

アサリ初期生態解明のための生化学的手法の利用

浜口 昌巳*

Immunological and molecular biological technique for identification of early life history stages short-necked clam, *Ruditapes Philippinarum*

Masami HAMAGUCHI*

Abstract Species identification is major limiting step in the study of early Life history stages of bivalves. Due to the morphological similarity of veligers, sorting large numbers of plankton samples by traditional methods is a laborious and time-consuming task. The use of monoclonal antibodies and indirect immunofluorescence technique provides the means to rapidly discriminate among species. In 1998, we have developed the monoclonal antibodies to the clam. In this summary, I will describe the strategy about development of new monoclonal antibodies for settled juvenile clam.

アサリの初期生態解明のための生化学的手法の利用は平成7～9年度にかけて実施された農林水産技術会議上の特別研究「魚介類の初期生態解明のための種判別技術の開発」で検討され、その結果、アサリ浮遊幼生の同定用モノクローナル抗体の開発に至った。この技術によって、これまで研究の隘路であった浮遊期のアサリ幼生の生態が解明されつつある。ここでは、本シンポジウム開催趣旨の項で述べたアサリの減少原因と考えられるいくつかの要因の中から、アサリの初期生態に関する事項を取り上げ、その解決のための新たな方針を示すとともに、生化学的手法の利用について述べる。

アサリの減少原因解明のために なぜ初期生態の研究が必要であるのか？

本来のアサリ漁業は干潟域に自然に発生した稚貝を用いて行われていた。国内に広く流通していたのも、国内で発生していた稚貝であり、それによってかつての生産量の大部分を占めていた。過去においては国内のいたるところで、アサリの幼生は豊富に供給され、それが着底して資源加入するというアサリの本来の生活環が成立していたと考えられる。いっぽう、アサリは発生初期の死亡率が高いので、常に大量の幼生が供給されないと資源加入に結びつかない。したがって、幼生の供給量が減少

した場合、アサリの資源は減少する。著者らはこれまでに多くの共同研究者とともに、国内各地のアサリ漁場における浮遊幼生の調査を行った結果、再生産が比較的良好であると考えられる三河湾等の幼生の出現状況や量を他の海岸と比較すると、出現回数や量ははるかに多く、このことが三河湾のアサリの生産を支えていると考えられる。このような観点から著者らは「幼生や初期稚貝の供給量が減少したのでアサリは減少した」という仮説を立て、その実証のため研究戦略を構築しているところである。さらに、自然発生のアサリ稚貝を有効に利用できる方法が開発できれば、現在、一部外国に頼っているアサリの種苗の供給を自前でできるようになり、国内の沿岸域を有効利用した持続可能な生態系の構築も可能となるだろう。

アサリ幼生や初期稚貝を減少させる 要因の推定と研究の進め方

いくつかの要因が考えられる。それぞれ箇条書きにすると；

- 1) 初期生活期の餌の減少や捕食者の増加
- 2) 海況の変化による幼生の滞留機構や着底場所を選択するための機構の崩壊
- 3) 産卵母集団の減少や個体あたりの産卵量の減少
- 4) 底質環境の変化

等があげられる。1)については当面は実験的手法により、小型の植物プランクトンやバクテリアを含め、幼生や稚貝の餌についての評価が必要であろう。一方、2)については周防灘、有明海、東京湾といった単位での幼生の動態調査が必要で、水産総合研究センター単独では困難であるので、様々な研究機関が共同で、幼生や稚貝の時空間分布の変化や様々な海況構造を調べる必要がある。3)については生理学的見地から、室内実験等を加えて解明することができるであろう。さらに、4)については当面は浮泥が発生初期のアサリにどのような影響を及ぼすのかを、実験生態学的手法によって解明する必要があると思われる。

