

ホタテガイ幼生分布調査に有用な免疫染色技術の実用的改善

清水洋平*¹, 狩野俊明², 成田伝彦³, 板倉祥一⁴, 榎本洸一郎⁵, 戸田真志⁶, 川崎琢真¹, 高島信一¹, 岩井俊治^{7,8}, 山下正兼⁷

¹北海道立総合研究機構栽培水産試験場, ²釧路総合振興局釧路地区水産技術普及指導所,
³十勝総合振興局十勝地区水産技術普及指導所, ⁴檜山振興局檜山地区水産技術普及指導所,
⁵新潟大学大学院自然科学研究科, ⁶熊本大学総合情報統括センター,
⁷北海道大学大学院生命科学院, ⁸愛媛大学南予水産研究センター

Practical improvement of the immunostaining method used for investigating the distribution of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) larvae in the field

YOHEI SHIMIZU*¹, TOSHIKI KARINO², MORIYOSHI NARITA³, SHOICHI ITAKURA⁴, KOICHIRO ENOMOTO⁵, MASASHI TODA⁶, TAKUMA KAWASAKI¹, SHIN-ICHI TAKABATAKE¹, TOSHIHARU IWAI^{7,8} and MASAKANE YAMASHITA⁸

¹ Mariculture Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, *Muroran, Hokkaido 051-0013*,

² Kushiro Fisheries Technical Guidance Office, Hokkaido Government Kushiro General Subprefectural Bureau, *Akkeshi, Hokkaido 088-1118*,

³ Tokachi Fisheries Technical Guidance Office, Hokkaido Government Tokachi General Subprefectural Bureau, *Hiroo, Hokkaido 089-2601*,

⁴ Hiyama Fisheries Technical Guidance Office, Hokkaido Government Hiyama Subprefectural Bureau, *Esashi, Hokkaido 043-8558*,

⁵ Graduate School of Science and Technology, Niigata University, *Niigata, Niigata 950-2181*,

⁶ Center for Management of Information Technologies, Kumamoto University, *Kumamoto, Kumamoto 960-0862*,

⁷ Graduate School of Life Science, Hokkaido University, *Sapporo, Hokkaido 060-0810*,

⁸ South Ehime Fisheries Research Center, Ehime University, *Ainan, Ehime 798-4292, Japan*

For the efficient collection of natural spats of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*), the distribution and development of larvae in the field should be periodically monitored at various areas in the sea. To simplify this task, an immunostaining method using polyclonal antibodies that specifically react with Japanese scallop larvae is being utilized; however, some processes of the immunostaining require improvement. In the present study, we examined the optimal conditions of fixation in the immunostaining technique to obtain stable immunostaining results. We found that fixation of samples with 0.9% formaldehyde or 0.5% glutaraldehyde in sea water overnight leads to constant and reliable results. The optimization of the antigen-antibody reaction and chromogenic reaction also shortens the total time required for immunostaining.

キーワード：抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体, 固定液, ホタテガイ幼生分布調査, 免疫染色技術

ほたてがい漁業は北海道水産業における基幹産業である。この漁業において放流もしくは養殖に用いられる稚貝はすべて天然採苗に依存している。天然採苗を効果的に行うため、各関係機関は多くの調査地点でホタテガイ幼生を採集し、幼生の出現数や殻長組成を経時的に把握

する調査を実施している（以後この調査を分布調査と記す）。清水ら（2014a）は幼生の計数や計測の作業を効率化させるため、ホタテガイ幼生を特異的に染色する免疫染色技術を開発した。これに用いられる抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体は非常に特異性が高く、ホタテガ

イ幼生だけを染めることができる。さらに、免疫染色工程の簡略化や操作の簡易化により、本技術の現場への普及が図られている(清水ら, 2014b)。しかし、漁業現場で活用される中でいくつかの問題点が指摘されている。すなわち、試料の固定状態によっては非特異的発色がみられたり、面盤が染色されたりすることにより観察が困難になる。特に面盤は、種間で同じ構造をした抗原が含まれているためか、ポリクローナル抗体を用いた免疫染色では他種の面盤も染色されやすく、非特異的な発色の原因となる。また、面盤の露出により繊毛同士が絡み合うことで幼生同士がくっつき、貝殻の角度が変わるため観察しづらいといった問題を生じる。そのほか、計数作業を現場でより効率的に行うため、現状ではそれぞれ30分間かかる抗体反応や発色時間の短縮も求められている。そこで、本研究では免疫染色法の実用的改善を目的として、免疫染色に用いる試料を固定する溶液の種類や、刺激臭がホルマリンより少ないことで利用されることが多くなったグルタルアルデヒドを用いた固定条件について、さらに、抗体反応および発色反応に必要な最小時間について検討した。

