

資源管理・増殖シリーズ

ホタテガイ幼生を染め分ける

—新判別技術の開発—

キーワード：抗ホタテガイ幼生抗体、免疫染色、ホタテガイ幼生調査、幼生判別技術

はじめに

平成19年の北海道におけるホタテガイの生産量は38.6万トンであり、魚種別生産量は堂々の第一位です¹⁾。この北海道の基幹産業とも言えるホタテガイ漁業は天然の稚貝を得る（天然採苗）ところから始まるため、天然採苗を確実に行うことが稚貝の安定生産を行うための大前提となります。

ホタテガイ幼生の発生量や発生時期は海洋環境に大きな影響を受けるため、関係機関では幼生の発生状況を調査し、採苗情報を発信して採苗安定化を図っています。この調査は、噴火湾から日本海、オホーツク海とホタテガイ漁業が行われている各地区で実施されています。特に噴火湾では金星丸を用いた全湾調査や各浜での調査などサンプル数は膨大です。にもかかわらず、迅速に採苗情報を発信しなければならないため、大勢でサンプル処理及び計数を行っているのが現状です。

この作業の問題点としては、プランクトンネットで採集したサンプルから二枚貝幼生に混ざってくる植物プランクトンや甲殻類を取り除く作業（クリーニング）に時間がかかること、二枚貝幼生（特に初期幼生）の形態が似ており、ホタテガイ幼生の判別が難しいことがあげられます。特に初期幼生は種が異なっても形態がよく似ており、見慣れた人でも悩むことが多いようです。ホタテガイ幼生だけに色をつけることができれば、素人の私でも判別できるようになるはずです。

ところで、ホタテガイ同様に、幼生の発生状況

や分布調査を行っている魚種にアサリがあります。アサリも幼生は他の二枚貝とよく似ており、形態からの判別は難しいのですが、「免疫染色による判別法」が確立されており、蛍光生物顕微鏡を覗くことによって簡単に判別できます。この方法を用いれば、アサリの幼生の面盤部分（幼生が遊泳するための運動器官）が緑色に光るのです²⁾。そこで、ホタテガイ幼生の判別にこの「免疫染色による判別法」を応用できないかと考え、北海道大学先端生命科学研究院の山下正兼教授（先端生命分子科学分野生殖発生生物学第一研究室）と共同で研究・技術開発を行っています。

ここでは、私たちが開発した免疫染色によるホタテガイ幼生の判別技術の現状について報告させていただきます。

ところで免疫染色とは……

先日、インフルエンザの予防接種に行ってきました。とは言っても季節型なのですが。この予防接種ではインフルエンザウィルスの表面にあるタンパク質を精製して体内に注射しています。そうすると、体内ではこのインフルエンザタンパク質に結合する抗体を作り出します。この抗体はしばらくの間は体の中で作られているため、実際にインフルエンザウィルスに感染した時「すぐに抗体がウィルスに結合して体内から追い出し、病気が重篤化せずにすむ」ということを期待しているわけです。

さて、この時作られた抗体は、このインフルエンザタンパク質にしか結合しません。体の中には、たくさんの種類の抗体が存在しますが、それぞれ結合する相手はたった一つです。免疫染色はこの抗体の特異性を利用した染色方法です。

予防接種のように、ホタテガイ幼生の抽出液をウサギやモルモットに注射します。すると、これら動物の体内ではホタテガイ幼生に結合する抗体が作られます。この抗体を精製し、酵素標識を結合させたものを“抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体（以下「抗体」と略します）”としてホタテガイ幼生の免疫染色に用います（図1）。この抗体に結合させた酵素と発色基質を反応させると紫色の沈殿を生じて色がつく仕組みとなっており、つまりは、抗体が結合しているところのみが紫色になるというわけです。

さて、プランクトンネットで集めてきた二枚貝幼生の中には、ホタテガイ以外にも様々な種の幼生が存在します。これらの二枚貝幼生と抗体を混ぜると、抗体がホタテガイ幼生のみ結合します。ここで発色基質と抗体に結合した酵素を反応させると、ホタテガイ幼生が紫色に染色され、色で他の二枚貝と区別することができるようになります（図2）。

