

技術報告

## ホタテガイ幼生簡易同定に用いる高特異的 ポリクローナル抗体の作製

清水洋平\*<sup>1</sup>・岩井俊治\*<sup>2,3</sup>・高畠信一\*<sup>1</sup>・川崎琢真\*<sup>1</sup>・山下正兼\*<sup>2</sup>

### Production of highly specific polyclonal antibodies to simplify the identification of Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* larvae

Yohei SHIMIZU, Toshiharu IWAI, Shin-ichi TAKABATAKE, Takuma KAWASAKI and Masakane YAMASHITA

In order to increase the efficiency of natural seed collection for the cultivation of Japanese scallop, *Mizuhopecten yessoensis*, each research institute needs to investigate the distribution and development of seed scallop accurately. However, identification of bivalve species based on larval morphology is difficult because of similarities in their appearance. To simplify the identification of species, we produced antibodies that specifically react with Japanese scallop larvae. Extracts from Japanese scallop larvae were injected into guinea pigs and rabbits, and the specificity of the obtained antibodies was examined by immunostaining bivalve larvae collected in Funka Bay. The antibodies stained Japanese scallop larvae with high specificity, indicating that this method is useful to identify scallop larvae among bivalve larvae of other species collected in the field. We anticipate that the antibodies will increase the efficiency of natural seed collection and enable enhancement of Japanese scallop cultivation.

2014年3月20日受付, 2014年6月5日受理

多くの二枚貝幼生は浮遊生活をするため、海流や潮汐により母貝とは異なる海域へ輸送されることが多い。二枚貝の生態や発生に関する情報を得るため、浮遊幼生の動態調査が行われているが、二枚貝の幼生の形態は類似しており、正確な種判別は極めて困難である。そこで、このような調査における浮遊幼生の種判別には、それぞれの種に特異的に反応する抗体が用いられつつある<sup>1-4)</sup>。

ほたてがいがい漁業は北海道の基幹産業である。ホタテガイの生産量は、天然採苗や中間育成技術、オホーツク海の地まき放流の拡大により増加し、平成15年には49万トン記録した。その後の生産量は40万トン前後で推移し、平成23年には年間37.8万トンが漁獲された（平

成14年から平成23年の平均漁獲量：42.0万トン<sup>5)</sup>。北海道における水揚げに対するホタテガイ生産量の割合はおよそ30%前後で推移しており、平成23年は29.2%を占めた。ほたてがいがい漁業は、1年貝を漁場に放流して数年後に漁獲する地まき漁業や、耳づりやポケット網を用いた垂下養殖が主で、すべて天然採苗で得た稚貝を用いている。天然採苗においては、適切な時期に採苗器を漁場に投入し、付着したホタテガイ幼生を採苗器上で稚貝まで成長させる。漁業者はこの稚貝を回収して1年貝となるまで座布団かごで育成した後、漁場に放流もしくは垂下養殖する。このように、天然採苗はほたてがいがい漁業の基盤であり、ホタテガイの増養殖技術の開発が開始

\*<sup>1</sup> 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1-156-3

Mariculture Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan  
shimizu-yohei@hro.or.jp