アサリの幼生や稚貝を減少させる

要因解明のための研究戦略

1) アサリの卵形成過程の評価の必要性

近年、環境ホルモン物質等の影響が懸念される中、まず、幼生の前にアサリの成熟過程はどうなっているのか？を調べる必要がある。アサリにおける卵形成課程の評価は①アサリ雌一個体当たりの卵の数の評価と②卵質の評価に分かれる。①については定量的な手法、②については定性的な手法の開発が不可欠である。アサリ一個体が産む卵の数は様々な要因の影響を受ける。たとえば環境ホルモン物質の影響を考える場合、雌雄同体個体では当然のことながら一個体の持つ卵数は減少する。また、*Perkinsus*症のように生殖巣となるべきところに病巣をつくる感染症では、抱卵数は減少する。アサリのように初期生残が低い生物の場合、産卵数の減少は、その後の幼生数の急激な減少要因となる。したがって、アサリの産卵量の多寡はその後の資源加入に影響を及ぼすことになる。これまでの、アサリの卵の定量的検査は、生殖巣の組織切片を作成してその面積を測ったり、一個体の生殖巣を切開して出来るだけ卵を流出させ、その数を直接定量する方法等によって行われてきた。しかしいずれの方法も煩雑であり、多数の個体の処理は困難であった。Choi *et al.* (1993) はバージニアガキの卵に対する特異的な抗体を作成し、それらによる酵素抗体法 (ELISA) によって、間接的にその個体の卵数を定量する試みを行っている。アサリについては、農林水産技術会議の「環境ホルモン」プロジェクトによって卵および精子の定量方法が開発されつつあり、アサリでも卵、精子それぞれに対する特異的モノクローナル抗体によって定量的調査が可能になると思われる。これによって、様々な要因について、卵数に及ぼす影響の評価ができるために、内分泌かく乱物質、*Perkinsus*感染症および餌料の種類や量による卵数の変化を調べる事が出来るなど応用範囲は

広い。一方、いわゆる良い卵・悪い卵といったような卵質の評価については、二枚貝の卵は魚類と異なり、卵そのものの成熟の過程が組織学的な検査によって判別できないので、卵の成熟過程を評価できる手法も望まれるであろう。これらの評価には卵黄タンパクの定量的検査や成熟に伴う卵の物質的な変化をタンパク質や糖質の質的・量的変化として捉えることが利用出来ると推測される。そこで、そのような変化を分子生物やタンパク解析によって調べ、卵質や成熟に関連したマーカーを見出し、その簡易定量法を開発することになる。一般に、遺伝子解析では近年のアレイや発現遺伝子解析によって定量的検査は可能ではあるが、特殊な技術や装置が必要であるので、普及には時間がかかると推測されるので、現状では抗体を使った方法が好ましいと考えられる。

2) 浮遊幼生の動態解明

既存の技術を使用することによって可能であるので、現在、様々な共同研究者とともに大規模な動態調査を実施中である。

3) 着底初期稚貝の動態解明

現在、アサリのあらゆる発育段階の調査の中で、最も困難が伴うのは殻長0.3mm~0.5mm程度の着底初期稚貝の時期である。着底初期稚貝の殻は脆く、ハンドリングに熟練を要するとともに、固定も困難である。加えて、着底初期稚貝のサンプリングは、一定体積の底質を採取することによって行われているために、稚貝と混入する砂や泥との分離が極めて困難である。そのため、一定面積中にパッチ状に分布するベントスの定量的調査を行うために理論的に必要なデータ数を得ることが出来ない場合が多い。また、アサリの着底初期稚貝でも足糸を利用して浮遊性の強いものからみつくなどして、Bayne (1964) がムラサキガイで報告したような再浮遊を行い、移動・分散するものと考えられる。アサリの稚貝は着底後もこの再浮遊機構や単なる物理的条件によっても移動しているものと推測される。しかしその動きは潮汐単位である場合もあり、着底初期稚貝の分布は刻々と変化することが予想されるので着底初期稚貝の動態を解明するための調査は比較的広い面積を対象に、かつ、統計学的に有意な結論を導き出すためには、多大な試料の分析が必要となる。そこで着底初期稚貝の動態調査への生化学的手法の導入は、大量の試料をいかに簡便かつ迅速に処理することが出来るか？が焦点になる。したがって、多種類の浮遊幼生の中からアサリのみをマーキングするといったようなアサリ幼生特異的モノクローナル抗体の開発とは異なり、比較的少ない種類の着底初期稚貝のなかからアサリの稚貝をどのように迅速に定量できるかが、手法開発の鍵を握ることになる。これによって、着底稚貝の調査の面積が拡大し、稚貝の分布に影響を及ぼす様々な要

