

二枚貝類資源量評価のための生化学的手法の開発

実施機関名：水産庁瀬戸内海区水産研究所海洋環境部浅海生物生産研究室・浜口昌巳

調査実施年度：平成10～12年度

1. 緒言

アサリ等の有用二枚貝の大部分は発生初期に3週間程度の海中を遊泳するプランクトンとしての浮遊生活期を持つので、海流や潮流によつての移動分散が大きいことが知られている。そのために、ある海域に漁場等を造成し、自然発生による幼生を利用してアサリ増殖を計る際には、造成漁場等にどこから、どのくらいの幼生が供給されるのか？をあらかじめ調べる必要がある。我々は過去2期の沿整アサリ直轄調査の結果、瀬戸内海等の内海域におけるアサリ漁場造成には図1に示すような大別して2つのモデルを提唱するにいたつた。そのうちひとつは天然発生するアサリ浮遊幼生を資源として漁場に添加させ出荷サイズまでその場で育成するものであり、もうひとつは種苗を他地域から移入してその場で生育させて出荷するものである。このモデルによる漁場造成を行う際には、漁場を造成する海域内でアサリ浮遊幼生がどこから供給され、どのように移動しているのかといった動態を調べる必要がある。これまでに、当研究室では海域での浮遊幼生の動態を調べるために新しい手法を開発したが、それを野外調査に適用するためには各海域で実際に使用し、その問題点を抽出し、改良する必要がある。

いっぽう、図1に示したモデルのなかで、資源量の影響を及ぼすと思われる要因のひとつに食害生物による被食や大量への死の原因となる感染症等による減耗が考えられる。これまでに、当研究室ではアサリ初期稚貝の野外における被食者の同定法¹⁾や近年、国内のアサリで問題となっている感染症について報告してきた²⁾。

