北海道における外来種マンハッタンボヤ *Molgula manhattensis* (DeKay, 1843) の初記録First Occurrence of the Invasive Ascidian *Molgula manhattensis* (DeKay, 1843) (Urochordata, Ascidiacea) in Hokkaido, Japan金森 誠^{1), 2), *}・川崎琢真³⁾¹⁾ 地方独立行政法人北海道立総合研究機構函館水産試験場 〒041-0051 北海道函館市弁天町 20-5²⁾ 北海道大学大学院水産科学研究院 〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1³⁾ 地方独立行政法人北海道立総合研究機構栽培水産試験場 〒051-0013 北海道室蘭市舟見町 1-156-3Makoto KANAMORI^{1), 2), *} and Takuma KAWASAKI³⁾¹⁾ Hakodate Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, 20-5, Benten, Hakodate, Hokkaido 041-0051, Japan²⁾ Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1, Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan³⁾ Mariculture Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, 1-156-3, Funami, Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan

Abstract: We present the first report to our knowledge of an alien ascidian *Molgula manhattensis* (DeKay, 1843) from Akkeshi-ko Estuary in Hokkaido. *M. manhattensis* was identified through molecular analysis using about 840 bp of nuclear 18S rRNA and about 546 bp of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 (mt-CO1) genes, and by evaluating its morphological and biological characteristics. The 18S rRNA gene analysis and evaluations of the morphological and biological features are considered more preferable than mt-CO1 gene analysis for the identification of *M. manhattensis*, because the mt-CO1 genes of *M. manhattensis* and the congener *M. provisionalis* in the GenBank at National Center for Biotechnology Information (NCBI) are identical. Akkeshi-ko Estuary is a known production area of cultured oyster (*Crassostrea gigas*); the introduction of *M. manhattensis* possibly occurred during oyster cultch transfer from Honshu. Our findings show that the distribution of *M. manhattensis* has expanded over a wide range in Japan (from Kyushu to Hokkaido) during the 40 years since it was first reported in Japan.

Key Words: Hokkaido, invasive ascidian, molecular analysis, *Molgula manhattensis*, morphology

はじめに

マンハッタンボヤ *Molgula manhattensis* (DeKay, 1843) は北大西洋原産の単体性のホヤで、体は球形、直径は大きくとも 3 cm 程度、沿岸域において、時に高密度に発生する (Lambert & Lambert 1998; 西川 2009)。マンハッタンボヤはその学名が示すとおり、アメリカ東海岸で発見されたホヤであるが、後にヨーロッパ沿岸でも分布が確認されている (Berrill 1950; Monniot 1969)。そのため、現在は大西洋をはさんで両大陸に分布する起源不明種 (cryptogenic species) とされている (Haydar *et al.* 2011)。マンハッタンボヤは世界中に外来種として分布を広げており、北米太平洋沿岸 (Lambert 2001)、オーストラリア (Kott 1985)、ロシア日本海沿岸 (Zvyagintsev *et al.* 2003)、韓国 (Pyo *et al.*

2012) などで報告がある。日本では 1972 年の広島県沿岸の塩性湿地での発見が初記録である (Tokioka & Kado 1972)。その後、1970 年代から 90 年代にかけて、東京湾、浜名湖、伊勢湾、愛知県沿岸、大阪湾、愛媛県沿岸、洞海湾で発見されている (大谷 2002; 西川 2002)。2000 年代に入り、島根県中海 (石田・安木 2006)、宮城県松島湾 (宮城県 2008) で記録があり、分布域は九州から東北まで及んでいると考えられる。このホヤは北米において、アメリカカガキ (*Crassostrea virginica*) 上に普通に見られ、最も優占する付着生物の一つとされる (Galtsoff 1964)。そのため、当初、国内においても二枚貝養殖漁業への影響が懸念されていた (荒川 1985) が、これまでのところ、このホヤによる漁業被害は報告されていない (西川 2009)。

北海道では、2008 年以降、マンハッタンボヤと同じく、北大西洋原産の単体性ホヤであるヨーロッパザラボヤ *Ascidella aspersa* (Müller, 1776) が、噴火湾の養殖ホタテガイに大量付着し、深刻な漁業被害が発生している (水産庁 2011; 金森 2012)。そのため、北海道水産林務部および

Received 13 March 2014 Accepted 14 April 2014

* Corresponding author

E-mail: kanamori-makoto@hro.or.jp

Fig. 1. A, Ascidians attached to cultured oysters in Akkeshi-ko Estuary, eastern Hokkaido. B, Ascidians removed from their shells and extending their siphons in seawater. Picture A was provided by N. Hasegawa, National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency.

