

原著論文

消化酵素活性によるアサリ摂餌状況評価の試み

坂見知子^{*1}・日向野純也^{*2}An Attempt to Assess the Feeding Activity of Short-neck Clam *Ruditapes philippinarum* Juveniles by a Digestive Enzyme Cellobiosidase Activity

Tomoko SAKAMI and Junya HIGANO

Digestive enzyme cellobiosidase activity was measured in short-neck clam *Ruditapes philippinarum* juveniles in order to assess their feeding activity. The enzymatic activity of the clams fed *Pavlova lutheri* increased rapidly on the third day after the experiment started. The specific enzymatic activity became about eight times greater than that of the unfed controls on the fifth day. The cellobiosidase activity of the clam juveniles collected from some tidal flat areas with different environmental conditions was also measured. The enzymatic activity of the *in situ* clams varied greatly. No obvious seasonal variation was observed in the clams collected from a tidal flat area for two years. The mean enzymatic activity tended to be high when the chlorophyll *a* or protein content was high in the sediment. The enzymatic activity of the clams collected from a subtidal area was greater than those from intertidal areas. Moreover, the enzymatic activity of the clams collected from an area covered densely with Asian date mussel *Musculista senhousia* mat was lower than those from the neighboring sandy area. These results suggest that the enzymatic activity reflected the availability of food in the clam habitats.

2011年10月3日受付, 2012年1月23日受理

アサリ *Ruditapes philippinarum* は日本沿岸の干潟から潮下帯にかけて広く分布する主要な二枚貝であり、重要な水産資源である。しかしながら日本のアサリ漁獲量は低下が甚だしく、1970～80年代に約15万トンに達していたのが2000年以降は3万トン台の低水準が続いている¹⁾。アサリ減産の原因としては、埋め立てによる生息環境の減少²⁾や過剰漁獲³⁾等の直接的な影響の他に、貧酸素水や硫化水素⁴⁾といった生息環境のインパクト、また新たな疾病・食害生物の侵入等⁵⁾の様々な要因が指摘されている。これらの要因はそれぞれの海域によって異なり、また幾つかが複合的に作用していると考えられる。したがって、アサリ減少の原因解明のためには、現場の貝の資源状況や生理状態を把握しておくことが必要である。

一般にベントスでは幼生の着底初期に死亡率が高く、

アサリでも着底後の稚貝の減耗が個体群減少の重要な要因だと考えられている⁶⁾。稚貝の死亡原因は様々であるが、食害を除けば餌不足(飢餓)が大きな原因の一つと考えられる。これまで二枚貝の摂餌に関する活性や生理状態を調べるのに、ろ水速度がしばしば測定されてきた⁷⁻¹⁴⁾。しかし野外に生息している稚貝のろ水速度の測定は容易ではない。またろ水速度の測定は懸濁粒子を水塊から除去する能力を評価することであり、餌料の不足を評価することはできない。現地で採集された稚貝が有効な餌を取り込み、消化しているのか評価を加えるためには他の手段が必要である。一方、二枚貝において消化酵素の活性が摂餌状況や餌の質・量によって変化することが多く報告されている^{7, 11, 12, 15-19)}。消化酵素の活性はエビの幼生等の小型生物でも測定可能であり²⁰⁾、また試料を一時的に凍結保存することができるため野外の個体に

*1 独立行政法人水産総合研究センター東北水産研究所

〒985-0001 宮城県塩釜市新浜町3-27-5

Tohoku National Fisheries Research Institute, FRA, 3-27-5 Shinhamacho, Shioyama, Miyagi 985-0001, Japan

sakami@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

対しても適用できる²¹⁾。そのため、アサリ稚貝でも消化酵素活性を測定することにより、摂餌状況あるいは餌環境を評価できる可能性がある。

アサリの消化酵素については、高槻²²⁾が成貝の消化酵素の種類や活性について報告している。しかし稚貝について消化酵素活性を測定した報告や餌料環境との関係について調べた例は見当たらない。本研究はアサリ稚貝の摂餌状況と消化酵素活性との関係を明らかにすることを目的とした。消化酵素の中でもセルラーゼはプロテアーゼやアミラーゼに比べて餌料環境によって活性が変化しやすいことが他種の二枚貝において示されている^{7,19)}。一般的にセルラーゼ活性としてCMセルラーゼが測定されるが、セルロースの分解に関わる酵素の一つであるセロビオシダーゼ (cellulose 1,4-beta-*cellobiosidase* EC 3.2.1.91) は、セロトリオースのアナログである *p*-nitrophenyl- β -D-*cellobioside* を基質に使い遊離された *p*-nitrophenol の吸光度を直接測定することで高感度で簡易に測定できる²³⁾。そこでアサリ稚貝を用いて給餌飼育実験を行い、飢餓と摂餌に伴うセロビオシダーゼ活性の変化を調べた。また野外の様々な生息場所からアサリ稚貝を採取してセロビオシダーゼ活性を測定し、本酵素活性が餌環境によってどのように変化するのかについて検討した。