\*<sup>2</sup> 北海道大学大学院理学研究院

\*<sup>3</sup> 愛媛大学南予水産研究センター

された1930年代以降、天然採苗の安定化および効率化は本種の増養殖業を支える重要な課題である。そのため、関係する漁業協同組合、水産技術普及指導所、水産試験場では、プランクトンネットで採集したホタテガイ幼生の海水中の密度、大きさを調べ、ホタテガイ幼生の発生・分布状況を把握し、採苗器投入時期の判断基準となる採苗情報を発信している。これには、同時期・同所的に発生する様々な他種の二枚貝幼生とホタテガイ幼生を区別する必要がある。木下<sup>6,7)</sup>や丸<sup>8)</sup>は、海中や人工飼育から得られたホタテガイ幼生の殻の形態や発生を調べ、形態的特徴を示した。田中<sup>9)</sup>は様々な二枚貝の幼生殻の形態に加え、鉸装の形状について詳細に観察し、種ごとの特徴を明らかにした。ホタテガイ幼生の鉸装の形状については丸<sup>8)</sup>や田中<sup>10)</sup>により発生過程における幼生殻の形態変化や鉸装の形状が詳細に記された。しかしながら、鉸装の観察には幼生を一個体ずつ顕微鏡下で立てる必要があり、分布調査現場での判別方法としては簡易性に欠け、現実的ではない。そのため、ホタテガイ幼生を殻の形態に基づいて判別する方法が一般的であったが、この方法においても、種間の類似性や観察角度による見え方の違いから正確な判別が難しい。近年、DNAの塩基配列に基づいて種を特定する方法が普及し、データベースに登録されている様々な種の塩基配列との比較により、正確な種同定が可能となった。この手法は客観的かつ正確に種を特定できるが、調査現場でのPCRの実施は困難であり、DNAの抽出やPCRを行う技術を持った職員も少なく、解析に時間がかかるため、実用的とは言えない。

形態から種を判別するには熟練した技術が必要であると同時に、多大な時間と労力を要する。さらに、この作業に従事する人材の育成も困難である。そこで、ホタテガイ幼生を特異的に染める免疫染色技術を開発し、種判別法を「形」から「色」に変えることで、特別な能力や経験を必要とせず、漁協職員や漁業者自らこの作業に従事できることをめざした。

## 材料と方法

**抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体の作製** 噴火湾産ホタテガイを産卵誘発し、殻長160 $\mu$ mの幼生を得た。これをリン酸緩衝食塩水(PBS; 137mM NaCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68mM KCl, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)で洗浄した後、同溶液中でポッター型ホモジナイザーおよび超音波破砕機(MISONIX Model XL-2020, 55W, 90秒)により粉砕した。粉砕物を遠心分離(3000g, 5分)し、上清を得た。上清のタンパク質濃度を、ウシ血清アルブミンを標準としたBradford法で測定し、PBSで3mg/mlに希釈後、小分けして-80°Cで冷凍保存した。免疫する動物種や個体によって性質の異なるポリクローナル抗体ができる予想されたため、ウサギ(Jla:JW, 2.0kg,

オス)とモルモット(Kwl:Hartley, 3週齢, オス), それぞれ2個体を用いて抗体を作製した(以降, 得られた抗体をウサギ1, ウサギ2, モルモット1, モルモット2抗体と呼ぶ)。供試個体に対し, ウサギ1羽当たり1.5mg, モルモット1匹当たり0.625mgの抗原を各回に注射した。初回の注射ではフロインド完全アジュバント(Sigma)と抗原の等容積混合液, 2回目以降はフロインド不完全アジュバント(Sigma)との等容積混合液を, ウサギには2週間毎に, モルモットには10日毎に注射した。4回目の注射後に試採血し, ELISAで抗体価の上昇を確認した。ELISAは, 0.01 $\mu$ gの抗原を底面に吸着させた96ウェルマイクロプレートを用い, 直接吸着法により行った。ドライミルク溶液(5%ドライミルク, 20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20)で1,000倍(vol/vol)に希釈した血清100 $\mu$ lをプレートの1列目に加え, 2列目以降はさらに3倍ずつ希釈した血清を加えて37°Cで1時間処理した。処理後, 界面活性剤を含むトリス緩衝液(TTBS: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20)で10分間洗浄し, これを3回繰り返した。二次抗体には1,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識二次抗体(Invitrogen)を用い, 1時間処理した。TTBSで10分間3回洗浄した後, 1-Step NBT/BCIP(Takara)を100 $\mu$ l加えて20分間室温で発色させた。発色後, 水道水で発色反応を停止させ, 発色が見られた血清の希釈率を確認した。抗体価の上昇が確認できた後, 全採血した。血液は3時間室温においた後, 4°Cで一晩冷蔵保存し, 血餅を凝固させた。遠心により血清を分離し, -80°Cで冷凍保存した。