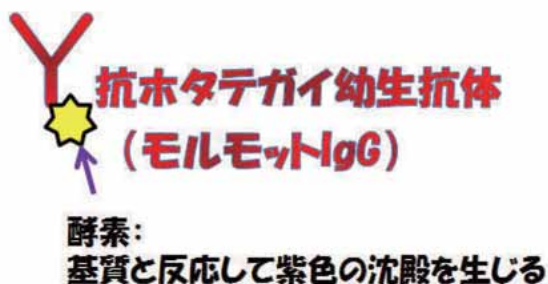


図1 抗ホタテガイ幼生抗体の模式図
抗体はY字の形をしたタンパク質（IgG）。
免疫染色に用いる抗体には酵素が結合している。

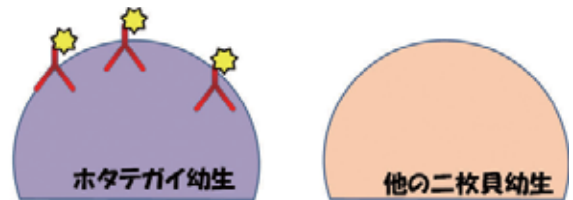


図2 免疫染色法の原理

抗体はホタテガイ幼生のみ結合する。
抗体に結合している酵素と基質が反応して
紫色の沈殿物が生じ、ホタテガイ幼生のみ
が紫色に染まる。

免疫染色方法

- 1) クリーニングを終えた二枚貝幼生を1.5mlのマイクロチューブ（以下チューブ）へ移します（写真1）。



写真1 マイクロチューブに幼生を移す

- 2) チューブの底に幼生が沈んだのを確認し、ピペットもしくはアスピレーター（以下ピペットに統一）を用いてチューブ内の水を捨てます（写真2）。



写真2 マイクロチューブから水を吸引する

- 3) 約1mlの溶液Aをチューブに入れます。
- 4) 2) および3) をさらに2回繰り返した後、溶液Aをピペットで捨てます。
- 5) 0.2mlの溶液Bをチューブに入れ、30分間ローテーターで撹拌します(写真3)。

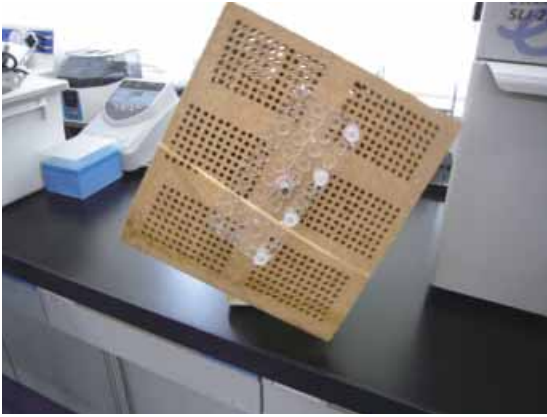


写真3 ボードにマイクロチューブを差し込んで回転させる

- 6) 溶液Bをピペットで捨てます。
- 7) 約1mlの溶液Cをチューブに入れます。
- 8) チューブの底に幼生が沈んだら、ピペットで溶液Cを捨てます。

- 9) 7) および8) をさらに2回繰り返します。
- 10) 約1mlの溶液Dをチューブに入れ、15~30分間ローテーターで撹拌して発色させます。もしくは、時計皿に移して発色させます(写真4)。

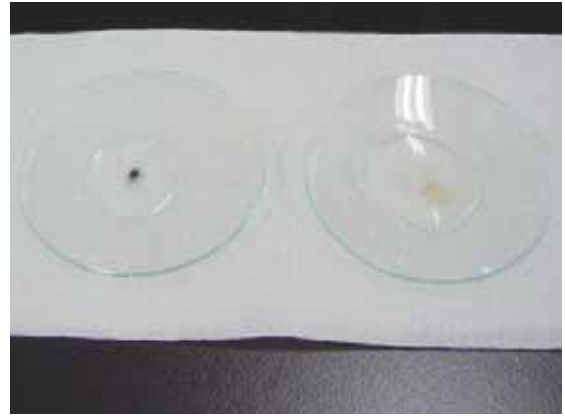


写真4 免疫染色の発色状況(右: 発色していない、左: 発色後)