材料と方法

アサリ稚貝の給餌飼育試験 人工採苗したアサリ稚貝に *Chaetoceros neogracile* を与えて飼育したものを試験に用いた。試験は小型 (殻長 5.7 ~ 8.1 mm, 平均 7.0 mm) と大型 (同 10.7 ~ 13.1 mm, 平均 11.7 mm) の2種類の稚貝について行った。清浄な砂を入れた容器に稚貝を収容し、フィルターでろ過した海水 (20°C, 塩分 32) をかけ流しながら飼育を行った。水槽に稚貝を収容して1日間は無給餌下におき、その後給餌区の水槽には培養した *Pavlova lutheri* を約 10 μ g Chla l^{-1} の濃度を保つように飼育槽に連続して滴下した。無給餌区ではろ過海水のみをかけ流した。給餌開始後 1, 3, 5 日目にそれぞれの試験水槽から稚貝を5個体ずつ取り-80°Cで凍結保存した。飼育期間中の稚貝の死亡はほとんど認められなかった。

野外に棲息するアサリ稚貝の採取 野外におけるアサリ稚貝の消化酵素活性の変化を見るために、2006年12月から2008年12月にかけて、伊勢湾に注ぐ五十鈴川河口の川口干潟内の5地点からアサリ稚貝を採取した (図1a)。また、潮間帯と潮下帯に棲息するアサリ稚貝の消化酵素活性を比較するために、2007年5月の大潮時に榑田川河口の松名瀬干潟において、水深約20cmの潮下帯 (St.1) から満潮時の汀線付近 (St.6) にかけて線上に計6地点から、アサリ稚貝を採取した (図1b)。さら

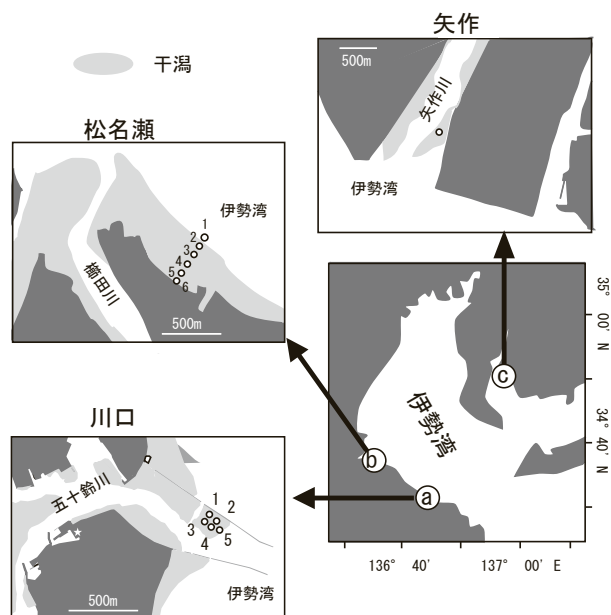


図1. 伊勢湾沿岸の稚貝採取場所
a: 五十鈴川河口川口干潟, b: 榑田川河口松名瀬干潟,
c: 矢作川河口干潟

に2007年7月に矢作川河口の干潟において、底質が砂質の場所と隣接するホトトギスガイ *Musculista senhousia* のマットで覆われた場所からアサリ稚貝を採取した (図1c)。アサリ稚貝は殻長5~10mmのものを採取し、採取後直ちにドライアイスで凍結して持ち帰り、分析まで-80°Cで保存した。

稚貝の採取と同時に干潟の底土を採取し、餌環境の指標としてクロロフィル *a* 及びタンパク質含有量を測定した。直径23mmの筒を用いて各地点につき3本ずつ採取し、表層1cmを切出して分析まで-30°Cで保存した。

