

原著論文

アサリ受精卵ならびに浮遊幼生の成長と 生残に与えるグリシンの影響について

兼松正衛^{*1}・村上恵祐^{*2}・内田基晴^{*3}・三好達夫^{*3}

Effect of Glycine on the Growth and Survival of Fertilized Eggs and Planktonic Larvae of the Short-neck Clam *Ruditapes philippinarum* in Rearing Tanks

Masaei KANEMATSU, Keisuke MURAKAMI, Motoharu UCHIDA and Tatsuo MIYOSHI

The effect of glycine on the growth and survival of fertilized eggs and planktonic larvae of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* was examined in rearing tanks. Tolerance of the larvae to glycine increased with the development stage of the clam. The conditions of glycine treatment without any negative effect on metamorphosis development and feeding activity were 10 min. at 1,000 ppm glycine for the egg fertilizing stage, 30 min. at 10,000 ppm for the D-shaped and ambo stage, and 60 min. at 10,000 ppm for the full-grown stage. The survival rate of the clam increased when glycine was supplemented within the day when some problem was observed with the larvae in feeding activity, and a one-day delay of the treatment resulted in less effect on the survival. The average survival rate of the clam recorded in mass-scale rearing of spat during 2007–2008 with and without glycine treatment was 37.1% ($n = 12$) and 14.0% ($n = 15$), respectively, and the difference was statistically significant ($p < 0.05$). The glycine treatment was demonstrated to be effective for spat rearing of short-neck clam.

2011年10月3日受付, 2012年3月22日受理

我が国において重要な水産資源であるアサリ *Ruditapes philippinarum* の漁獲量は、1970年代までは比較的高水準であったが、1984年以降に激減¹⁾した。この減少に伴って移植放流に用いる天然種苗の供給量も著減したため、近年は人工種苗生産により稚貝を生産して利用することにより、資源の回復や生産量の増加を図る方策が求められている。

一方、アサリの人工種苗生産に関する研究は、主要な産地であった東京湾、瀬戸内海を中心に多くの道府県で取り組まれてきたが、浮遊幼生期の各ステージで急激な遊泳行動の不活発化および摂餌量の低下によりたびたび

大きな減耗が発生するため、安定的な大量生産技術はいまだに確立しておらず、早期の飼育技術の安定化が望まれている。アサリを含めた二枚貝類の浮遊幼生期飼育では、減耗の要因としてビブリオ病等の細菌症²⁾、原生動物の増殖等が指摘されているが、これらを抑制する抗生物質などの薬剤は食品の安心・安全、薬剤耐性菌出現の危惧等の観点から使用の難しい状況にある。

そこで本研究では、イセエビフィロソーマ幼生期における飼育環境中の細菌の増殖を抑制する効果があり³⁾、フィロソーマ幼生⁴⁾およびヨーロッパイガイ⁵⁾では環境水中から上皮組織より体内に摂取することが可能で、さ

*1 独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所 (海産無脊椎動物研究センター)

〒722-0061 広島県尾道市百島町1760

Research Center for Marine Invertebrates, National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, FRA, 1760 Momoshima, Onomichi, Hiroshima 722-0061, Japan

kanematu@fra.affrc.go.jp

*2 独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所

*3 独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

らに食品添加物としても広く利用されているアミノ酸の一種グリシン⁶⁾について、アサリ受精卵ならびに浮遊幼生の成長と生残に与える影響を検討したので報告する*¹。

材料および方法

供試幼生 本研究では、アサリ親貝の飼育水温を15℃から28℃へ30分で上昇させた後15℃へ急冷する操作を2回行う処理に加え、雄の軟体部磨砕物を添加することにより、放卵放精を刺激して受精卵を得た。受精卵よりふ化した幼生に市販の濃縮冷蔵保存キートセロス・ネオグラシーレ（以下、キートセロス・ネオグラシーレ）を給餌して飼育し、各ステージの試験幼生を確保した。

