけるAZA群の代謝物を検索し、代謝物と推定されるピークを検出した。

2. アザスピロ酸のモニタリング手法の開発

アンフィドマ科渦鞭毛藻を定量検出するため、定量PCR (qPCR) 用のプライマーとプローブを作成した。培養株を用いてqPCRでのDNA増幅を確認するとともに検量線を作成し、検出精度の確認を進めている。*Amphidoma* の一種について、*Amphidoma languida* との形態形質の相違を明らかにするために、鋳板配列を走査電顕で、ピレノイドなど細胞内微細構造を透過電顕で観察した。

アザスピロ酸産生種を解析対象とする定量メタバーコーディング解析に、最も適切な遺伝子領域について検討し、適切な領域として28S rDNA D2領域を選定した。本領域のDNA断片を増幅可能なPCRプライマー (LSUD2MiSeqFow並びにLSUD2MiSeqRev) を開発した。

培養したAZA2生産藻類をろ過海水で段階的に希釈し、各希釈段階のAZA2生産藻類を含む海水試料を逆相固相抽出カラムを用いて精製濃縮し、LC/MS/MS分析した。

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業

「持続可能な農林水産業推進とフードテック等の振興に対応した未来の食品安全プロジェクトのうち、
脂溶性貝毒アザスピロ酸のモニタリング技術の高度化」

令和6年度 研究実績報告書

課題番号	23812757
課題名	脂溶性貝毒アザスピロ酸のモニタリング技術の高度化

研究実施期間	令和5年度～令和9年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所
研究総括者	松嶋 良次
共同研究機関	国立大学法人 東京大学 大学院農学生命科学研究科
	国立大学法人 高知大学 教育研究部自然科学系農学部門

＜別紙様式2＞研究実績報告書

令和6年度 安全な農畜水産物安定供給のための
包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業
「持続可能な農林水産業推進とフードテック等の振興に対応した未来の食品安全プロジェクトのうち、
脂溶性貝毒アザスピロ酸のモニタリング技術の高度化」
研究実績報告書

I. 研究の進捗状況等

令和6年度はムラサキイガイおよびカキに培養アザスピロ酸（AZA）生産藻類 *Azadinium poporum* の給餌を行い、軟体部を部位ごとに分け各部位のAZAを測定した。ムラサキイガイおよびカキにおけるAZA群の分布を明らかにし、AZAの蓄積率を算出した。ムラサキイガイからAZA群の代謝物と推定されるピークを検出した。

前年度に作成した定量PCR（qPCR）用のプライマーとプローブを用い、環境DNA試料からのアンフィドマ科渦鞭毛藻の定量検出を実施し、検出精度の確認を進めた。アンフィドマ科の培養株作成を継続し、日本周辺海域より出現が確認されている *Amphidoma* の1種を記載報告した。前年度に決定した28S rDNA D2領域を解析対象とする定量メタバーコーディングを開発するために、内部標準として用いるDNA3種を設計・調製した。これを現場試料に添加することに先立ち、現場試料に含まれる、rDNA総量を定量可能なqPCRを開発し、海水試料に含まれるrDNA総量を網羅的に解明した。ろ過海水に培養アザスピロ酸産生藻類を添加し、プランクトンネット等によるろ過濃縮条件を検討した。アザスピロ酸産生藻類を含む海水を5 μmメッシュのプランクトンネットでろ過濃縮し、計数によるアザスピロ酸産生藻類の回収率は約60%で、AZA2量は約15%と低い回収率を示した。

1. アザスピロ酸の二枚貝の複数種への蓄積特性の解明

令和6年度はムラサキイガイおよびカキにアザスピロ酸生産藻類 *Azadinium poporum* を連続した4日間給餌し、軟体部を部位ごとに分けて分析試料を調製した。各部位の定量値からムラサキイガイおよびカキにおけるAZA群の分布を明らかにし、給餌した *A. poporum* の毒量から蓄積率を算出した。ムラサキイガイからAZA2の代謝物と推定されるピークが検出された。

2. アザスピロ酸のモニタリング手法の開発

前年度に作成したqPCR用のプライマーとプローブを用い、環境DNA試料からのアンフィドマ科渦鞭毛藻の定量検出を実施し、検出精度の確認を進めた。qPCR用の現場海水試料は相模湾と浦ノ内湾から毎月入手し、環境DNAを抽出して保存している。アンフィドマ科の培養株作成を継続し、日本周辺海域より出現が確認されている *Amphidoma* の1種を記載報告した。