消化酵素活性の測定 稚貝では消化組織だけをとり出すのは容易ではないため、アサリ一個体の全軟体部から粗酵素液を調製した。なお、消化盲嚢を除いた軟体部にはセロビオシダーゼ活性がほとんどないことを予備実験により確認した。凍結保存した稚貝から全軟体部を取り出して0.5~1mlの抽出用緩衝液 (20mM NaClを含む0.01M リン酸緩衝液 pH 7.0) 中で氷冷しながら超音波破砕機を用いて組織を破砕した。これを20,000 × gで15分間遠心分離し、上清を粗酵素液として測定に用いた¹⁸⁾。粗酵素液中のタンパク質含量は牛アルブミンを標準物質としてローリー法により求めた²⁴⁾。

セロビオシダーゼ活性は *p*-nitrophenyl- β -D-*cellobioside* (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) の分解速度により測定した²³⁾。0.5M リン酸バッファー (pH 6.5) で適宜希釈した粗酵素液に最終濃度0.5mMになるように上記基質を加え、37°Cで反応させた。60~90分毎に数回、反応液の一部を取り1M Na_2CO_3 を等量加えて攪拌後、405nmのフィルターを装着したプレートリーダー (Multiscan JX, Thermo Labsystems, Shanghai) を用いて

吸光値を測定した。*p*-nitrophenol (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) を標準物質として、粗酵素液中のタンパク質 1 mg, 1 時間あたりの *p*-nitrophenol 放出量を本酵素の比活性とした。吸光値の増加速度を求めた際の回帰係数の標準誤差は 4 ~ 7% (平均 6%) であった。

底土中のクロロフィル *a* 及びタンパク質含有量の分析

クロロフィル *a* 含有量は、底土試料からジメチルホルムアミドを用いて抽出したものを蛍光法により測定した²⁵⁾。タンパク質含有量は、底土試料からアルカリ分解法により抽出した可溶性タンパク質を、デトリタスによる影響を除くように改変したローリー法により測定した²⁶⁾。

結 果

給餌飼育試験 アサリ稚貝に *P. lutheri* を給餌して飼育した場合、セロビオシダーゼの比活性は小型、大型の両稚貝とも実験期間中に増大した。(図 2)。一方無給餌の場合には変化はなかった。給餌開始後 5 日目の本酵素比活性は、無給餌区に比べて小型稚貝で 7.1 倍、大型稚貝では 8.8 倍になった。また給餌開始後 1 日目よりも 3 および 5 日目後の方が比活性は高くなっており、観察された酵素活性の増大は摂餌による一時的なものではないと

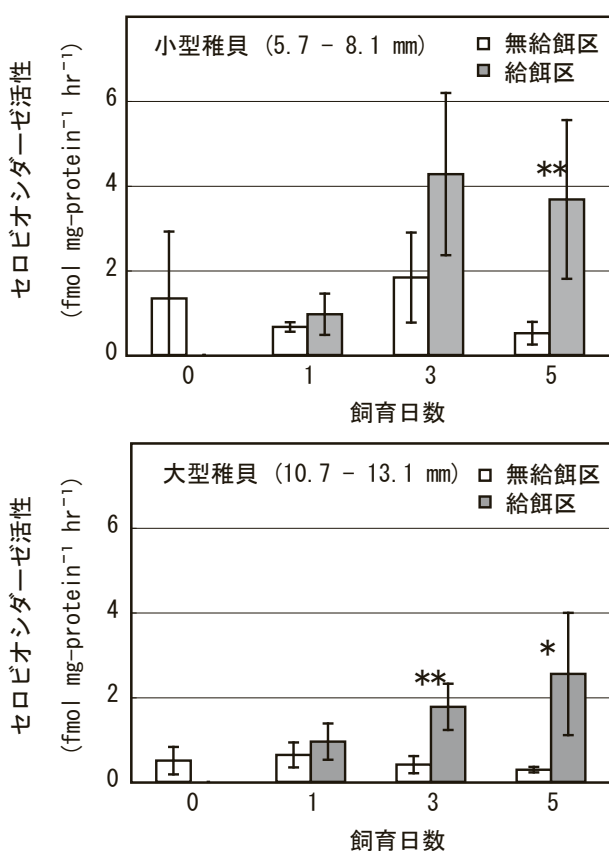


図 2. 給餌試験中のアサリ稚貝のセロビオシダーゼ活性の変化平均 ± 標準偏差 ($n=5$)。米印は無給餌区との有為差が $p < 0.05$ (*) または $p < 0.02$ (**) を表す