また、幼生を田中（1982）⁷⁾に基づいて以下の3ステージに分類した。すなわち、D型期：幼殻が左右相称で殻頂がへこんでいる、アンボ期：殻頂が膨らみ始める、フルグロウン期：種固有の生活に移行できるまでに体制の整った幼生、とした。

浸漬処理方法 グリシンは和光純薬工業（株）製の試薬特級（ロット番号077-00735）を用いた。受精卵あるいは飼育幼生の全数をテロン製ネット（目合い24～96 μm）で水槽より回収し、紫外線殺菌処理海水（以下、UV海水）で3分程度の洗浄を行い、設定濃度のグリシン溶液を入れた1ℓ（耐性試験）～10ℓ（飼育試験2）容量の水槽に収容して強通気しながら水温20～23℃で設定時間の浸漬を行った。浸漬後は再度UV海水で1～2分間の洗浄を行い、水を切った後に新しい飼育水槽へ移動した。

耐性試験 千葉県富津市産の親貝（平均殻長29.5mm）より2008年4月25日に採卵した受精卵（1～2細胞期）と、3日後のD型期（殻長105～110 μm）、6日後のアンボ期（殻長136～145 μm）、16日後のフルグロウン期（殻長168～201 μm）の各幼生を供試した。試験中のふ化および飼育管理は、全て20℃に設定した恒温室内で実施した。

試験区として、浸漬濃度を100, 1,000および10,000ppmの3段階、浸漬時間を10, 30, 60分および72時間（受精卵）あるいは48時間（幼生）の4段階で、各濃度と時間を組み合わせた12試験区およびグリシン処理しない対照区（UV海水洗浄のみ）の合計13区を設定した。浸漬容器には1ℓガラスビーカーを用い、受精卵では10万粒（収容密度100粒/ℓ）、D型期では2万個体（同20個体/ℓ）、アンボ期およびフルグロウン期では1万個体（同10個体/ℓ）を、UV海水で洗浄後に試験濃度に調整した1ℓのグリシン溶液中に

収容した。

試験区ごとに設定のグリシン濃度と時間で浸漬処理を行った後、受精卵約300粒あるいは幼生約2,000個体を取り上げて100mlガラスビーカーに移し、0.2 μmの中空糸ろ過膜で精密ろ過した海水（以下、精密ろ過海水）100 mlで止水とし、パスツールピペットを通した通気によるふ化および飼育管理を行った。対照区については、UV海水での洗浄処理後、各ステージの最長処理時間（48～72時間）まで同様の飼育管理を行った。餌料にはキートセロス・ネオグラシーレを用い、D型では10万細胞/ℓ、アンボ期およびフルグロウン期では20万細胞/ℓとなるよう収容時に1回のみ給餌した。

受精卵はD型に変態した浸漬処理72時間後、各ステージ幼生は同48時間後にルゴール液で固定して顕微鏡観察を行った。外部形態的に歪な殻型あるいは軟体部が殻の内部に収まりきれない形成不全の殻を有する個体を異常とし、殻の正常な幼生の割合（正常発生率）を求め、摂餌個体の割合（摂餌個体率：胃内容物が餌料と同様に茶色く染色して観察される個体の割合）を計数して試験結果を比較した。

試験結果は、対照区に対する正常発生率および摂餌個体率について χ^2 検定あるいはFisherの正確確率検定⁸⁾による統計処理を行い、浸漬処理の影響を比較した。

飼育試験1：連続浸漬試験

試験には、千葉県木更津市産の親貝（平均殻長35.1mm）より2007年7月3日に採卵して得られたD型期幼生を用いた。500ℓ黒色ポリエチレン水槽を用いて、試験区にはグリシンを10および20ppmに設定した各試験区とグリシンを添加しない対照区の計3区を設け、日齢1のD型期幼生（殻長93～106 μm）を70万個体ずつ収容した。飼育用水には精密ろ過海水を用い、止水、エアーストーン1個による通気を行い、飼育水温は22.9～24.2℃となるようチタン製電気ヒーターを介してサーモスタットで加温調節した。グリシン添加区には2日目に設定濃度となるよう添加し、餌料にはキートセロス・ネオグラシーレを約2万細胞/ℓとなるよう、1回/日給餌した。各試験区とも通気により十分に混合されている表層中央部より毎日100 mlの飼育水を採集し、その中に含まれる生残個体を計数して比容法により生残率を推定した。同時に採取した幼生を顕微鏡観察し、発育ステージと摂餌個体率を求めた。