## 抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体の特異性検証

平成20年6月3日に噴火湾内でメッシュサイズ100 $\mu$ mのプランクトンネットを用いて採集された二枚貝類幼生を, 得られたポリクローナル抗体を用いて免疫染色した。プランクトン試料を10%ホルマリン海水で固定し, 顕微鏡下で植物プランクトンや甲殻類等を除去した後, 1.5ml遠心チューブに二枚貝類幼生を回収して標本とした。これ以降の作業は全て室温で震盪させながら行った。標本をPBSで10分間洗浄し, これを3回繰り返した。ブロッキング液としてSuperBlock Blocking Buffer(Thermo Scientific)を用いた。これに同ブロッキング液で1,000倍に希釈した抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体で1時間処理した。一次抗体反応後, PBSで10分間3回洗浄した後, 上記ブロッキング液で1,000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識二次抗体(Invitrogen)で1時間処理した。反応後, 0.1mM Tris-HCl(pH 9.5)で10分間3回洗浄した後, BCIP/NBT溶液(Sigma)を基質として発色させた。抗体の特異性を検証するため, 染色個体と非染色個体に分離し, 実体顕微鏡下で幼生の鉸装の形状<sup>8,10)</sup>を観察し, 各個体についてホタテガイか別種かを判別した。染色個体におけるホ

タテガイ幼生の数と、非染色個体における非ホタテガイの個体の数の和を、観察した個体数で除した率を正答率とし、抗体の特異性を検討した。

**イムノグロブリン G (IgG) の精製** 鉸装の形状を基に抗血清の特異性を検証し、特に特異性が高く、量も十分に得られたモルモット 1 抗体から、HiTrap Protein A カラム (GE Healthcare) を用いて IgG を精製した<sup>11)</sup>。PD10 desalting カラム (GE Healthcare) によりバッファを PBS に置換後、Amicon Ultra-4 フィルター (Millipore) で IgG を濃縮し、PBS で 1 mg/ml に希釈した。

**16S rDNA 塩基配列による抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体の特異性検証** 精製した IgG の特異性をより正確に検証するため、免疫染色後の二枚貝幼生から DNA を抽出し、16S rDNA 遺伝子の塩基配列から種を特定した。なお、アルカリフォスファターゼの発色反応では、標本をアルカリ条件下で処理するため、DNA が分解されてしまうことが危惧された。そのため、この実験での二次抗体には、中性条件で反応させる蛍光 (Alexa Fluor 488) 標識抗体 (Invitrogen) を用いた。平成 24 年 5 月 22 日に噴火湾内で採集された二枚貝類幼生標本を免疫染色後、蛍光実体顕微鏡を用いて観察した。染色個体と非染色個体を別々に 1.5ml 遠心チューブに回収した後、100% エタノールに置換した。幼生を 1 個体ずつ 0.2ml PCR チューブに 15  $\mu$ l のエタノールとともに移し、85°C で 10 分間乾燥させた後、TE で希釈した 2mg/ml のプロテイナーゼ K を 10  $\mu$ l 加え、56°C で一晩反応させた。反応後、50  $\mu$ l の InstaGene matrix (Bio-Rad) を加えて攪拌混合した後、56°C で 30 分間保温した。再度攪拌混合した後、96°C で 10 分間処理した。これを遠心分離 (20,000g, 30 分) し、上澄みを DNA 溶液として PCR に供した。種判別のために 16S rDNA の部分塩基配列を決定した。あらかじめ混合した PCR 反応液 15  $\mu$ l に DNA 溶液 5  $\mu$ l を加えて 20  $\mu$ l とした (終濃度は 1  $\times$  ExTaq バッファ (Takara), 0.2mM dNTP 混液 (Takara), 0.125  $\mu$ M フォワードプライマーおよび 0.125  $\mu$ M リバースプライマー, 0.25 ユニット ExTaq ポリメラーゼ (Takara))。96°C 10 分間の処理後、熱変性 96°C 30 秒, アニーリング 52°C 30 秒, 伸長反応 72°C 2 分を 1 サイクルとして 40 サイクル, さらに 72°C 10 分間伸長反応を行った。プライマーは 16Sar (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') と 16Sbr (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACG-3') を用いた<sup>12)</sup>。得られた PCR 産物をエタノール沈殿し、ABI BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて定法によりサイクルシーケンシング反応を行った。反応産物を CleanSEQ Kit (Beckman Coulter) で精製し、ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列を BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/blastn?lang=ja>)<sup>13)</sup> により相同性検索を