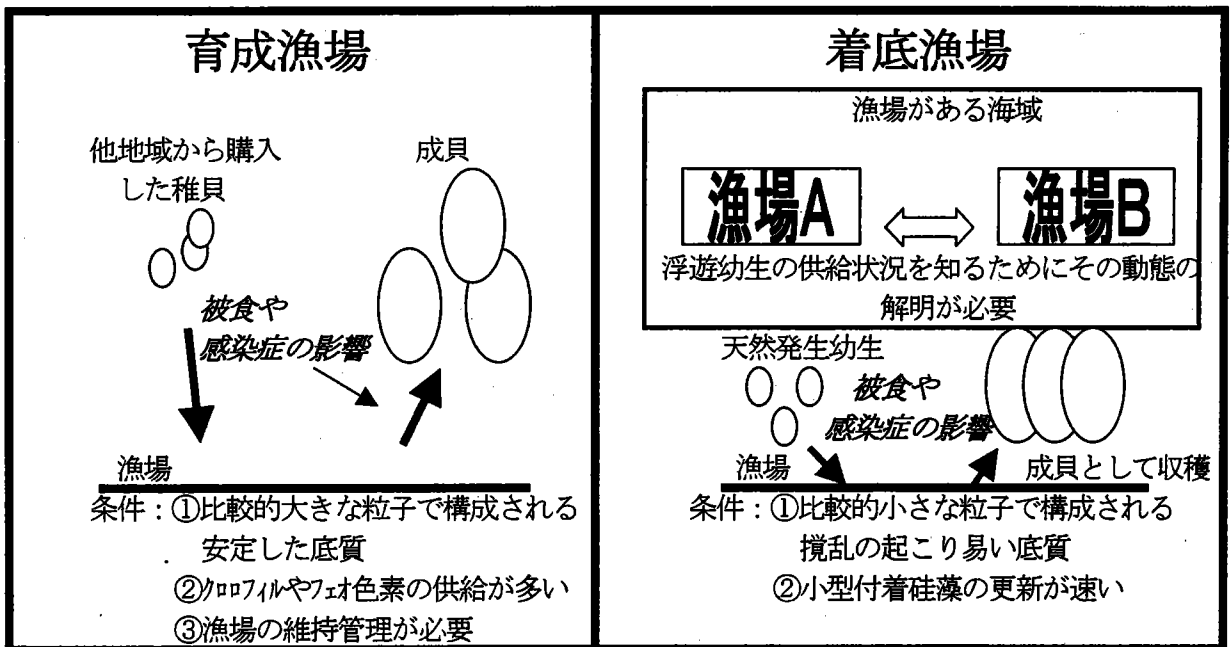


図1. 内海域におけるアサリ漁場行使モデル

そこで、本課題では二枚貝類資源量評価のための浮遊幼生の同定手法を野外試験に適したものとするために北海道、愛知県、三重県と共同でそれぞれの海域で調査を実施して問題点等を検討するとともに、アサリの資源の減耗要因となりうるがこれまでに調査されてこなかった。感染症等の診断法を

開発するとともに、その実態について調査した。さらに、資源加入に影響を及ぼすと考えられる捕食量を定量するための手法を開発する目的で調査を行った。

2. 調査方法

1) 生化学的手法によるアサリ浮遊幼生同定手法の野外へ適用法の検討

① アサリ浮遊幼生の分布水深の経時的変化

1999年6月19日と7月14日に広島県佐伯郡大野町鳴川沖で水深0.5、2、4、6、8mから海水0.5tをポンプで船上にくみ上げ、目合い100 μ mのプランクトンネットでアサリ幼生を採取した。試料は氷冷しながら研究室に持ち帰り、直ちに目合い100 μ mのネットで濃縮した後、3倍量の蒸留水を加えてアサリ浮遊幼生をガラスシャーレを用いた方法によって分離した。分離した幼生は海水に懸濁した後、 -80°C で保存モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法（以下、MAITと略する）のマニュアルにしたがって蛍光抗体法による分析を行った。対象には、マガキ幼生を用いた

② モノクローナル抗体と交差反応性を示す二枚貝幼生の同定

1998～2000年にかけて広島湾、三河湾、東京湾および北海道野付で採取された二枚貝浮遊幼生のうち、モノクローナル抗体と交差反応性を示す二枚貝浮遊幼生を選別し、従来の交差観察および遺伝子解析によって種を同定した。

2) 生化学的手法によるアサリの捕食者を定量・定性する手法の開発および発生初期のアサリの被食者の同定方法の野外への適用（ヤドカリ類）

① 実験室内におけるアサリ捕食者消化管内容物の検出方法の検討

ヤドカリ類およびヒトデにアサリ成貝軟体部を捕食させ、経時的に消化管を摘出し、これに10倍量のトリス緩衝食塩水（TBS）を加え、ホモジナイズした後、遠心操作を行い上清を得た。上清は酵素抗体法（ELISA）による分析に用いるまで 80°C で保存した。ELISAにはアサリの斧足に発現しているタンパク質を検出するモノクローナル抗体を用いた。モノクローナル抗体の調製は96時間培養したハイブリドーマ上清から硫酸塩析とアフィニティクロマトグラフィーによって行った。精製した抗体は2つに分け、片方をビオチンラベルした。ビオチンラベルしない抗体をTBSで10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように希釈し、ELISAプレートに添加し、 4°C で一晩反応させた。その後、プレートをTween20添加TBS（W-TBS）で2回洗浄した後、2%スキムミルクでブロッキングを行った。W-TBSで洗浄した後、ヤドカリの消化管ホモジナイズ上清をタンパク量1 mg/ml となるようにTBSで調整し、ELISAプレートの各ウェルに50 μl ずつ分注した。室温で2時間反応させた後、W-TBSで3回洗浄し、ビオチン標識した抗体をTBSで5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と希釈した後、各ウェルに添加し、室温で2時間反応させた。その後、W-TBSで3回洗浄した後、一定の濃度となるように希釈したアビジン-Peroxidaseを添加し、室温で一時間反応させた。その後、W-TBSで5回洗浄した後、Peroxidase発色キット（スミロン）によって発色させた後、マイクロプレートリーダーで各ウェルの吸光値を測定した。