飼育試験2：浸漬処理のタイミング

大分県宇佐市産親貝（平均殻長37.3mm）より2007年10月15日に採卵し、同18日に摂餌個体率の低下（前日の92%から18%に低下）が観察されたD型期の幼生（日齢3、殻長99～112 μm）2,070万個体を供試した。

*¹ 兼松・村上，平成21年度日本水産学会春季大会講演要旨集，2009

幼生群を2群に分けて、即時に（日齢3浸漬区）および一日経過後（日齢4浸漬区）にグリシン濃度1,000ppmで10分の浸漬処理を行い、5kℓ容量FRP水槽に各々收容した。その後は両試験区とも日齢12、18および24の3回、同設定での浸漬処理を水槽替えと合わせて行った。

飼育用水には10μmフィルターを通過したUV海水を使用し、止水、直径13mm塩ビ管に1mmの穴を1cm間隔で開けた3mの通気管（通称エアブロック）を用いて通気を行い、飼育水温は21.5～22.5℃となるようチタン製熱交換器を介した温水ボイラーで加温調節した。餌料は、キートセロス・ネオグラシーレを約1～2万細胞/mlとなるよう1回/日給餌した。飼育水槽の上面を厚さ0.2mmの農業用黒色ビニールシートで覆い、遮光および飼育水の飛沫防止を図った。

幼生の成長（殻長）、遊泳行動、摂餌量および生残数の経過を観察し、收容時のD型期幼生数から着底完了（11月17日、日齢33）までの生残率および平均殻長をt検定⁸⁾により比較した。

結 果

耐性試験 各ステージのグリシン耐性を正常発生率で比較すると、受精卵では、1,000ppm、30分以上の浸漬区において有意（ $p < 0.05$ ）な低下が認められ、10,000ppmの全ての区で正常な発生が認められない結果となった。一方、100ppmでは72時間後にも87.1%と対照区と変わらない高い値を示していた。D型期では、各濃度区とも浸漬48時間後に急激に低下し（ $p < 0.05$ ）

アンボ期では、10,000ppmで60分以上、100および1,000ppmでは48時間後に低下した（ $p < 0.05$ ）。フルグロウン期では、全ての浸漬処理区で正常発生率の低下は認められなかった（図1）。

摂餌個体率では、1,000ppmで48時間、100および10,000ppmで60分以上の浸漬により低下（ $p < 0.05$ ）が認められ、48時間処理ではほとんど摂餌がみられなかった。フルグロウン期では、各濃度とも60分までの浸漬区で摂餌の低下はみられなかったが、48時間後には急激に低下した（ $p < 0.05$ ）。しかし、アンボ期では、対照区で48時間後にほとんどの個体が摂餌していなかったが、各濃度区では30～60分にかけて摂餌する個体が増え、再び48時間後には激減する結果となった（図2）。

飼育試験1：連続浸漬試験 グリシン添加による生残への影響は、対照区では日齢9までの生残率がほぼ100%であったのに対し、20ppm添加区では日齢3、10ppm添加区では日齢6から減耗がみられ、日齢8には全て死亡した（図3）。各区とも試験開始2日後の日齢3より摂餌を開始（最初の摂餌個体率75.0～90.9%）したが、グリシン添加区では開始3日後で摂餌する個体が著しく減少した（図4）。一方、対照区では、試験期間中の摂餌個体率63.6～90.9%と高い値を示していた（図4）。