考えられた。本酵素活性の 3 および 5 日目の平均値は小型の稚貝で $4.0 \text{ fmol mg-protein}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ であったのに対して大型の稚貝で $2.1 \text{ fmol mg-protein}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ と小さかった。

野外に棲息する稚貝の活性 野外で採取したアサリ稚貝のセロビオシダーゼ活性は $0.8 \sim 3.0 \text{ fmol mg-protein}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ の範囲内であった (図 3a, 図 5a, d)。ただし同一地点から採取した稚貝でも測定値の標準偏差は平均値の 40% 程度あり個体間の違いが大きかった。

川口干潟で周年採取したアサリ稚貝のセロビオシダーゼ活性は、2007 年の 7 ~ 9 月にかけてやや高い傾向が見られたが、全期間を通しての明瞭な季節変化は認められなかった (図 3a)。また干潟内に設けた 5 観測点間での差も認められなかった。稚貝を採取した場所の底土中クロロフィル *a* 含有量は、夏季に高い傾向が見られ、また 2008 年 2 月も高かった (図 3b)。底土中のタンパク質含有量は調査期間を通じて徐々に高くなる傾向があり、季節による変化は見られなかった (図 3c)。稚貝のセロビオシダーゼ活性の平均値と底土中のクロロフィル *a* あるいはタンパク質含有量との関係を見ると、正の相関がみられたが、ばらつきは大きかった (図 4)。

松名瀬干潟において潮下帯から汀線にかけて採取したアサリ稚貝のセロビオシダーゼ活性は、潮下帯 (St.1) の方が潮間帯 (St.2 ~ 6) よりも高くなっていった (図 5a)。一方、底土中のクロロフィル *a* の含有量は潮下帯で低く、酵素活性とは逆になっていた (図 5b)。タンパク質含有量は全測点で差がなかった (図 5c)。矢作川河口干潟において、ホトトギスガイのマット内から採取したアサリ稚貝は、隣接する砂地から採取したものよりもセロビオシダーゼ活性が低かった (図 5d)。この時の底土中のクロロフィル *a* 及びタンパク質の含有量は両地点間で差がなかった (図 5e, f)。

考 察

本研究は、野外の生息場におけるアサリ稚貝の生理状態を調べることを目的としたが、酵素活性測定用の稚貝は活性が変化しないよう採取後できるだけ速やかに固定 (凍結) する必要があるため、干潟上で肉眼で識別できるサイズとして殻長 5 ~ 10 mm 程度の個体について調べた。ただし、手法的には蛍光ラベルした基質 (4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside) を用いることで殻長 2 mm の稚貝でもセロビオシダーゼ活性の測定は可能であり (未発表データ)、本手法が着底初期の稚貝にも応用できる可能性はある。

給餌試験の結果から、アサリ稚貝は摂餌している時、高いセロビオシダーゼ活性を持つことが示された (図 2)。なお、今回測定を行った殻長 5 ~ 10 mm 程度のアサリ稚貝にも CM セルラーゼの活性が認められ (未発表データ)、セロビオシダーゼは CM セルラーゼ等とも