行い、幼生の種を判別した。

## 結 果

### 抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体を用いた免疫染色

ウサギ 1 抗体 48ml, ウサギ 2 抗体 48ml, モルモット 1 抗体 8ml, モルモット 2 抗体 2ml が得られた。ELISA で抗体価を調べたところ、すべての抗体が 81,000 倍希釈まで反応した。これらの抗体とアルカリフォスファターゼ標識二次抗体および BCIP/NBT を用いて二枚貝幼生を免疫染色した結果、いずれの抗体を用いた場合も、貝殻全体が紫色に染色された幼生が観察された (図 1)。

### 抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体の特異性の検証

抗体の特異性を検証するため、免疫染色による染色個体と非染色個体を分離後、各幼生の鉸装の形状を観察し (図 2), ホタテガイ幼生を判別した (表 1)。各抗体の正答率は、ウサギ 1 抗体が 99.6%, ウサギ 2 抗体が 96.6%, モルモット 1 抗体が 99.3%, モルモット 2 抗体が 100% だった。モルモット抗体の方がウサギ抗体より特異性が高い傾向にあった。

抗体の特異性をさらに検証するため、染色された二枚貝幼生の種を DNA 塩基配列に基づき判定した。モルモット 1 抗体から精製した IgG を用いて、噴火湾で採集された二枚貝幼生を蛍光免疫染色した結果、貝殻全体が染色されている二枚貝幼生が確認できた (図 3)。染色個体の 16S rDNA 配列を 1 個体ずつ決定し、BLAST により塩基配列の相同性を検索した結果、115 個体中 114 個体がホタテガイと相同だった (表 2)。残りの 1 個体はマテガイ類, *Solen* sp. と判別された。一方、非染色個体 81 個体の塩基配列を決定した結果、67 個体がマテガイ類と判別され、残りはその他の二枚貝幼生であった。非染色個体にホタテガイ幼生は含まれなかった。従っ

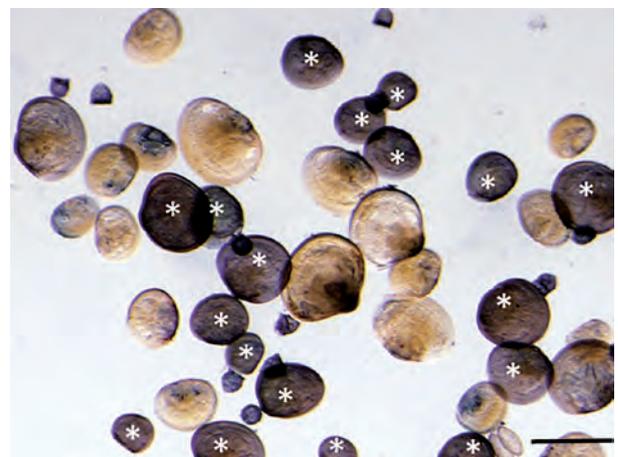


図 1. 精製前抗ホタテガイ幼生ウサギ 1 ポリクローナル抗体を用いた免疫染色像  
アスタリスクは抗体により染色された幼生を示す  
Bar = 200  $\mu$  m

表 1. 幼生の鉸装の形状を基にした抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体の特異性検証

抗体	免疫染色結果	観察数	ホタテガイの幼生数	他種の幼生数	正答率 (%)
ウサギ 1	染色有り	256	255	1	99.6
	染色無し	248	1	247	
ウサギ 2	染色有り	131	124	7	96.6
	染色無し	76	0	76	
モルモット 1	染色有り	198	196	2	99.3
	染色無し	86	0	86	
モルモット 2	染色有り	193	193	0	100
	染色無し	104	0	104	

