

有用二枚貝4種の浮遊幼生における  
消化器官の形成に関する  
組織学的検討および種苗生産への知見の応用

2007年12月

大 橋 智 志

## 目 次

緒 言 .....	15
第1章 浮遊幼生における消化器官の形成に関する組織学的検討 .....	16
(1) イワガキ .....	16
材料と方法 .....	16
結 果 .....	17
考 察 .....	18
図 表 .....	20
(2) クマサルボウガイ .....	31
材料と方法 .....	31
結 果 .....	31
考 察 .....	32
図 表 .....	33
(3) タイラギ .....	42
材料と方法 .....	42
結 果 .....	42
考 察 .....	43
図 表 .....	44
(4) トリガイ .....	51
材料と方法 .....	51
結 果 .....	51
考 察 .....	52
図 表 .....	53

## 第2章 組織学的知見の種苗生産への応用

(1) クマサルボウガイ幼生に対する2種の微細藻類 <i>Chaetoceros calcitrans</i> および <i>Pavlova lutheri</i> の餌料効果の検証	61
材料と方法	61
結 果	61
考 察	62
図 表	63
(2) クマサルボウガイ浮遊幼生の成長・生残に対するマガキ卵磨碎物の添加効果	64
材料と方法	64
結 果	65
考 察	66
図 表	68
(3) タイラギ浮遊幼生および着底稚貝の飼育	75
材料と方法	75
結 果	77
考 察	79
図 表	82

## 第3章 総合考察

(1) 二枚貝4種の浮遊幼生における器官形成過程の組織学的特徴	90
(2) 組織学的知見の種苗生産への応用	91

## 謝 辞

## 参考文献

## 要 約



## 緒言

二枚貝類の種苗生産は養殖用種苗の供給あるいは資源増殖を目的としてアコヤガイ、ホタテガイ類、カキ類、アカガイ類、アサリ、トリガイ等多くの有用種について行われている。ホタテガイ、マガキ、アサリのように天然種苗を効率的に利用ができる種では人工種苗生産は限定的であるが、生産される真珠の品質の面から育種的利点を優先するアコヤガイや天然採苗による種苗の確保が困難なアカガイ類では人工種苗生産による種苗供給が主体となっている。また、トリガイ、バカガイ、ハマグリなどのように漁獲の豊凶の激しい種類や、近年の食生活の多様化による経済的価値の向上から注目されるようになったイワガキなどでは、人工種苗生産による種苗の供給によって増養殖の試みが進められるようになった。しかし、これらの人工種苗生産による種苗の供給はしばしば成績が不安定である。

二枚貝種苗生産の成績不振を招く主な要因に浮遊幼生期の減耗がある。団らはD型期から殻頂期への移行期に死亡率が高いことを指摘しているが、軟体部の構造に大きな変化はなく原因が明らかでないとしている(団ら,1983)。浮遊幼生期の減耗要因については餌料藻類の種類、餌料密度の不適合や餌料藻類の培養状態の良否などが指摘されることが多く、特に餌料藻類の培養状態はその栄養価に影響を与えるとして重要視されてきた(押尾ら,1995)。また細菌類の影響についても報告があり(Elston and Leibovitz,1980; Elston et al.,1981; Jeffries,1982)、病原性が懸念される数種の細菌類が分離・同定されている(Tubiash et al.,1965; Tubiash et al.,1970)。これらの要因はいずれも幼生に対して外部から影響を与えるものであるが、外的要因が浮遊幼生の形態や生理に与える影響を検討した報告は非常に少ない。このことは、二枚貝浮遊幼生が一般に小型で観察が難しく、諸器官の形成や体構造の発達について詳細な検討が進んでいないことによる。特に組織学的には未解明な部分が多く、魚類の仔稚魚で行われているよ

うな詳細な組織構造あるいは器官形成過程の観察はほとんどなされていない。このため諸器官の発達過程やその特性に立脚した種苗生産技術の検討もほとんど行われていない状況にある。従来、新種の種苗生産技術の開発はアコヤガイやアカガイなどで開発された飼育技術を応用して進められており、良好な成績を示した飼育機関の飼育技術を模倣する事例が多いがこのような方法では改善が成功しない事例が少なくない。また人工種苗生産対象種の中にはイワガキのように生産が不安定で地域によって生産成績が異なり比較的種苗生産が困難な種と位置付けられるものがある。さらに、タイラギのように種苗生産の最初の試みから40年以上に渡って技術確立ができず、ごく少数の稚貝の生産に成功した事例が2例しか報告されていない(明楽,1998; 川原ら,2004)有用種もいまだ存在する。本研究では二枚貝浮遊幼生の消化器官の形成および発達過程を明らかにすることによって種苗生産技術の向上に資する知見を得ることを目的として、イワガキ、クマサルボウガイ、タイラギ、トリガイの4種の浮遊幼生について組織学的な検討を行った。また、組織学的な検討から得られた知見をもとにクマサルボウガイ浮遊幼生に対する微細藻類2種の餌料効果を検証し、D型期から殻頂期幼生への変態・成長期に栄養的な問題が存在することを示唆した。卵黄の消長および脂肪滴の蓄積過程を組織学的に検討することによって、卵黄栄養の不足が減耗要因に関与することを推定し、この知見に基づいてマガキ等の二枚貝成熟卵を磨砕して調製した新餌料(卵磨砕物)とその利用方法を開発した(大橋, 2006ab)。これを添加餌料として用いることでクマサルボウガイ浮遊幼生の大量減耗を回避し生産を安定させることに成功した(大橋ら, 2007)。さらに同技術を種苗生産技術が確立されていないタイラギの種苗生産に応用し、本種としては3例目となる稚貝の生産に成功し飼育成績の向上をもたらした。

## 第1章 浮遊幼生における消化器官の形成に関する組織学的検討

### (1) イワガキ (*Crassostrea nippona*)

カキ類は古代から食用とされ養殖の歴史も長い。日本ではマガキ*Crassostrea gigas*が主に養殖されているが用いられる種苗は天然採苗したものが主体である。このため種苗生産を必要とするのは、天然採苗が見込めない近縁種、天然資源の再生産が見込めない寒冷地の養殖種苗、あるいは3倍体作出のような特殊な種苗を生産する場合に限られる。イワガキ*C. nippona*はマガキと同じ*Crassostrea*属であるが外洋性で資源的には少なく、漁獲対象種としている地域は限定されている。ところが、近年マガキの端境期である夏季に食べられるカキ類として注目されるようになり、各地で養殖が試みられるようになった。本種は上記のうち天然採苗が見込めない近縁種に該当し、養殖種苗のほとんどは種苗生産によって供給されているが、種苗生産の成績は生産が容易な地域と安定しない知地域の差が大きく種苗生産の比較的困難な種とされている。イワガキの種苗生産において成績の不振を報告している事例の多くは浮遊幼生飼育中の減耗であるが(薬師寺ら2002a,b;薬師寺, 2003)、浮遊幼生における器官形成過程が未解明で、斃死要因の推定も困難な状況にある。このため、イワガキ浮遊幼生の消化器官を中心とした器官形成過程の組織学的検討を行った。また、幼生の消化器官を構成する胃及び桿晶体嚢と消化盲嚢の発達の様相をより定量的に明らかにすることを目的として、これらの器官について形態計測を行った。

## 材料と方法

### 浮遊幼生の飼育と採材

供試したイワガキ親貝は2005年3月に宮城県石巻市雄勝町より購入し、その後同年7月14日まで長崎県総合水産試験場地先の筏から海面に垂下したカゴ内で飼育し、成熟させたものを用いた。供

試貝は雄3個体、雌7個体で、卵および精子は切開法で親貝より取り出し、水温25℃で受精させた。受精卵は洗卵後25℃の恒温ウォーターバス内に設置した500L円形ポリカーボネイト水槽に10個体/mlの密度で収容して孵化させた。孵化幼生は日令1のD型期幼生で孵化槽からサイホンとオープニング20μmのネットを用いて回収し、25℃の恒温ウォーターバス内に設置した500L円形ポリカーボネイト水槽に約6個体/mlの密度となるよう調整して収容した。飼育水はオープニング1μmの濾材で濾過した25℃の調温海水を用い、1~2日毎に全量あるいは2/3量を換水した。餌料藻類は*Chaetoceros calcitrans*と*Pavlova lutheri*を用いた。*C. calcitrans*は田崎真珠(株)製の濃縮市販品(約5×10<sup>8</sup>cells/ml)を購入し、1週間以内に使用した。*P. lutheri*はF培地(Guillard and Ryther, 1962)を用いて照度3000lx、気温20℃の恒温室内で5~7日培養し、細胞密度が6~9×10<sup>6</sup> cells/mlに達したものを使用した。また、特開2006-271208「二枚貝成熟卵を原料とする二枚貝浮遊幼生飼料である二枚貝成熟卵磨砕物の精製法」(大橋 2006b)に準じて調製したマガキ卵磨砕物を日令10まで添加した。飼育水中の餌料密度は成長に応じて増加し、*C. calcitrans*は5~10×10<sup>3</sup> cells/ml、*P. lutheri*は3~10×10<sup>3</sup> cells/mlの範囲とした。供試個体は2日毎にオープニング20μmのネットで飼育槽から採取した。ただし、未受精卵とトロコフォア幼生の試料は4月5日に採卵・受精させたものを用いた。

### 組織学的方法

採取した卵および浮遊幼生は氷冷下で2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド液(0.1Mカコジル酸緩衝, pH 7.4)で前固定し10%EDTA溶液(pH 7.2)で2日間常温で脱灰を行った後、1%四酸化オスミウム液(0.1Mカコジル酸緩衝, pH 7.4)で後固定を行った。ただし卵およびトロコフォア幼生は脱灰の処理を行わなかった。固定試料は常法に従ってSpurrの樹脂に包埋し、ウルトラミクロトーム(ULTRACUT, UCT型, Leica社製)を用いて厚さ1μmの光顕用切片と電顕用

の超薄切片を作製した。光顕用切片は1%トルイジン青で染色し、殻長サイズ毎の器官形成過程の観察に供した。超薄切片は酢酸ウランル-クエン酸鉛で染色し、JEOL-JEM1010型透過電子顕微鏡を用いて各器官の微細構造の観察に供した。

### 胃および桿晶体囊と消化盲囊の形態計測

組織学的検討に用いた試料と同じ飼育群のうち、日令1,3,5,8,10,13,15,17に採集した浮遊幼生を氷冷下で2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド液(0.1Mカコジル酸緩衝,pH7.4)で前固定し、10%EDTA溶液(pH7.2)で2日間常温で脱灰を行った後、1%四酸化オスミウム液(0.1Mカコジル酸緩衝,pH7.4)で後固定を行った。固定試料は、常法に従ってSpurrの樹脂に包埋した。包埋試料から平均殻長に近い3個体を用いて0.5あるいは1 $\mu$ mの連続切片を作製し、浮遊幼生のサイズに応じて5,7.5,15,20 $\mu$ m毎の組織切片を撮影し、画像処理ソフト(Photoshop CS Adobe社製)を用いて胃および桿晶体囊と消化盲囊の面積をそれぞれの組織の範囲に該当するピクセル数で求めた。これを同様にして求めた組織全面積のピクセル数で除した値を積算する方法で、1個体毎の胃および桿晶体囊組織と消化盲囊組織の体積を求めた。

## 結果

### 外部形態

外部形態の観察結果をFigs.1A-Lに示す。受精卵は直径約50 $\mu$ mの球形で、マガキ、クマサルボウガイ、タイラギ、トリガイに比較するとやや小型であった(Fig.1 A)。水温24 $^{\circ}$ Cの恒温水槽内では、受精6時間後にトロコフォア幼生の形態で孵化した(Fig.1 B)。トロコフォア幼生は幼殻を分泌して形態を変化させながら発生を進め(Fig.1 C)、孵化後約24時間でD型期幼生に成長した。初期D型期幼生の殻長は約70 $\mu$ mであった(Fig.1 D)。初期D型期幼生は面盤が発達し繊毛を活発に動かして遊泳する様子が観察されたが、軟体部内部には顕著な活動が認められる器官は確認できなかつ

た。殻長80 $\mu$ mに成長すると軟体部中央に褐色に着色した組織が見られ、部位から消化盲囊と考えられた。また胃腔と考えられる体腔内で繊毛が活発に活動し、摂取した餌料藻類と考えられる摂取物質が攪拌されている様子が観察された(Fig.1 E)。殻長100 $\mu$ mに達すると殻頂部の膨隆が始まり(Fig.1 F)、殻長120 $\mu$ mまでにすべての個体が殻頂期幼生に変態した(Fig.1 G)。殻頂期幼生は幼殻の殻頂部の膨隆と縁辺部の伸張がさらに進み(Figs.1 H-J)、眼点を有する着底期幼生に成長した(Fig.1 K)。着底した稚貝は縁辺に殻を分泌してすみやかに固着した(Fig.1 L)。

### 組織学的観察

#### [D型期幼生]

組織学的観察結果をFigs.2-11に示す。発生中の胚の細胞内はトルイジン青に濃染される電子密度のやや高い卵黄顆粒と、トルイジン青にほとんど染色されない電子密度の低い卵黄顆粒が多数確認され、その直径は0.5から1 $\mu$ mであった(Fig.2)。トロコフォア幼生は消化管の原基が形成され(Fig.3:A1,A2)、ほぼすべての体細胞内に胚体で確認されたものと同じ卵黄顆粒が多数確認された(Fig.3 B)。また消化管上皮を構成する未分化細胞には繊毛が確認された(Fig.3 C)。日令1(殻長70 $\mu$ m Fig.4:A1,A2)のD型期幼生では未分化細胞内にまだ多数の卵黄顆粒の存在が確認され(Fig.4 B)、消化器官では食道、胃腔およびの桿晶体囊と消化盲囊の膨出が確認された。消化盲囊は7 $\mu$ m前後の数個の細胞で構成され、多数の卵黄顆粒を有していた(Fig.4 C)。胃には繊毛と微柔毛を有する高さ7 $\mu$ m前後の上皮細胞が発達したが(Fig.4 D)、消化盲囊細胞と同様にまだ多数の卵黄顆粒を有し、胃腔はまだ小さく胃内容物および桿晶体は認められなかった。腸管は繊毛を有する1層の細胞で構成されていた。日令3(殻長80 $\mu$ m Fig.5:A1,A2)では一部の細胞に電子密度の低い卵黄顆粒の残存が確認されたが(Fig.5 B)、また消化盲囊が発達し高さ15 $\mu$ m前後の機能細胞内には消化空胞の形成がみられた(Fig.5 C)。胃

腔は発達し、胃内容物として外殻が除去された*C. calcitrans*の細胞質と見られる物質 (Fig.5 D) や外殻の破片と見られる電子密度のやや高い小片が多数確認された (Fig.5 E)。胃上皮細胞には脂肪滴の蓄積が確認された (Fig.5 F)。日令5では体内のほぼ全域において卵黄顆粒は消失し、桿晶体囊および消化盲囊の発達が進んだ (Fig.6:A1,A2)。桿晶体囊には桿晶体は確認できなかったが (Fig.6 B), 胃腔内には消化中の微細藻類が観察され、胃上皮細胞へは直径1~2 $\mu\text{m}$ の脂肪滴が積層して蓄積されていた (Fig.6 C)。腸管は殻頂縁辺を通る細管として確認された。