試料および方法

固定液の種類と濃度の検討 2010年5月27日に豊浦町沖で北原式プランクトンネット(開口径30cm, 目合い0.1mm)を用いて、深度15mからの鉛直曳きにより二枚貝幼生を採集し、これをエタノール(99.8%, 関東化学株式会社), ホルマリン(37%ホルムアルデヒド溶液, 和光純薬工業株式会社)もしくはグルタルアルデヒド溶液(25%グルタルアルデヒド溶液(関東化学株式会社)で固定した。エタノール固定の終濃度は試料を含む海水で希釈して5%, 10%および20%とした。ホルマリン(37%ホルムアルデヒド溶液)を用いた固定は、試料を含む海水で100倍(ホルムアルデヒド終濃度0.37%), 40倍(同0.9%), 20倍(同1.9%)および10倍(同3.7%)に希釈して各濃度で行った(以降、試料を含む海水で希釈したホルマリンをホルムアルデヒド海水溶液と呼ぶ)。また、グルタルアルデヒド溶液(25%グルタルアルデヒド溶液)を用いた固定は、試料を含む海水で50倍(グルタルアルデヒド終濃度0.5%), 25倍(同1%), 16.7倍(同1.5%)および12.5倍(同2%)に希釈して各濃度で行った(以降、海水で希釈したグルタルアルデヒド溶液をグルタルアルデヒド海水溶液と呼ぶ)。いずれの固定液を用いた場合も、試料は室温で一晩固定した。また、対象として、固定をせずに免疫染色に用いるまで4℃で保存した試料も用意した。免疫染色に用いる試料の処理は以下の

ように行った。まず、試料から、500 μ m目合いのメッシュで大きなゴミを取り除いた。次いで500mlのメートルグラスへ試料を移し、比重の軽い植物プランクトンをアスピレーターで除去した。最終的に実体顕微鏡下で残りの植物プランクトンや甲殻類プランクトン等を取り除き、二枚貝幼生のみを1.5mlマイクロチューブに移した。これを清水ら(2015)の方法で免疫染色した。全ての操作は室温で行った。

グルタルアルデヒドによる固定時間と短時間固定における固定濃度の検討 栽培水産試験場で生産したホタテガイ浮遊幼生を、1%グルタルアルデヒド海水溶液で固定した。固定時間は、5分, 15分, 30分, 60分, 180分および360分とした。固定後、試料をリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄し、抗体反応までブロッキングバッファー(Super Block Blocking Buffer in PBS, Thermo Scientific)に浸して4℃で保存した。免疫染色は、清水ら(2015)の方法に従った。また、短時間の固定で処理する場合の適切な固定液濃度を調べるため、ホタテガイ浮遊幼生を、25%グルタルアルデヒド溶液を海水で25倍, 12.5倍, 8.3倍および6.3倍希釈して、それぞれ1%, 2%, 3%および4%グルタルアルデヒド海水溶液とした異なる濃度のグルタルアルデヒドで固定した。固定時間は30分とした。**抗体反応時間と発色反応時間の検討** 免疫染色の作業時間を短縮するため、抗体反応および発色反応に必要な最小時間を検討した。試料は小樽沖と遠別沖で採集された二枚貝幼生を用いた。抗体反応については、抗体処理時間を20分もしくは30分とした。その後の洗浄および発色反応方法については清水ら(2015)に従った。免疫染色後、両者の染色性を比較した。発色時間の検討を行うため、清水ら(2015)の方法で抗体反応および洗浄作業を終えた試料に発色基質を加え、発色反応開始後5分, 10分, 15分, 20分, 25分, 30分, 40分および60分に写真を撮影した。撮影した画像から、染色された幼生と染色されなかった幼生をそれぞれ5個体ずつ抽出し、画像ソフトPaint shop Pro X(コーレル株式会社)を用いて、それぞれの貝殻の中心部から縁辺部を含まないように円領域を目視により指定した。ここで対象領域において、面積をN, 輝度値をL($L=0.2989012 \times R+0.586611 \times G+0.114478 \times B$, 0~255)としたとき、幼生の色濃度Fを

$$F = 1 - \frac{1}{N} \sum_N (255 - L) \dots (0 \leq F \leq 1)$$

と定義した。各個体の色濃度を算出した後、平均値と標準偏差を求めた。ただし、発色反応後60分に撮影した画像については、他の画像より全体の輝度が高く比較することが不適当と考えられたため、解析から除いた。

結 果

固定液の種類と濃度の検討 豊浦沖で採集した二枚貝幼生を固定せずに免疫染色に供した場合 (Fig. 1A), 貝殻全体に加え面盤および貝殻内部が染色されたホタテガイ幼生が見られた (Fig. 1Aアスタリスク)。また, ホタテガイ以外の幼生も貝殻内部が強く発色し (Fig. 1A矢頭), 免疫染色による種の判別は困難であった。エタノール固定した二枚貝幼生を染色した結果 (Fig. 1B-D), 濃度にかかわらず, 比較的均一にホタテガイ幼生の貝殻が染色されたが, 面盤部位の発色も見られた (Fig. 1B-D矢印)。また, 他の二枚貝幼生の貝殻内部に不均一な発色が見られた (Fig. 1B-D矢頭)。0.37%ホルムアルデヒド海水溶液を用いた場合, エタノール固定と同様に, ホタテガイ以外の幼生の貝殻内部に発色が見られた (Fig. 1E矢頭)。しかし, 0.9%から3.7%ホルムアルデヒド海水溶液を用いた場合は, ホタテガイ幼生の貝殻が均一に染まり, かつ, ホタテガイ幼生の面盤や他の二枚貝幼生の貝殻内部に発色が見られないなど, 非常に良好な染色結果が得られた (Fig. 1F-H)。グルタルアルデヒド海水溶液を用いた場合, 濃度 (0.5-2%)に関わらず, ホタテガイ以外の幼生に発色は見られず, 良好な染色がみられた (Fig. 1I-L)。