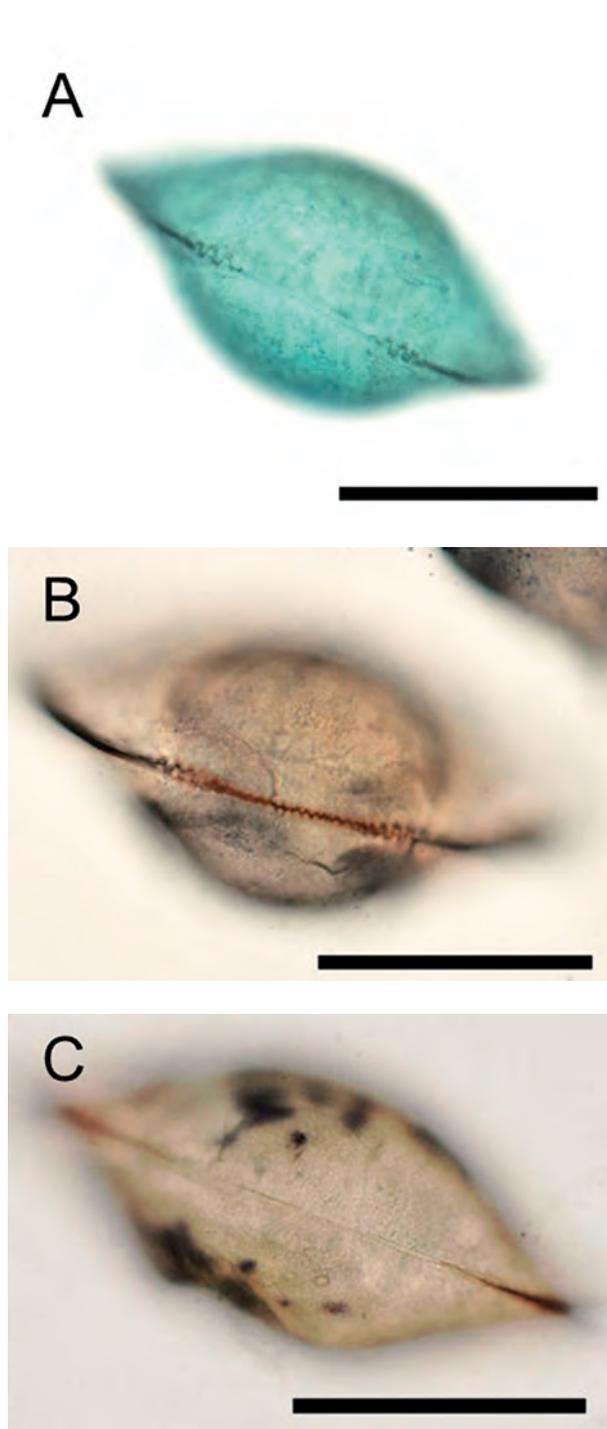


図 2. ホタテガイ幼生 (A) および他種 (B, C) の鉸装  
Bar = 100 μm

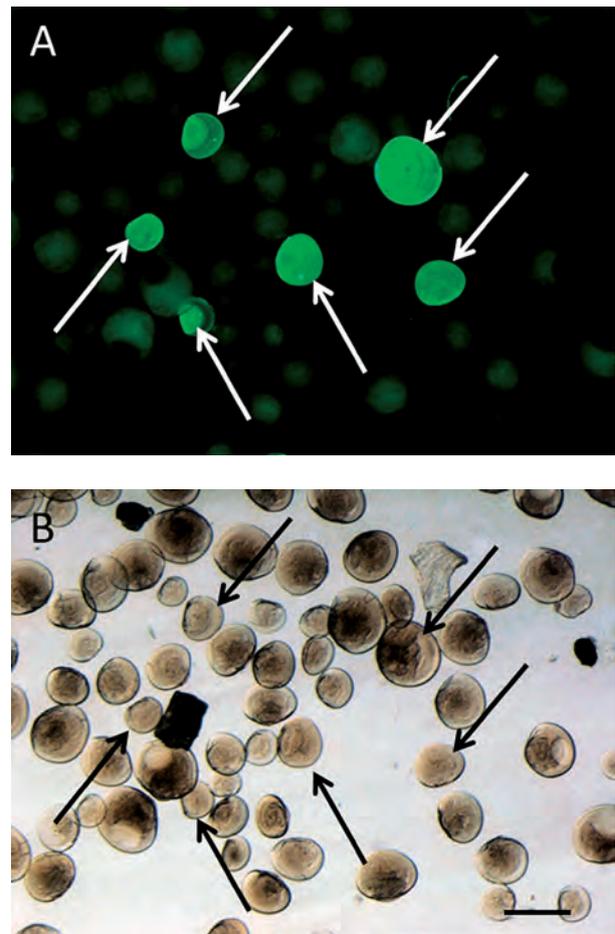


図 3. 精製 IgG を用いたホタテガイ幼生の免疫染色  
(A) 蛍光実体顕微鏡の視野. (B) 光学顕微鏡の明視野  
矢印は染色された幼生  
Bar = 200 μm

て、判別正答率は 99.5% で、鉸装の形態に基づく正答率 (99.3%) と同様の成績が得られた。以上の結果から、抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体を用いた免疫染色により、ホタテガイ幼生を判別できることが示された。

### 考 察

これまでホタテガイ幼生の判別は幼生殻の形態に基づいて行われてきた。この方法では、種間の類似性から判別が困難であり、観察に多大な労力と時間が掛かるだけ

表 2. 抗ホタテガイ幼生モルモット 1 抗体を用いて免疫染色した幼生の 16S rDNA 塩基配列による同定

種	染色有り	染色無し	Blast による相同性検索の結果		
			Accession No.	種	相同性
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	114	0	AB103394	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	99%
<i>Solen</i> sp.	1	67	JN786377	<i>Solen strictus</i>	88%
<i>Mytilus trossulus</i>	0	2	HM462080	<i>Mytilus trossulus</i>	99%
<i>Hiatella</i> sp.	0	6	KC429286	<i>Hiatella arctica</i>	86%