② 野外で採取したヤドカリ類の消化管内容物中のアサリ抗原の検出

この時期、アサリ幼生は夕刻の潮に乗って着底するために、その後干潮になり、漁場が干上がった直後にヤドカリ類30個体を採取し、直ちに消化管を摘出した。上記ELISA法によって消化管内容物中のアサリを定量した。一定の吸光値以上の個体についてアサリ捕食があったものとして比率を求めた。また、前浜干潟における着底稚貝数および着底稚貝数とアサリを捕食したヤドカリの比率を求めた。

3) 生化学的手法によるアサリの *Perkinsus* 感染症の診断技術の開発と実態調査

① アサリの *Perkinsus* 診断法の開発

広島県佐伯郡大野町内のアサリから *Perkinsus* 原虫を培養法によって単離し、ITS 等の遺伝子領域の塩基配列の解析を行った。その配列をもとに PCR プライマーを設計し、診断法を開発した。

② *Perkinsus* 感染実態の調査

上記診断法を用いて国内の 74 ヶ所の漁場のアサリの *Perkinsus* 感染の実態調査を行った。

3. 結果および考察

1) 生化学的手法によるアサリ浮遊幼生同定手法の野外へ適用法の検討

① アサリ浮遊幼生の分布水深の経時的変化

マガキおよびアサリ浮遊幼生の分布水深の経時的変化は図 2 に示す。マガキとアサリ浮遊幼生の分布水深は一日のうちでも経時的に変化することが明らかとなった。調査当日の日で 6:13 と 18:46 であった。マガキは正の走光性が強く、日の出とともに 0.5m 層に幼生が集積し、日中は 2m 以浅に平均 80% の幼生が分布していた。それに対し、アサリはマガキほど分布水深の偏りや変化は明瞭でなく、4m 付近が多いものの、その水深への幼生の集積は日中でも最大で 50% 程度であった。また、アサリ浮遊幼生の分布水深に及ぼす塩分等の影響について検討したが、期間中の調査では、調査時刻によってもアサリの分布水深は変化することが明らかとなった。さらに、アサリ幼生は塩分が 30psu の層に集まり、降水によって塩分が低下した場合、水深に関