また、成長については、対照区では順調な成長がみられて日齢5でアンボ期幼生（殻長140μm以上）の割合が68%となったのに対し、グリシン添加区では両区ともほとんど殻長の成長がみられず（殻長100～106μm）、D型期からアンボ期に移行する幼生は全く

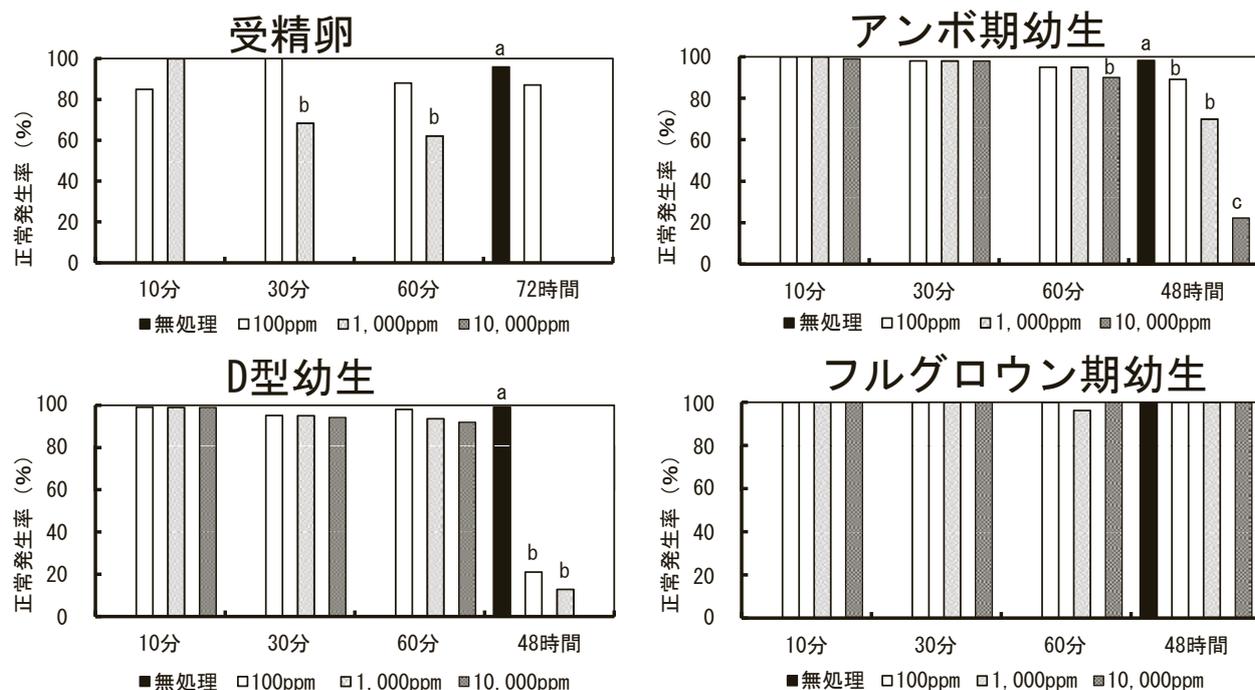


図1. アサリ受精卵および浮遊幼生の正常発生率に与えるグリシン濃度と浸漬時間の影響（図中のアルファベットは、無処理（対照区）に対して有意差（ $p < 0.05$ ）が検出された試験区を示す。）

