

# ホタテ稚貝の短期飢餓に対するトリグリセライド含有量の変化

宮園 章\*

Change of triglyceride concentration in juveniles of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) under a short term starvation culture.

Akira MIYAZONO\*

Change of triglyceride (TG) concentration in juvenile of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) were examined under a short term starvation culture experiment (7 days). The fifth trials were carried out in different periods from August to November, 2004, using the juveniles collected from the cage culture off Yakumo or Oshamanbe in Funka Bay. Shell length and initial TG concentration of the juveniles used for the fifth trials were 3.6 times and 6.7 times differ in maximum among the experiments, respectively. The TG concentrations on one day after the experiments were 70 to 80 % of the values at start points. The TG concentrations on seven days after the experiments were 10 to 20 % of the values at start points. A positive linear regression is admitted between the TG concentrations and daily TG consumption under the starvation cultures. A quickly respons of TG concentration in the scallop juveniles to a short term starvation was confirmed. The regression coleration between TG concentrations and daily TG consumptions means that TG concentration of the scallop juveniles can indicate the metaboric activity. From these results, TG concentration has a future as in situ index of physiological condition of the scallop juveniles.

キーワード：ホタテガイ，稚貝，トリグリセライド，飢餓飼育

## はじめに

噴火湾をはじめとするホタテガイ養殖工程の中で、夏から秋に行われる稚貝の分散作業（仮分散・本分散）は翌春の本養成（耳吊り，籠養殖）に使用する稚貝を育成するための重要な工程である。分散作業は稚貝の干出やふるい分けによる物理的衝撃を伴うため，稚貝に大きな負荷を及ぼすことはよく知られている<sup>1)</sup>。分散作業の成功・失敗は作業後しばらく養殖した時点の稚貝へい死状態で判断しているのが現状である。他方，養殖環境による稚貝のへい死についても，時化などによる外套膜損傷を伴う場合のみ，貝殻の観察や走査型電子顕微鏡観察などからへい死要因の特定がなされている<sup>2)</sup>。しかし，分散作業を伴う稚貝のへい死要因は養殖作業という人為

的側面とその前後の養殖条件という環境的側面が関与するため<sup>3-5)</sup>，へい死が発生した後にその要因を特定することは困難な場合が多い<sup>6)</sup>。稚貝自身の生理状態をバイオセンサーとして養殖現場における稚貝のダメージの大きさや回復状況をチェックすることができれば，分散作業の影響や養殖環境の影響を評価し，分散作業によるへい死を少なくする技術につなげることができる。これまでに，閉殻筋のタンパク質やDNA・RNAおよび核酸比等の変化から稚貝の生理状態の違いを把握する取り組みが行われてきた<sup>4,5,7)</sup>。ところが，稚貝の体内における生理物質の変化が負荷に対して感度良く応答するかという問題とともに，生化学分析には煩雑な分析操作を伴うこと，生体サンプル採集および保存法に制約が多いことなど，作業面でのデメリットの大きさが実用化に向けての障害

報文番号 A392 (2005年7月19日受理)

\* 北海道立函館水産試験場 (Hokkaido Hakodate Fisheries Experimental Station, Yunokawa, Hokkaido 042-0932, Japan)

となっている。トリグリセライドはホタテガイの中腸腺に蓄積される重要なエネルギー貯蔵物質である。ホタテ稚貝に関しては1週間程度の飢餓飼育によってトリグリセライド含有量が大きく減少することが確かめられているが<sup>2)</sup>、短時間の飢餓に対する応答は不明である。

本研究では、ホタテ稚貝のトリグリセライド含有量の短期飢餓に対する応答を調べ、養殖現場におけるホタテ稚貝の生理指標としての有効性を検討した。

材料および方法

1. 飢餓飼育試験

水槽（約40ℓ）に満たした濾過海水を1μm目合のカートリッジフィルター（アドバンテックTCW-1N-PPS）を装着した水中ポンプで循環させることで飼育水内の餌料粒子を除去した（図1）。また飼育水はエアポンプによるエアレーションを施した。飼育水槽の外側に冷却水槽を配置し、飼育水温を約17℃に調温した。飼育に用いたホタテ稚貝は八雲沖から2回（2004年8月25日、9月15日採集）、長万部沖から3回（2004年8月25日、10月4日、11月1日採集）、それぞれ採取し、合計5回の飼育試験に供した。採取した稚貝は船上で直ちに海水でぬらしたスポンジで包んで、保冷剤をいれたクーラーボックスに収容した。稚貝は実験施設に持ち帰り、直ちに飼育試験に供した。飼育期間中の稚貝のサンプリングは飼育開始時と飼育後1、3、5、7日目に行った。稚貝はそれぞれ10個体ずつを採取し、貝殻の水気をふき取った後、直ちに凍結保存した（-40℃）。これらは、後日、まとめてトリグリセライド（TG）分析に供した。