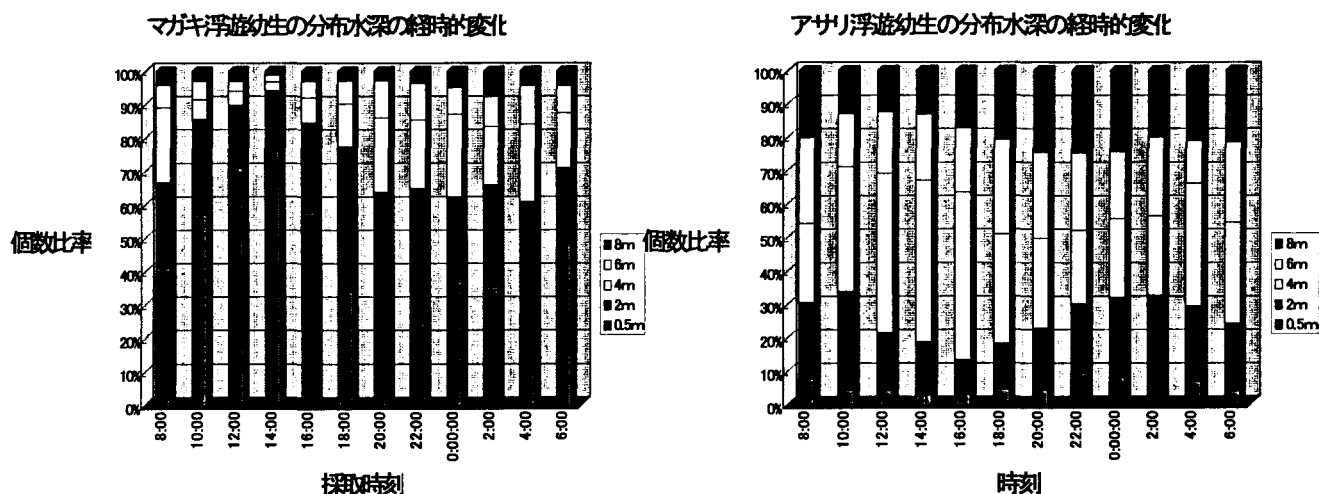


図 2. 広島湾西部海域におけるマガキとアサリ浮遊幼生の分布水深の経時的変化

係なくこの塩分の部分に集積する傾向を示した。これらのことから、アサリ浮遊幼生の調査時には、調査時刻、天候、塩分濃度によって採水水深を変化させる必要があることが明らかとなり、これらの結果は、実際に野外で調査を行う際の指標となると考えている。

② アサリ浮遊幼生同定用モノクローナル抗体と交差反応性を示す二枚貝幼生の同定

国内各地で現在使用中の抗体で交差反応性と思われる反応を示す二枚貝浮遊幼生の存在が明らかになりつつある。このうちほとんどが従来の同定手法では同定が不能であり、現在、遺伝子解析を用いて種の判別を行っているが、該当する親貝の決定には至っていない。表 1 のうち手法の改良による識別の項目は、交差反応性がレクチン由来等の非特異抗体結合タンパク質の存在によるものである場合などはブロッキング反応を加えることによって識別可能となるが、

その可能性について示している。いずれにしても、このような操作上の改良を加えたとしても改良できない種については、本法によって同定を行う際には、透過光による貝殻形態も併せて行うことによって精度を高めることが可能である。また、これらの幼生は、とくに三河湾のイヨスダレガイ等は毎年出現しているわけではなく、年によってその出現状況が異なるようである。

表1 各海域に出現したモノクローナル抗体を交差反応性を示す二枚貝浮遊幼生

海域	交差反応性を示す種	形態による識別	手法の改良による識別
北海道野付	ワスレガイの仲間	可	不可
	種不明	可	可
	種不明	可	可
東京湾	種不明	可	不可
三河湾	イヨスダレガイ	可	不可
	ヒメアサリ	不可	不可
	種不明	可	可
広島湾	なし		

2) 生化学的手法によるアサリの捕食者を定量・定性する手法の開発発生初期のアサリの被食者の同定方法の野外への適用 (ヤドカリ類)

① 実験室内におけるアサリ捕食者消化管内容物の検出方法の検討

ヤドカリ類 (ユビナガホンヤドカリ) の消化管内容物の抗アサリ抗体マウスモノクローナル抗体の反応はいずれの温度でも捕食後 1-3 時間後で最大となり、それ以後は減少し、減少割合は温度が高いほど速やかであった (図3)。いっぽう、ヒトデでは捕食後すみやかに抗体の反応は低下し、検出限界以下となった (図3)。これらのことから、抗体による消化管内容物中のアサリ抗原の検出法はヒトデには適用できないことが明らかとなった。また、ヤドカリ類においても捕食後の経過時間によって反応性は変化することから、野外に適用する場合は捕食時間を推定する必要があると推測された。