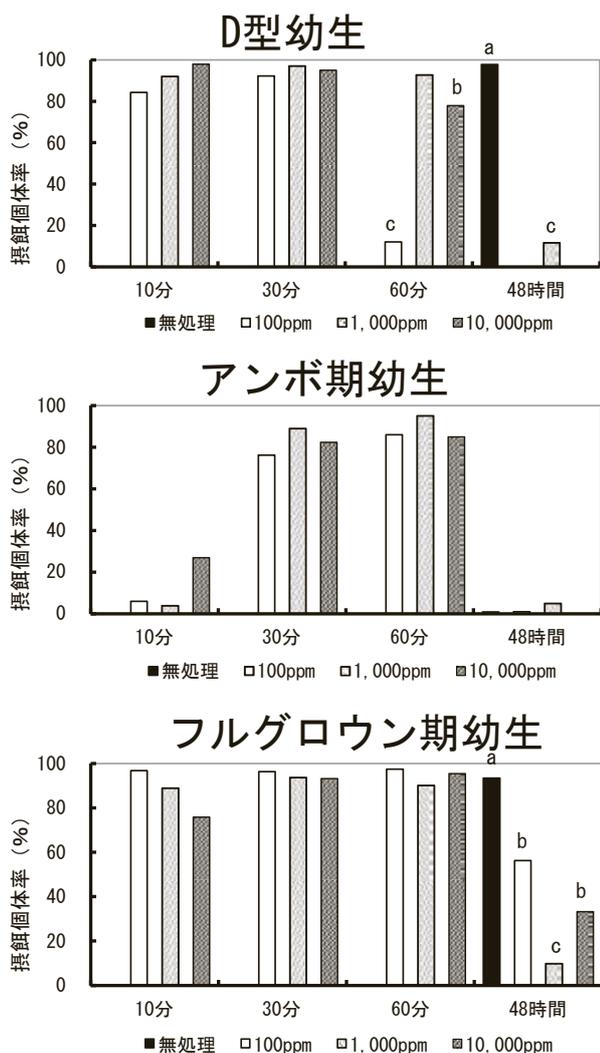


図2. アサリ浮遊幼生の摂餌に与えるグリシンの濃度および浸漬時間の影響
(図中のアルファベットは無処理(対照区)に対して有意差 ($p < 0.05$) が検出された試験区を示す。)

出現していなかった。

飼育試験2：浸漬処理のタイミング 摂餌個体率が18%に低下した供試群は、日齢3浸漬区では速やかに翌日の摂餌個体率80%、日齢5に同96%と回復して順調な成長がみられたのに対し、日齢4浸漬区では翌日に同55%、日齢6に同80%と回復が約2日遅れ、日齢11まで有意に成長の停滞が観察された (t 検定, $p < 0.05$)。しかしながら日齢4浸漬区ではその後に急成長がみられ、両試験区とも日齢14にはフルグロウン期幼生の割合が74~79%に達し、以降はほぼ同様の成長がみられた。

日齢3浸漬区では緩やかな減耗で推移し、着底完了した日齢33における生残率は50.5%であったが、日齢4浸漬区では飼育初期のD型期からアンボ期の日齢12(生残率51%)までに大きな減耗がみられ、日齢33における生残率は31.6%であった(図5)。