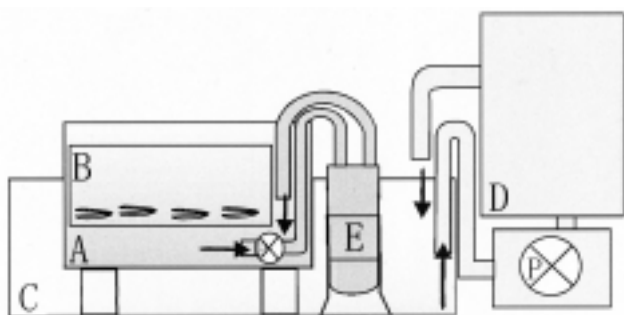
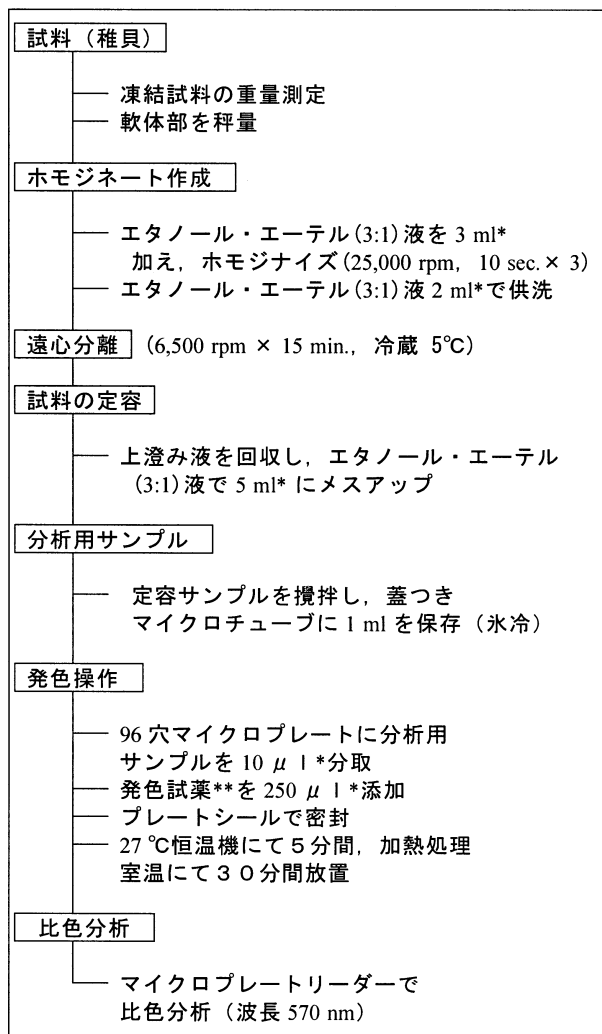


図1 飼育実験水槽の概要 A：飼育水槽，B：稚貝収容籠，C：恒温水槽，D：冷却水槽，E：カートリッジフィルター，P：ポンプ

2. トリグリセライドの分析

TGの分析には、発色試薬としてトリグリセライドE-テストワコー（和光純薬：GPO・DAOS法）を用いた。多試料分析の時間短縮のために、96穴マイクロプレート中で発色操作を行い、マイクロプレートリーダー（BIO-



\*微量サンプル(湿重量 < 50 mg)のときは2 mlでホモジナイズ、1 mlで供洗い、3 mlにメスアップした。発色操作では分析サンプルを50 μl、発色試薬を250 μlで反応させた。

\*\*トリグリセライドE-テストワコー。

図2 凍結試料を用いたトリグリセライドの分析手順

表3 飼育試験に使用した稚貝の大きさとTG含有量

試験番号	(平均値±標準偏差)		
	殻長 (mm)	軟体部重量 (g)	TG含有量 (mg/g 軟体部)
1	8.67 ± 0.47	0.03 ± 0.007	6.67 ± 1.27
2	14.34 ± 1.52	0.17 ± 0.05	3.42 ± 0.36
3	20.25 ± 2.27	0.47 ± 0.15	1.01 ± 0.22
4	20.23 ± 2.35	0.46 ± 0.14	1.96 ± 0.42
5	31.70 ± 3.09	1.54 ± 0.48	5.08 ± 1.08