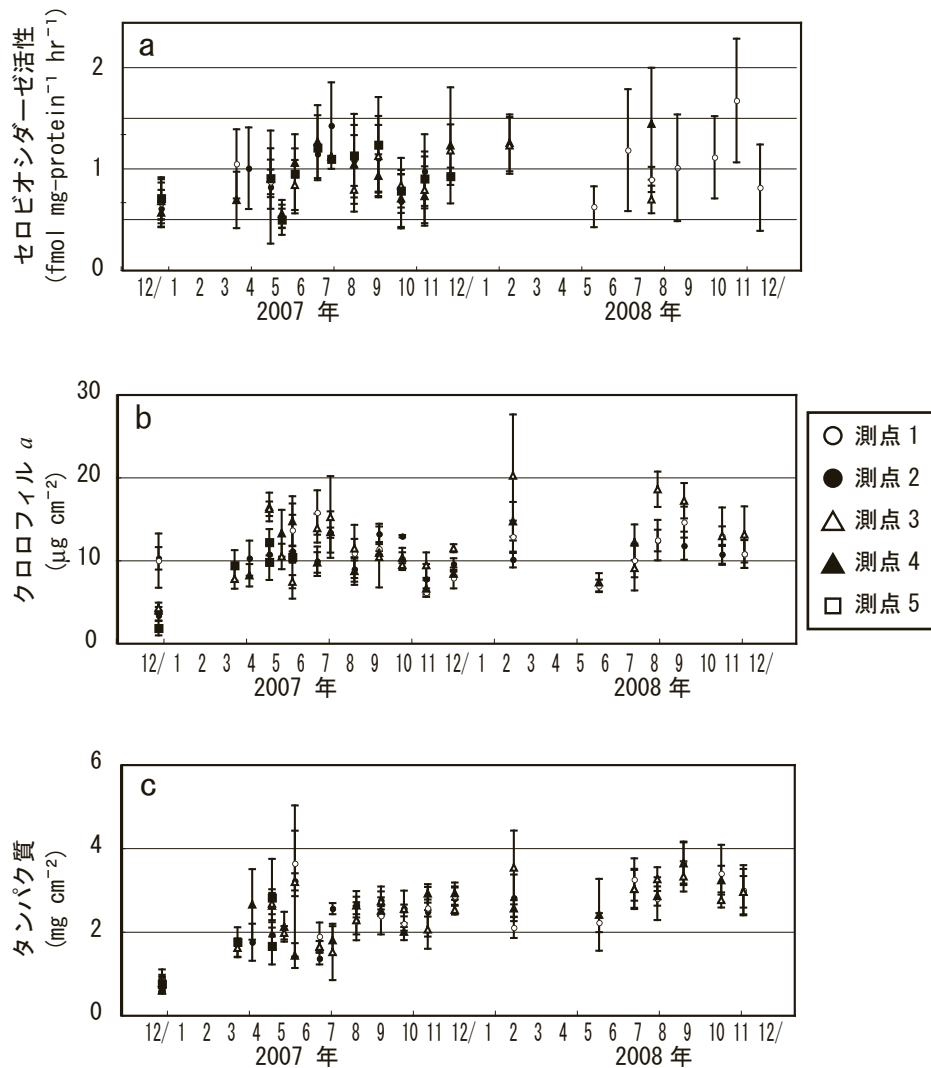


図3. 川口干潟におけるアサリ稚貝のセロピオシダーゼ活性の季節変化 (a), 底土中のクロロフィル *a* 含有量 (b), 及び底土中のタンパク質含有量 (c) 平均±標準偏差 (a: $n=5$, b: $n=3$, c: $n=3$)

にセルロースの分解に関与していると考えられた。ホタテガイに有機物含有量の高い餌を与えて飼育した場合、桿晶体のアミラーゼとセルラーゼの活性が3日後に急に上昇したと報告されている¹⁸⁾。セルラーゼはイガイ等では桿晶体に多く含まれ、植物プランクトンの細胞壁を壊す役目をしていると推測されている¹⁶⁾。また、珪藻食性のアミはセルラーゼ活性が高いとの報告がある²¹⁾。アサリ餌料として珪藻類、特に底棲珪藻の重要性が指摘されており^{27,28)}、アサリ稚貝が持つセルラーゼ活性は餌料となる微細藻類の分解に関係していると考えられる。なお、アサリはセルロースを直接有機物源として利用しないことが示されているので²⁷⁾、セルロースを分解して栄養源とするのではなく、餌となる微細藻類の細胞壁等を壊れやすくし、物理的な分解を補う役割を持つと考えられる。

野外で採取したアサリのセロピオシダーゼ活性は、飼育試験に比べて個体差が非常に大きく、同一個体群のなかに様々な生理状態のものが含まれていることが示唆さ

れた。一般にアサリの成長は高水温期によいと考えられているが²⁹⁾、川口干潟で周年採取した稚貝のセロピオシダーゼ活性に明瞭な季節変化は認められなかった。川口干潟のアサリは春と秋の2回の稚貝加入があり、季節に応じて各加入群の平均殻長が変化していくのに対し¹⁾本試験では採取する稚貝のサイズを5~10 mmとしたために、加入直後では成長の良い個体が、加入から暫く経過した後では成長の悪い個体が偏って採取されたことが理由として考えられる。本酵素活性と干潟底土中のクロロフィル *a* やタンパク質含有量には正の相関を持つ傾向がみられたが非常にばらつきが大きかった(図4)。また松名瀬干潟では逆にクロロフィル *a* 量が低い潮下帯で酵素活性が高くなっていたことから(図5)、野外での餌の量と貝の酵素活性の関係は明瞭でなかった。餌の量だけでなく、高水温や波浪、降雨による生息場所の物理的な攪乱等の要因がアサリの摂餌状況に影響を与えていることが考えられる。