グルタルアルデヒドによる固定時間と短時間固定における固定濃度の検討 30分以下の固定時間では, 幼生の貝殻が閉じきらず, 面盤が貝殻から露出している個体が見られた (Fig. 2A-C矢印)。これらの個体は面盤部が強く染色されていた。また, 幼生同士が付着し合い, 殻長の測定に不具合を生じた。一方で, 60分以上の固定を行った試料では, 貝殻がきつく閉じられ, 面盤が露出している個体は見られなかった (Fig. 2D-F)。そのため, 貝殻全体が均一に染色され, かつ, 個体同士の接着もみられず, 観察が容易であった。次いで, 固定時間を30分とし, 固定濃度を変えた場合, 1%と2%グルタルアルデヒド海水溶液で固定された試料は, 貝殻から面盤が出ている個体が多く見られ, また, 幼生同士が付着していた (Fig. 3A, B矢印)。3%グルタルアルデヒド海水溶液でも一部の個体で面盤が染色された (Fig. 3C矢印)。4%グルタルアルデヒド海水溶液で固定された試料は, 貝殻が閉じられており, 面盤の露出もなかった。また, この条件では貝殻が均一に染色され, 幼生同士の付着もみられなかった (Fig. 3D)。

抗体反応時間と発色基質反応時間の検討 抗体反応時間を20分もしくは30分として免疫染色を行った染色像をFig. 4に示した。反応時間が20分 (Fig. 4A)でも30分 (Fig.

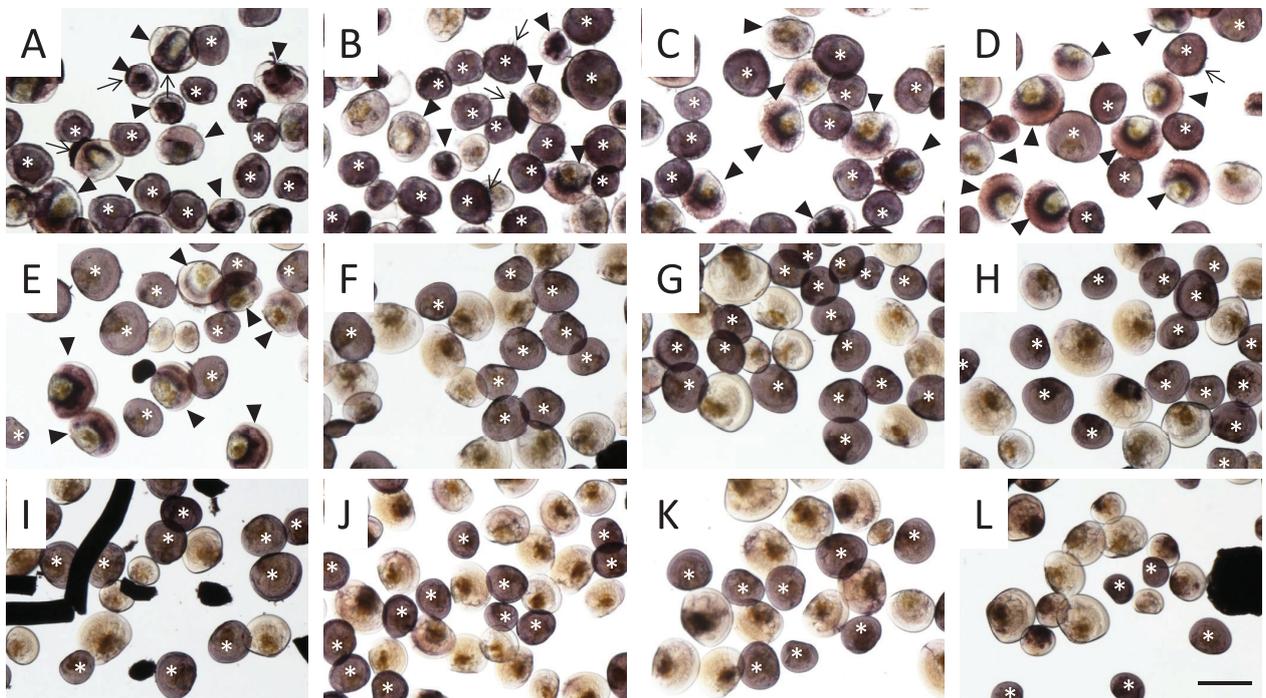


Fig.1 Immunostaining of bivalve larvae collected from the shore offing of Toyoura fixed with various concentrations of fixatives diluted in sea water. A, sea water as a negative control; B, 5% ethyl alcohol; C, 10% ethyl alcohol; D, 20% ethyl alcohol; E, 0.37% formaldehyde; F, 0.9% formaldehyde; G, 1.9% formaldehyde; H, 3.7% formaldehyde; I, 0.5% glutaraldehyde; J, 1% glutaraldehyde; K, 1.5% glutaraldehyde; L, 2% glutaraldehyde. Asterisks indicate larvae stained with the antibody. Arrows indicate vela stained with the antibody. Arrowheads show larvae stained unequally with the antibody. Bar, 200 μ m.