1：長万部(8/25)， 2：八雲(8/25)， 3：八雲(9/15)，  
4：長万部(10/4)， 5：長万部(11/1)

RAD MODEL 680) で一括分析した。図2にその分析手順を示した。

飢餓条件下での連続する2回のTG含有量の差を経過日数で除したものをここでは「TG消費速度 (mg/g軟体部/日)」と定義した。

結果

飼育試験に供したホタテ稚貝のサイズおよびTG含有量は大きく異なった(表1)。殻長では、試験1の約8.7mm(長万部, 8月25日)から試験5の約31.7mm(長万部, 11月1日)まで、最大3.6倍の違いがあった。軟体部重量では、試験1の約0.03gから試験5の約1.54gまで、最大51倍の違いであった。TG含有量は試験3(八雲, 9月15日)の1.0mg/g軟体部から試験1の6.7mg/g軟体部まで、最大6.7倍の違いであった。

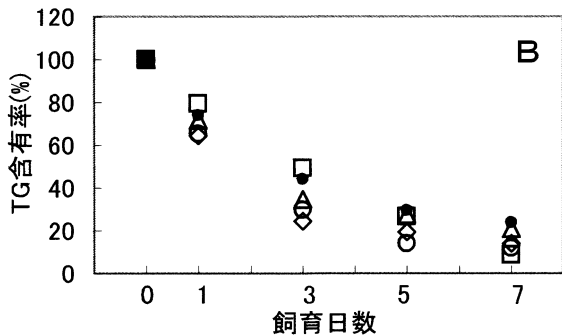
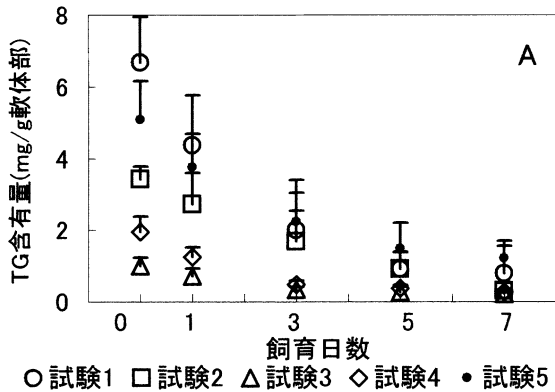
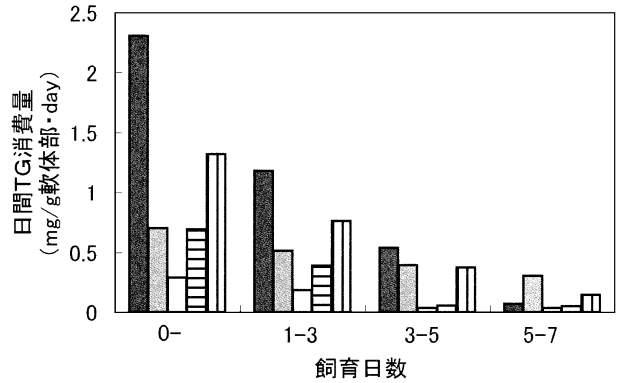


図3 飢餓飼育期間中のホタテ稚貝のTG含有量の変化(A), および飼育開始時に対するTG含有率の変化(B) 図A中の縦棒は標準偏差を示す。

飢餓飼育中のホタテ稚貝のTG含有量の変化およびはじめのTG含有量に対する割合の変化をそれぞれ図3A, Bに示した。ホタテ稚貝のTG含有量は全ての試験で、飼育日数に応じて減少した。はじめのTG含有量に対する減少割合はいずれの場合もほぼ同じであった。飢餓1