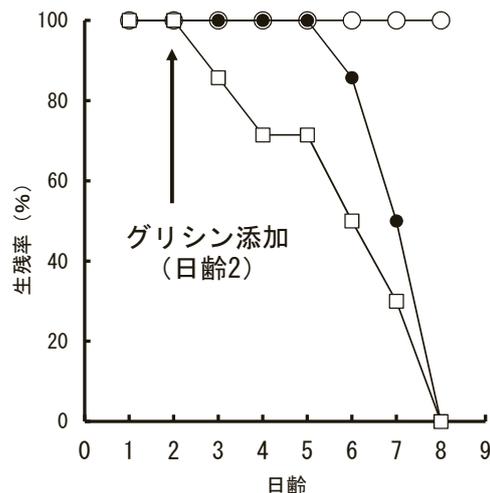


図3. グリシン添加飼育時の生残率の変化
○ 対照区 ● 10ppm 添加区
□ 20ppm 添加区

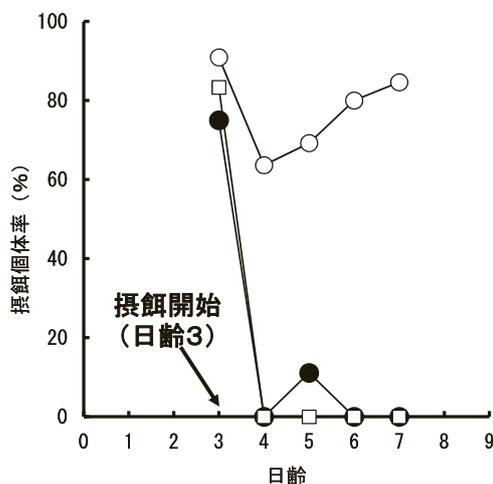


図4. グリシン添加飼育時の摂餌個体率の推移
○ 対照区 ● 10ppm 添加区
□ 20ppm 添加区

考 察

正常発生率ならびに摂餌個体率からみたアサリ受精卵および浮遊幼生のグリシン耐性は受精卵で最も低く、発育が進むにしたがって高まること示された。すなわち、正常発生率と摂餌個体率に悪影響を与えない濃度と浸漬時間は、受精卵では100ppm濃度で72時間あるいは1,000ppm濃度で10分以内、D型期およびアンボ期幼生では10,000ppm濃度で30分以内、フルグロウン期幼生では10,000ppm濃度で60分以内であった。

今回の耐性試験に供試したアンボ期幼生では、対照区で48時間後の摂餌個体率が著しく低率であったことから、供試幼生に問題があったか、試験時間中に何らかの要因で摂餌低下を招いたものと考えられる。一方、30~60分の浸漬処理区では逆に摂餌個体率が大幅に向上

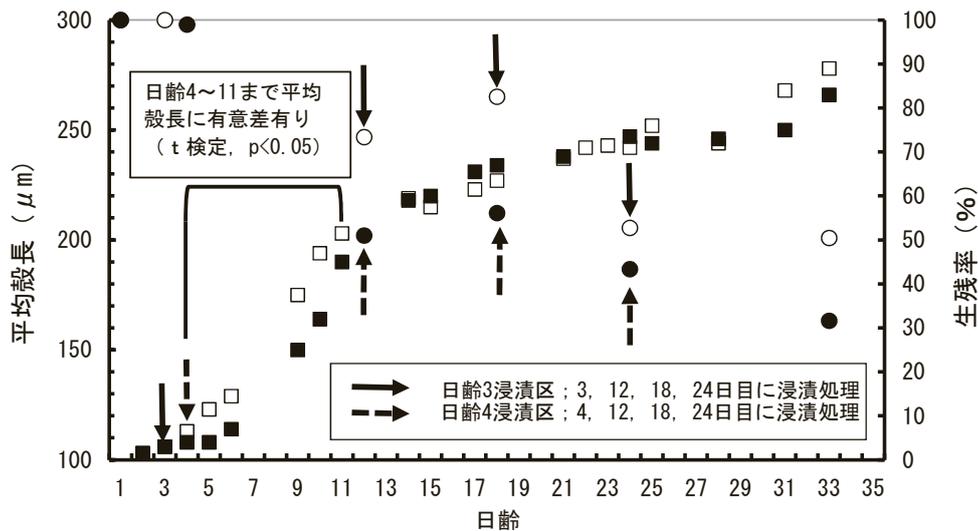


図5. アサリ浮遊幼生に対するグリシン浸漬処理の効果

□ 日齢3浸漬区の成長 ■ 日齢4浸漬区の成長
○ 日齢3浸漬区が生残 ● 日齢4浸漬区が生残

していたことから、グリシンが摂餌行動を回復させることが出来たものと推測される。

D型幼生をグリシンに連続浸漬した場合には、耐性試験より低い10～20ppm濃度に設定したにもかかわらずD型期幼生の摂餌および成長に悪影響を及ぼし、全く発育しないまま添加後6日目の日齢8で全滅した。このことから、グリシンは10～20ppmの低濃度でも、常在した環境では飼育に適用出来ないことが明らかとなった。飼育水へのグリシン添加により、アサリ幼生の摂餌が低下し、成長がみられなくなった理由については、飼育水中における細菌の生育による水質の劣化が考えられるが、グリシン添加後1～2日以内に摂餌がみられなくなっていることから、細菌が関与しない機序による可能性も否定できない。