#### [殻頂期幼生]

殻頂期幼生期の組織学的観察結果をFigs.7-9に示す。初期殻頂期幼生 (日令11, 殻長150 $\mu\text{m}$  Fig.7:A1,A2) では桿晶体の形成が確認された (Fig.7 C)。消化盲囊では個々の盲囊構造が確認され (Fig.7 B), 胃および腸管を覆うように発達した。その後は成長に伴い消化盲囊および桿晶体が発達し (Fig.8:A1,A2), 脂肪滴の蓄積も増加した (Fig.8 B)。腸管は細胞の大型化によりやや厚みを増した。殻頂期後期幼生 (日令15~17) では消化盲囊は胃および桿晶体囊を覆う最大の器官に発達した (Fig.9:A1,A2)。消化盲囊の囊胞および機能細胞は充実し、脂肪滴の蓄積が見られる細胞はさらに増加した (Fig.9 B)。また、桿晶体囊の発達に伴い桿晶体が大型になった (Figs.9 D)。消化盲囊組織内には盲囊導管を経由して取り込まれたと考えられる餌料藻類の細胞片が多数観察された (Fig.10 A)。摂餌された餌料藻類の一部は外殻を胃で除去された後消化盲囊上皮細胞へ直接取り込まれ、細胞内消化によって消化・吸収される状態が観察された (Fig.10 B)。着底期幼生では閉殻筋に接して10 $\mu\text{m}$ 前後の粗い格子状を呈する腎組織の原基および匍匐枝の原基が形成された (Fig.11)。

#### 胃および桿晶体囊と消化盲囊の形態計測

供試した浮遊幼生の平均殻長をFig.12に、胃および桿晶体囊と消化盲囊の体積の経時的変化を

Fig.13に示した。浮遊幼生は日令1で平均殻長75.3 $\pm$ 3.9 $\mu\text{m}$ を示し、その後日令5で109.5 $\pm$ 4.4 $\mu\text{m}$ に、日令10で165.7 $\pm$ 17.3 $\mu\text{m}$ に成長し、日令17では315.3 $\pm$ 23.9 $\mu\text{m}$ となり87%の幼生が着底期幼生に到達した。胃および桿晶体囊と消化盲囊の体積は、それぞれ日令1を1とすると、胃および桿晶体囊は日令5で4.5倍、日令10で20.7倍、日令15で106.0倍に、消化盲囊は日令5で4.6倍、日令10で50.0倍、日令15で361.7倍になった。胃および桿晶体囊と消化盲囊の体積は日令8までは胃および桿晶体囊が消化盲囊に対して有意に大きかった (t検定,  $p < 0.05$ )。その後日令15までは両者はほぼ同体積を示し、日令15で消化盲囊の体積が胃および桿晶体囊のそれを上回り、日令17で約1.7倍を示したが有意差は認められなかった。胃および桿晶体囊と消化盲囊と消化盲囊の体積比の経時的変化をFig.14に示した。日令1では軟体部の体全体に占める胃および桿晶体囊と消化盲囊と消化盲囊の体積比は20.3%であったが、日令3では34.7%に増加し、日令10で47.0%に達し最も割合が高くなった。その後は体組織の発達に伴って減少に転じ日令17では34.7%であった。

#### 考察

イワガキ成熟卵は染色性の異なる2種類の卵黄顆粒を有し、卵黄顆粒は細胞分裂に伴い各細胞に分配された。トロコフォア幼生期には幼殻の分泌が開始され、消化管の形成が始まったが、体細胞には前述した2種の卵黄顆粒が多数確認された。このことからトロコフォア期は卵内での発生と同様に卵黄栄養によって器官形成を進めると考えられた。消化管は日令1, D型期初期の殻長70 $\mu\text{m}$ 前後で基本構造が形成されたが、この段階の胃および桿晶体囊は体積が小さく胃内容物も見られなかった。また消化盲囊の細胞は少数で消化空胞の形成も見られなかったことから消化器官としての機能はまだ非常に低いか機能していないと考えられた。日令3, 殻長80 $\mu\text{m}$ では胃内容物が確認され、胃上皮細胞は桿晶体囊へ連なる繊毛と微絨毛を有



する上皮細胞の部位と微絨毛を有する上皮細胞によって構成される部位が明瞭に分かれた。胃内容物では外殻を除去された微細藻類が胃腔内に、外殻と思われる細片が桿晶体囊内に確認された。また、消化盲囊は発達して機能細胞数が増加しており、生体観察では外部から消化盲囊部に着色が見られた。このことから日令3では摂餌が開始され、餌料の消化・吸収が行われていると考えられた。餌料の消化は胃腔内で餌料藻類の外殻が除去され、分解・消化されて胃上皮細胞から吸収されるものと消化盲囊で細胞内消化されるものの両方があると推察されたが、桿晶体囊からの分泌はあるかもしれないが桿晶体は形成されていないことから、胃における消化能力はまだ相対的に未発達であると考えられた。この状態は殻頂期幼生に成長し殻長が $150\mu\text{m}$ に達するまで続いた。一方で体組織の各所の細胞に未吸収の卵黄顆粒が確認され、日令5で消失した。従って消化器官の機能化が確認された日令3から5の時期は卵黄栄養と餌料の両者の栄養を利用して器官形成を進めていると考えられた。また、2種の卵黄顆粒のうち電子密度の高い顆粒は早く消失し、電子密度の低い顆粒が最後まで確認された。これらの結果から、消化盲囊が未発達なD型期は胃上皮を主な消化・吸収器官として成長すると考えられた。

殻頂期幼生に成長すると、消化盲囊は胃および桿晶体囊を覆う最大の器官に発達し囊胞および機能細胞が充実した。このことは消化盲囊が主な消化器官として発達したことを示すと考えられた。一方、胃では桿晶体囊が発達し桿晶体が形成された。このことは胃腔における消化能力の著しい向上を示しており、消化盲囊の発達と相まって浮遊幼生の消化吸収能力は飛躍的に向上すると考えられた。特に消化盲囊による細胞内消化が頻繁に観察されたことは消化盲囊の発達が餌料藻類の消化吸収に重要であることを示すものと考えられた。

形態計測の結果によれば、胃および桿晶体囊と消化盲囊の軟体部組織に占める割合は摂餌が開始される日令3で30%を越え、それぞれの体積は日令1の1.5倍以上になったが、これは摂餌活動が開

始され、体積が増加したためと考えられた。その後日令8まで胃および桿晶体囊の体積は有意に消化盲囊より大きかった。このことはイワガキD型期幼生の消化・吸収器官が胃を主体とすることを示すと考えられた。しかし、殻頂期幼生への変態が進んだ日令8以降では消化盲囊の発達が進み、日令10では胃および桿晶体囊の体積が日令1の約20倍に発達したのに対し消化盲囊は50倍に発達していた。また組織学的には殻長 $150\mu\text{m}$ から桿晶体が確認された。このことは摂取した餌料の消化に桿晶体から放出される消化酵素が関与することを示しており、胃および桿晶体囊はそれまでの栄養吸収に加えて消化酵素による消化の場へ役割を変化させていると考えられた。胃および桿晶体囊と消化盲囊組織が軟体部組織に占める比率は日令10以降は徐々に低下したが、これは成長に伴う閉殻筋、面盤、腎組織および結合組織等の発達によりその割合が低下したものと考えられた。日令10以降の胃および桿晶体囊と消化盲囊の体積比は平均値では消化盲囊がやや上回ったが、有意差がみられなかったことは両者がほぼ同体積であることを示すと考えられる。しかし消化盲囊は多数の盲囊で構成された充実した臓器であり、上皮細胞の数は中空の臓器である胃に比較すると非常に多く、消化・吸収能力は消化盲囊が格段に上回ると考えられた。さらに消化盲囊では細胞内消化が行われており、この点でも胃腔の上皮細胞よりも消化・吸収能力にすぐれていると考えられた。このように、胃では桿晶体囊及び桿晶体が機能することにより消化の場としての役割が増大し、消化盲囊の発達と相まってさらに効率的な消化吸収が可能になるものと考えられる。また、胃および桿晶体囊上皮細胞だけでなく、消化盲囊上皮細胞にも脂肪滴の蓄積が進む様子が観察され、消化盲囊の発達は栄養の蓄積にも寄与していると考えられた。イワガキは殻長 $150\mu\text{m}$ を超えると成長が速くなるが、以上の論議から消化器官の発達が速やかな成長を支えていると結論しているであろう。

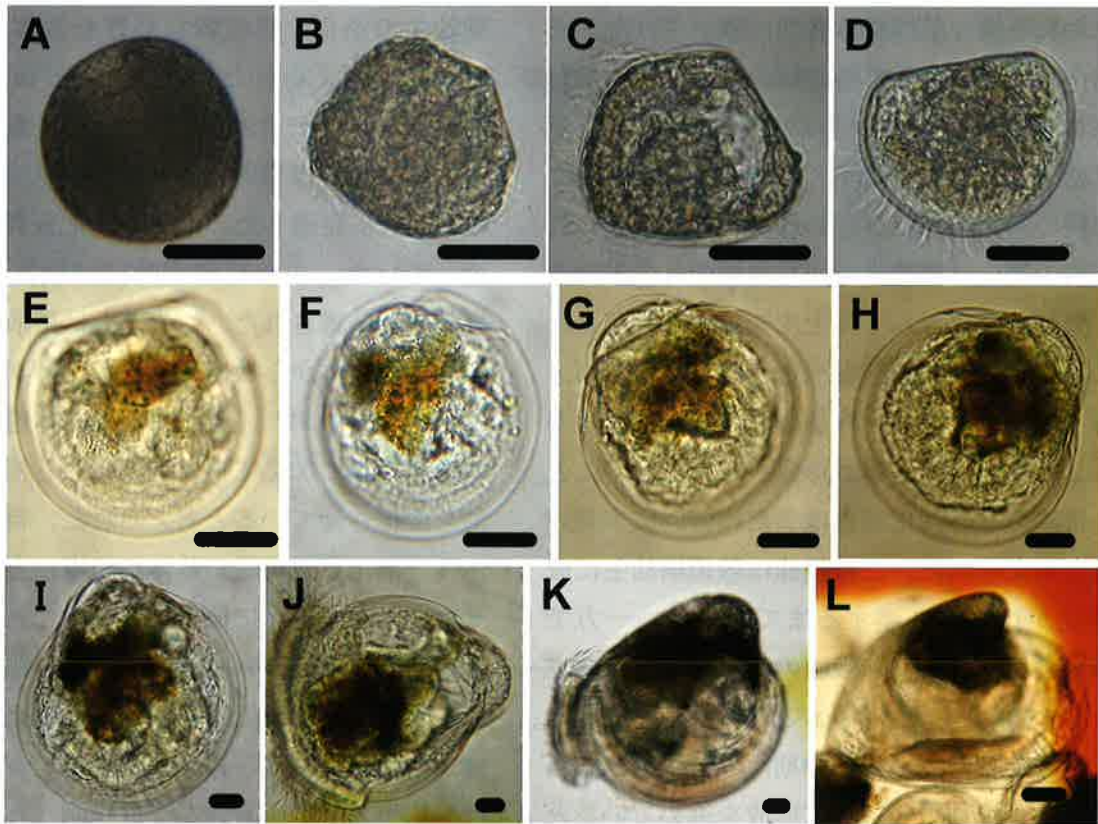


Fig. 1. Light micrographs showing different developmental stages of the rock oyster *Crassostrea nippona*. A; A fertilized egg. B; A trochophore larva. C; A trochophore larva undergoing metamorphosis. D-E; D-shaped larvae. F-J; Umbo-stage larvae. K; A settlement-stage larva. L; A newly settled juvenile. Scale bars = 20  $\mu$  m (A-K), 40  $\mu$  m (L).

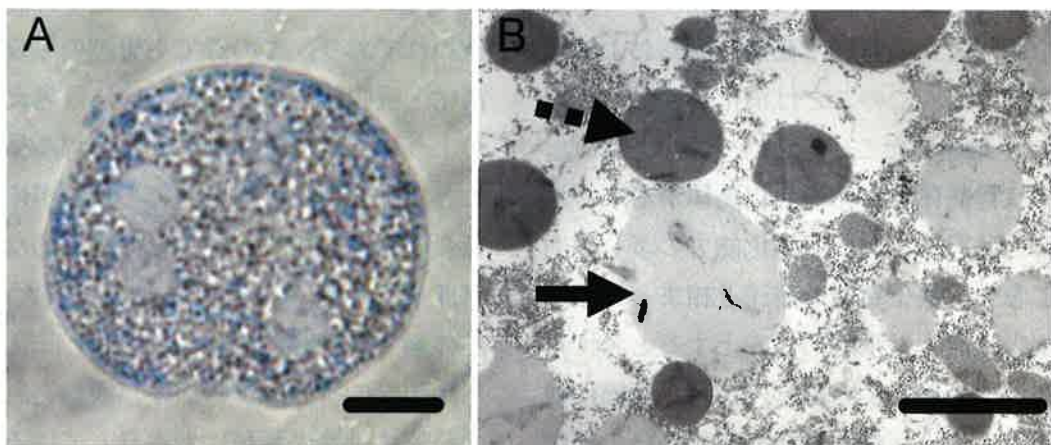


Fig. 2. Light and transmission electron micrographs of a fertilized egg of the rock oyster *Crassostrea nippona*. A; A light micrograph of section. Stained with toluidine blue. Scale bar = 10  $\mu$  m. B; A transmission electron micrograph showing two types of yolk granules with lower (arrow) or moderate (dotted arrow) electron density in an undifferentiated cell. Scale bar = 1  $\mu$  m.

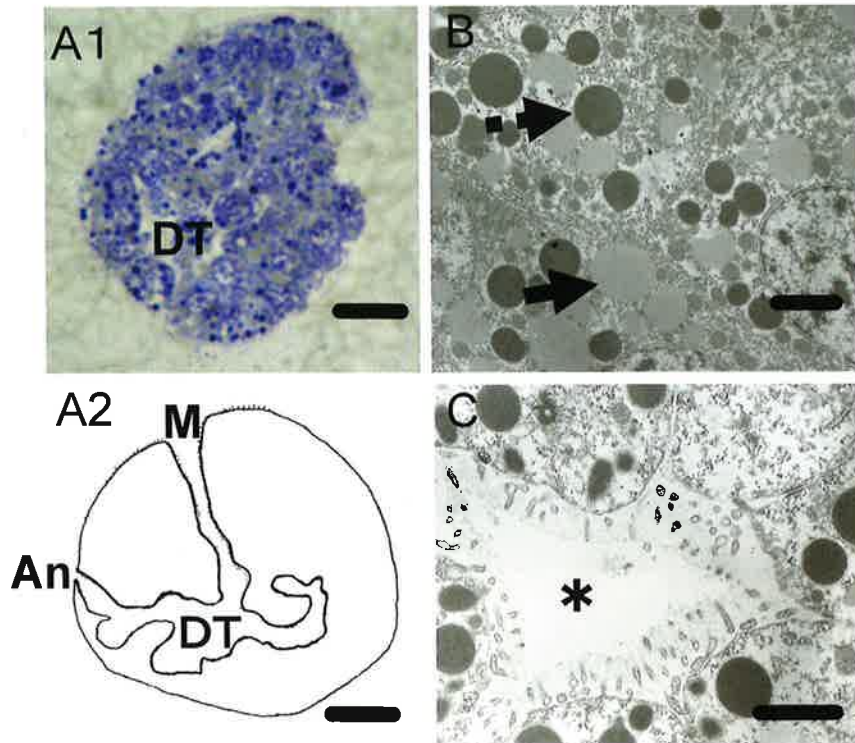


Fig. 3 . The composition of the primitive trochophore-larva of the rock oyster *Crassostrea nippona* . A1; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A2; a schematic drawing showing digestive tract. Scale bars = 10  $\mu$  m. B; A transmission electron micrograph showing two types of yolk granules with lower (arrow) or moderate (dotted arrow) electron density in an undifferentiated cell. Scale bar = 1  $\mu$  m. C; A transmission electron micrograph showing the primitive stomach with lumen (asterisk). Scale bar = 1  $\mu$  m. An, anus; DT, digestive tract; M, mouth.