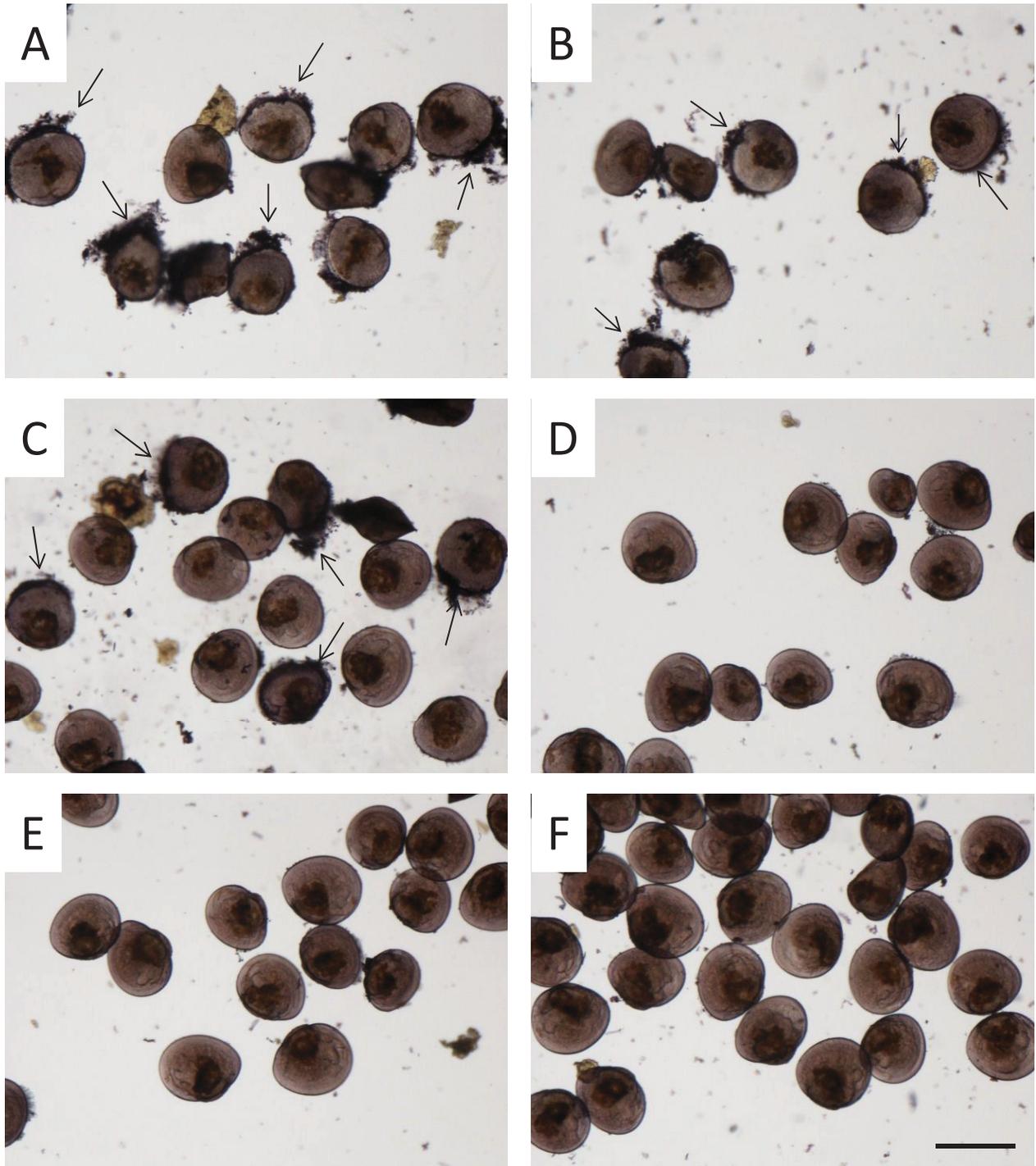


Fig.2 Immunostaining of artificially bred Japanese scallop larvae fixed with 1% glutaraldehyde in sea water for 5 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D), 180 (E), and 360 minutes (F). Arrows indicate vela stained with the antibody. Bar, 200 μ m.