Fig. 2. Maps showing the locality of Akkeshi-ko Estuary in Hokkaido and the collection sites in Akkeshi-ko Estuary. Samples were collected from A, B, and C on June 23, 2010 and from D on October 3, 2012.

北海道立総合研究機構函館水産試験場が、2010年から道内におけるヨーロッパザラボヤの分布調査を実施している。この調査において、北海道東部厚岸湖の養殖カキにマンハッタンボヤと外観が非常に類似した単体性のホヤが多数付着していることが判明した (Fig. 1)。

本報は、今回、厚岸湖から採取されたホヤが形態査定、遺伝子解析及びその生態的な特徴からマンハッタンボヤと結論づけられ、本種の北海道からの初記録であることを報告する。

材料と方法

材料

種同定に用いた標本は、北海道東部厚岸湖の養殖カキ上から、2010年6月23日に釧路地区水産技術普及指導所職員により、2012年10月3日に独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所に勤務していた長谷川夏樹博

士により採取され、海水に入った状態で、函館水産試験場に送付された (Fig. 2)。送付された標本は、形態査定用に5%ホルマリン海水で固定された。また、2012年10月の標本の一部は、遺伝子解析に用いるため、99.5%エタノールで固定された。

形態査定

形態査定用に固定した標本から9個体 (2010年6月の標本4個体；体長10.4~17.2 mm, 2012年11月の標本5個体；体長15.4~22.8 mm) を選び、解剖用ハサミとピンセットを用いて、被囊より筋膜体を取り出し、筋膜体外観を観察し、デジタルカメラ (Olympus μ Tough-8000) により撮影を行った。次に入水孔から腹側に沿って、鰓嚢を切り開き、マイヤーヘマトキシリン (×2) (和光純薬工業株式会社) により染色した後に鰓嚢内を観察し、顕微鏡専用デジタルカメラ (Nikon DS-Fi1) により撮影を行った。

遺伝子解析

フクロボヤ属の遺伝子解析には、生殖巣が用いられる (Huber *et al.* 2000; Haydar *et al.* 2011; Pyo *et al.* 2012). 遺伝子解析用にエタノール固定した標本から5個体 (体長 10.2~12.9 mm) を選び、被嚢を取り除き、筋膜体外観の観察を行った後、筋膜体の両側にある生殖巣を筋膜ごと切り取った。生殖巣を採取した標本も形態査定と同様の方法で、鰓嚢内の観察を行い、形態査定に用いた標本と同じ特徴を持

つことを確認した。採取した生殖巣は、DNA 抽出キット (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega 社) により DNA を抽出した。得られた DNA 溶液は、分光光度計 (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific 社) を用いて濃度測定を行い、PCR 反応に供するまで -30℃ で保存した。

抽出した DNA を鋳型とし、18S リボゾーム RNA (18S rRNA) およびミトコンドリア COI (mt-COI) をコードする遺伝子の部分配列を PCR 法により増幅した。18S rRNA

Fig. 3. Mantle body and internal morphological features of *Molgula manhattensis*. A, Left side; B, Right side; C, Six branchial folds; D, Stigma; E, Tentacles; F, Dorsal tubercle. 1. Oral siphon; 2. Atrial siphon; 3. Branchial sac; 4. Intestine; 5. Gonads; 6. Kidney; 7. Branchial folds; 8. Dorsal tubercle; 9. Stigmata; and 10. Tentacle.