- 11) 十分発色したら、溶液Dを捨てて水道水を加えて発色反応を止めます。
- 12) 実体顕微鏡や万能投影機で観察します。

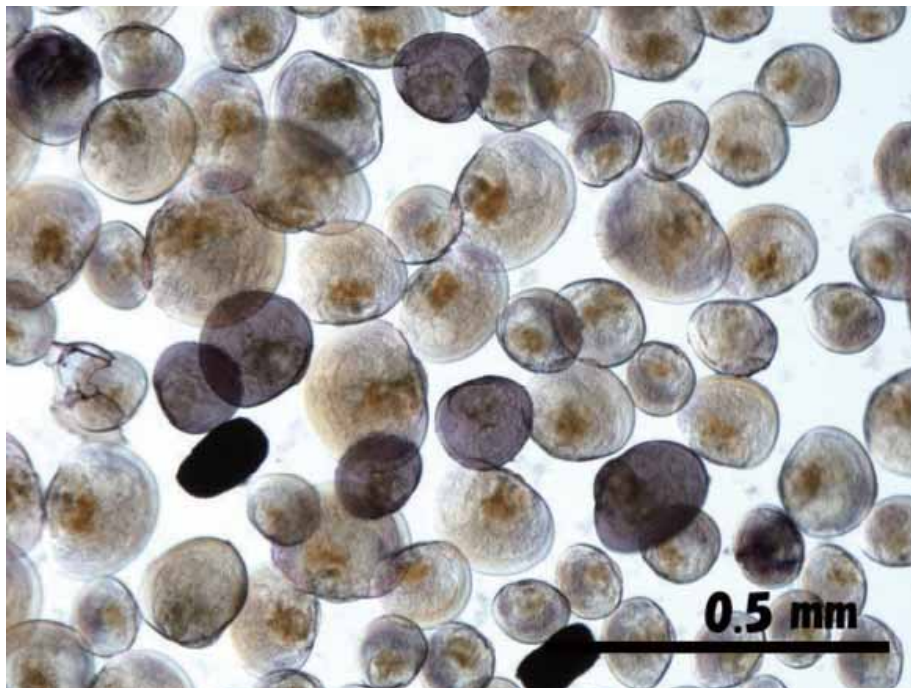


写真5 豊浦町礼文華沖サンプルの免疫染色結果(実体顕微鏡画像)
ホタテガイ幼生が紫色に染色されている(6個体)。左上および右下に染色ムラのある個体が見られるが、ホタテガイ幼生ではない。黒いのはゴミ。

ここで、

溶液A：リン酸緩衝食塩水

溶液B：抗体溶液

溶液C：洗浄液

溶液D：発色基質溶液

です。試薬が4種類もあって複雑そうに思えますが、操作は溶液の出し入れだけですので、実際にやってみるととても簡単です。1人で20サンプルの処理を行ったとしても作業にかかる時間は1時間半くらいです。

写真5は実際に免疫染色を行った結果です。ホタテガイ幼生は殻全体が紫色に染色されています。染色されていない、もしくは染色にムラがある二枚貝幼生は、ホタテガイではありません。検鏡では殻全体が紫色の幼生だけをカウントすればよいので、小型個体であっても悩むことはなくなります。

最後に

本技術は、栽培水試普及指導員や各地区水産技術普及指導所の他、いぶり噴火湾漁協や豊浦町等と、たくさんの方々のご協力を得て、簡単でかつ精度の高い判別技術として開発することができました。今年度は実際に、中央水試海洋環境部とおやしお丸が日本海で実施したホタテガイ幼生の調査（本号海洋環境シリーズ参照）や、函館水試調査研究部と金星丸による噴火湾の調査でも活用されました。また、普及員一般研修の場で多くの普及員の方々に体験していただくことができ、よい評価が得られたと実感しています（本号トピックス参照）。しかしながら、現場への普及に向けて、さらに簡易な操作でかつ計数作業が容易になる技術へと発展させていく必要があるため、今後より染色性の高い抗体の開発や免疫染色技術の改良を進めていきます。

参考文献

- 1) 水産林務部総務課水産企画グループ：“北海道水産業・漁村の概要”．北海道水産業・漁村のすがた2009～北海道水産白書～．札幌，北海道庁，2009，12p.
- 2) 浜口昌巳：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. 日本水産学会誌. 75 (5) , 771-774 (2009)

(清水洋平 栽培水試生産技術部

報文番号B2317)