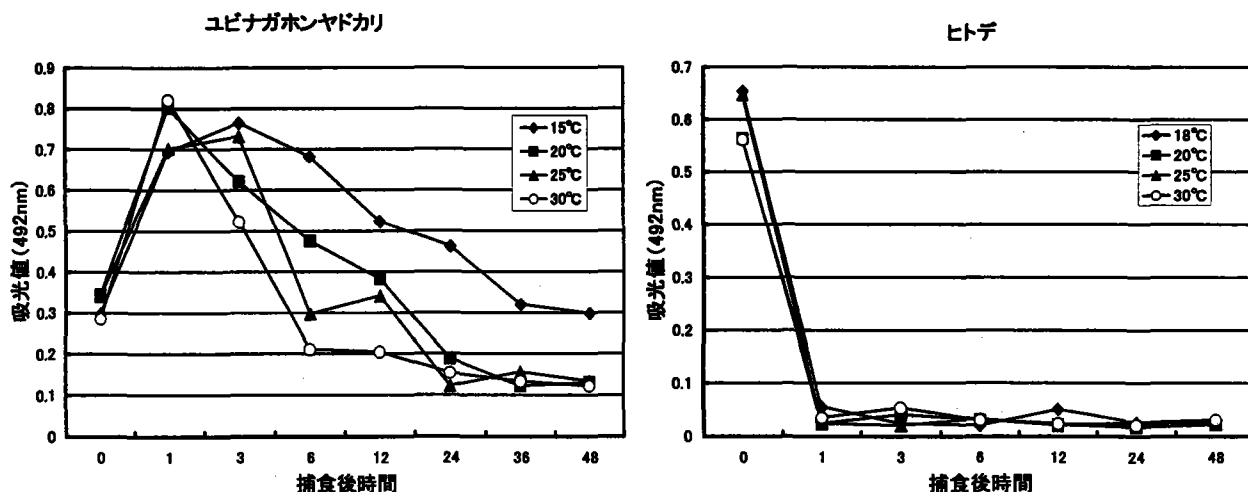


図3. 実験条件下におけるアサリを捕食させた後のヤドカリ類とヒトデの消化管内容物のアサリに対する抗体の反応性の変化

②野外で採取したヤドカリ類の消化管内容物中のアサリ抗原の検出

この時期、アサリ幼生は夕刻の潮に乗って着底するために、その後干潮になり、漁場が干上がった直後にイソガニを採取し、消化管内容物におけるアサリ抗原の有無について検討した結果は下図に示す。調査は3日に分けて行ったが、アサリ着底稚貝の多かった日に採取したイソガニの消化管内容物から高い反応性が認められ、捕食量が多かったことが推測される(図4)。着底稚貝数とアサリ捕食ヤドカリ数の間の相関計数は0.90となり、着底稚貝数とアサリ捕食ヤドカリ数は高い相関を示した(図4)。このことから、アサリ着底期にはヤドカリ類はアサリ稚貝を捕食している可能性が野外調査においても示唆される結果が得られた。しかしながら、捕食者の捕食からの時間経過に伴って抗体の反応性が低下することが知られている。今回調査したイソガニについても行動学的検討から捕食の時間を推定し、サンプリングや数字の補正を行う必要があると思われる。