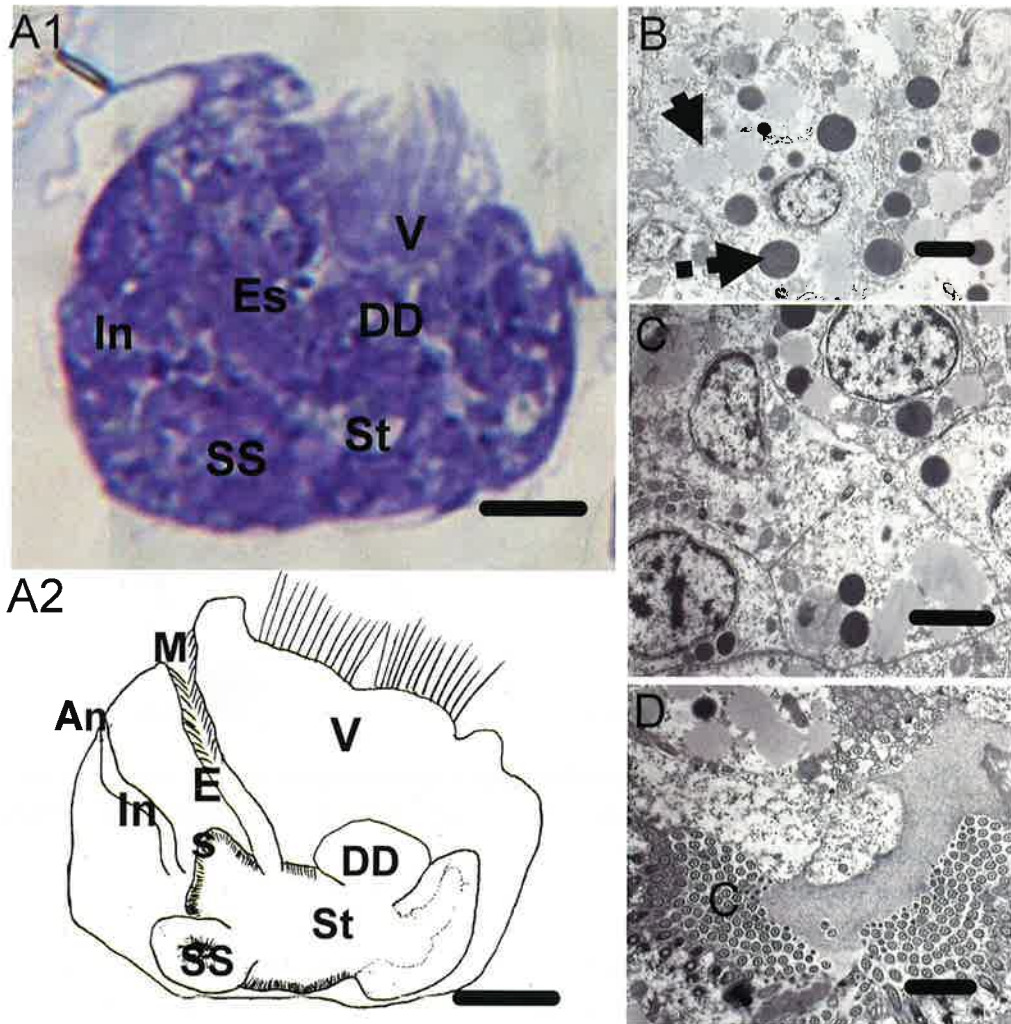


Fig.4. A D-shaped larva(1 day post-hatch) of the rock oyster *Crassostrea nippona*. A1; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars = 10  $\mu$  m. B; A transmission electron micrograph showing two types of yolk granules with lower (arrow) or moderate (dotted arrow) electron density in an undifferentiated cell. Scale bar = 1  $\mu$  m. C; Epithelial cells of the rudimentary digestive diverticulum. Scale bar = 1  $\mu$  m. D; Stomach. Numerous well-developed cilia were seen in the lumen. Scale bar = 1  $\mu$  m. An, anus; C, cilia; DD, digestive diverticula; Es, esophagus; In, Intestine; SS, style sac; St, stomach; V, velum.

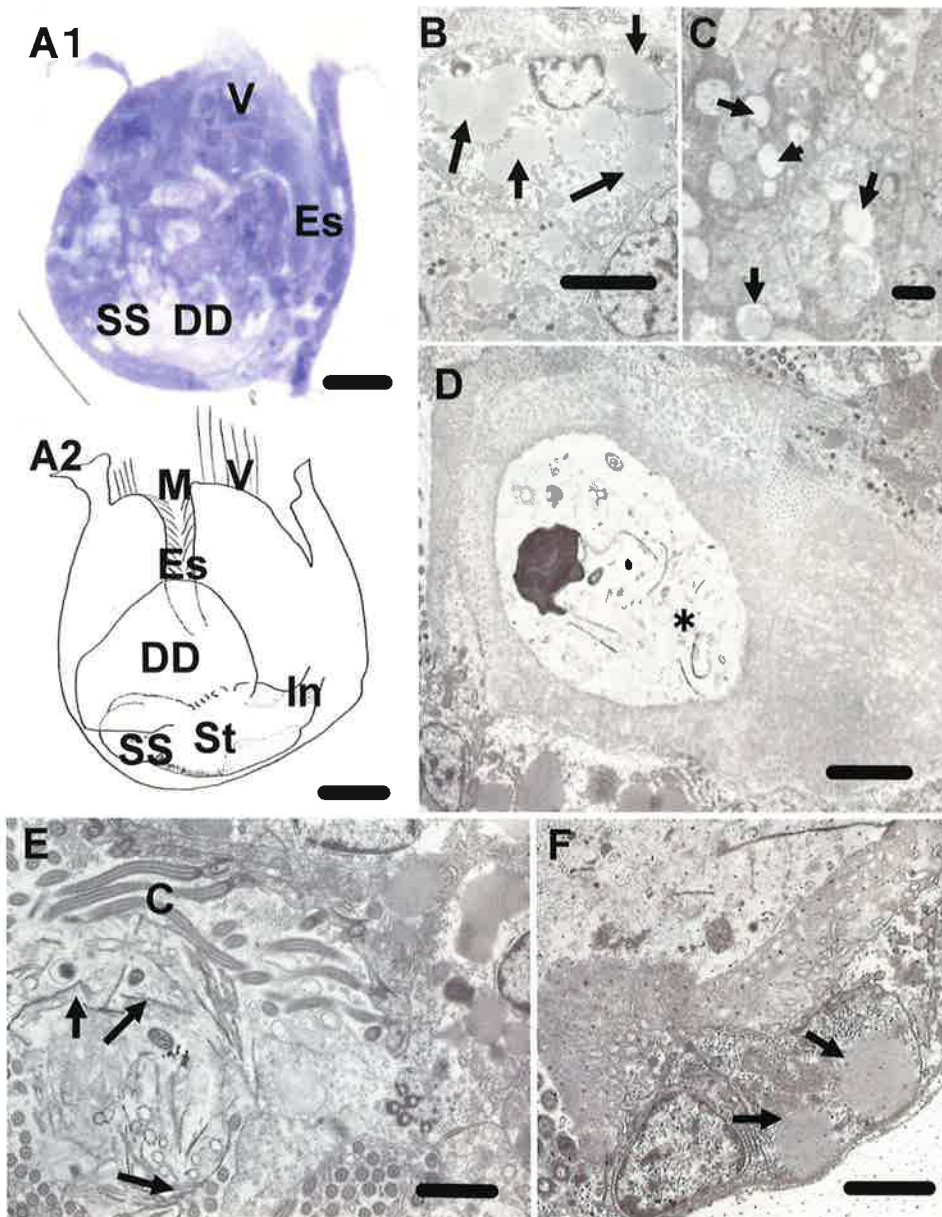


Fig.5. A D-shaped larva (3 days post-hatch) of the rock oyster *Crassostrea nippona*. A1; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars =  $10 \mu\text{m}$ . B-F; Transmission electron micrographs. B; Velum cells containing yolk granules with lower electron density (arrows). C; Digestive diverticular cells containing numerous vacuoles (arrows). D; Stomach. Debris of ingested microalgal cell (asterisk) was seen in the gastric lumen. E; Style sac. Cellular debris containing filamentous substances (arrows) was seen in the lumen. F; Stomach. Epithelial cells containing lipid droplets (arrows) were seen. Scale bars =  $1 \mu\text{m}$ . Abbreviations are the same as in Fig.4.

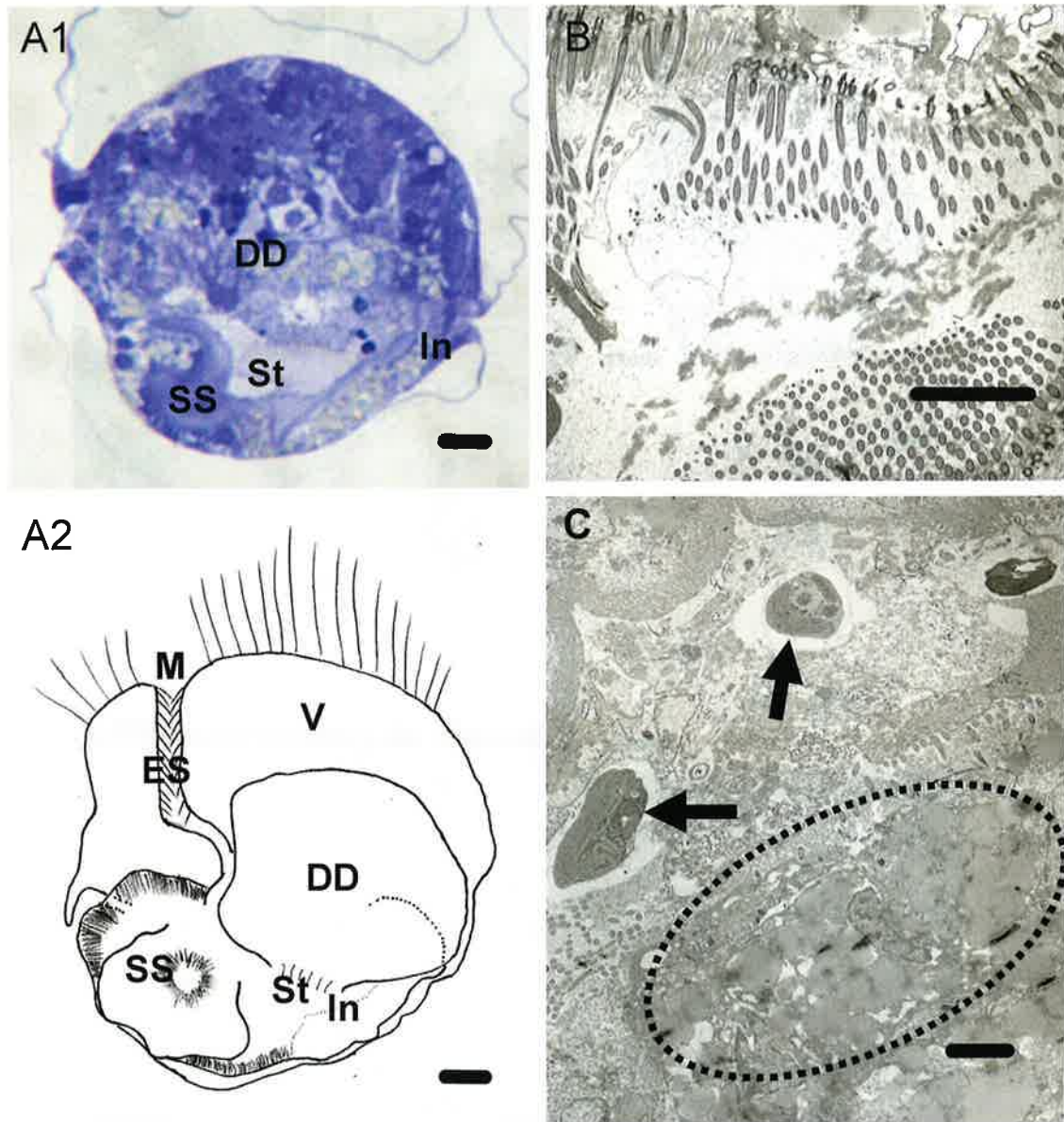


Fig.6. A D-shaped larva (5 days post-hatch) of the rock oyster *Crassostrea nippona*. A1; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars = 10  $\mu$  m. B; A transmission electron micrographs of the style sac. Scale bar = 1  $\mu$  m. C; Stomach. Cellular debris of ingested microalgal cells (arrows) were seen. Epithelial cells accumulated lipid droplets (dotted circle). Scale bar = 2  $\mu$  m. Abbreviations are the same as in Fig. 5.

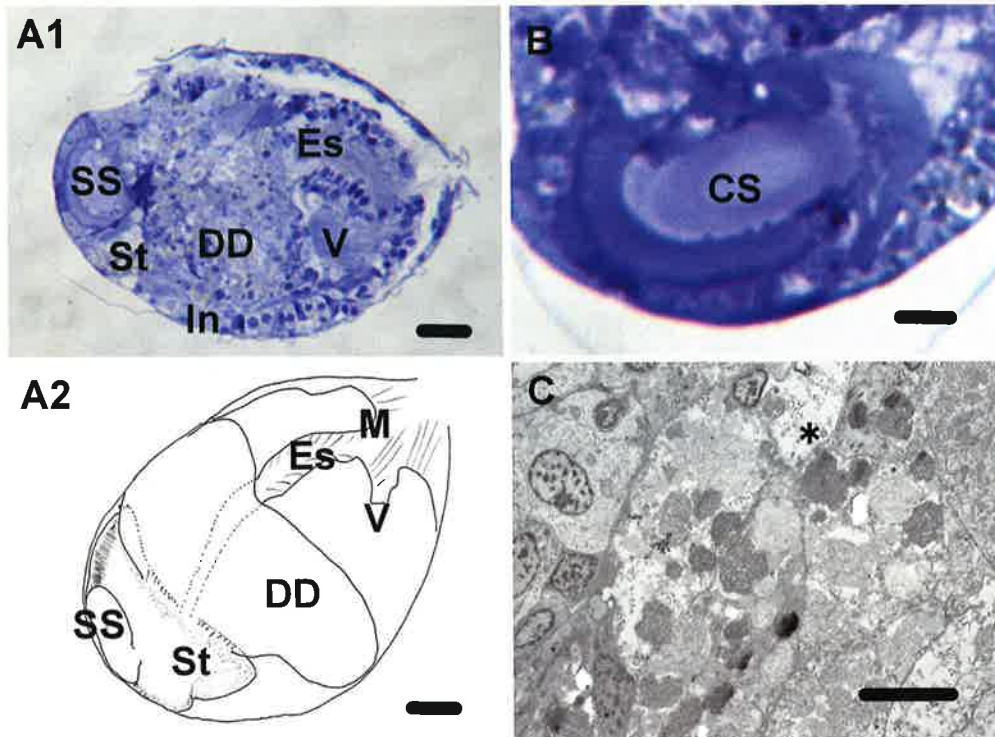


Fig.7. An umbo larva (11 days post-hatch) of the rock oyster *Crassostrea nippona*. A1; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars = 10  $\mu$  m. B; A light micrograph of the crystalline style (CS) in the style sac. Scale bar = 5  $\mu$  m. C; A transmission electron micrograph of digestive diverticula cells containing numerous vacuoles. An asterisk shows the cecum. Scale bars = 2  $\mu$  m. Abbreviations are the same as in Fig. 6.