因の解明が可能になる。これまでに、アサリ資源加入の研究の研究では、アサリ浮遊幼生の来遊量と着定量の関係について必ずしも一致しないと言われているが、その問題については今後、着底稚貝調査の面積の拡大や浮遊幼生のより細かなサイズ毎の調査によって再考する必要があると思われる。また、現在、堤らの一連のアサリ調査結果から導き出された“着底後まもなくへい死することによって減耗する”という結論についても、稚貝の移動・分散の詳細な調査を行うことによって、別の結論が導き出される可能性もある。したがって、今後、着底初期稚貝の簡易定量法を確立し、従来法では困難である調査の時空間的方向への拡大によって、着底稚貝の動態解明を行うべきではないかと考え、平成15年度の水産総合研究センター交付金プロジェクトとして提案した。特に有明海のように潮汐流の卓越する場所での漁場形成においては、着底後の稚貝の移動・分布を詳細に検討し、資源加入について検討する必要があると思われる。たとえば、諫早湾口にある長崎県小長井のアサリ漁場では、他の地域からのアサリ種苗を用いて生産を上げているが、ここではある先駆的な漁業者によって稚貝の定着促進が実践されており、効果をあげている。この例では潮汐流によって常に移動する稚貝をどのように定着させるかに絞って、簡単な構造物を構築し、効果をあげているがそのような構造物の効果を評価するためにも、着底後の稚貝の移動・分散機構を調べる必要がある。

稚貝の簡易同定法開発における技術的戦略

ここでは平成15年度の水産総合研究センター交付金プロジェクトのうち、feasibility study (以下FSとする)として認められた研究で実施する、アサリ稚貝の簡易定量法の開発にあたっての研究戦略を説明する。先の項で述べたように、稚貝の簡易定量法は稚貝の定量的調査を時空間的に拡大し、着底後の稚貝の移動・分散を詳細に調べるための技術開発を行う。これにあたっては、まず、アサリと同じ場所に定着し、かつ、着底期が重なる二枚貝とアサリとの識別と、迅速で手間もかからず簡便な方法による稚貝の定量化という二点を同時に実現しなければならない。アサリと同じ場所に同時期に出現する二枚貝稚貝のうち、最もポピュレーションが大きいと推測されるのがホトトギスガイである。アサリとホトトギスガイは分類上亜綱レベルで異なるために、着底稚貝は形態、遺伝子および発現タンパク質のいずれのレベルでも識別可能である。また、場所によってはシオフキ、バカガイ、マガキ等の稚貝も混入する恐れがあるが、これらとの識別は容易である。では、今回の技術開発のうちの問題点は何かというと底質の影響をどう克服するかである。こ

れには、比重分離法によってサンプルに混入する底質を除去する方法と、一定のメッシュサイズの篩を通し、混入する底質とともに前処理を行って稚貝定量的のためのELISAの系に持ち込む方法の2つが考えられる。二枚貝類稚貝の比重分離法については今回のFSで技術的に協力をお願いする養殖研究所の日向野さんがすでに開発した手法の利用が考えられる。この方法は安価な試薬を用いた簡便な方法であり、実用性は高い。野外で採取した試料はまず比重分離か、一定のメッシュサイズ(今回対象とする着底初期稚貝のサイズは0.3~0.5mmなので、それに見合ったサイズを選択する)の篩によって濾して通過画分を回収し、ホモジナイズあるいは化学的な処理によって抗原を抽出し、それをELISAによって分析し、あらかじめ求めておいた検量線によって定量とする。この場合、今回用いる予定のELISAの各段階での反応時間を考慮すると、一回の作業は前処理を含めて三日単位が必要で、その間のサンプル処理能力は、現在の瀬戸内水研であればホモジナイズ法であれば約30定点、化学抽出法であれば60定点程度と推測される。これは、比較の対象によって異なるが、不肖著者自身の能力と比較すると、比重分離法を使わない従来法と比較すると十倍程度の早さに相当する。ただ、ELISA法による定量は、従来法と異なり、抗体の反応時間中は他の仕事が可能であり、一日中顕微鏡下で泥や砂と稚貝をより分けて計数しなければならない従来法よりはるかに上である。したがって、この技術開発によって広範囲にわたる稚貝の移動分散調査が可能となり、着底から資源加入にいたる過程の調査ができるようになると思われる。