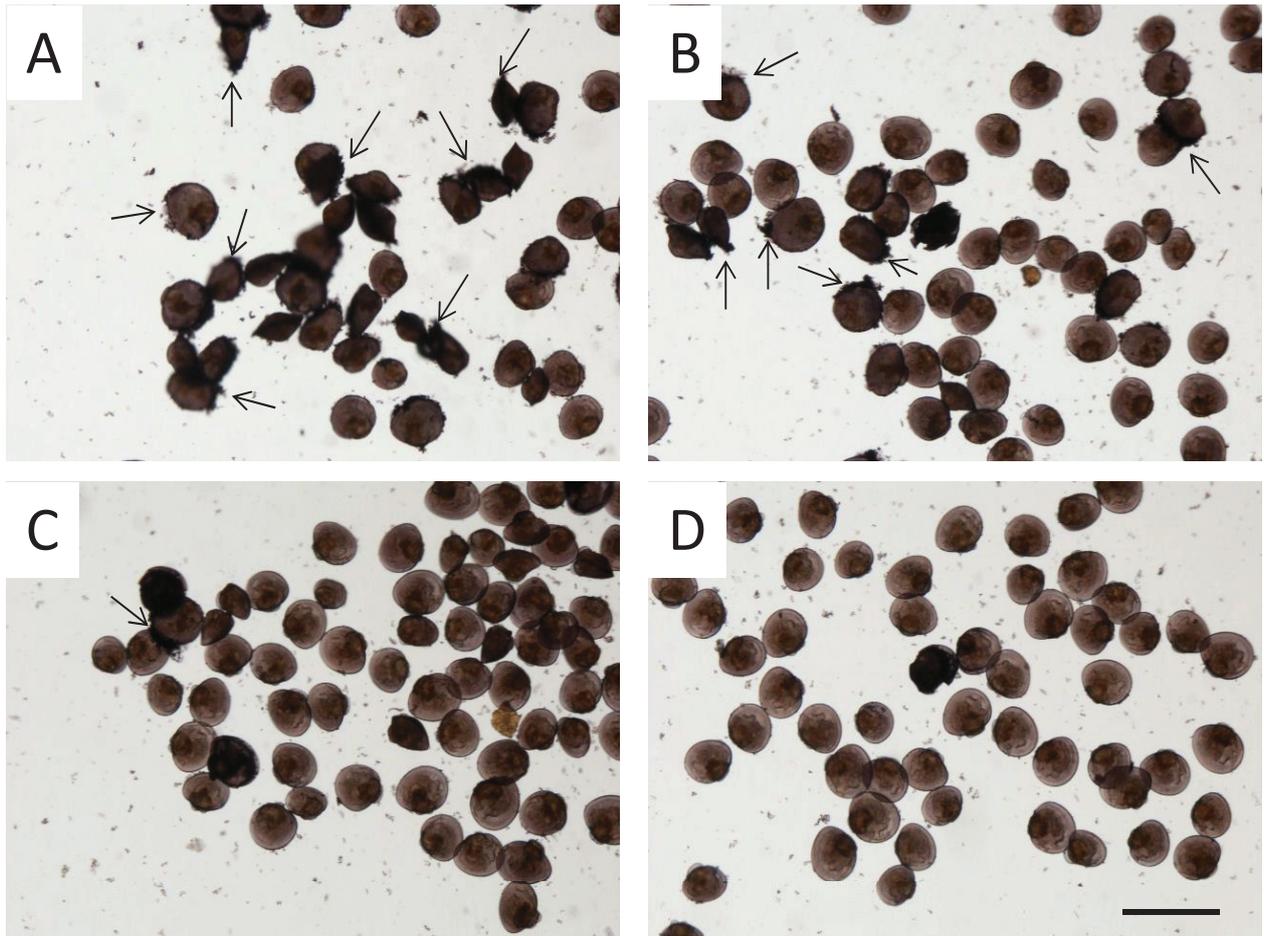


Fig.3 Immunostaining of artificially bred Japanese scallop larvae fixed with 1% (A), 2% (B), 3% (C), and 4% (D) glutaraldehyde in sea water for 30 minutes. Arrows indicate vela stained with the antibody. Bar, 200 μ m.