のPCR反応に用いたプライマーは、18SA: 5'-AGCAGCC-GCGGTAATTCCAGCTC-3'および18SB: 5'-AAAGGGCAG-GGACGTAATCAACG-3' (Wada *et al.* 1992), mt-CO1のPCR反応に用いたプライマーは、HCO2198: 5'-TAAACTT-CAGGGTGACCAAAAAATCA-3'およびLCO1490: 5'-GGT-CAACAAATC ATAAAGATATTGG-3' (Folmer *et al.* 1994)である。それぞれ10 µL反応系にて10×Ex Taq Buffer (タカラバイオ株式会社) 1 µL, 2.5 mM dNTP Mixture (タカラバイオ株式会社) 0.8 µL, 5 µM プライマー各0.5 µL, TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社) 0.05 µL, DNAのサンプル10–100 ngの割合でPCR反応液を作成した。PCR反応は、サーマルサイクラー (Veriti Thermal Cycler, Life Technologies 社) を用いて94℃で2分間の初期変性反応の後、94℃で30秒間の変性/54℃で1分間の会合/72℃で1分間の伸張を35回繰り返し、72℃で7分間の最終伸張を行った。PCR産物は、市販の精製キット (ExoSAP-IT, Affymetrix/USB 社) を用いてプライマーおよび未反応dNTPsの除去を行い、塩基配列解析用サンプルとして、再び–30℃で保管した。

プライマー除去を行ったPCR産物を鋳型とし、シークエンスPCRキット (BigDye ver. 3.1, Life Technologies 社) を用いてシークエンス反応を行った後、シークエンス産物精製キット (Agencourt CleanSEQ Kit, Beckman Coulter 社) を用いて精製し、キャピラリーシークエンサー (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer, Life Technologies 社) を用いて塩基配列の決定を行った。

フクロボヤ科の種の特徴を記述する場合、鰓嚢内の鰓褶数は、必ず言及される重要な形質である (Van Name 1945; Monniot 1969; Kott 1985; 西川 1995)。後述のとおり、厚岸湖で採取された標本を解剖した結果、全ての標本で鰓褶数は左右とも6であった (Fig. 3C)。そのため、GenBank (National Center for Biochemical Information) に登録されているフクロボヤ属の中で、鰓褶数が6とされる種: マンハッタンボヤ *Molgula manhattensis* (18S rRNA; L12426, HM574380, mt-CO1; HM574345–49, JQ742950), *M. provisionalis* (18S rRNA; L12434, HM574389, mt-CO1; HM574376), *M. socialis* (18S rRNA; L12436, HM574390, mt-CO1; HM574377–79), *M. arenata* (18S rRNA; AY903919), *M. occidentalis* (18S rRNA; L12428, FM244850, mt-CO1; AY116608) および鰓褶数が6もしくは7とされる種: *M. complanata* (18S rRNA; L12422) を配列比較の対象とし、厚岸湖の標本より得られた塩基配列とともに、MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) 上のClustal Wでアライメントを行った。アライメントを行ったデータセットについて、MEGA5を用いて、BICによる最適な塩基置換モデルの検討および最適モデルを用いた最尤推定系統樹の作成を行った。系統樹作成にあたり外群としてエボヤ *Styela clava* (18S rRNA; L12442, mt-CO1; FJ528636) およびマボヤ *Halocynthia roretzi* (18S rRNA; AB013016, mt-CO1; AB024528)、初期系統樹として近隣結合法 (NJ/

BioNJ法) による系統樹、発見的検索法としてSPR (Subtree-Pruning-Regrafting) を用いた。各分岐の信頼性は、1,000回反復によるブートストラップ確率により評価した。なお、配列比較の対象としたフクロボヤ属種のうち、国内での分布が確認されているのはマンハッタンボヤだけであるが、*M. provisionalis* および *M. socialis* はマンハッタンボヤと形態が非常に似ており (Van Name 1945; Monniot 1969), *M. socialis* は、しばしばマンハッタンボヤと混同されていることが指摘されている (Arenas *et al.* 2006)。

結 果

形態査定

標本の形状は球形で、長い入水管を有し、出水管より入水管の方が長い (Fig. 1B)。被嚢は薄く、半透明で、消化管や生殖腺の形状が被嚢上からうっすらと観察される。被嚢を取り除くと、筋膜体両側に生殖腺、左面に消化管が観察される (Fig. 3A, B)。消化管は非常に深い第2腸環を有し、その内側に生殖腺を確認できる。右面の生殖腺は腎嚢とほぼ平行で、精巣と卵巣は分離していない。卵巣は細長い嚢状、出水孔側に輸卵管が開口している。精巣は主に卵巣の腹側と反開口端を覆っている。鰓嚢内の鰓褶数は左右ともに6 (Fig. 3C)、鰓孔は不規則で複雑な構造を示し (Fig. 3D)、入水孔触手は樹状 (Fig. 3E)、繊毛溝は馬蹄形であった (Fig. 3F)。