<i>Mya</i> sp.	0	5	KC429313	<i>Mya arenaria</i>	88%
Other species	0	1	JF496756	<i>Laevicardium crassum</i>	85%

でなく、この作業に従事する人材の育成も困難であった。これに代わる方法として、免疫染色法がある。免疫染色は簡単な操作で実施でき、2-3時間で終了する。判別は、染色の有無を確認するだけで簡単に行える。そこで、本研究では、ホタテガイ幼生を特異的に染色する抗体を作製し、免疫染色法を確立した。

本研究で得られた4種のポリクローナル抗体の特異性を検証するため、免疫染色による染色個体と非染色個体の種を殻装の形状で判定した。その結果、これらの抗体はホタテガイ幼生を判別するのに十分な特異性を有することが判った（正答率、96.6% - 100%）。高い特異性は16S rDNAの塩基配列に基づく種判定でも確認された。本抗体は、本研究で観察された二枚貝幼生以外にも、ウバガイやビノスガイ等の同時期に発生する二枚貝幼生や、同じイタヤガイ科のアカザラガイ幼生についても染色しないことが確認されており（未発表データ）、ホタテガイ幼生の出現時期を通じて、活用できると考えられる。本抗体の特徴として、ホタテガイ幼生の貝殻全体を染めることがあげられる。この場合、軟体部や面盤よりも広範囲が染色され、かつ、アルカリフォスファターゼを用いた本研究の発色方法では沈着した基質が濃い紫色を呈するため、現場で利用されている万能投影機や実体顕微鏡で観察した際に視認しやすい。このため、容易に染色された幼生を認識することができ、観察者の能力や経験に依存しない客観的なデータを得ることが可能である。本法により、ホタテガイ幼生を形態ではなく染色で客観的に識別できるため、ホタテガイ幼生の判別精度が増すことが期待される。これは、はたてがい漁業開始以来70年近く続いた形態を基にした主観的種判別からの脱却といえる。