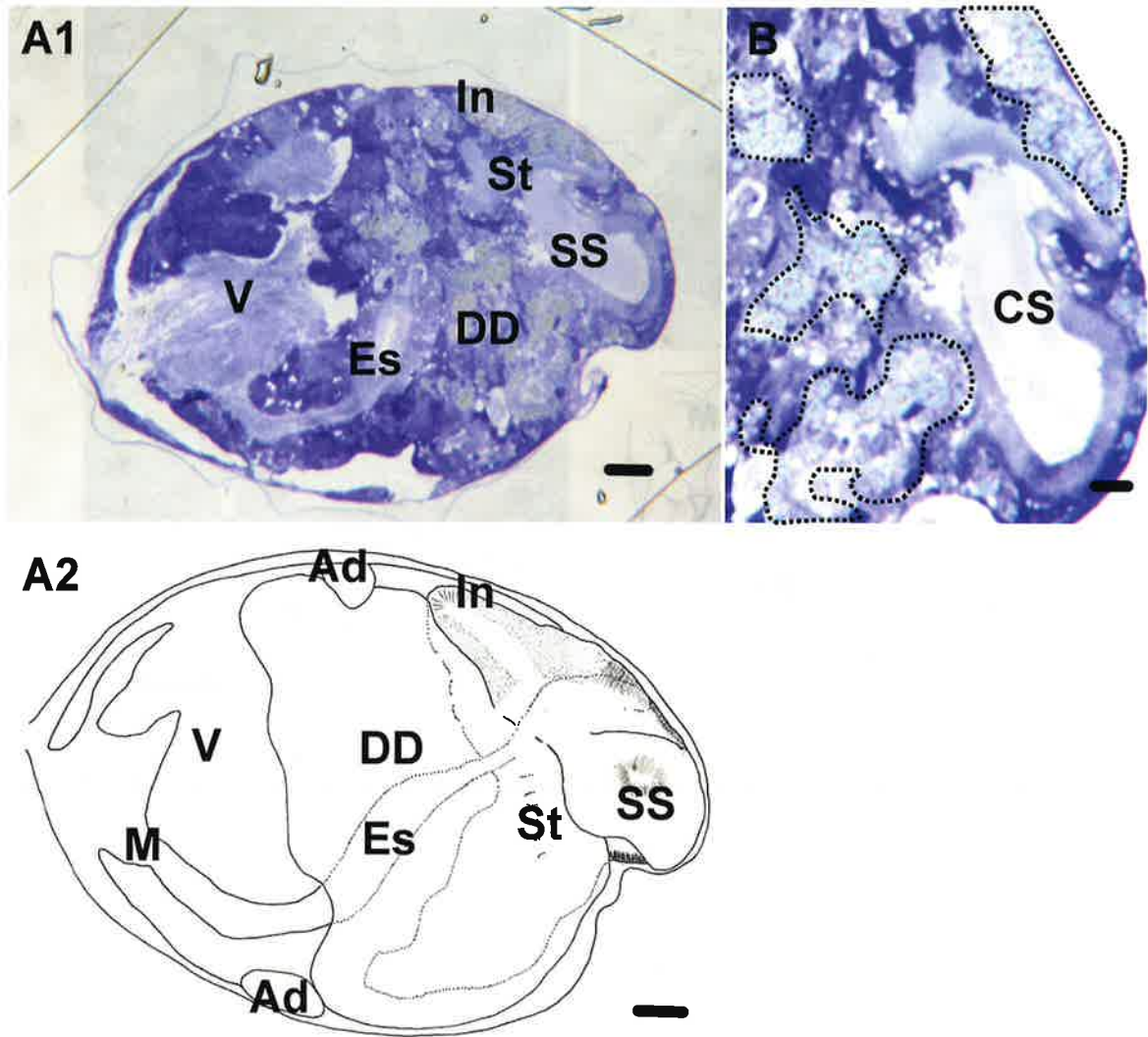


Fig.8. An umbo larva (13 day post-hatch) of the rock oyster *Crassostrea nippona*. A1; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars = 10  $\mu$  m. B; A light micrograph showing the crystalline style (CS) in the style sac and accumulation of lipid droplets in the epithelial cells of the digestive diverticula (areas enclosed in dotted lines). Scale bar = 5  $\mu$  m. Ad; adductor muscles. Other abbreviations are the same as in Fig. 7.



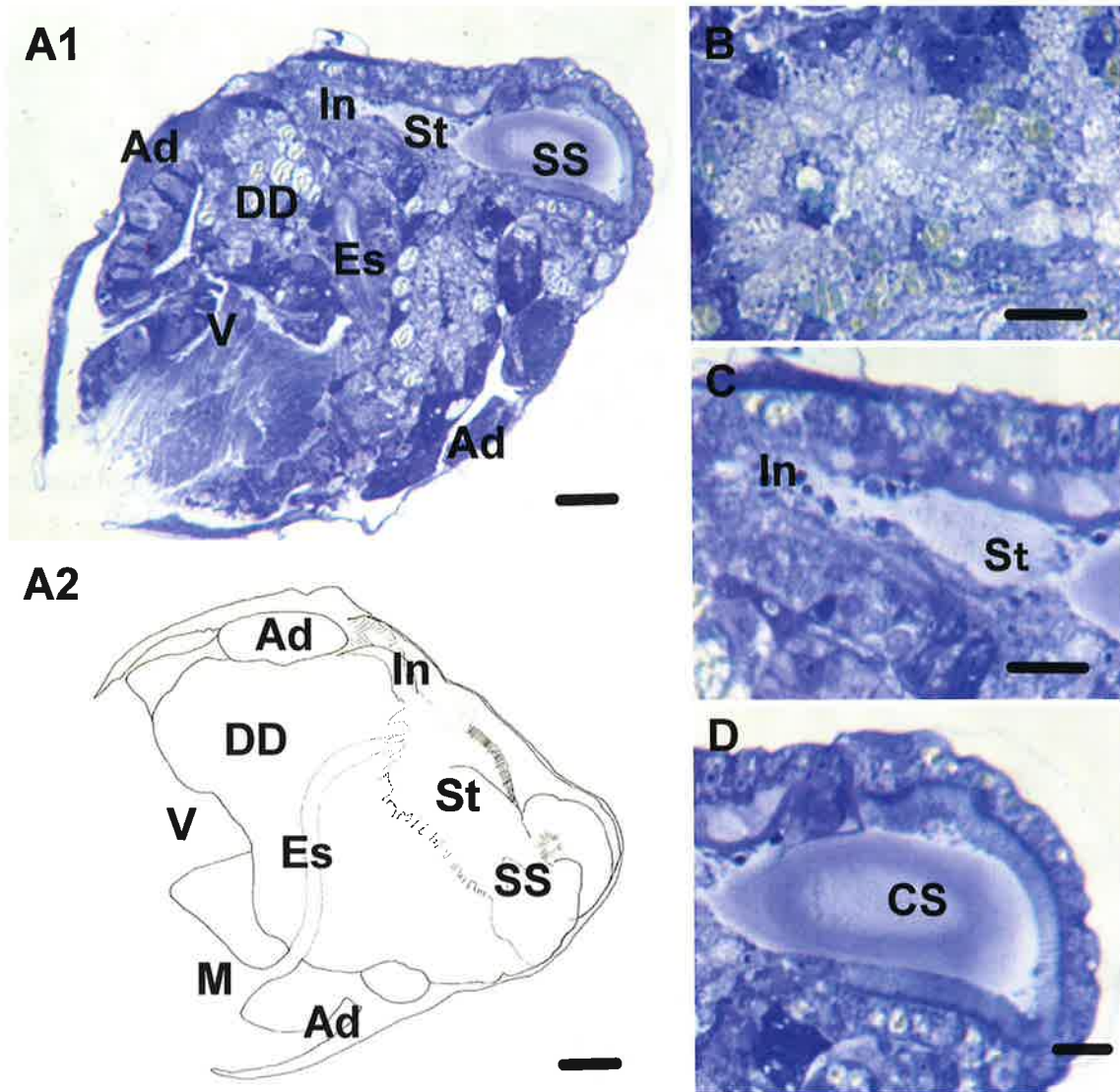


Fig.9. An umbo larva (15 days post-hatch) of the rock oyster *Crassostrea nippona*. A1; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars = 20  $\mu$  m. B; Digestive diverticula. C; Stomach and intestine. D; Style sac containing the crystalline style (CS). B-F; Scale bars = 10  $\mu$  m. Abbreviations are the same as in Fig. 8.

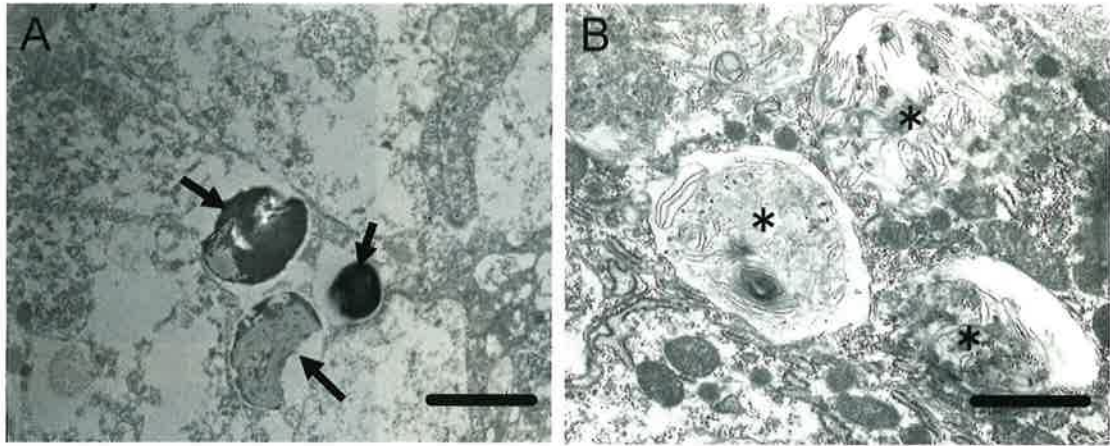


Fig.10. Transmission electron micrographs of the digestive diverticula of the umbo larva (15 days post-hatch) of the rock oyster *Crassostrea nippona*. A; Epithelial cells of the digestive diverticula and cellular debris of ingested microalgal cells (arrows). Scale bar = 2  $\mu$  m. B; Cellular debris of ingested microalgal cells in the endocytotic vacuoles of the epithelial cells of the digestive diverticula (asterisks) was seen. Scale bar = 1  $\mu$  m.

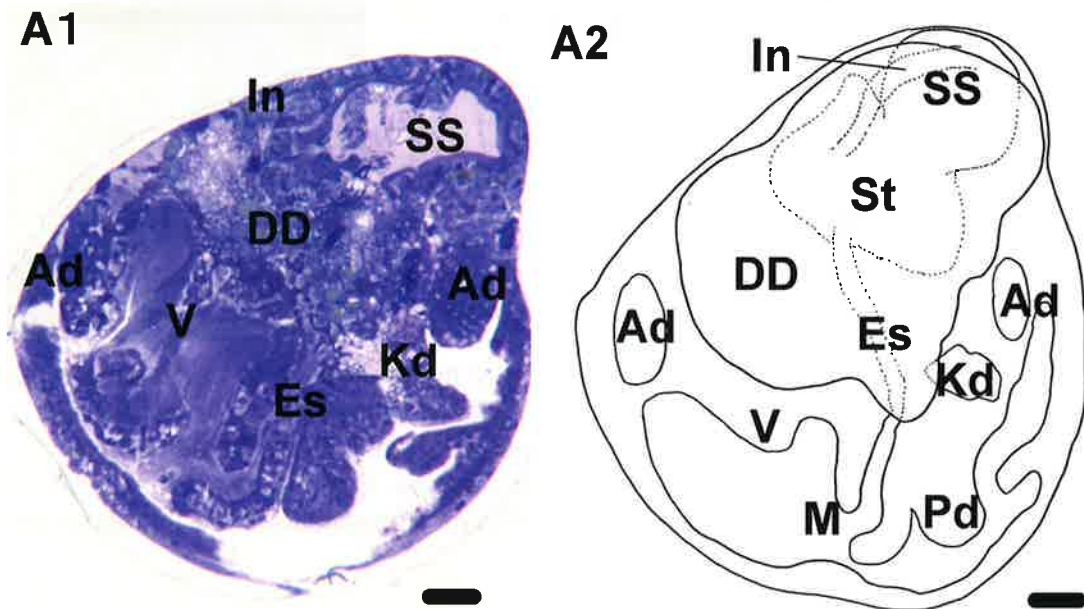


Fig.11. A pedveliger larva (17 days post-hatch) of the rock oyster *Crassostrea nippona*. A1; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bar = 20  $\mu$  m. Kd, kidney; Pd, pedal organ. Other abbreviations are the same as in Fig. 9.

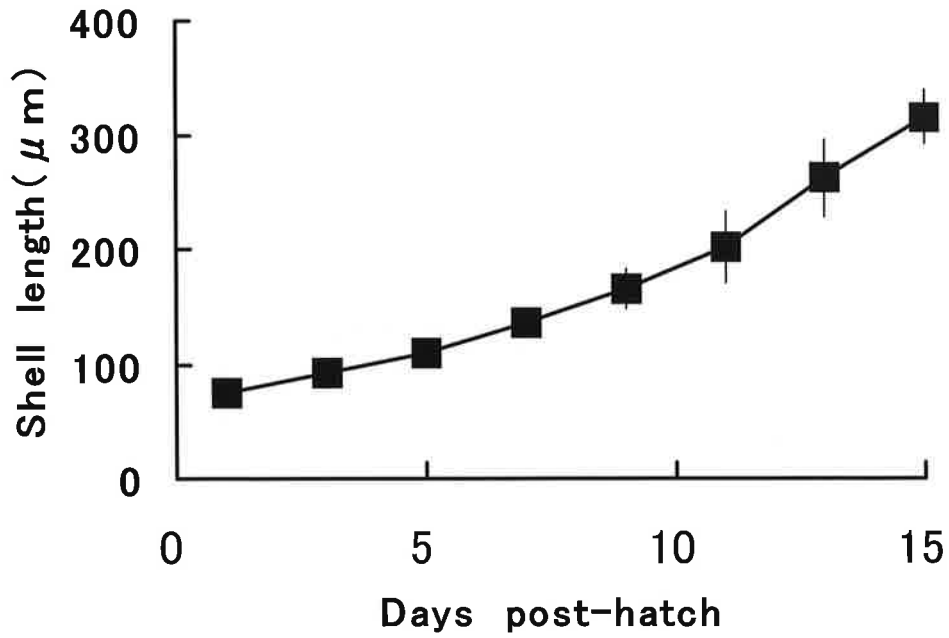


Fig.12. Change in average shell length of the rock oyster larvae *Crassostrea nippona* (mean±SD).