■試験区1 □試験区2 □試験区3 □試験区4 □試験区5

図4 飢餓飼育期間中のホタテ稚貝のTG消費速度の推移

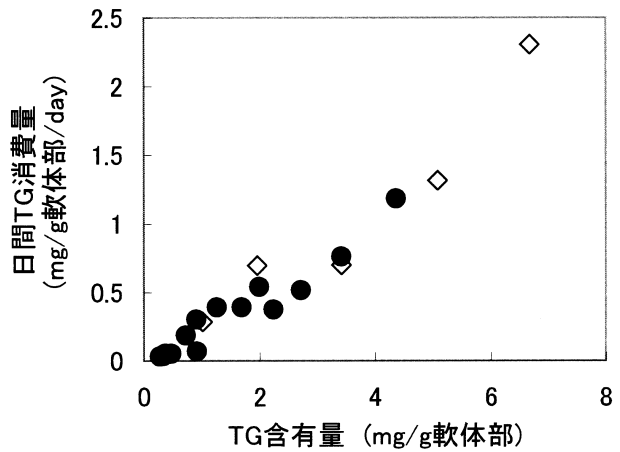


図5 飢餓飼育期間中のホタテ稚貝のTG含有量とTG消費速度との関係 ◇は試験開始時, ●は飼育途中のデータを示す。

日後のTG含有量が20~30%減少したことは注目すべきである。

図4には各試験におけるTG消費速度の飢餓飼育期間中の推移を示した。TG消費速度は飼育日数の増加に伴い減少している。各試験によってははじめのTG含有量が異なるため、TG消費速度の変化はばらばらに見える。

図5には、TG含有量とそれに対応するTG消費速度との関係を示した。

試験開始時と試験期間中のデータとで異なる傾向はみられず、全てのデータを用いた両者の間には正の直線相関が認められた ( $p < 0.001$ ,  $n = 20$ ,  $r = 0.957$ )。

考察

生化学的なホタテガイの健康評価は閉殻筋のグリコーゲン、タンパク質および核酸などについて試みられてき

た<sup>8-14)</sup>。現在では、経年的な成長指標の一つとして、オホーツク海の地まきホタテガイの閉殻筋のグリコーゲン含有量のモニタリングが継続されている<sup>15)</sup>。稚貝については、閉殻筋と中腸腺のタンパク質量と核酸および中腸腺のTGについて、健康評価指標としての可能性が検討され、これらが干出や流れなどの負荷に対する生理状態の変化を指標するという結果が得られている<sup>9)</sup>。特に、飢餓や干出ストレスに対して、中腸腺は生理的に大きな変化を示すため、生理指標として有望であることが指摘されているが、短いスケールでの応答時間についての検討はされていない。本研究では、ホタテ稚貝のTG含有量の変化が短期間の飢餓に対して早い応答をすることを確認した(図3A)。養殖現場における稚貝へい死に関わる要因には、養殖作業や時化・水温や塩分の急激な変化などの短期間の強い負荷と餌料条件などの持続性のある負荷が考えられる。負荷に対する応答の早さは現場で使える生理指標の重要なファクターとなる。TG含有量はこの点において生理指標として有望である。

二枚貝の代謝活性は水温、体サイズ、酸素濃度、餌料条件、生殖サイクル、活動レベルおよび生理的コンディションで変化することが知られている<sup>16)</sup>。本試験で得られた稚貝のTG消費速度は1日の代謝維持に消費したエネルギー量を反映すると考えれば、その大きさは稚貝の代謝活性を指標する。飢餓飼育期間中にTG消費速度が減少傾向を示したこと(図4)は餌料条件の悪化に対して代謝活性を低下させた稚貝の生理応答を示すと考えられる。また、飼育開始時のTG消費速度に着目すると、試験1, 5では、TG消費速度が大きかった。逆に、試験3, 4では飼育開始のTG消費速度が小さかった。これらは現場におかれた稚貝の代謝活性の違いを反映するものと考えられる。このことから、1日飢餓飼育によるTG消費速度の測定は現場における稚貝の代謝活性の直接推定法として有効であろう。

今回得られた稚貝のTG含有量とTG消費速度との間にみられた正の直線関係(図5)は静穏な飢餓飼育環境で得られた。しかし、飼育開始時のTG消費速度が現場の生理状態を反映したと考えると、この直線関係は現場データにも当てはめることができる可能性がある。そうすれば、TG含有量そのものが稚貝の代謝活性を示す指標として養殖現場で利用できることになる。今後は、養殖現場から得た複数の場合について、1日飢餓飼育によるTG消費速度の測定を行うことで、このことを確かめる必要がある。

養殖現場で迅速に稚貝の生理状態を判定するためには、サンプリングの容易さと分析の簡便さも重要なファクターとなる。TG分析のためのサンプリングは稚貝を採取

したのち、できるだけ早く冷凍保存することが重要であるが、特殊な固定液などが不要のため、漁業者によるサンプリングが可能である。タンパク質や核酸は分析操作が煩雑で、養殖現場でのモニタリングや急な分析依頼に対して迅速に対応できない。これに対して、TG分析は市販の発色試薬を利用するため、比較的簡便に多数のサンプル処理が可能である。さらに、今回適用した96穴マルチプレートを使ったマイクロプレートリーダーによるTGの比色分析は従来の分光光度計を用いた比色分析よりもはるかに迅速に多数の分析に対応できる。