二枚貝幼生に対するポリクローナル抗体の作製は、ヨーロッパホタテガイ *Pecten maximus* での事例がある<sup>14)</sup>。Paugam *et al.* は、ヨーロッパホタテガイ幼生からフェノールやクロロフォルムとメタノールの混合液を用いてタンパク質を抽出し、これを抗原としてポリクローナル抗体を作製した。この抗体は、ウエスタンブロッティングにより種特異的なバンドを検出でき、また、マガキ幼生の抽出液で非特異的抗体を吸着させることで、プランクトン中のヨーロッパホタテガイ幼生を認識した。アルカリフォスファターゼが結合した二次抗体を用いた免

疫染色では、外套膜上の殻が強く染色された<sup>14)</sup>。本研究では、殻長160  $\mu$ mのホタテガイ幼生をPBS中で粉碎し、その抽出液を抗原としてウサギとモルモットで作製された抗体のすべてが、ホタテガイ幼生の貝殻を特異的に染色することが示された。変態直後のD型幼生からのPBS抽出液でウサギ、モルモット、マウスを免疫した場合も、ホタテガイ幼生の貝殻を染める抗体が得られた（未発表データ）。さらに、イガイ類のD型幼生からのPBS抽出液でウサギとモルモットを免疫した場合も、幼生の貝殻を染める抗体が得られた（未発表データ）。すなわち、幼生をPBS中で粉碎して得られた抽出液を抗原に用いることで、免疫する動物種や個体に関わらず、種特異的に貝殻を染める抗体が得られると考えられる。抗原性の強い貝殻成分がPBSで効率的に抽出されると予想され、この成分を化学的に同定することで、各種二枚貝幼生の貝殻を特異的に染色できる抗体の作製がより現実になろう。

これまで、二枚貝幼生を認識するモノクローナル抗体がいくつか報告されている。アサリ幼生に対するマウスモノクローナル抗体（特許第2913026号）は、幼生を氷冷下で超音波処理した後、遠心分離して得られた上清を抗原として作製された。イガイ付着期幼生（特開2009-148170）や *Perna* 属のイガイ幼生（特許第5007321号）に特異的なマウスモノクローナル抗体は、PBSと幼生の混合物を抗原として作製された。しかし、これらのモノクローナル抗体は、貝殻ではなく、幼生の足や面盤を染色する。少なくともイガイ幼生に対するモノクローナル抗体の作製にはPBS抽出抗原が使用されたため、得られたマウス抗血清は幼生の貝殻に反応する抗体を含んでいた可能性が高い。しかし、モノクローナル抗体のスクリーニング過程で、貝殻を染色する抗体を産生するハイブリドーマは排除されたと考えられる。このことは、より視認しやすいと考えられる貝殻全体を染色するモノクローナル抗体を作製するためには、スクリーニング手法が極めて重要であることを示唆する。

ポリクローナル抗体はモノクローナル抗体とは異なり、消費されると同じ特性の抗体を再度作製することが困難というデメリットが予想されるが、ウサギやモルモットを用いることで大量の抗体を一度に作製できるというメリットもある。ウサギを用いると1羽あたり

50ml 程度、モルモットを用いると 10ml 程度の抗体を得ることができる。一次抗体処理に必要な液量は 250 $\mu$ l であるため、希釈率 1,000 倍として、1 サンプルに使用する抗体量は 0.25  $\mu$ l である。そのため、特異性の高いポリクローナル抗体を一度作製すれば、冷凍保存することで何十年も使用できる。モノクローナル抗体に比べ、ポリクローナル抗体の作製は容易で安価であることに加え、抗原の調製も幼生を PBS 中で粉碎するだけで、極めて簡便である。ポリクローナル抗体を用いた貝殻染色は、二枚貝幼生の種判別法として非常に有効と考えられる。