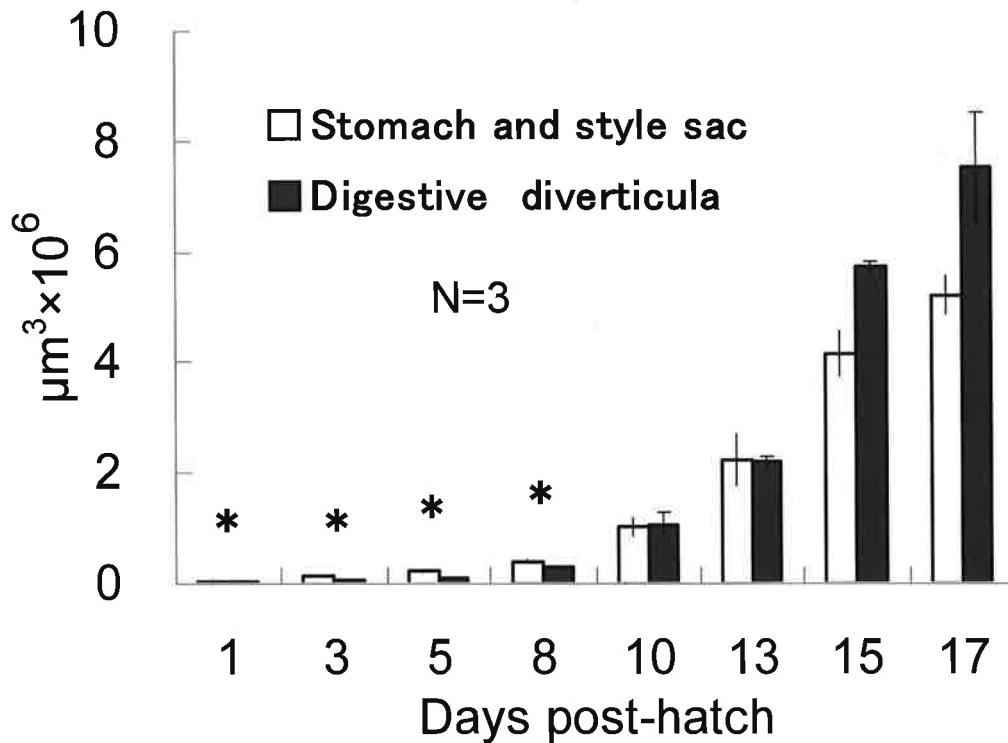


Fig.13. The change of the volume of the stomach and style sac, and digestive diverticula with the lapse of time (mean±SE). \* means significant difference between the stomach and style sac and the digestive diverticula by *t*-test ( $p < 0.05$ ).

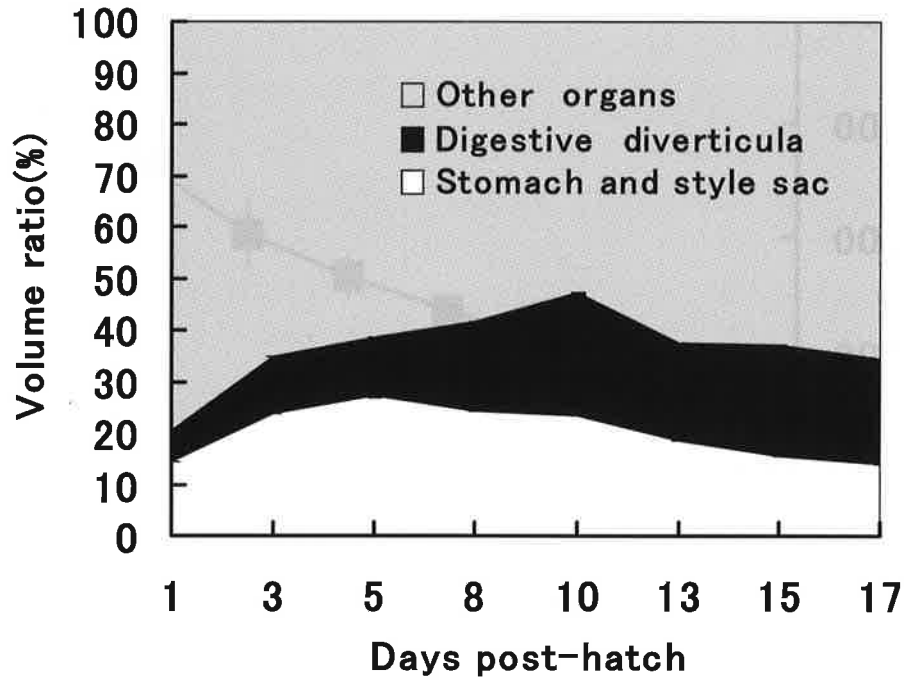


Fig.14. Change in the volume frequency of the digestive diverticula and stomach with lapse of time.

## (2) クマサルボウガイ (*Scapharca globosa ursus*)

クマサルボウガイ *Scapharca globosa ursus* は、有明海と瀬戸内海に生息するフネガイ科の大型二枚貝で、諫早湾で過去に多獲されていたが、1992年の約42tの漁獲記録をピークとして急激に漁獲が減少し、すでに10年以上漁獲が記録されていない(大橋, 2002)。このため長崎県ではクマサルボウガイの種苗生産の試みを進めているが、近縁種のアカガイ *Scapharca broughtonii* では *Pavlova lutheri* と *Chaetoceros calcitrans* あるいは *P. lutheri* と *C. gracilis* の混合給餌で種苗生産が可能であるのに対して、クマサルボウガイは同様の餌料条件ではD型期幼生の初期に成長が停滞して斃死し、良好な結果を得ることができていない(森ら2000, 2001; 大橋ら2002)。また、飼育中の浮遊期幼生の成長に伴う体組織の発達については知見が乏しく、斃死要因等の検討が十分にできない状態にある。そこで、クマサルボウガイ浮遊期幼生の成長に伴う消化器官の発達について組織学的に検討した。

## 材料と方法

### 浮遊幼生の飼育と採材

組織学的検討に用いたクマサルボウガイ浮遊期幼生は、諫早市小長井町地先で2001年1月から2002年3月にかけて漁獲され、長崎県総合水産試験場地先の筏で垂下飼育されていた親貝37個体を用い、2002年5月15日、5月23日、6月11日に松田らの方法(松田・藤井, 2000)で得た受精卵から孵化したものをを用いた。また組織学的検討に用いた試料の一部は2004年6月22日に同様の方法で得た受精卵を用いて飼育した浮遊幼生で補完した。得られた浮遊期幼生は25°Cの恒温水槽内に収容した500lポリカーボネイト水槽に6~10個体/mlの密度で収容し、*C. calcitrans*, *P. lutheri* を用いて給餌飼育した。餌料藻類はF培地(Guillard and Rytter, 1962)を用いて照度3000lx, 気温20°Cの恒温室内で5~7日培養し、*C. calcitrans* は6~15×10<sup>6</sup> cells/ml, *P. lutheri* は細胞密度が6~9×10<sup>6</sup> cells/mlに達したものを使用した。飼育水中の餌料密度

は成長に応じて増加し、*C. calcitrans* は8~18×10<sup>3</sup> cells/ml, *P. lutheri* は2~10×10<sup>3</sup> cells/mlの範囲とした。これらの飼育群から採苗までの21~24日間、毎日無作為に浮遊幼生を採集し、氷冷下で2%パラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド2.5%溶液(カコジル酸緩衝, pH7.4)で固定した後、1%四酸化オスミウム液(カコジル酸緩衝, pH7.4)で後固定した。固定試料は常法に従ってエタノール系列で脱水し、Spurrの樹脂に包埋した後ウルトラミクロトーム(ULTRACUT, UCT型, Leica社製)を用いて厚さ1μmの光顕用切片と電顕用の超薄切片を作製した。光顕用切片は1%トルイジン青で染色し器官形成過程の観察を行った。超薄切片は酢酸ウラニル-クエン酸鉛で染色し、JEOL-JEM1010型透過電子顕微鏡を用いて各器官の微細構造の観察に供した。

## 結果

### 浮遊幼生の成長

採卵日毎の浮遊期幼生の平均殻長の推移をFig.15に示す。いずれの飼育群も日令7前後で殻頂期幼生が出現し、日令10前後までは成長が緩やかであった。その後殻長が150μmを超えると成長が速くなり、日令19~21で殻長250μmを超える着底期幼生(full-grown幼生)が出現し着底した。着底期幼生は最大で殻長300μmに達したが、これまでの報告(異儀田ら, 1977; 高見ら, 1981)で観察された眼点の形成は認められず、稚貝に変態した後に眼点が観察された。

### 外部形態

外部形態の変化をFig.16に示す。受精卵は直径60μmの球形であった(Fig.16 A)。受精後は卵内発生を続け、水温25°Cで約6時間後にトロコフォア幼生の形態で孵化した。トロコフォア幼生は形態を変化させながら幼殻を分泌し(Fig.16 B)、水温25°Cで孵化後約24時間でD型期幼生に変態した(Fig.16 C)。D型期幼生は日令7までに殻長110μmに達し(Fig.16 D)、その後殻長120μmから殻頂

部の膨隆が認められるようになり殻頂期幼生に成長した。初期の殻頂期幼生は楕円形を呈していたが (Fig.16 E), 殻長 $150\mu\text{m}$ に達すると殻頂部の隆起が進み (Fig.16 F), アカガイ類浮遊幼生に特徴的な形態を示すようになった。その後, 殻頂部の隆起と縁辺部の伸長が続き, 殻長 $250\mu\text{m}$ を超えると着底期幼生 (full-grown幼生, Fig.16 G) となって着底を開始した。

### 組織学的検討

受精卵内には多数の卵黄顆粒が確認された。卵黄顆粒は形態の異なる2種類が存在していた (Fig.17 A)。トロコフォア幼生は外観からは消化器官の形成は確認できなかったが, 組織学的には消化管原基の形成が進んでいた (Fig.17:B1,B2)。日令1のD型期幼生 (殻長 $80\sim 90\mu\text{m}$ ) では, 消化管が開通し, 食道, 胃および腸管の原基が区別できた (Fig.18:A1,A2)。この時期の幼生の体細胞内には電子密度の低い大型の顆粒と電子密度の高い2種の卵黄顆粒が多数存在しているのが確認され (Fig.19 A), この卵黄顆粒を含有した状態で細胞分裂を行う様子が確認された (Fig.19 B)。日令3~4 (殻長 $100\sim 105\mu\text{m}$ ) の幼生では体細胞内の2種の卵黄顆粒は急激に減少した (Fig.20:A1,A2,B)。胃からは桿晶体囊が膨出して形成され, 消化盲囊細胞は $10\mu\text{m}$ 前後の消化空胞を有する機能細胞で構成されていたが, 細胞数は数個であった (Fig.20 C)。胃上皮細胞では発達初期にはみられなかった細胞内への脂肪滴の蓄積が確認された (Fig.21:A,B)。卵黄顆粒は日令6 (殻長 $110\sim 115\mu\text{m}$ ) に消失した。殻頂期に達した幼生 (殻長 $120\mu\text{m}$ ) では胃上皮細胞および消化盲囊上皮細胞への脂肪滴の蓄積がさらに進み, 消化盲囊上皮細胞には消化空胞が多数見られるようになった (Fig.22)。殻長 $150\mu\text{m}$ に達すると消化盲囊は各盲囊構造が明瞭になり, 桿晶体囊には桿晶体が明瞭に確認できるようになった (Fig.23)。この時期から日間成長量は増加し, 殻長 $200\mu\text{m}$ 前後の浮遊幼生では桿晶体がさらに発達し, 腎臓の原基が確認された (Fig.24)。着底期幼生では消化盲囊組織が体内で

最大の器官となった。閉殻筋はさらに発達し, 匍匐肢の原基が形成された (Fig.25)。

### 考察

受精卵および孵化幼生の体細胞中に確認された2種類の顆粒はその形態および消長から卵黄顆粒と考えられ, 浮遊幼生はこの卵黄を栄養として日令1で消化管の原基を形成し, 日令2からは摂餌を開始すると考えられる。卵黄は日令6で消失したことから, この間は卵黄と餌料の双方の栄養を利用して成長するものと考えられた。摂餌した餌料の消化・吸収は胃上皮と消化盲囊が行うと考えられた。消化盲囊は消化空胞が見られる機能細胞が日令4から確認されたが, 個々の盲囊構造が形成されたのは殻頂期幼生以降であった。このことから消化盲囊の機能が向上するのは殻頂期以降であると考えられた。これらの結果から, 浮遊幼生の摂餌した餌料の消化・吸収はD型期までは胃上皮を主体とし, 殻頂期以降は胃上皮と消化盲囊の双方で行われると考えられた。また殻長約 $150\mu\text{m}$ で桿晶体が形成されることによって消化能力が格段に向上すると考えられた。胃上皮細胞では日令3以降, 餌料由来の栄養物質と考えられるオスミウムに好染される脂肪滴の細胞内蓄積が見られた。この脂肪滴は成長に伴い胃および桿晶体囊上皮細胞全体に見られるようになり, その後消化盲囊の発達に伴い消化盲囊上皮細胞にも蓄積が進んだ。以上の結果を殻長サイズを基準にして整理すると, ふ化後D型期初期 (殻長 $90\mu\text{m}$ ) に口, 食道, 胃原基, 腸管および肛門からなる消化管を形成した浮遊期幼生は殻長 $110\mu\text{m}$ に達するD型期後期までは卵黄と摂餌した餌料の双方を利用して成長し, 殻長 $120\mu\text{m}$ 以上の殻頂期幼生は摂餌のみで成長するようになると考えられた。また栄養摂取の形態は, ふ化から殻長 $120\sim 150\mu\text{m}$ 未満の殻頂期初期までは胃上皮細胞による栄養摂取を主体とし, その後は消化盲囊による栄養摂取が加わると考えられ, 殻頂期以降の成長量の増加は, 栄養摂取形態の変化によるものと考えられた。長崎県

総合水産試験場で成績が不調であった種苗生産における斃死幼生の殻長組成は、殻長120~130 $\mu\text{m}$ と殻長160~170 $\mu\text{m}$ のサイズでピークが見られている(森ら2001;大橋ら,2002)。このサイズは卵黄と摂餌した餌料の双方を利用する時期から摂餌のみに切り替わる時期と、消化盲嚢や桿晶体の形成により栄養摂取と消化吸収の形態が変化する時期にあたる。これらの変化はその後の成長に大