遺伝子解析

18S rRNA 領域の配列は845 bpを読み取ることができ、厚岸湖産の5個体から得られた配列は全て同じであった。Clustal Wを用いたアライメントにより、840 bpのデータセットが得られた。アライメントの結果、厚岸湖産のホヤから得られた配列は、データベースから取得したマンハッタンボヤの18S rRNAの配列 (HM574380) と同一であった。BICによるモデル選択では、座位間の変異率の違いを離散化ガンマ分布により近似した木村の2変数モデル (Kimura 1980, カテゴリー数5, シェイプパラメータ [+G] = 0.0500) が選択された。このモデルで推定された最尤系統樹 (ML = –1879.5125) では、厚岸湖産の標本とデータベースから取得したマンハッタンボヤ (HM574380, L12426) は同一のグループとなり、98%のブートストラップ確率で支持された (Fig. 4)。mt-CO1 領域は、625 bpを読み取ることができ、18S rRNA 同様、5個体で同じ配列であった。Clustal Wを用いたアライメントにより、546 bpのデータセットが得られた。アライメントの結果、厚岸湖産のホヤから得られた配列は、データベースから取得したマンハッタンボヤのmt-CO1 領域の配列 (HM574345, JQ742950) および *M. provisionalis* のmt-CO1 領域の配列 (HM574376) と同一であった。BICによるモデル選択では、座位間の変異率の違いを離散化ガンマ分布により近似した田村と根井のモデル (Tamura & Nei 1993, カテゴリー数5, シェイプ

Fig. 4. Molecular phylogenetic analysis of *Molgula* species with six branchial folds using the 18S rRNA dataset obtained via maximum likelihood method (the highest log likelihood = -1879.5125). Accession numbers AB921971-75 were obtained from our results. *Styela clava* (GenBank, L12442) and *Halocynthia roretzi* (GenBank, AB013016) were chosen as the outgroups. Numbers on the branches are the bootstrap probabilities (%) after 1000 replications. The scale bar indicates the number of substitutions per site.

パラメータ $[+G]=0.5974$ が選択された。このモデルで推定した最尤系統樹 (ML = -2391.9730) では、厚岸湖産の標本とデータベースから取得したマンハッタンボヤ (JQ742950, HM574345-49) および *M. provisionalis* (HM574376) が同一のグループとなり、99%のブートストラップ確率で支持された (Fig. 5)。

考 察

北海道厚岸湖の養殖カキに付着するホヤは、解剖による形態查定の結果、消化管、生殖腺の配置、鰓褶数、鰓孔、入水孔触手および繊毛溝の形状は、全てマンハッタンボヤの特徴 (Van Name 1945; Tokioka & Kado 1972; Kott 1985) と一致した (Fig. 3)。また、厚岸湖産の標本から得られた 18S rRNA 領域の配列は、データベースから取得したマンハッタンボヤと一致し、推定された系統樹において、形態が類似した近縁種 (*M. provisionalis* および *M. socialis*) と区別された (Fig. 4)。マンハッタンボヤの 18S rRNA 領域の配列は、これまで複数の研究者によって多くの標本が解析され、いずれもほぼ同じ配列が得られている (Hadfield *et al.* 1995, L12426; Hayder *et al.* 2011, HM574380-88; Pyo *et*