本研究で行った免疫染色は、一次抗体および二次抗体反応がそれぞれ 1 時間また、発色反応に 30 分程度を要した。さらに、それぞれの反応の間に 30 分ほどの洗浄時間が必要であるため、合計 3 時間掛かることになる。現場で免疫染色を行う場合、情報を迅速に発信するため、より短時間で染色を終えることが望ましい。そのため、精製した IgG にアルカリフォスファターゼを直接結合させることで二次抗体反応およびその後の洗浄工程を省き、全体的な作業時間を短縮させる工夫が必要である。また、現場におけるマイクロピペットの使用は、高価であると同時に操作に専門性が求められる。そこで、ドロップボトルや点眼ボトルのような容易に溶液を注入できる溶液を用いて操作を簡便にし、キット化することで現場への普及が促進されることが考えられる。これらの改良により、幼生分布調査がより効率化すると同時に、各地で得られた客観的データを広範囲で取りまとめることも可能となる。ホタテガイの幼生は付着に至るまで広範囲を海流により輸送されると考えられている<sup>15)</sup>。本免疫染色により、D 型幼生から着底期幼生までのホタテガイ幼生を判別できるため（清水、投稿準備中）、海域ごとのホタテガイ幼生の発生過程別分布を知ることができる。これらの情報を統合・共有することで、広域かつ長期的な天然採苗に関する情報が各現場に提供されることが期待される。

## 謝 辞

標本の採集にご協力いただいた胆振噴火湾漁協所属の田中勇次漁業士および北海道水産技術普及指導所の皆様へ感謝いたします。本研究は北海道ホタテガイ振興協会からの受託事業「日本海ホタテガイ採苗不振対策事業」により行った。

## 文 献

- 1) 浜口昌巳 (1999) 貝類浮遊幼生の免疫学的特性の解明。「魚介類の初期生態解明のための種判別技術の開発」, 農林水産技術会議事務局, 東京, 21-31pp.
- 2) 浜口昌巳 (2009) アサリ等海産ベントスの初期生態研究推進のための技術開発. 日水誌, **75**, 771-774.
- 3) 福澄賢二・浜口昌巳・小池美紀・吉岡武志 (2013) モノクローナル抗体法及びリアルタイム PCR 法によるアコヤガイ浮遊幼生の同定. 福岡水海技七研報, **23**, 27-32.
- 4) 鳥羽光晴・山川絃・庄司紀彦・小林豊 (2013) 東京湾盤川沿岸での 1 潮汐間におけるアサリ幼生の鉛直分布の特徴. 日水誌, **79**, 355-371.
- 5) 北海道 (2013) 北海道水産業・漁村のすがた 2013 ~ 北海道水産白書~, 札幌, 20-22pp.
- 6) 木下虎一郎 (1936) 帆立貝の知識. 北海道水産試験場, 27-35pp.
- 7) 木下虎一郎 (1949) ホタテガイの増殖に関する研究. 北方出版社, 札幌, 11-34pp.
- 8) 丸邦義 (1972) ホタテガイ幼生の形態について. 北水試研報, **14**: 55-62.
- 9) 田中彌太郎 (1979) 二枚貝類幼生の同定 1. 海洋と生物, **2**, 27-33.
- 10) 田中彌太郎 (1980) 二枚貝類幼生の同定 6. 海洋と生物 **7**, 119-121.
- 11) GEヘルスケア・ジャパン株式会社 (2006) はじめての抗体精製ハンドブック. 東京, 41-42pp, 123p.
- 12) KESSING, B., H. CROOM, A. MARTIN, C. MCINTOSH, W. O. McMILLAN and S. P. PALUMBI. (1989) The simple fool's guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu, USA.
- 13) ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHAFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER and D. J. LIPMAN (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. **25**: 3389-3402.
- 14) PAUGAM, A., M. L. PENNEC and A-F. GENEVIEVE (2000) Immunological recognition of marine bivalve from plankton samples. J. Shellfish Res. **19**: 325-331.
- 15) 磯貝安洋・磯田豊・下野学・小林直人・工藤勲・干場康博 (2010) 北海道西岸沖のホタテ種苗生産を支える産卵及び浮遊幼生の輸送過程. 北海道大学水産科学研究彙報, **60**: 23-37.