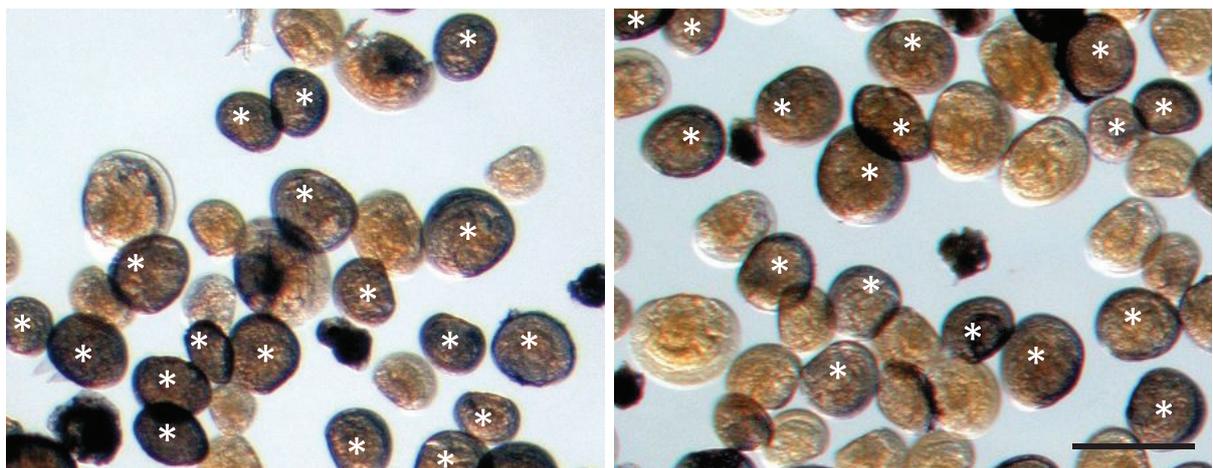


Fig.4 Immunostaining of bivalve larvae collected in Ishikari Bay. Samples were treated with the antibody for 20 (A) and 30 minutes (B). Asterisks indicate larvae stained with the antibody. Bar, 200 μ m.

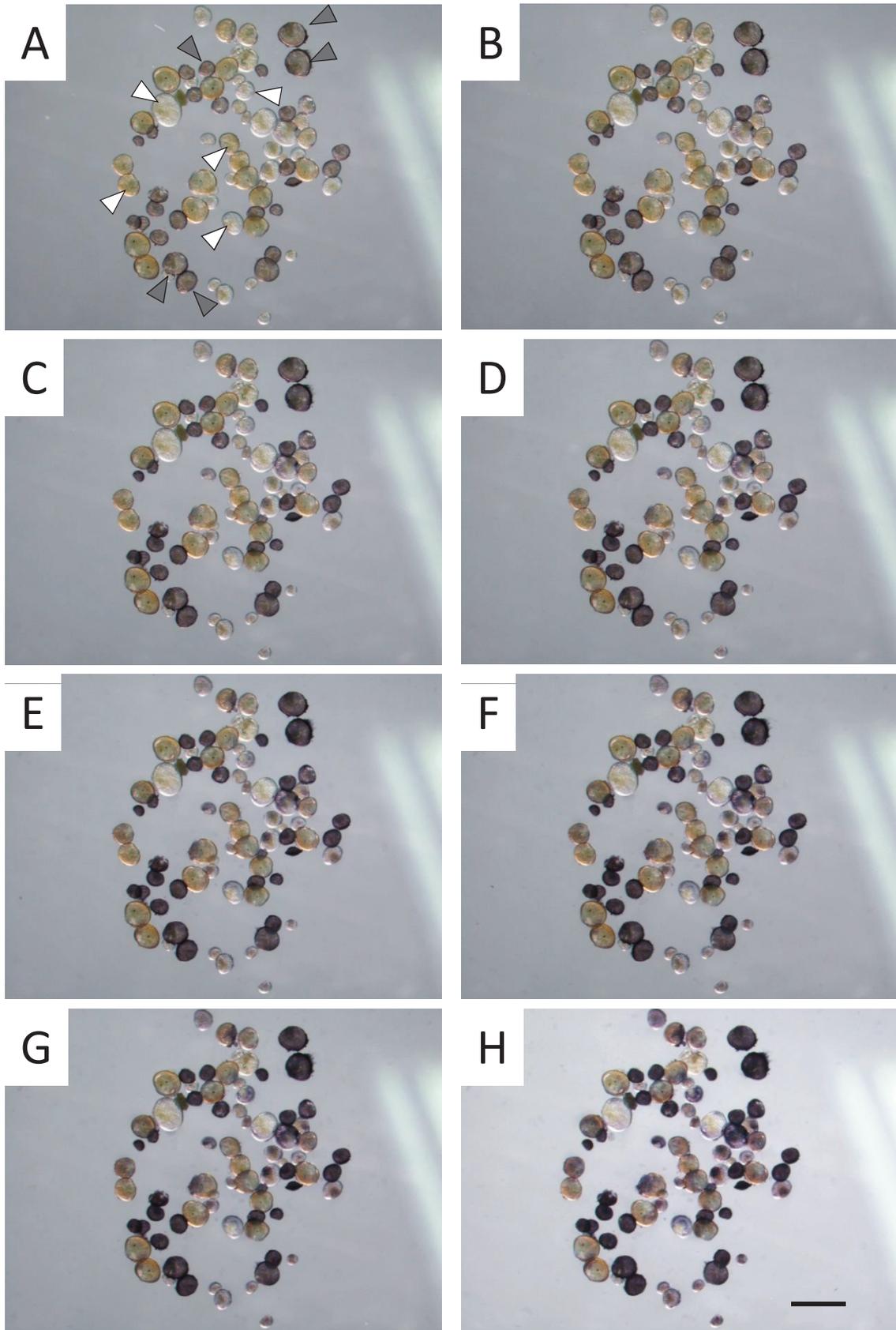


Fig.5 Immunostaining of bivalve larvae collected from the shore offing of Enbetsu. The identical sample was successively photographed 5 (A), 10 (B), 15 (C), 20 (D), 25 (E), 30 (F), 40 (G), and 60 minutes (H) after the initiation of chromogenic reaction with alkaline phosphatase. Arrowheads in A: Larvae used for the measurement of the density of color of larval shell. White arrowheads: unstained larvae. Grey arrowheads: stained larvae. Bar, 500 μ m.