きく影響すると考えられ、殻長150 $\mu\text{m}$ 以降に見られる急速な成長は、これらの諸器官が機能することによって維持されていると考えられた。従って栄養摂取法の変化が幼生の生残に大きく関与すると考えられた。

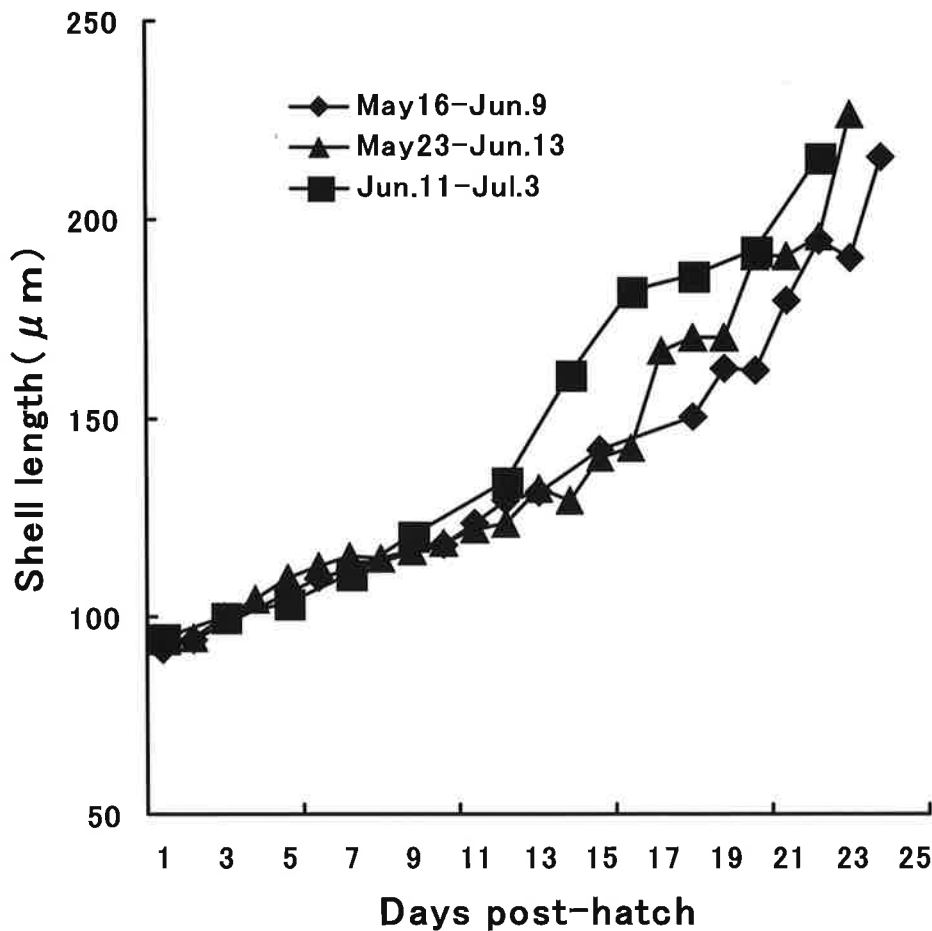


Fig.15. Change in the average shell length of the arkshell larvae *Scapharca globosa urusus* in different rearing groups.

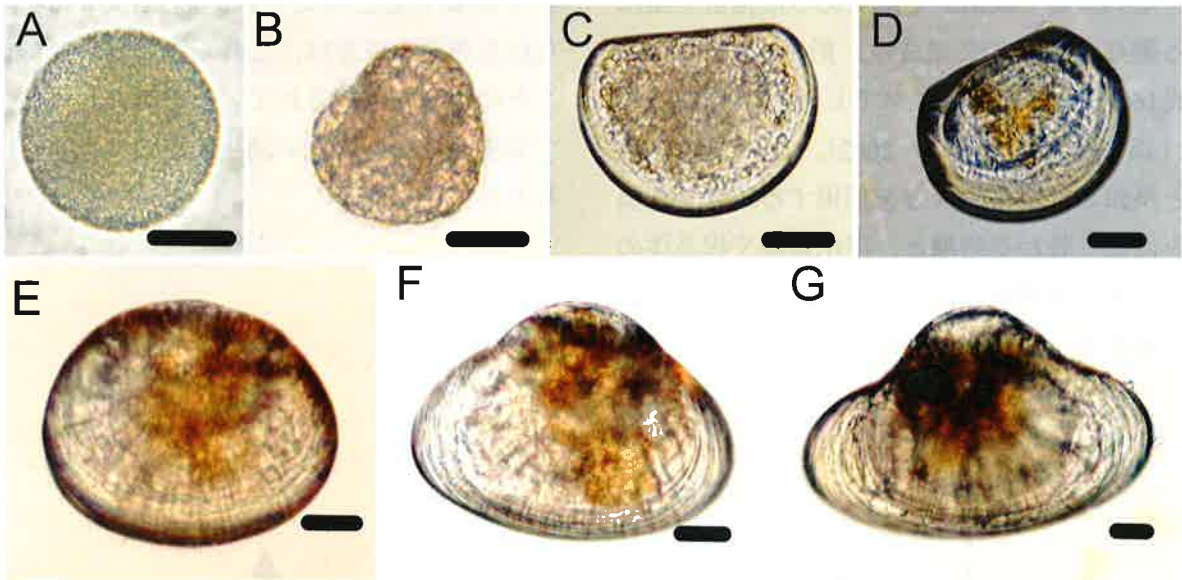


Fig. 16. Light micrographs showing the different developmental stages of the arkshell *Scapharca globosa urusus*. A; A fertilized egg. B; A trochophore larva. C; D-shaped larvae. D-F; Umbo-stage larvae. G; A settlement-stage (full grown larva. Scale bars = 20  $\mu$  m.



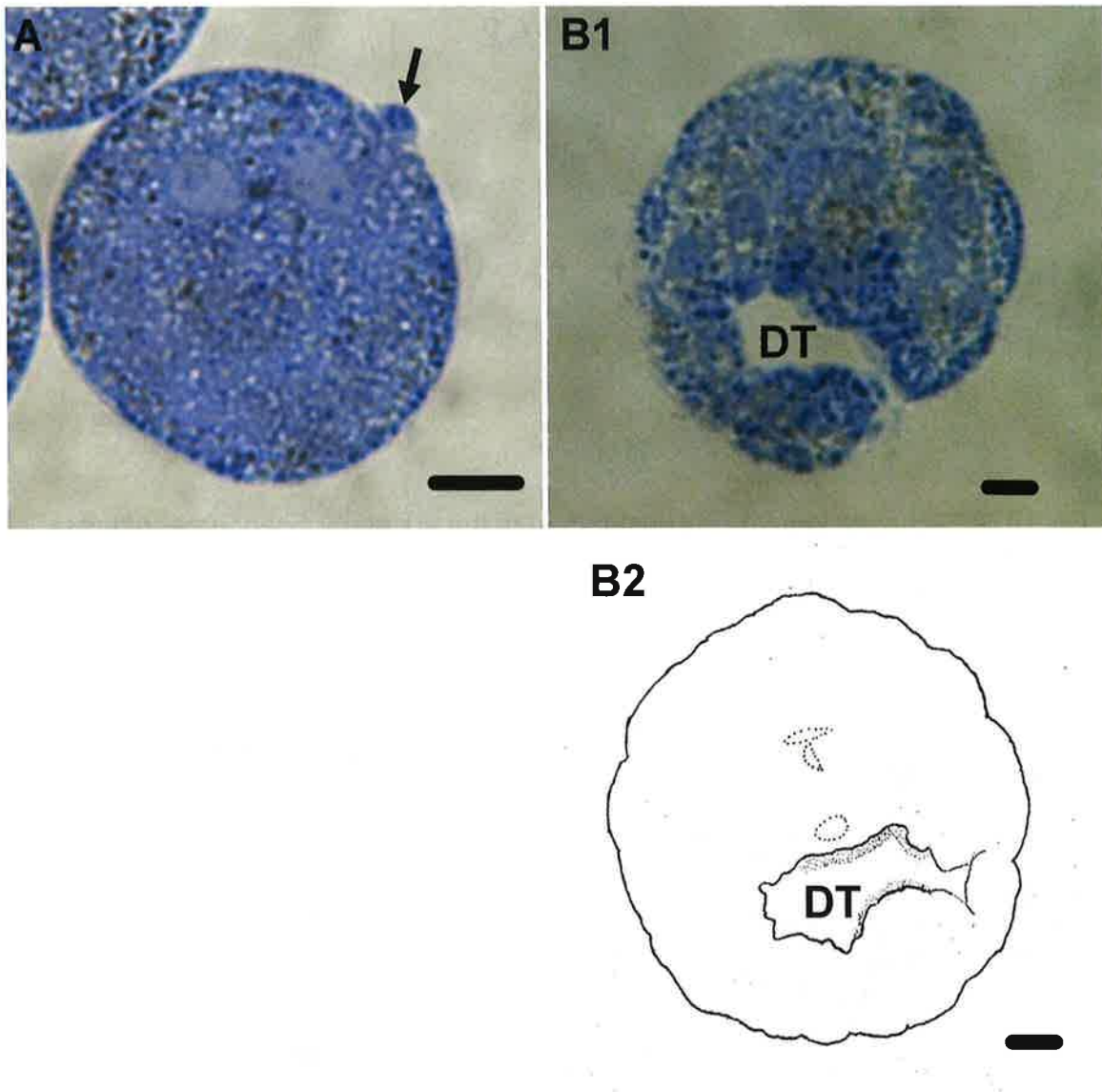


Fig. 17 . A fertilized egg and a trochophore-larva of the ark shell *Scapharca globosa urusus*. A; A light micrograph of the fertilized egg. Polar body was seen (arrow). Stained with toluidine blue. B; A light micrograph of the trochophore-larva (B1) and a schematic drawing showing the primitive digestive tract (DT). Scale bars = 10  $\mu$ m.

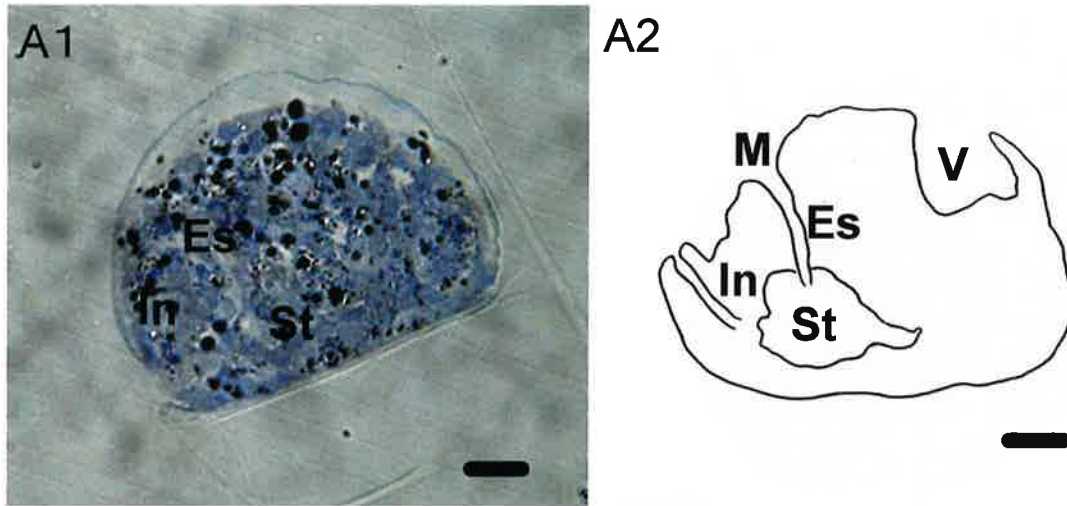


Fig.18. A D-shaped larva(1 day post-hatch) of the ark shell *Scapharca globosa urusus* . A; A light micrograph of section stained with toluidine blue (A1) and a schematic drawing (A2) showing the composition of digestive organs. Scale bars = 10  $\mu$  m. Es, esophagus; M, mouth; In,Intestine; St, stomach; V, velum.

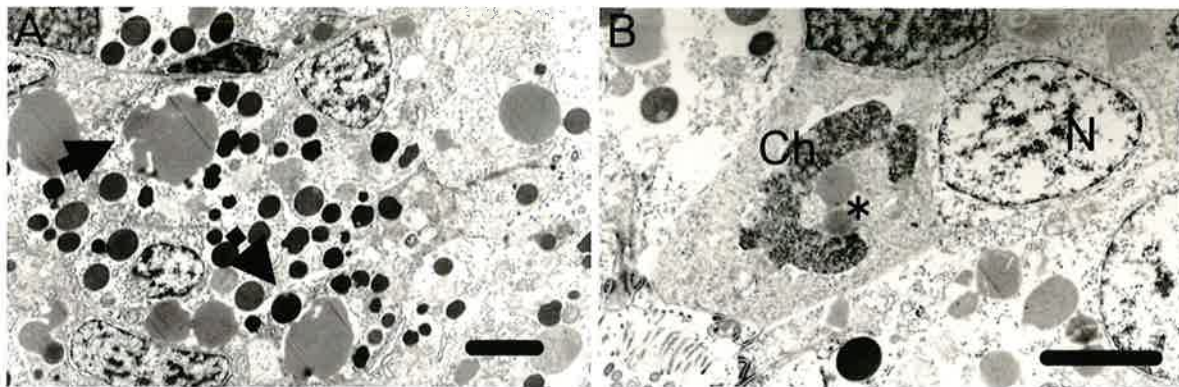


Fig.19. Transmission electron micrographs of D-shaped larvae (2 days post-hatch) of the ark shell *Scapharca globosa urusus* . A; Localization of two types of yolk granules with lower (arrow) or moderate (dotted arrow) electron density in an undifferentiated cell. B; The yolk granules in a cell under cell division. N, nucleus; Ch, chromatin. Scale bars = 1  $\mu$  m.