al. 2012, JN573245-60)。従って、データベースから取得した配列の信頼性は高く、今回の解析結果は、厚岸湖産の標本がマンハッタンボヤであることを強く支持するものである。一方、mt-CO1 領域の配列は、マンハッタンボヤだけでなく、*M. provisionalis* と一致し、推定された系統樹では厚岸湖産の標本、マンハッタンボヤおよび *M. provisionalis* が同一グループとなった (Fig. 5)。*M. provisionalis* を記載した Van Name (1945) は、この種について、外観および内部形態ともにマンハッタンボヤによく似ているとした上で、「大きくても体長は約 10 mm で、マンハッタンボヤよりかなり小型であること」および「マンハッタンボヤと異なり、群生しないこと」を特徴として挙げている。今回、厚岸湖で採取した標本は、体長 10~20 mm の個体が普通に見られ、養殖カキ上に群生していることから、生態的な特徴は *M. provisionalis* の記載とは異なる (Fig. 1A)。また、Van Name (1945) は *M. provisionalis* の内部形態の特徴として「卵巣壁が連続した丸みのある袋を形成し、筋膜上からでも容易に観察されること (The walls of the ovary are produced into a series of rounded pouches, very easily seen through the mantle, pp. 390)」を指摘し、この点でマンハッタンボヤとは異なるとしている。今回、入手した厚岸湖産

Fig. 5. Molecular phylogenetic analysis of *Molgula* species with six branchial folds using the mt-CO1 dataset obtained via maximum likelihood method (the highest log likelihood = -2391.9730). Accession numbers AB922015-19 were obtained from our results. *Styela clava* (GenBank, FJ528636) and *Halocynthia roretzi* (GenBank, AB024528) were chosen as the outgroups. Numbers on the branches are the bootstrap probabilities (%) after 1000 replications. The scale bar indicates the number of substitutions per site.

の標本では、*M. provisionalis* の卵巣の特徴は観察されなかった。以上の結果から、我々は、厚岸湖の養殖カキに群生するボヤをマンハッタンボヤと同定し、これは本種の北海道からの初記録となる。

M. provisionalis の mt-CO1 領域の配列 (HM574376) をデータベースに登録した Haydar *et al.* (2011) は、その配列が、彼らがハプロタイプ 1 として登録したマンハッタンボヤの配列 (HM574345) と一致することに言及した上で、核 DNA (18S rRNA 領域) の解析結果から、*M. provisionalis* を独立した種と考えている。また、核 DNA (18S rRNA および 28S rRNA) の解析結果からフクロボヤ科の無尾幼生の進化について検討を行った Huber *et al.* (2000) も有尾幼生のマンハッタンボヤと無尾幼生の *M. provisionalis* を別種として議論を行っている。それに対して、Pyo *et al.* (2012) は、形態的な特徴に明確な差が乏しく、mt-CO1 領域の配列で区別できないマンハッタンボヤと *M. provisionalis* については、厳密な形態比較による分類の再検討を求めている。仮に、*M. provisionalis* が独立した種であった場合、現在登録されている DNA データベースを利用した

mt-CO1 領域の比較では、*M. provisionalis* とマンハッタンボヤは区別できない。上記の議論に結論が得られるまで、マンハッタンボヤの同定に際しては、核 DNA (18S rRNA 領域) の解析や形態 (鰓褶数、生殖腺等) および生態的な特徴 (サイズ、付着状況等) の観察を重視する方が良いであろう。

今回、入手したマンハッタンボヤの標本には、卵巣、精巣が発達した成熟個体が含まれていた。また、2012 年 10 月にマンハッタンボヤが採取された養殖カキは、厚岸町内の種苗生産施設で生産されたものであり、マンハッタンボヤは厚岸湖内に垂下後、養殖カキに付着したものと考えられる。さらに、釧路地区水産技術普及指導所が 2010～2011 年に厚岸湖の養殖カキ上のマンハッタンボヤを調査した結果では、いずれの年も養殖カキ上にマンハッタンボヤが付着し、8 月～9 月にその個体数が増加し、本種が厚岸湖において、夏季～秋季に繁殖していると推測している (釧路総合振興局釧路地区水産技術普及指導所 2012)。マンハッタンボヤは厚岸湖内で繁殖および新規加入していると見られ、この水域に既に定着していると考えられる。厚岸湖と周辺湿地は、ラムサール条約 (特に水鳥の生息地と

して国際的に重要な湿地に関する条約)の条約湿地として、自然環境の適正利用と保全が図られている水域である(環境省 2013)。低塩分耐性が高く(西川 2002)、塩性湿地にも分布するマンハッタンボヤの定着が、条約湿地の生態系に与える影響について、今後、慎重に検討していく必要がある。