今後の展望

生化学的手法を用いた新しい技術開発によって、これまでに解明されずに残されている、アサリの成熟過程における環境ホルモン物質の影響等が解明され、その実態が明らかになるであろう。さらに、幼生や稚貝を減少させた要因の解明が進み、アサリ資源回復のための方針を立てることができるようになるものと推測される。

文 献

- Bayne, B.I., 1964: Primary and secondary settlement in *Mytilus edulis* L., *J. Animal Ecol.*, **33**, 513~523.
- Choi, K-s., Lewis D. H., Powell, D. H., and Ray, S. M., 1993: Quantitative measurement of reproductive output in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture and Fisheries Manage-*

ment, 24, 375~398.

質疑応答

司 会 「ありがとうございました。それでは、意見やご質問等ございますでしょうか。これからこういう形で調査手法の改革をしていくという意見表明という感じで」

浜口氏 「そうですね、いくつかまだアサリで調べたい部分があると思うんですけども、その辺のところで、現在できないようなところっていうのを、そういう生化学的な技術をつかうことで出来ればいいなっていうのがひとつあります」

司 会 「いかがでしょうか。ご質問、意見等。あのちょっと無い物ねだりというか、ああ、どうぞどうぞ」

黒田氏 「愛知水試の黒田ですけど、けっこうしょうもないことなんですけど、さっきの稚貝のELISA やるときに、泥と分離するのがまず必要だっておっしゃいましたが、分離しないでもできちゃうってことはあり得ないんですか」

浜口氏 「出来ると思います。実は、浮遊幼生の調査では、あまり使われてないんですけども、全然分離せずに、そのままプランクトンネットで採取した試料を二枚貝だけ取らずにそのままホモジナイズしても、かなり高い定量性があります。」

黒田氏 「ですよ、だから泥があってもいいのかなって気がします」

浜口氏 「ええ、多少はですね、今ひとつ考えてるのは、メッシュですね、簡単な粗いメッシュかけて、それを通った奴をそのままELISAに持っていく、あるいは泥ごとつぶしてELISAに持っていくことも可能かっていうふうに考えております。」

司 会 「他にございますでしょうか。あの、今のお話では、試料をホモジナイズしちゃいますよね、

そうすると着底初期のやつっていうのは、個体ごとのサイズを測ったりしたいのですが、それはわかりますでしょうか」

浜口氏 「そうですね、その場合、それはちょっと困るんですけども、例えばあの、コアを取るときに同時に、二カ所分の試料を採って置いて、ひとつは固定して、もうひとつはそういったELISAでさっとソーティングして、多そうな所だけで、残りの試料で個体数やサイズを測るといった風にしたいなと思ってますね。というのも、浮遊幼生と違いまして、着底稚貝になりますと、貝殻が形成されてきますので、浮遊幼生みたいに直接、蛍光抗体を反応させるとですね、貝殻が邪魔になって見えないのですね、それがあって今回、ELISAってのを提示したのは、そういう意味合いもあるんです。ただ、多分ですね、その着底稚貝を継続的に調査するには、相当なサンプル数をこなさないといけないと思うので、そういったサンプル処理能力を考えて、エライサーと従来法っていう組み合わせを今回、提示したという過程があります。」

? 氏 「浮遊幼生の蛍光抗体を使うのとちょっと違い、着底後以降は蛍光が見えづらいということですけども、相当透明に見えるんですけども、それはどうなんでしょうか」

浜口氏 「確かにそうなんですけど、蛍光顕微鏡で見ますとだいぶその、炭酸カルシウムがはいってるんですね、多分この透明光が拡散されちゃうんですね、それで見にくいんですね。実はこれ、試してみたんですけど、やはりすごく見にくい感じでした。着底初期稚貝は一見、見てみると透き通ってるし、着底ごく初期は大丈夫だと思うんですけど、ちょっと石灰がかって、炭酸カルシウムの結晶化が進んでくるとちょっと見にくいんですね。」