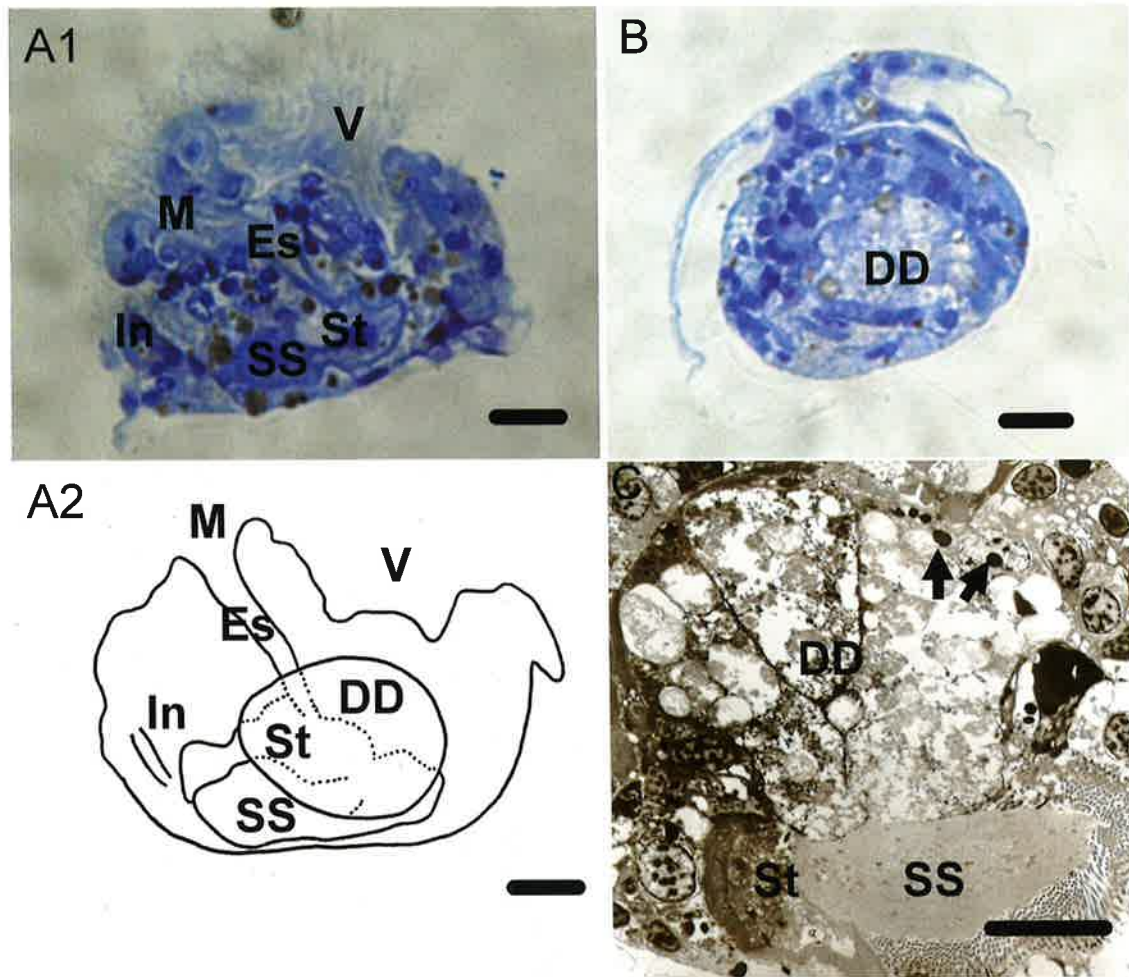


Fig.20. D-shaped larvae (3 and 4 days post-hatch) of the ark shell *Scapharca globosa urusus*. A1,B; Light micrographs of sections stained with toluidine blue A2 ;A schematic drawing showing the composition of digestive organs. A1 and B were cut from the same individual. Scale bars = 10  $\mu$  m. C; A transmission electron micrograph of D-shaped larva (4 days post-hatch). Arrows indicate yolk granules. Scale bars = 10  $\mu$  m. DD, digestive diverticula; SS, style sac; Other abbreviations are the same as in Fig.18.

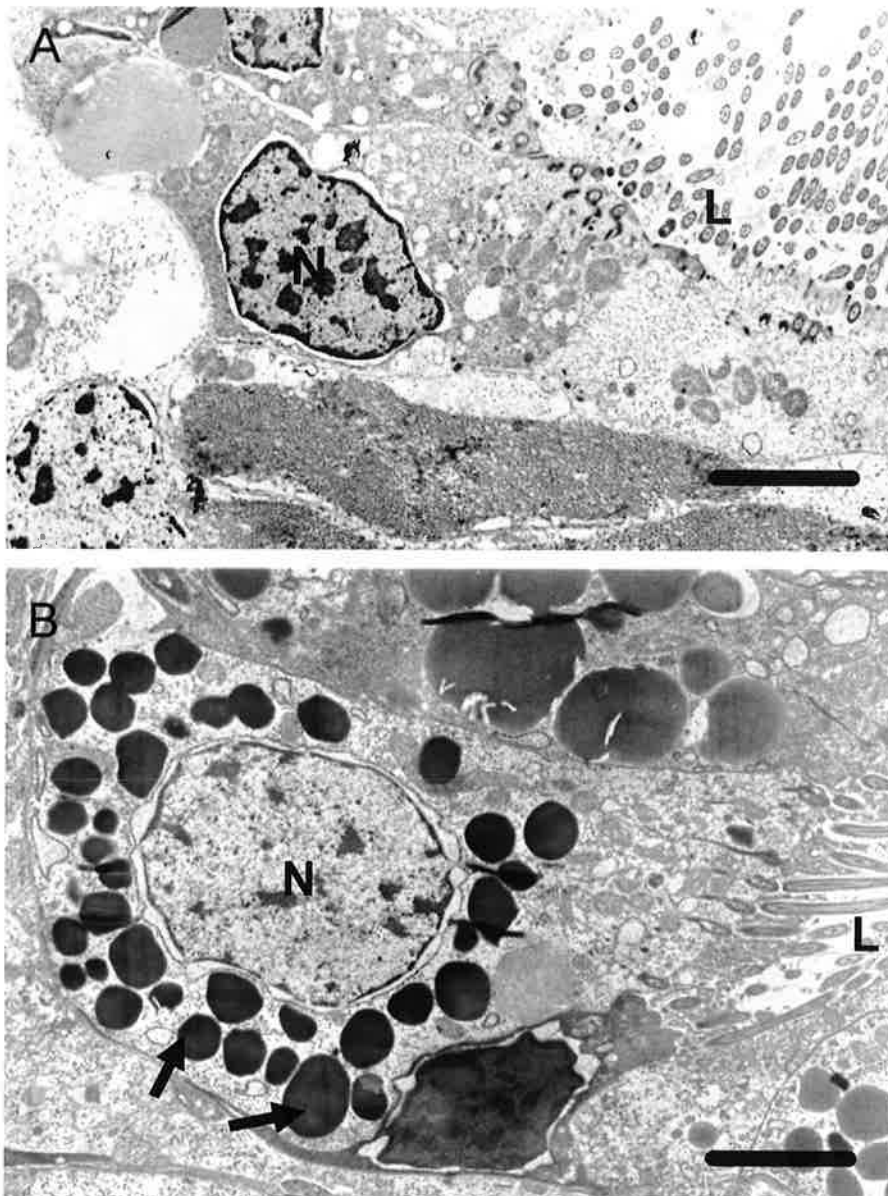


Fig.21. Transmission electron micrographs of gastric epithelial cell of D-shaped larvae of the ark shell *Scapharca globosa urusus*. A; 2 days post-hatch. B; 4 days post-hatch. Arrows indicate lipid droplets. N, nucleus; L, stomach lumen. Scale bars = 2  $\mu$  m

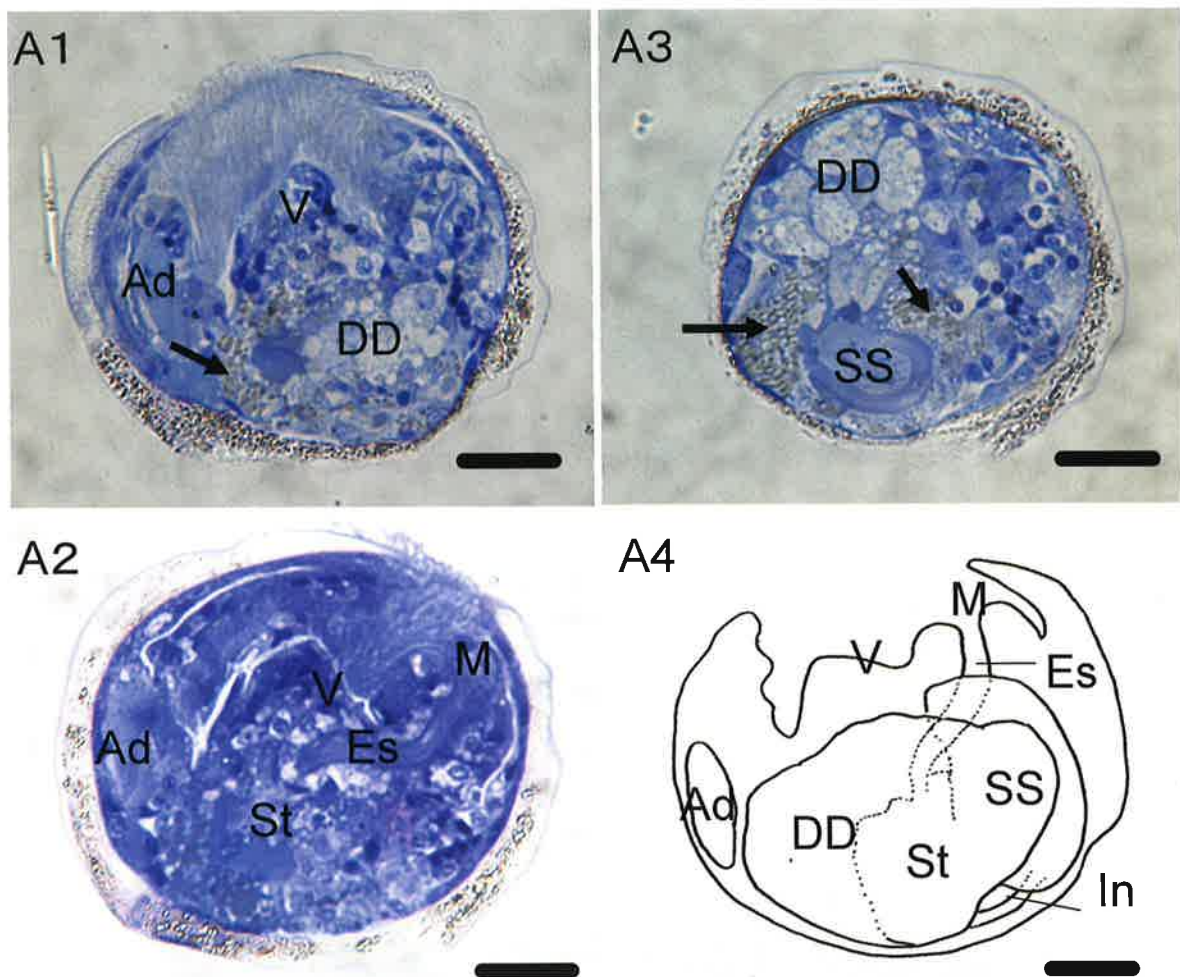


Fig. 22. An early umbo larva ( $120\ \mu\text{m}$  shell length) of the arkshell *Scapharca globosa urusus*. A1-3; Light micrographs of sections stained with toluidine blue. Lipid droplets (arrows) were seen. A1-3 were cut from the same individual. Scale bars =  $20\ \mu\text{m}$ . A4; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bar =  $20\ \mu\text{m}$ . Ad, adductor muscles. Other abbreviations are the same as in Fig. 20.

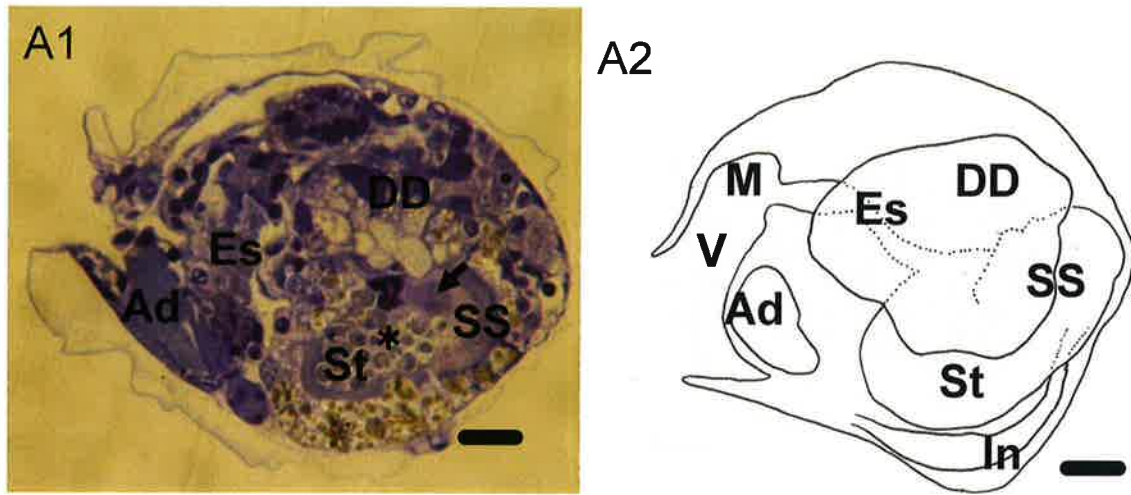


Fig. 23. An umbo larva (150  $\mu$  m shell length) of the arkshell *Scapharca globosa urusus*. A; A light micrograph of a section stained with toluidine blue (A1) and a schematic drawing (A2) showing the composition of digestive organs. Ingested microalgal cells (asterisk) were seen. An arrow indicates the crystalline style. Scale bars = 10  $\mu$  m. Abbreviations are the same as in Figs.22.

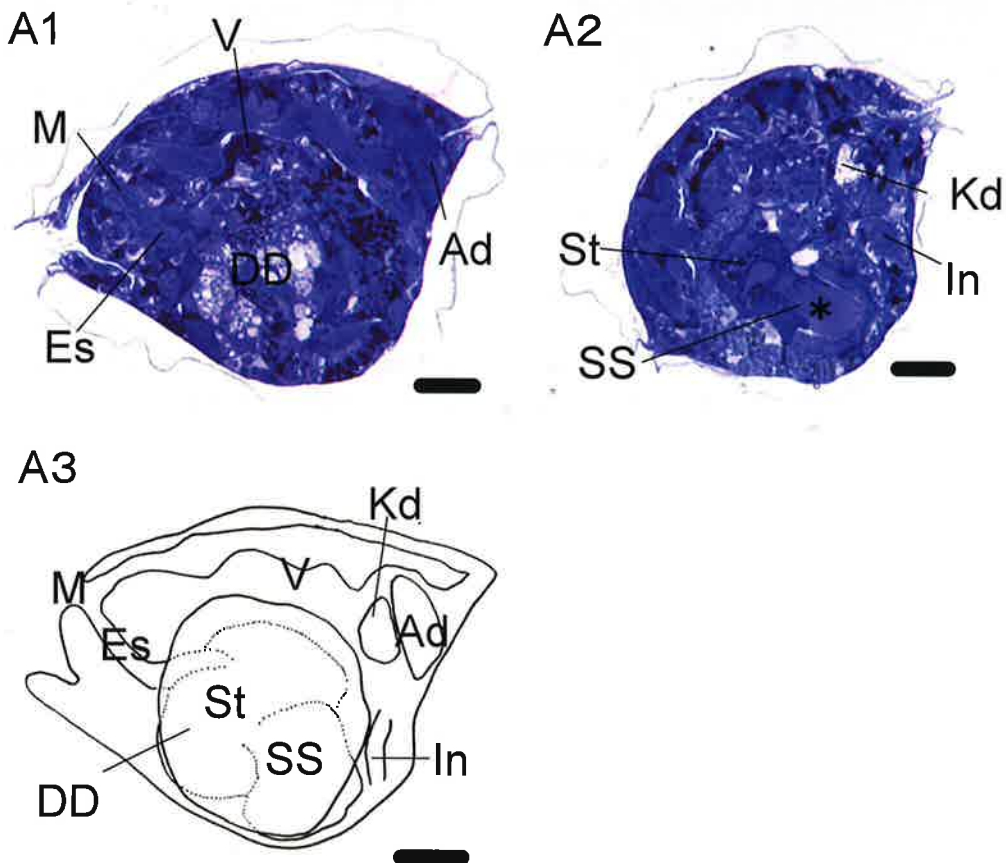


Fig. 24. An umbo larva (180  $\mu$  m shell length) of the arkshell *Scapharca globosa urusus*. A1,2 ; A light micrographs of sections stained with toluidine blue. A1 and A2 were cut from the same individual. A3 ; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Asterisk indicates the crystalline style. Scale bars = 20  $\mu$  m. Kd, kidney. Other abbreviations are the same as in Fig. 23.