我々の知る限り、これまで北海道では、厚岸湖以外からマンハッタンボヤは見つかっていない。厚岸湾および厚岸湖は年間生産量 280 t、生産額 7.5 億円(2007~2011 年平均)を誇る北海道有数の養殖カキの産地であり(北海道 2012; 北海道 2013)、毎年、カキ原盤(多数の稚ガキが付着したホタテガイ殻)が本州から導入されている。養殖カキは、海洋性外来種の主要なベクターの一つと考えられており(荒川 1985; Carlton 2003)、厚岸湖へのマンハッタンボヤの導入は、養殖カキの国内移動に伴って起きたのかもしれない。

既に述べたようにマンハッタンボヤは 1972 年に国内で初めて発見され、これまで九州から東北で記録されていた。本報で報じた 2010 年の北海道でのマンハッタンボヤの記録は、海外から侵入した外来ホヤが、初記録から約 40 年後に日本列島(九州~北海道)の全域で見られるようになったことを示している。ただし、東北地方および北海道における本種の情報は限られており、今後も情報を集積する必要があるだろう。また、近年、国内に侵入し、北日本のホタテガイ養殖漁業で被害をもたらしている外来種ヨーロッパザラボヤもマンハッタンボヤと同じ「世界中の温帯~冷帯に分布を広げている北大西洋原産の単体性のホヤ」であり、数十年という時間スケールで国内の分布域が大きく拡大する恐れがある。国内の養殖漁業が盛んな海域では、水産種苗などの国内移動による新たな外来ホヤの侵入とそれに伴う漁業被害の発生に常に警戒が必要だと考えられる。

謝辞: マンハッタンボヤの解剖方法、形態的な特徴および近縁種に関する貴重な文献を教示いただくとともに、本報の執筆を助めていただいた東邦大学理学部の西川輝昭教授、遺伝子解析に関して、貴重な助言をいただいた独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所の大原一郎博士、田邊晶史博士、北海道立総合研究機構栽培水産試験場の清水洋平博士、厚岸湖での標本採取・送付を行っていただいた独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所の長谷川夏樹博士と釧路地区水産技術普及指導所の職員の方々、そして原稿の校閲をいただいた 2 名の匿名査読者にお礼申し上げる。

引用文献

- 荒川好満 1985. 食用カキ移植に伴う付着生物の侵入—。沖山宗雄・鈴木克美(編), 日本の海洋生物 侵略と攪乱の生態学, 東海大学出版会, 東京, pp. 69-78.
- Arenas, F., J. D. D. Bishop, J. T. Carlton, P. J. Dyrinda, W. F. Farnham, D. J. Gonzalez, M. W. Jacobs, C. Lambert, G. Lambert, S. E. Nielsen, J. A. Pederson, J. S. Porter, S. Ward and C. A. Wood 2006. Alien spe-