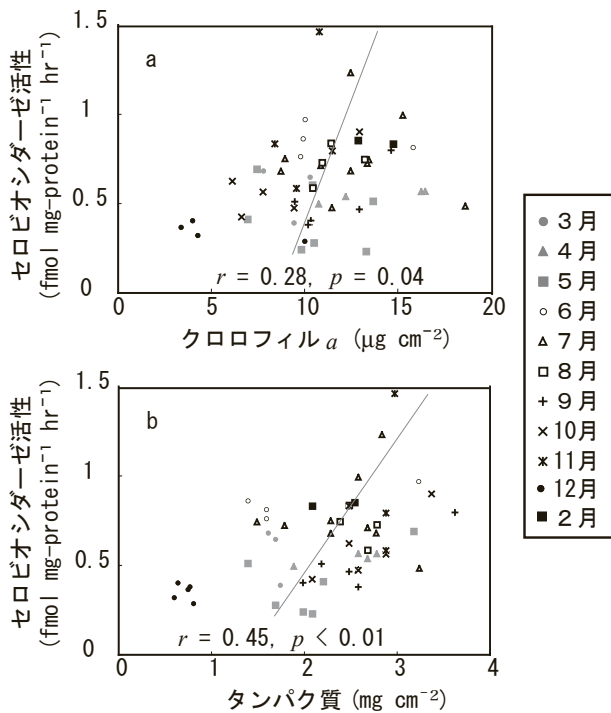


図4. アサリ稚貝のセロビオシダーゼ活性と底土中のクロロフィル *a* 含有量 (a), 及びタンパク質含有量 (b) との関係

松名瀬干潟において、潮下帯 (St.1) から採取した稚貝のセロビオシダーゼ活性は潮間帯 (St.2~6) から採取したものよりも高く、潮下帯の方がアサリ稚貝にとって餌環境が良いことが示唆された (図 5a)。しかし底土中のクロロフィル *a* 含有量は逆に潮下帯で低くなっており、潮下帯では浮遊性の微細藻の重要性が考えられる。イガイを用いた移植実験では、潮間帯よりも潮下帯の方が貝の CM セルラーゼ活性が高くなることが示されており、その理由として懸濁物中の有機物の含有率が潮下帯の方が高く、餌料の質が良いことがあげられている¹⁶⁾。他種の二枚貝でも懸濁物中の有機物含有率が低下すると CM セルラーゼ活性が下がることが示されている^{7, 12, 15, 18)}。おそらくアサリにとっても潮下帯は底土の巻き上げの影響が小さく餌料の質が良かったと考えられる。また、潮下帯は摂餌可能な時間が長いことや、さらに伊勢湾でのアサリの主要漁場は潮下帯であることから、潮下帯がアサリにとって良好な餌環境であることが推測される。

矢作川河口干潟においてホトトギスガイのマット内から採取したアサリ稚貝はセロビオシダーゼ活性が低くなっていた (図 5d)。底土中のクロロフィル *a* やタンパク質含有量はマット内外で差がなかったが、ホトトギスガイとの餌料をめぐる競合でアサリが餌不足になっていた可能性、あるいはマット内は泥質であるため懸濁物中の有機物含有率が低かったことなどが考えられる。またマット内では水流の低下や無機懸濁物の増加など、餌環境以外の要因がアサリの活性に影響を与えたことも考え