有毒なアンフィドマ科を解析対象とする定量メタバーコーディング解析を行うに際し、前年度に決定した28S rDNA D2領域を解析対象とする定量メタバーコーディングに用いる内部標準としてDNA3種を設計・調製した。現場試料に含まれるrDNA総量を定量可能なqPCRを開発し、海水試料に含まれるrDNA総量を網羅的に解明した。また、高知県浦ノ内湾において定期的にプランクトン試料を採取しこれらを保存した。さらに、本藻の増殖に適した培地選抜試験を実施し、その増殖に適した培地を選抜した。

令和6年度はろ過海水に培養アザスピロ酸産生藻類を添加し、プランクトンネット等によるろ過濃縮条件を検討した。前処理としては95 μmメッシュのプランクトンネットが適していると考えられた。次に約1 cells/mLのアザスピロ酸産生藻類を含む海水を5 μmメッシュのプランクトンネットでろ過濃縮し、計数によるアザスピロ酸産生藻類の回収率と、ろ過濃縮物から検出されたAZA2量を確認した。

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業

「持続可能な農林水産業推進とフードテック等の振興に対応した未来の食品安全プロジェクトのうち、脂溶性貝毒アザスピロ酸のモニタリング技術の高度化」

令和 7 年度 研究実績報告書

課題番号	23812757
課題名	脂溶性貝毒アザスピロ酸のモニタリング技術の高度化

研究実施期間	令和 5 年度～令和 9 年度（5 年間）
代表機関	国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所
研究総括者	渡邊 龍一
共同研究機関	国立大学法人 東京大学 大学院農学生命科学研究科
	国立大学法人 高知大学 教育研究部自然科学系農学部門

＜別紙様式2＞研究実績報告書

令和7年度 安全な農畜水産物安定供給のための
包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業
「脂溶性貝毒アザスピロ酸のモニタリング技術の高度化」
研究実績報告書

I. 研究の進捗状況等

ホタテガイ、ムラサキイガイ、マガキ、ヒオウギガイ、イガイにアザスピロ酸（AZA）生産藻類*Azadinium poporum*を給餌し、各組織に分布するAZAを測定することで、AZAの蓄積率やAZA群の主要代謝物を特定した。また、種によってAZAの代謝能に違いがあることも明らかにした。日本沿岸に出現するアンフィドマ科渦鞭毛藻を定量検出するため、定量PCR用のプライマーとプローブを作成し、環境DNA試料から当該渦鞭毛藻の検出を実施し、検出精度を確認した。実際に、日本沿岸数か所から採取した海水に本法を適用し、現在、モニタリングを進め、出現動向を調べている。定量メタバーコーディング解析に必要な内部標準として用いるDNA3種を設計・調製し、海水試料に含まれるrDNA総量を網羅的に解析することで、最適な内部標準添加濃度を求め、定量メタバーコーディング法を開発した。海水に含まれるAZA2の分析法として、小径の孔を有するフィルターを用いることで、回収率を旧法での15%から52%へと高めることに成功した。

1. アザスピロ酸の二枚貝の複数種への蓄積特性の解明

ホタテガイ、ムラサキイガイ、カキ、ヒオウギガイ、イガイの5種の二枚貝に対しアザスピロ酸生産藻類を給餌したところ、これらの二枚貝においてAZA群の蓄積が確認された。給餌したホタテガイ、ムラサキイガイ、ヒオウギガイ、イガイ試料からは、給餌したアザスピロ酸生産藻類の主要毒に対する代謝物を検出した。さらに、給餌試料を部位別分析したところ、ムラサキイガイ、イガイ、マガキでは代謝物を含むアザスピロ酸群が中腸腺に有意に蓄積する一方、ホタテガイおよびヒオウギガイでは中腸腺および鰓に主として蓄積するという種間差が明らかとなった。

2. アザスピロ酸のモニタリング手法の開発

日本沿岸に出現するアンフィドマ科渦鞭毛藻を定量検出するため、定量PCR用のプライマーとプローブを作成し、環境DNA試料から当該渦鞭毛藻の検出を実施し、検出精度を確認した。実際に、日本沿岸数か所から採取した海水に本法を適用し、現在、モニタリングを進め、出現動向を調べているが、特徴的な出現動向は認められていない。定量メタバーコーディング解析に必要な内部標準として用いるDNA3種を設計・調製し、海水試料に含まれるrDNA総量を網羅的に解析することで、最適な内部標準添加濃度を求めた。以上より、定量メタバーコーディング法を開発することに成功した。海水に含まれるAZA2の分析法として、極めて小径の孔を有するフィルターを用いることで、プランクトンネットを用いた従来法での15%から52%へと回収率を高めることに成功した。