- cies and other notable records from a rapid assessment survey of marinas on the south coast of England. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86: 1329-1337.
- Berrill, N. J. 1950. *The Tunicata with an account of the British species*. Ray Society, London, 354 pp.
- Carlton, J. T. 2003. Community assembly and historical biogeography in the North Atlantic Ocean: the potential role of human-mediated dispersal vectors. *Hydrobiologia*, 503: 1-8.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
- Galtsoff, P. S. 1964. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin*, 64: 1-480.
- Hadfield, K. A., B. J. Swalla and W. R. Jeffery 1995. Multiple origins of anurid development in ascidians inferred from rDNA sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 40: 413-427.
- Haydar, D., G. Hoarau, J. L. Olsen, W. T. Stam and W. J. Wolff 2011. Introduced or glacial relict? Phylogeography of the cryptogenic tunicate *Molgula manhattensis* (Ascidacea, Pleurogona). *Diversity and Distributions*, 17: 68-80.
- 北海道 2012. 平成 19 年~平成 22 年北海道水産現勢. 北海道水産林務部(編), URL: <http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/sum/kcs/indexfiles/sui-toukei/suitoukei.htm> [Accessed 27 Nov. 2013].
- 北海道 2013. 平成 23 年北海道水産現勢. 北海道水産林務部(編), URL: <http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/sum/kcs/indexfiles/sui-toukei/suitoukei.htm> [Accessed 27 Nov. 2013].
- Huber, J. L., K. B. da Silva, W. R. Bates and B. J. Swalla 2000. The evolution of anurid larvae in molgulid ascidians. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 11: 419-426.
- 石田健次・安木 茂 2006. 漁場造成実証試験(穴道湖・中海水産振興事業). 平成 17 年度島根県内水面水産試験場事業報告書, 90-97.
- 金森 誠 2012. 噴火湾の「ザラボヤ」の正体—外来種ヨーロッパザラボヤ—. 試験研究は今, 707, URL: <http://www.fishexp.hro.or.jp/cont/marine/o7u1kr0000006st7.html> [Accessed 1 Mar. 2013].
- 環境省 2013. 厚岸湖・別寒辺牛湿原. 環境省自然環境局野生生物課(編), 日本のラムサール条約湿地—豊かな自然・多様な湿地の保全と賢明な利用—, pp. 19, URL: http://www.env.go.jp/nature/ramsar_wetland/pamph02/index.html [Accessed 11 Mar. 2014].
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- 釧路総合振興局釧路地区水産技術普及指導所 2012. マンハッタンボヤ付着状況調査指導. 北海道水産林務部(編), 平成 23 年度水産業改良普及事業普及活動事例集, pp. 95-104.
- Kott, P. 1985. The Australian Ascidacea Part I, Phlebobranchia and Stolidobranchia. *Memoirs of Queensland Museum*, 23: 1-440.
- Lambert, G. 2001. A global overview of ascidian introductions and their possible impact on the endemic fauna. In *The biology of ascidians*, Sawada, H., H. Yokosawa and C. C. Lambert (eds.), Springer-Verlag, Tokyo, pp. 249-257.
- Lambert, C. C. and G. Lambert 1998. Non-indigenous ascidians in southern California harbors and marinas. *Marine Biology*, 130: 675-688.
- 宮城県 2008. 平成 20 年度環境技術実証事業 閉鎖性海域における水環境改善技術分野 実証試験結果報告書(簡易なアカモク漁場造成手法), 62 pp.
- Monniot, C. 1969. Les Molgulidae des mers Européennes. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle—Série A, Zoologie*, 60: 172-272.
- 西川輝昭 1995. 脊索動物門 CHORDATA. 西村三郎(編), 原色

- 検索日本海岸動物図鑑 II, 保育社, 大阪, pp. 573–610.
- 西川輝昭 2002. マンハッタンボヤ. 日本生態学会 (編), 外来種ハンドブック, 地人書館, 東京, pp. 178.
- 西川輝昭 2009. 外来ホヤ類研究の魅力と課題. 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, 神奈川, pp. 99–104.
- 大谷道夫 2002. 日本における移入付着動物の出現状況, 最近の動向, *Sessile Organisms*, 19(2): 69–92.
- Pyo, J., T. Lee and S. Shin 2012. Two newly recorded invasive alien ascidians (Chordata, Tunicata, Ascidiacea) based on morphological and molecular phylogenetic analysis in Korea. *Zootaxa*, 3368: 211–228.
- 水産庁 2011. 平成 22 年度水産白書, 130 pp. URL: http://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_jfa/h22/ [Accessed 5 Aug. 2013].
- Tamura K. and M. Nei 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512–526.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Tokioka, T. and Y. Kado 1972. The occurrence of *Molgula manhattensis* (De Kay) in brackish water near Hiroshima, Japan. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, 21(1): 21–29.
- Van Name, W. G. 1945. The North and South American Ascidians. New York, American Museum of Natural History. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 84: 1–476.
- Wada, H., K. W. Makabe, M. Nakauchi and N. Satoh 1992. Phylogenetic relationships between solitary and colonial ascidians, as inferred from the sequence of the central region of their respective 18S rDNAs. *Biological Bulletin*, 183: 448–455.
- Zvyagintsev, A. Y., K. E. Sanamyan and M. D. Koryakova 2003. The introduction of the ascidian *Molgula manhattensis* (De Kay, 1843) into Peter the Great Bay (Sea of Japan). *Sessile Organisms*, 20(1): 7–10.