イセエビのふ化から稚エビまでの浮遊幼生期飼育では、定期的にグリシンの浸漬処理を行うことで、抗生物質（アンピシリン）と同等の高い生残率と成長を得ることができる一方、フィロソーマが脱皮する時刻にはグリシンの脱皮への悪影響を避けるため、飼育水中にグリシンが残存しないように流水飼育を行う方法が有効と報告されている³⁾。アサリ浮遊幼生においても、グリシンの連続浸漬では成長と生残に悪影響がみられたことから、使用には同様の注意が必要である。また、グリシン10ppm以下の低濃度におけるアサリ幼生への影響については、今後の検討が必要である。

浸漬処理のタイミングについては、摂餌個体率の低下が観察された場合は、一日でも早くグリシンの浸漬処理を行うことが重要であると考えられた。日齢3というD型初期のステージで摂餌個体率の低下が観察された場合は、通常であればその後の成長・生残が悪く、飼育継続の困難であることが伯方島庁舎における飼育事例から経

験されているが、本試験では速やかにグリシン浸漬処理を実施することにより比較的高い生残率（50.5%）で稚貝を生産することが可能であった（図5）。

以上のことから、グリシンは短時間の浸漬処理で利用することにより、アサリ浮遊幼生の発育を正常に維持し、着底までの生残率を安定的に向上する効果のあることが明らかになった。これらの試験結果は、グリシン浸漬処理の開始時期や濃度を定める際に有用なデータになると思われる。

グリシンは自然界に多く存在しているアミノ酸の一種で、抗菌性を有することから様々な静菌剤や食品添加物として広く産業的に利用されている⁶⁾。ヨーロッパイガイでは、上皮組織から溶存態アミノ酸のグリシン、チロシンやタウリンを体内に吸収すること⁵⁾、アサリでは、海水中に貯蔵糖系の3糖以下の低分子の糖質を適当な濃度で添加することで、アサリの成長が促進されることを見出しており、この理由として二枚貝類が低分子有機物を直接栄養源として吸収する能力によるものと推察している⁹⁾。これらの知見から、アサリ浮遊幼生は、溶存態のグリシンを浸漬処理中に体内へ吸収し栄養源として利用することで、衰弱した活性を回復した可能性が考えられる。

一方、二枚貝類を含む水生無脊椎動物では、開放血管系であるため高浸透圧環境下では浸透圧調節物質（オスモライト）を蓄積して細胞内浸透圧を上昇させ、細胞容積を保つよう進化しており、このようなメカニズムは「細胞内等浸透調節」と呼ばれ、容易に生合成の可能な非必須アミノ酸であるグリシンやアラニンは、多くの無脊椎動物種で最も有効なオスモライトとされている¹⁰⁾。アサリの種苗生産過程では、飼育環境下で起こり得る浸透ストレス等に対して、グリシンが、これらを軽減する何ら