## 要 約

ホタテ稚貝の7日間の短期飢餓飼育を行い、トリグリセライド(TG)含有量の変化を調べた。飼育試験は2004年8月から11月までの異なる時期に八雲、長万部から採取された稚貝を用いて、計5回行った。使用した稚貝の大きさ、TG含有量は試験によってそれぞれ最大3.6倍、6.7倍、異なった。飢餓飼育1日目のTG含有量は開始時の70~80%に減少した。TG含有量の減少率は7日目には開始時の80~90%に至った。飢餓飼育期間中のTG含有量とTG消費速度との間には正の直線相関が認められた。ホタテ稚貝のTG含有量の短期間の飢餓に対する応答は早いことが確認された。TG含有量とTG消費速度の間にみられた相関関係はTG含有量が稚貝の生理活性を指標できることを示唆する。これらのことはTG含有量が養殖現場における迅速な稚貝の生理状態指標として有望であることを示した。

## 謝 辞

本報告にあたり、稚貝の提供など、試験にご協力頂いた長万部漁業協同組合 長間馨一氏、青年部 諸氏、八雲漁業協同組合 菊池信晴氏、渡島北部地区水産技術普及指導所、函館水産試験場および函館水産試験場室蘭支場の諸氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 北海道水産資源技術開発協会：噴火湾ホタテガイ養殖の手引(改訂版)．1979, 17p.
- 2) 小坂善信：ホタテガイの異常へい死ーポリドラだけでへい死するか？ー．青森県水産総合研究センター増養殖研究所だより．98, 2-3 (2003)
- 3) 吉田達：稚貝採取時の高水温、止水、流れの複合的影響．青森県水産増殖センターだより．95, 3-4

(2002)

- 4) 北海道：先端技術等地域実用化研究促進事業 ホタテガイ健康評価と養殖技術の改善に関する研究（平成11年度～13年度報告書）. 2002, 27p.
- 5) 青森県：先端技術等地域実用化研究促進事業 ホタテガイ健康評価と養殖技術の改善に関する研究（平成11年度～13年度報告書）. 2002, 70p.
- 6) 伊藤義三：1995年噴火湾養殖ホタテガイ稚貝のへい死について(速報). 北水試だより. 31, 25-30(1995)
- 7) 青森県：水産業関係地域重要新技術開発促進事業 ホタテガイ種苗の種苗性評価および改善に関する研究（平成8年度～10年度報告書）. 1999, 82p.
- 8) 宮園章：ホタテガイとグリコーゲン. 北水試だより. 25, 23-27 (1994)
- 9) 宮園章, 中野広：北海道オホーツク海沿岸域における地まきホタテガイの閉殻筋中のタンパク質量とグリコーゲン量の季節変化. 北水試研報. 58, 23-32 (2000)
- 10) 宮園章, 中野広：北海道オホーツク海沿岸域における地まきホタテガイ閉殻筋中のRNA/DNA比および酸性プロテアーゼ活性の季節変化. 北水試研報. 58, 33-39 (2000)
- 11) 蔵田護, 櫻井泉, 阿部英治：イ. 噴火湾虻田における養殖ホタテガイの成長・歩留・グリコーゲン量の季節変化. 北海道函館水産試験場平成3年度事業報告書. 173-184 (1993)
- 12) 蔵田護, 辻浩司, 水島敏博, 西田芳則：ウ. ホタテガイの活力判定手法に関する基礎試験. 北海道立函館水産試験場平成3年度事業報告書. 185-196(1993)
- 13) 蔵田護：イ) ホタテガイの活力判定手法に関する基礎試験. 北海道函館水産試験場平成4年度事業報告書. 142-145 (1994)
- 14) 多田匡秀, 阿部英治, 堀井貴司：2) ホタテガイの活力判定手法に関する試験. 北海道立函館水産試験場平成5年度事業報告書. 144-147 (1995)
- 15) 品田晃良, 栗原康裕：ホタテガイ成長モニタリング調査. 北海道立網走水産試験場平成14年度事業報告書. 83-92 (2003)
- 16) Brichlj, V.M. and Shumway, S.: " Physiology: energy acquisition and utilization ". *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Amsterdam, ELSEVIER, 1991, 305-346.