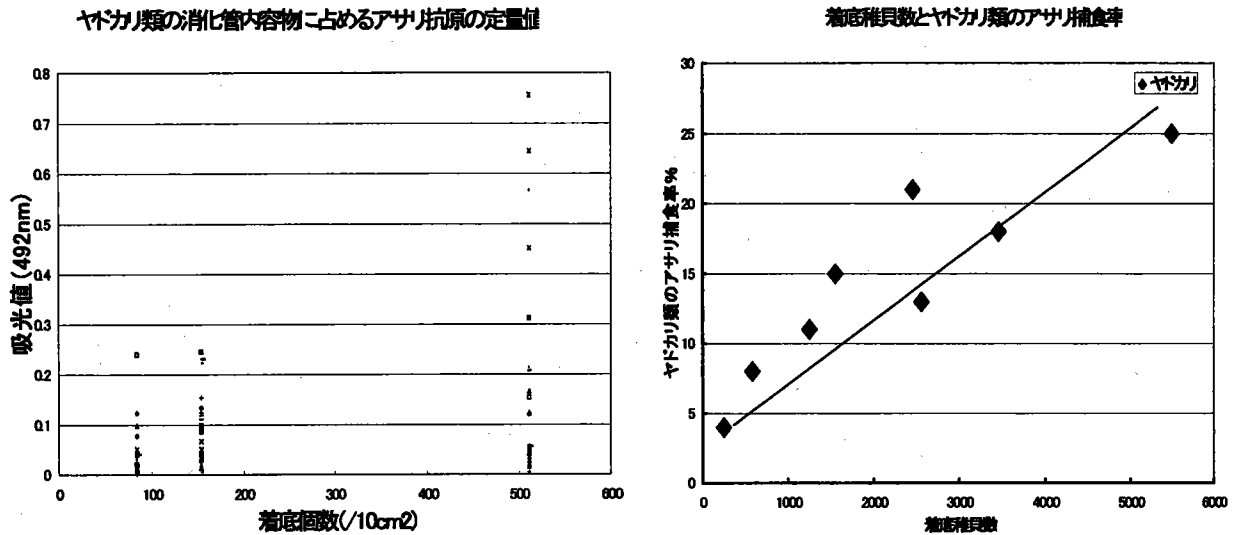


図4. 野外におけるアサリ着底稚貝数とヤドカリ類の捕食量の関係

3) 生化学的手法によるアサリの *Perkinsus* 感染症の診断技術の開発と実態調査

① アサリの *Perkinsus* 診断法の開発

アサリの *Perkinsus* 感染症について *Perkinsus* を単離し、塩基配列を決定した結果、その診断用 PCR プライマーの開発に至った。プライマーの配列は下表に示すとおりである。これによって、PCR 反応を 94℃で 30 秒、62℃で 20 秒、72℃で 45 秒で合計 40 サイクル実施することによって診断が可能となった。

表2. アサリ *Perkinsus* 診断用 PCR プライマー

プライマー名	配列 (5'→3')
PA-1	ATCCCCCACCTGACCGCCTTAACG
PA-1R	CCAAAGACACTCACAGGCGCGGTCC

② *Perkinsus* 感染実態の調査

この方法を用いて国内各地のアサリ漁場から採取したアサリの *Perkinsus* 原虫の保有率と漁場行使別の感染率を調べた結果、日本国内各地のアサリ漁場では *Perkinsus* 原虫はひろく感染

しているが、なかでも漁場の行使状況によって感染率が変化しており、天然漁場と比較して潮干狩り場や漁場は高い結果となっている。この原因としては、他地域とくに国外からの種苗の移入等が考えられるが、現在その理由は明らかになっていない。広島県佐伯郡大野町内の漁場では、1991年に採取したアサリからは本原虫は確認されていないが、1999年では感染率が90%を超えており、貝の身入りも悪くなっている。しかし、山口県の漁場では20年前のアサリの組織切片上では *Perkinsus* 原虫は確認されているが、現在のものと虫体のサイズ等が異なっており、種が変化した可能性が指摘されている。この原虫のアサリへの影響は不明な点が多く、現在のところ寄生部位が生殖腺となる部分であることなどから、産卵量を減少させる要因となりうるのではないかと疑われている。