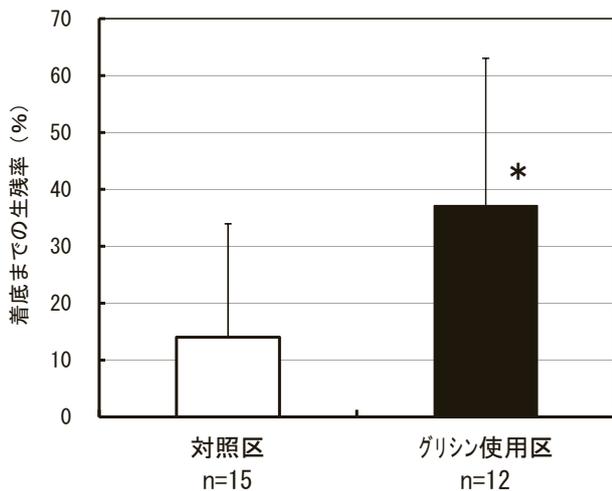


図6. アサリ浮遊幼生期飼育におけるグリシン浸漬処理の効果 (* : マン・ホイットニーのU検定, $p < 0.05$)
バーは標準偏差を示す

かの効果を発揮した可能性も考えられる。今後は、その作用機序も含めて、より高い種苗生産効率を得るためのグリシン浸漬方法について試験する予定である。

参考：技術データ「事業ベースでのグリシン使用結果」

2007～2008年に瀬戸内海区水産研究所・伯方島栽培技術開発センター（現・伯方島庁舎）で実施した種苗生産試験全27事例について、グリシン浸漬処理を行った12事例（グリシン使用区）と行わなかった15事例（対照区）の2群に区分し、着底までの生残率についてマン・ホイットニーのU検定⁸⁾による統計処理を行い、飼育成績を比較した。

飼育方法は全て止水とし、対照区では、定期的にUV海水で2～3分洗浄して新しい水槽へ移動した。グリシン使用区では、原則として飼育幼生の遊泳行動の不活発化および摂餌量の低下がみられた際に日に浸漬処理を実施し、1,000ppm濃度で10～30分の処理を行った。

その結果、全く着底稚貝が得られなかった生残率0%の試験事例の数は、対照区で8事例（53.3%）であったのに対し、グリシン使用区では1事例（8.3%）であった。対照区の着底完了までの平均生残率14.0%（0～55.0%）であったのに対し、グリシン使用区では同37.1%（0～76.6%）となり、対照区と比べて約3倍の生残率向上効果が確認された（ $p < 0.05$, 図6）。

謝 辞

飼育実験を行うにあたりご協力いただいた瀬戸内海区水産研究所増養殖部資源増殖グループ長・島 康洋氏をはじめ伯方島庁舎職員の皆さまに感謝する。また研究推進にあたりアサリ資源全国協議会を構成する道県及び（独）水産総合研究センター等の関係各位に厚くお礼申し上げます。本研究は、（独）水産総合研究センターの一般交付金小課題「アサリの資源培養技術の開発」（課題番号1BB108, 2006～2010年）で行われた。

文 献

- 1) 松川康夫, 張成年, 片山知史, 神尾光一郎 (2008) 我が国のアサリ漁獲量激減の要因について. 日本水産学会誌, 74 (2), 137-143.
- 2) 鳥羽光晴 (2001) アサリ幼生のビブリオ属細菌による大量死亡と紫外線照射海水による簡易防除. 栽培技研, 28 (2), 81-91.
- 3) 村上恵祐 (2011) イセエビ幼生の成長特性と飼育技術の向上に関する研究. 東京海洋大学, 博士学位論文, 1-270.
- 4) Söylemez, S. C., K. MURAKAMI, C. A. Strüssmann, M. YOKOTA, and S. WATANABE (2010) Uptake of dissolved free amino acids by spiny lobster *Panulirus japonicus* phyllosoma larvae. *Fish Sci*, 76, 437-444.
- 5) Jørgensen, C. B. (1983) Patterns of Uptake of dissolved amino acids in Mussels (*Mytilus edulis*). *Marine Biology*, 73, 177-182.
- 6) 宮尾茂雄 (2000) 第2編第5章第7節. 食品および天然成分中の抗菌性物質による微生物制御. 7-3 グリシン. 有害微生物管理技術, 第I巻 (芝崎勲監修), フジ・テクノシステム, 東京, 802-811.
- 7) 田中彌太郎 (1982) 二枚貝幼生の同定-⑩. 海洋と生物, 18, 23-26.
- 8) 石居進 (1985) 生物統計学入門. 培風館, 東京, 290 pp.
- 9) UCHIDA, M., M.KANEMATSU and T.MIYOSHI (2010) Growth promotion of the juvenile clam, *Ruditapes philippinarum*, on sugars supplemented to the rearing water. *Aquaculture*, 302, 243-247.
- 10) 阿部宏喜 (2008) 水生動物における遊離 D-アミノ酸の存在, 生合成および生理的意義. 生化学, 80 (4), 308-315.