4B)でも、ホタテガイ幼生の貝殻全体が染色され、良好な染色結果が得られた。発色基質を加えてからの経時的な免疫染色像をFig. 5に示した。また染色強度の変化についてFig. 6に示した。貝殻は発色開始後5分ですでに染色されはじめ (Fig. 5A), 20分 (Fig. 5D) から25分 (Fig. 5E) でさらに濃く染色された。30分以降は、染色度合いに大きな変化は見られなかった (Fig. 5F-H)。幼生の色濃度を調べた結果 (Fig. 6), 染色されなかった幼生では染色された個体に比べ標準偏差が大きかった。染色されなかった個体の色濃度は、発色開始後5分に0.41だった。その後25分に0.44となり、30分には0.45, 40分には0.47と若干高まった。染色された個体の色濃度は開始5分で0.58となり、染色されていない個体 (0.41) に比べ高かった。また、経過時間とともに色濃度は高くなり、発色開始後20分で0.73, 30分および40分ではそれぞれ0.76および0.77となった。

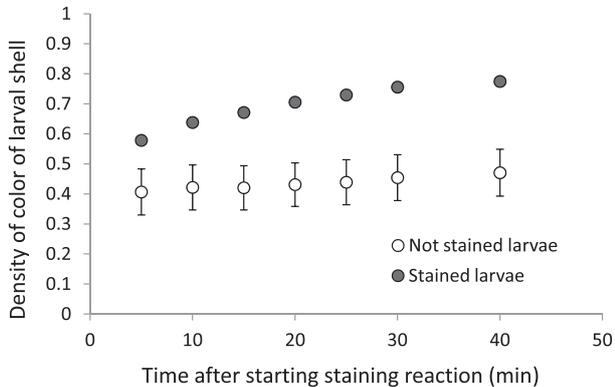


Fig.6 Changes in the intensity of color of the larval shell after starting the staining reaction. Vertical bars indicate standard deviation.

考 察

免疫染色に供する試料の固定方法 清水ら (2014a) が作製した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技術は、複数種の二枚貝幼生の中からホタテガイ幼生を判別するための有効な手段となっており、いくつかの調査現場で活用されているが、固定方法や採取地点から免疫染色を行う場所までの移動時間により、免疫染色の不良や染色度合いに差が生じるといった問題が確認された。本研究では、これらの問題を解決するため、免疫染色に最適な固定条件を調べた結果、エタノールや希釈率の高い (濃度の低い) ホルマリンを用いた場合、もしくは固定時間が短い場合、貝殻だけでなく面盤部位も発色し、さらに他の二枚貝の軟体部等にも発色が見られた (Fig. 1B-E)。ホタテガイ幼生の面盤や他の組織が染色されるのは、本抗体がホタテガイ幼生全体を抗原として

作製したポリクローナル抗体であることが一つの原因だと考えられる。本抗体にはホタテガイ幼生の様々な部位に結合する抗体が含まれているはずであり、さらには、他の二枚貝幼生の面盤や軟体部についても、ホタテガイ幼生と共通の抗原が存在すれば、これらも染色される可能性がある。また、試料に内在性アルカリフォスファターゼの活性があれば、発色反応が起こることも想像できる。したがって、ホタテガイ幼生の貝殻以外の組織や他の二枚貝幼生の貝殻を発色させないためには、貝殻をきつく閉じさせるように、より強力な固定液を用いて固定する必要がある。本研究では固定時間が1時間以上の場合、グルタルアルデヒドを50倍以下の希釈率 (0.5%以上のグルタルアルデヒド海水溶液) で用いることで、良好な免疫染色結果が得られることがわかった。ただし、これらは一般的な固定液としては比較的低濃度であるため、実際には、より高い濃度での使用を勧めたい。また、固定に必要な時間を考慮すると、試料を固定してから1時間以内に免疫染色を行う場合は、より高いグルタルアルデヒド濃度の固定液を用いる必要がある。本研究では、4%グルタルアルデヒド溶液を用いることで、固定時間を30分としても良好な染色像が得られた。

本研究の結果から、ホタテガイ幼生の免疫染色を行うために推奨する固定液と使用する濃度、固定時間をTable.1にまとめた。本研究では、ホルムアルデヒドに比べ刺激臭が少ないことで使われるようになったグルタルアルデヒドを中心に、使用濃度と時間について検討していないが、グルタルアルデヒドと同じアルデヒド類であるため、ホルムアルデヒドを用いた固定についてもより高濃度で処理することにより固定時間を短縮できるものとする。

Table 1 Recommended concentration of fixation and fix time for immunostaining of Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* based on this study.