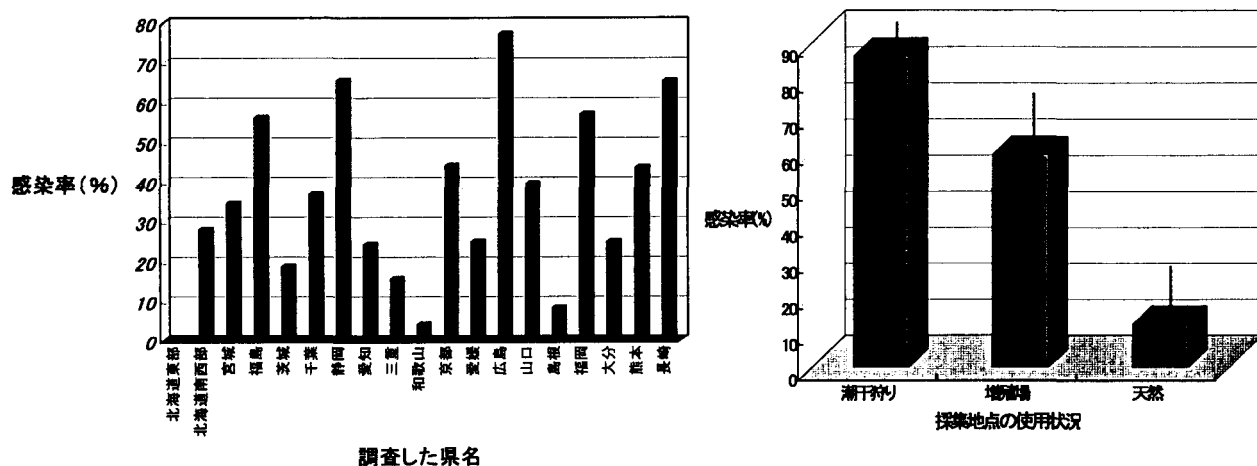


図5.漁場別の *Perkinsus* 感染率の変化

4. 摘要

1) 生化学的手法によるアサリ浮遊幼生同定手法の野外へ適用法の検討

アサリ浮遊幼生の同定法を用いて野外調査を行う際の調査指針の策定のための調査と、北海道から西日本まで広い範囲でアサリ漁場に適用が可能となるように実際にそれぞれの海域で得た浮遊幼生試料を分析し、その問題点を抽出した。その結果、野外調査ではアサリの分布水深や分布に影響を及ぼす各種の環境やアサリの行動特性に配慮して試料を採取する必要があることが明らかとなった。また、日本各地のアサリ漁場で本法を適用するにあたっては、交差反応性を示すアサリ以外の二枚貝幼生の出現が最大の問題となることが考えられたが、これについてはヒメアサリ以外の幼生では形態法を併用することによって回避できることが明らかとなった。上記の結果を加味して「モノクローナル抗体によるアサリ浮遊幼生の同定マニュアル」を改良した。その成果は愛知県や北海道のアサリ浮遊幼生の調査・研究に生かされ、論文として公表されている。

2) 生化学的手法によるアサリの捕食者を定量・定性する手法の開発発生初期のアサリの被食者の同定方法の野外への適用 (ヤドカリ類)

アサリの干潟への資源加入量を左右すると思われる捕食による減耗を評価するために生化学的手法の適用について検討した。野外でのアサリの捕食者としては甲殻類、ツメタガイ類およびヒトデ類が重要である。しかし、ヒトデやツメタガイ類は体外でアサリを消化して捕食するために、生化学的手法を適用しても、その捕食量を調べる事が出来なかった。そこで、本研究では着底初期の稚貝を捕食すると思われるヤドカリ類を用いて室内実験での捕食後の消化時間および野外での捕