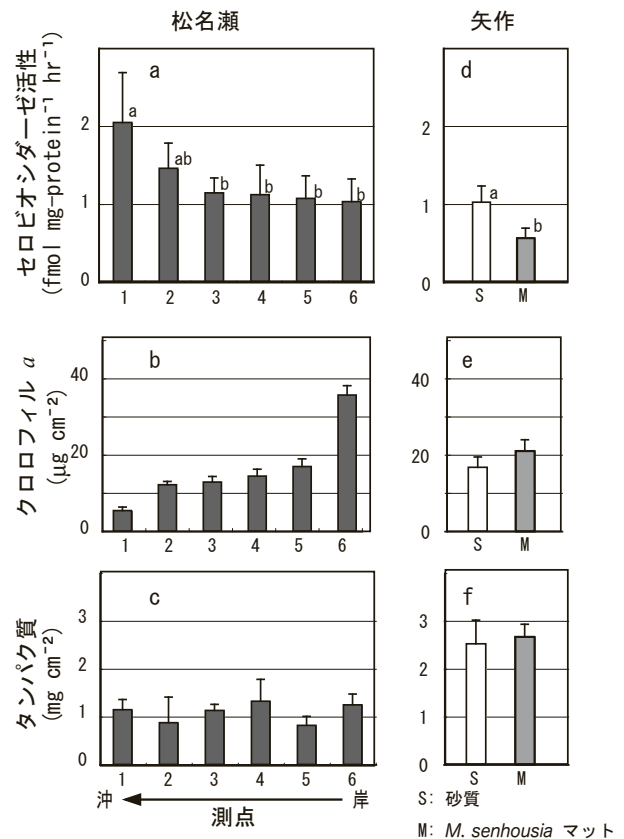


図5. 松名瀬干潟 (左) 及び矢作川河口干潟 (右) におけるアサリ稚貝のセロビオシダーゼ活性 (a, d), 底土中のクロロフィル *a* 含有量 (b, e), 及び底土中のタンパク質含有量 (c, f)
平均±標準偏差 (a, d: $n=5$, b, c, e, f: $n=3$)
図中のアルファベット小文字は統計的に差のないグループを示す ($p<0.05$)

られる。今回の結果は少なくともホトトギスガイマット内のアサリ稚貝の生理状態はマット外とは明らかに異なり、マット内ではアサリの摂餌状況が悪かったことを示唆している。

本研究の結果から、アサリ稚貝では消化酵素であるセロビオシダーゼの活性が摂餌状態によって変化することが示された。また、野外で採取した稚貝でも生息環境によるセロビオシダーゼ活性の差がみられ、本酵素活性が餌環境の良悪を反映していることが示唆された。ただし消化酵素活性は餌環境以外の要因でも変動することから^{14, 19)}、他の因子についても検討する必要がある。また本酵素活性は数日単位で変化したことから、短期間の餌環境変化を反映していると考えられる。一方成長や生残率等は、より長い期間の影響を反映していると考えられ、両方の指標を調べることで、アサリ稚貝にとっての好適な生息環境がより詳細に解明されることが期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、実験用稚貝を提供していただいた千葉県水産総合研究センター東京湾漁業研究所の

方々に感謝いたします。また、野外試料採取に御協力いただいた三重県水産研究所、愛知県水産試験場の方々に感謝いたします。その他にもアサリ資源全国協議会に関係する多くの方々から、有益なご助言やご配慮をいただきましたことを記して感謝いたします。本研究は農林水産省の平成18～20年度の「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業—新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」による支援を受けて行われた。