Fixative	Concentration	Fix time
Formaldehyde	0.9% - 3.7%	overnight
Glutaraldehyde	0.5%	overnight
	1% < 4%	1 hr <
	4%	30 min <

抗体反応時間と発色基質反応時間の検討 抗体が抗原に結合する反応や、アルカリフォスファターゼが基質を発色させる反応は温度に依存する。そのため、ホタテガイ幼生を免疫染色する際にも、反応温度が染色度合いに影

響すると考えられる。清水ら (2015) はホタテガイ幼生免疫染色キットを開発し、そのプロトコルでは、抗体反応および発色反応に必要な時間は室温 (20℃ から 25℃) で 30 分と指示している。本研究では、室温で作業をした場合、20 分の抗体反応でもホタテガイ幼生を目視で判別することができた。色濃度は 30 分以上発色させても高くならないこと、30 分以上の発色反応は非染色個体の非特異的発色を生じて色濃度が高まることから、発色反応は 20 分から 30 分程度でよいと考えられた。これらの結果から、従来 1 時間 30 分ほどかかっていた免疫染色にかかる時間を全体で 20 分程度の短縮が期待できる。しかしながら、抗体溶液や発色基質は使用まで冷蔵庫等で保存されており、溶液類を冷えたまま用いると、染色性が悪くなることが予想される。免疫染色を最小時間で実施するためには、試薬類は使用前に室温に戻しておくことが必要となる。

清水ら (2014a, 2014b, 2015) は、ホタテガイ幼生の分布調査を効率化するため、ホタテガイ幼生の免疫染色技術を開発し、さらに、現場への普及に向けた技術の簡易化を進めてきた。本研究では、普及過程で明らかになった免疫染色の問題点を克服するため、固定方法を中心に技術改良を行った。本免疫染色法は、ホタテガイ幼生の貝殻全体がアルカリフォスファターゼの反応により濃く染色されるため、現場で使用されている万能投影機や実体顕微鏡で観察しやすいという特徴がある。これら一連の技術開発・改良の結果、噴火湾を中心にホタテガイ幼生の分布調査を行っている多くの機関で本免疫染色法が導入され、調査の効率化が実現している。このことは、現場での二枚貝幼生の判別に、免疫染色法が極めて有効であることを示す。

清水ら (2014a) は、PBS で抽出した抗原を用いることで、二枚貝幼生の貝殻を特異的に認識するポリクローナル抗体が作製できることを示した。北海道では、ウバガイ、バカガイ、アサリ、シジミ等の重要二枚貝類が多く存在し、それぞれ漁業者による資源管理が行われている。これらの魚種は、ホタテガイのような天然採苗が行われていないため、現場レベルでの調査事例は多くないが、研究レベルでは浮遊幼生の分布調査が行われた事例がある。ウバガイ幼生については、櫻井・中尾 (1996) が苫小牧沖での分布特性を調べており、ここではウバガイ幼生の判別は形態的特徴 (林・寺井, 1964) に基づいて行

われた。しかしながら、ホタテガイ幼生と同様、外部形態を基にした判別は経験を要し、困難であったと想像される。清水ら (2014a) は、16S rDNA の塩基配列から幼生の種を特定している。この遺伝情報を利用した判別は非常に精度が高いものの、使用する技術や機材の専門性から、現場での活用は困難である。現時点ではホタテガイ以外の二枚貝類幼生の分布調査を漁業者自ら行うための幼生判別手法は確立されていない。そのため、二枚貝浮遊幼生の分布調査が必要とされる場合は、信頼性が高く、簡易で現場運用が可能な免疫染色技術の開発が望まれる。これまでホタテガイ幼生の免疫染色技術開発で得られた多くの知見は、他の二枚貝における同様の技術開発においても有用なものとなるであろう。

謝辞

本手法開発にあたり、多くのご意見をいただきました北海道各地区の水産技術普及指導所の皆様、サロマ湖養殖漁業協同組合の前川公彦氏および紋別市の片倉靖次博士に感謝申し上げます。本研究は北海道ほたて漁業振興協会からの受託研究「日本海ホタテガイ採苗不振対策研究」により行った。

引用文献

- 清水洋平, 岩井俊治, 高島信一, 川崎琢真, 山下正兼.
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. 水産技術 2014a ; 7 : 31-36.
- 清水洋平, 川崎琢真, 高島信一. 免疫染色法を応用したホタテガイ幼生判別技術の開発. 海洋と生物 2014b ; 36 : 341-347.
- 清水洋平, 川崎琢真, 高島信一, 岩井俊治, 山下正兼.
ホタテガイ幼生分布調査現場への普及に向けた免疫染色技術の簡易化. 北水試研報 2015 ; 87 : 93-96.
- 櫻井 泉, 中尾 繁. 北海道苫小牧沿岸におけるウバガイ浮遊幼生の分布特性. 水産増殖 1996 ; 44 : 1-23.
- 林 忠彦, 寺井勝治. 室蘭祝津沖におけるウバガイ *Spisula (S) sachalinensi* (Schrenck) 稚貝の研究, I. Plankton 中に出現する斧足類浮遊幼生の分類. 北水試研報 1964 ; 2 : 7-46.