食量を調べた。その結果、ヤドカリ類は実際のアサリ漁場でも着底初期稚貝を捕食していることが明らかとなり、資源加入における大きな障害となっていることが解明された。

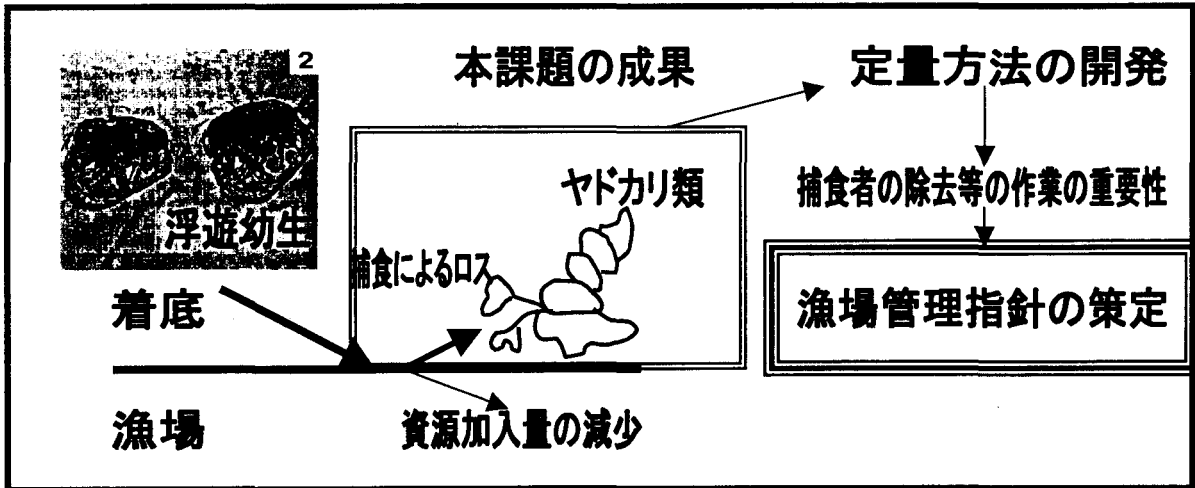


図 6. 資源加入に及ぼす捕食の影響

3) 生化学的手法によるアサリの *Perkinsus* 感染症の診断技術の開発と実態調査

まず、アサリの *Perkinsus* 原虫の診断法を開発し、それを用いて国内 74 ヶ所の漁場および生息場所で採取したアサリの *Perkinsus* 原虫の感染率を調べた。その結果、診断のために有効な PCR プライマーが開発された。また、感染実態調査によって、アサリ漁場内でも潮干狩り場での感染率が高いことが明らかとなった。これの原因としては潮干狩り場は干潟の地盤高の高い場所に設定されることや潮干狩り場では外国種苗が大量に導入されていることが考えられるが、それについては結論は出ていない。しかし、国内のアサリ漁場では北海道東部の海域を除く、ほとんどの場所で *Perkinsus* が感染していることが明らかとなった。

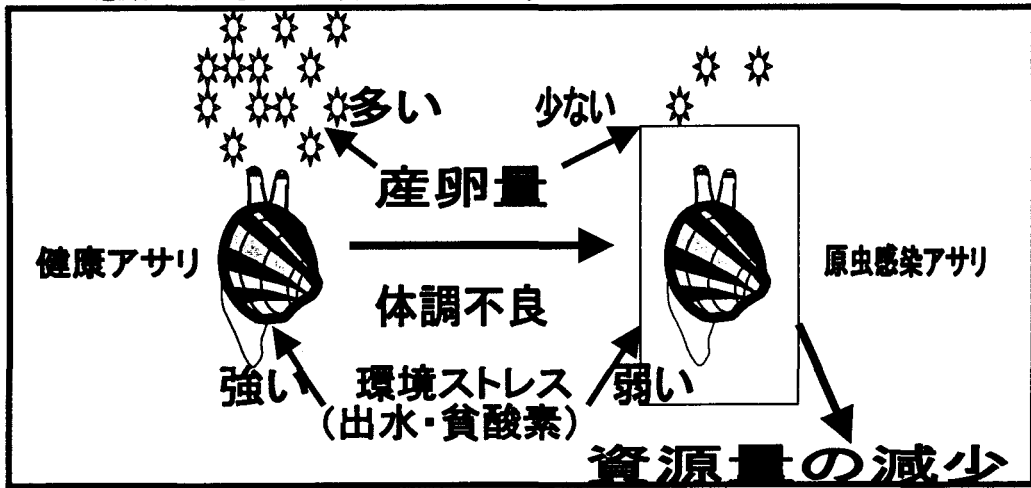


図 7. *Perkinsus* 感染がアサリ資源に及ぼす影響

5. 参考文献

- 1) 浜口昌巳・薄 浩則・石岡宏子 1997. アサリ漁場における各種生物の相互作用、水産工学、33 (3) 201-211.
- 2) Hamaguchi, M., N. Suzuki H. Usuki & H. Ishioka 1998. *Perkinsus* Protozoan infection in short-necked clam *Tapes (Ruditapes) philippinarum* in Japan. *Fish Pathology.*, 33: 473-480.