文 献

- 1) 水野知巳, 丸山拓也, 日向野純也 (2009) 三重県における伊勢湾のアサリ漁業の変遷と展望 (総説). 三重水研報, **17**, 1-21.
- 2) 佐々木克之. 内湾および干潟における物質循環と生物生産 (1998) 干潟と漁業生物 1. 東京湾のアサリ. 海洋と生物, **20**, 305-309.
- 3) 中原智康, 那須博史 (2002) 主要アサリ産地からの報告—有明海熊本県沿岸. 日本ベントス学会誌, **57**, 139-144.
- 4) 日向野純也 (2005) 貧酸素・硫化水素・浮泥等の環境要因がアサリに及ぼす影響. 水研センター研報別冊, **3**, 27-33.
- 5) CHOI, K. S., K. I. PARK, K. W. LEE, and K. MATSUOKA (2002) Infection intensity, prevalence, and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. *J. Shellfish Res.*, **21**, 119-125.
- 6) KOMORITA, T., S. SHIBANUMA, T. YAMADA, R. KAJIHARA, M. TSUKUDA, and S. MONTANI (2009) Impact of low temperature during the winter on the mortality in the post-settlement period of the juvenile of short-neck clam, *Ruditapes philippinarum*, on the tidal flats in Hichirippu Lagoon, Hokkaido, Japan. *Plankton Benthos Res.*, **4**, 31-37.
- 7) IBARROLA, I., J. I. P. IGLESIAS, and E. NAVARRO (1996) Differential absorption of biochemical components in the diet of the cockle *Cerastoderma edule*: enzymatic response to variations in seston composition. *Can. J. Zool.*, **74**, 1887-1897.
- 8) LABARTA, U., M. J. FERNÁNDEZ-REIRIZ, and M. F. BABARRO (1997) Differences in physiological energetics between intertidal and raft cultivated mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **152**, 167-173.
- 9) NAVARRO, J. M. and J. WIDDOWS (1997) Feeding physiology of *Cerastoderma edule* in response to a wide range of seston concentrations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **152**, 175-186.
- 10) NAVARRO, J. M., U. LABARTA, M. J. FERNÁNDEZ-REIRIZ, and A. VELASCO (2003) Feeding behavior and differential absorption of biochemical components by the infaunal bivalve *Mulinia edulis* and the epibenthic *Mytilus chilensis* in response to changes in food regimes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **287**, 13-35.
- 11) WONG, W. H., and S. G. CHEUNG (2003a) Site-related differences in the feeding physiology of green mussel *Perna viridis*: a reciprocal transplantation experiment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **258**, 147-159.
- 12) WONG, W. H., and S. G. CHEUNG (2003b) Seasonal variation in the feeding physiology and scope for growth of green mussels, *Perna viridis* in estuarine Ma Wan, Hong Kong. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, **83**, 543-552.
- 13) NIZZOLI, D., M. BARTOLI, and P. VIAROLI (2006) Nitrogen and phosphorous budgets during a farming cycle of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: An *in situ* experiment. *Aquaculture*, **261**, 98-108.
- 14) IBARROLA, I., X. LARRETxea, E. NAVARRO, J. I. IGLESIAS, and M. B. URRUTIA (2008) Effects of body-size and season on digestive organ size and the energy balance of cockles fed with a constant diet of phytoplankton. *J. Comp. Physiol. B*, **178**, 501-514.
- 15) IBARROLA, I., E. NAVARRO, and J. I. P. IGLESIAS (1998) Short-term adaptation of digestive processes in the cockle *Cerastoderma edule* exposed to different food quantity and quality. *J. Comp. Physiol. B*, **168**, 32-40.
- 16) FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J., U. LABARTA, and J. M. NAVARRO (2001) Enzymatic digestive activity in *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) in response to food regimes and past feeding history. *J. Comp. Physiol. B*, **171**, 449-456.
- 17) WONG, W. H., and S. G. CHEUNG (2001) Feeding rates and scope for growth of green mussels, *Perna viridis* (L.) and their relationship with food availability in Kat O, Hong Kong. *Aquaculture*, **193**, 123-137.
- 18) FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J., U. LABARTA, and J. M. NAVARRO (2004) Feeding and digestive response of *Argopecten purpuratus* to short-term variation in food quality and quantity. *Aquaculture*, **237**, 347-364.
- 19) FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J., J. M. NAVARRO, and U. LABARTA (2005) Enzymatic and feeding behavior of *Argopecten purpuratus* under variation in salinity and food supply. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **141**, 153-163.
- 20) JOHNSTON, D. J. (2003) Ontogenetic changes in digestive enzyme activity of the spiny lobster, *Jasus edwardsii* (Decapoda; Palinuridae). *Mar. Biol.*, **143**, 1071-1082.
- 21) JOHNSTON, M., D. JOHNSTON, and A. RICHARDSON (2005) Digestive capabilities reflect the major food sources in three species of talitrid amphipods. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **140**, 251-257.
- 22) 高槻俊一 (1961) アサリ (*Venerupis philippinarum*) の食物消化過程とそれになぞさわる消化酵素の性状. 水産増殖, **8**, 246-249.
- 23) HUANG, L., and C. W. FORSBERG (1987) Isolation of a cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1034-1041.
- 24) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 25) SUZUKI, R., and T. ISHIMARU (1990) An improved method

- for the determination of phytoplankton chlorophyll using *N*, *N*-dimethylformamide. *J. Oceanogr. Soc. Jap.*, **46**, 190-194.
- 26) RICE, D. L. (1982) The detritus nitrogen problem: New observations and perspectives from organic geochemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **9**, 153-162.
- 27) KASAI, A., H. HORIE, and W. SAKAMOTO (2004) Selection of food sources by *Ruditapes philippinarum* and *Macra veneriformis* (Bivalva: Mollusca) determined from stable isotope analysis. *Fish. Sci.*, **70**, 11-20.
- 28) KASIM, M., and H. MUKAI (2006) Contribution of benthic and epiphytic diatoms to clam and oyster production in the Akkeshiko estuary. *J. Oceanogr.*, **62**, 267-281.
- 29) 磯野良介 (1998) 東京湾盤洲干潟のアサリによる窒素摂取量の推定とその季節変動に係わる要因. 水環境学会誌, **21**, 751-756.