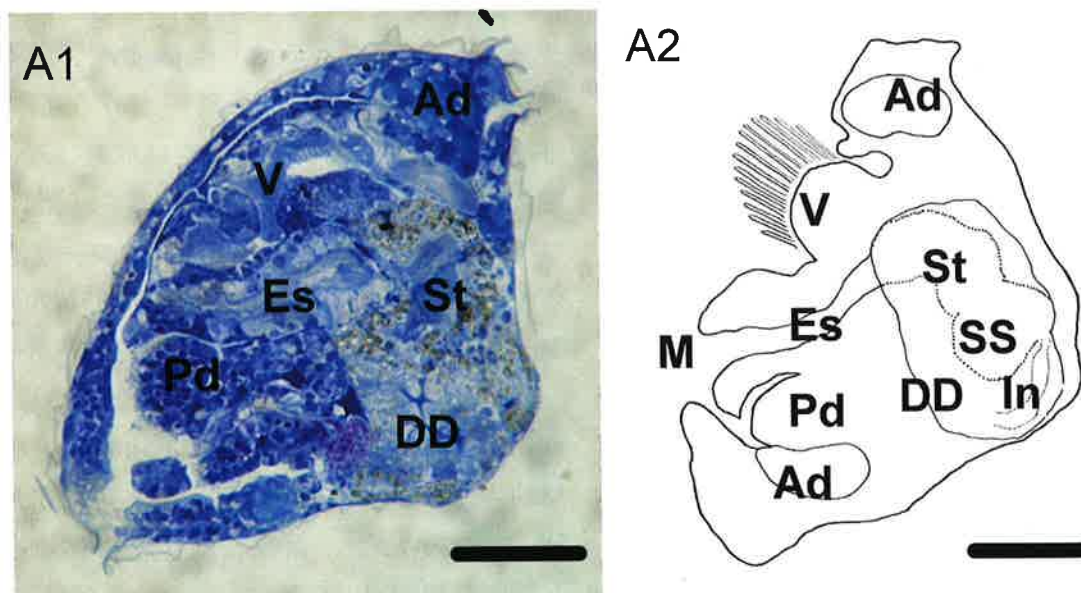


Fig.25. A full-grown larva (250  $\mu$  m shell length) of the ark shell *Scapharca globosa urusus*. A1; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A2 :A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars = 40  $\mu$  m. Pd; Pedal organ. Other abbreviations are the same as in Fig.24.

### (3) タイラギ (*Atrina pectinata*)

タイラギ *Atrina pectinata* は有明海および瀬戸内海を主産地とする大型二枚貝で、漁業上の重要資源であることから1960年代に種苗生産の試みが始まり (穂山・前川1963), 技術開発が鋭意続けられているが、浮遊幼生の飼育が非常に困難で (穂山・前川1963; 濱本・大林1984; 伊東義信ら1986; 松田ら1998, 1999; 大橋ら2004, 2005) 数十個体の稚貝が生産された成功例が過去に2例 (明楽1998; 川原ら2004) 報告されているに留まり、浮遊幼生から初期稚貝に至るまでの器官形成に関する知見は得られていない。そこで、本研究では後述する着底稚貝の生産に成功した飼育実験において各成長段階の浮遊幼生および初期稚貝を採材し消化器官を中心に器官形成に関する組織学的検討を行った。

## 材料と方法

### 浮遊幼生の飼育と採材

材料として、次章で述べる浮遊幼生および着底稚貝の飼育実験に用いた浮遊幼生および初期着底稚貝を供試した。

### 組織学的検討

供試試料は、氷冷下で2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド液 (0.1Mカコジル酸緩衝, pH7.4) で前固定し、10% EDTA溶液 (pH7.2) を用いて2日間常温で脱灰を行った後、1%四酸化オスミウム液 (0.1Mカコジル酸緩衝, pH7.4) で後固定を行った。固定試料は常法に従ってSpurrの樹脂に包埋し、厚さ1 $\mu$ mの光顕用切片と電顕用の超薄切片を作製した。光顕試料はトルイジン青で染色し、成長に伴う器官形成過程の観察を行った。超薄切片は酢酸ウラニル-クエン酸鉛で染色し、JEOL JEM-1010型電子顕微鏡を用いて各器官の微細構造の観察を行った。

## 結果

Fig.26に受精卵および孵化直後のトロコフォア幼生の組織像を示す。受精卵内には電子密度の異なる2種類の卵黄顆粒が存在していた (Fig.26:A1,A2)。この卵黄顆粒は卵割に伴い各細胞に分配され、水温25 $^{\circ}$ C、受精後約6時間でトロコフォア幼生が孵化した。トロコフォア幼生の体細胞には受精卵と同様の2種類の卵黄顆粒が存在していた (Fig.26 B)。トロコフォア幼生は水温25 $^{\circ}$ C、孵化後約24時間で幼殻を分泌してD型期幼生に変態した。日令1 (殻長100 $\mu$ m) のD型期幼生は、面盤および消化器官の原基が形成され (Fig.27:A1,A2), 面盤細胞を含む体組織のほとんどの細胞でトロコフォア幼生と同様に2種類の卵黄顆粒の存在が確認された (Fig.27 B)。胃腔には繊毛が確認されたが (Fig.27 C), 胃腔は小型で狭く胃内容物は確認できなかった。日令3では胃, 消化盲嚢, 桿晶体嚢, 腸管が形成され日令1で見られた卵黄顆粒は消失していた。日令5 (殻長120 $\mu$ m) の殻頂期幼生では、さらに胃, 桿晶体嚢, 消化盲嚢が発達していたが桿晶体は確認できなかった。また、胃上皮細胞および消化盲嚢上皮細胞内に脂肪滴の蓄積が確認された (Fig.28:A1,A2)。胃には胃内容物として外殻が除去された微細藻類が確認された (Fig.28 B)。日令10 (殻長150 $\mu$ m) では桿晶体の形成が確認され閉殻筋の存在が明瞭になった (Fig.29:A1,A2)。また、消化管上皮細胞への脂肪滴の蓄積はさらに進み、脂肪滴の蓄積が進んだ細胞はその内容のほとんどが脂肪滴で占められていた (Fig.29 B)。その後浮遊幼生の成長は速くなり、日令29 (殻長350 $\mu$ m) の殻頂期幼生では桿晶体嚢が殻頂部に発達し、消化盲嚢は他の消化管組織を覆うように発達した。また匍匐肢原基の隆起が確認されその後発達を続けた (Fig.30 :A1-A3)。閉殻筋周辺には腎組織の原基が出現した (Fig.30 B)。幼生の成長に伴って消化器官の形状の大きな変化は見られなかったが、いずれの器官も成長に伴い大型化し、特に消化盲嚢では脂肪滴の蓄積が著しく進んだ。着底期幼生 (日令35, 殻長500 $\mu$ m) では、面盤細胞の一部が脱落し、その部分に鰓および匍



匍肢が形成された。匍肢は内部に血洞が形成され、しばしば血球が集積しているのがみられた。匍肢基部には心臓の原基が形成がされていた (Fig.31)。着底初期稚貝 (日令35, 殻長0.7mm) では、面盤が完全に脱落し、形成された腔所に鰓弁が発達した。心臓は血管系を伴って発達した。消化器官では胃腔及び桿晶体囊が発達し、消化盲囊の体積は相対的に減少した (Fig.32)。

## 考察

タイラギ浮遊幼生は飼育が非常に困難であることから (濱本・大林,1984), 試料の採取が成立せず、成長に伴う器官の発達等については全く未解明であった。これまでの飼育事例ではD型期から殻頂期にかけて大量減耗が発生し、飼育の継続が困難になる事例が多く (穂山・前川,1963; 濱本・大林,1984; 伊東ら,1986; 松田ら1998,1999) 本種浮遊幼生に特徴的な浮上現象がその主要因とされてきた。今回の組織学的検討の結果、卵黄顆粒の構成はイワガキおよびクマサルボウと類似しており、D型期初期までの発生もほぼ同様の推移を示した。しかし、消化器官が機能するようになる日令2 (殻長100~105 $\mu\text{m}$ ) ではすでに卵黄顆粒が消失し、この点がイワガキやクマサルボウと大きく異なった。ただ、イワガキやクマサルボウガイではこのサイズに到達するまでに孵化後5日程度を要し、その間に卵黄顆粒が吸収され消失することから、タイラギでは成長速度が大きいために卵黄の吸収期間が他種より短くなると推察された。従って餌料由来の栄養と卵黄顆粒の両方を利用して成長と器官形成を進める期間は短いと考えられた。また栄養摂取はイワガキやクマサルボウガイと同様に、消化盲囊が発達するまでは胃上皮細胞からの吸収に大きく依存するものと考えられた。今回供試した浮遊幼生は初期餌料に卵磨砕物が添加されており、従来より高いD型期幼生の生残が得られたことは卵磨砕物の添加効果が現れたと考えられる。従ってこれまで浮上現象が主因と

されてきた大量減耗は、殻頂期への変態に必要な栄養の枯渇が関わっている可能性が推察された。特に本種は卵黄の消費が速く、このことは卵黄栄養の枯渇現象による障害が現れやすいのではないかと考えられる。ただ、供試した飼育群の殻頂期到達率は30%程度とクマサルボウガイに卵磨砕物を添加した事例の100% (大橋ら, 2007) に比較して低く、卵黄栄養の添加方法や卵黄栄養以外の栄養要求が関わっている可能性が示唆された。D型期以後の各消化器官の形成や発達が確認された殻長サイズはイワガキやクマサルボウとほぼ同じで、殻長120 $\mu\text{m}$ で殻頂部の膨出が始まり殻長150 $\mu\text{m}$ で桿晶体が形成された。また消化盲囊や胃腔の発達過程にも大きな差はみられず、脂肪滴の蓄積の推移も類似していた。しかし、タイラギの成長はイワガキやクマサルボウガイ幼生に比較して速く、着底サイズが殻長500 $\mu\text{m}$ 以上と大型であるにもかかわらず消化器官に特徴が見られないことは、速やかな成長を支える適正な餌料環境が本種飼育には特に重要であると考えられた。また着底後に相対的に消化盲囊の体積が減少し匍肢や鰓の形成が進むことは、それまでに餌料由来の栄養を蓄積して形成した脂肪滴がエネルギーとして利用されている可能性がある。これまで着底稚貝までの飼育が非常に困難とされてきたのは、他種に比較して速やかに成長しなければならない浮遊幼生に十分な栄養を供給できる餌料環境を確立・維持できなかったことが大きな要因であろう。今後は栄養要求や蓄積される脂肪滴の役割についてさらに検討を進めることが、浮遊幼生の飼育技術の確立に必要であると考えられる。

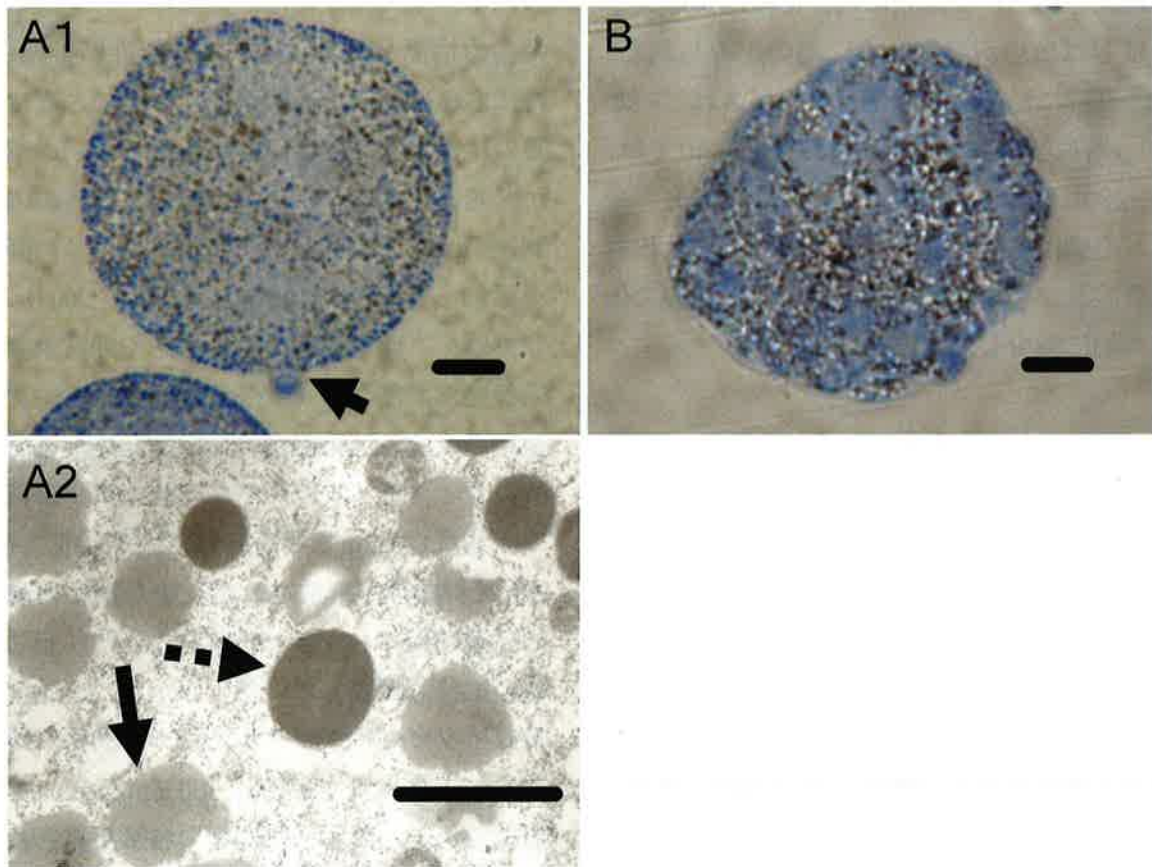


Fig. 26 . Light and transmission electron micrographs of fertilized egg and trochophore-larva of the pen shell *Atrina pectinata* .A1 ; A section of fertilized egg , stained with toluidine blue. Polar body was seen (arrow) . Scale bar = 10  $\mu$  m. A2 ; A transmission electron micrograph of fertilized egg. Two types of yolk granules of lower (arrow) or moderate (dotted arrow) electron density in an undifferentiated cell. Scale bar = 1  $\mu$  m. B ; A section of trochophore-larva stained with toluidine blue. Scale bar = 10  $\mu$  m.

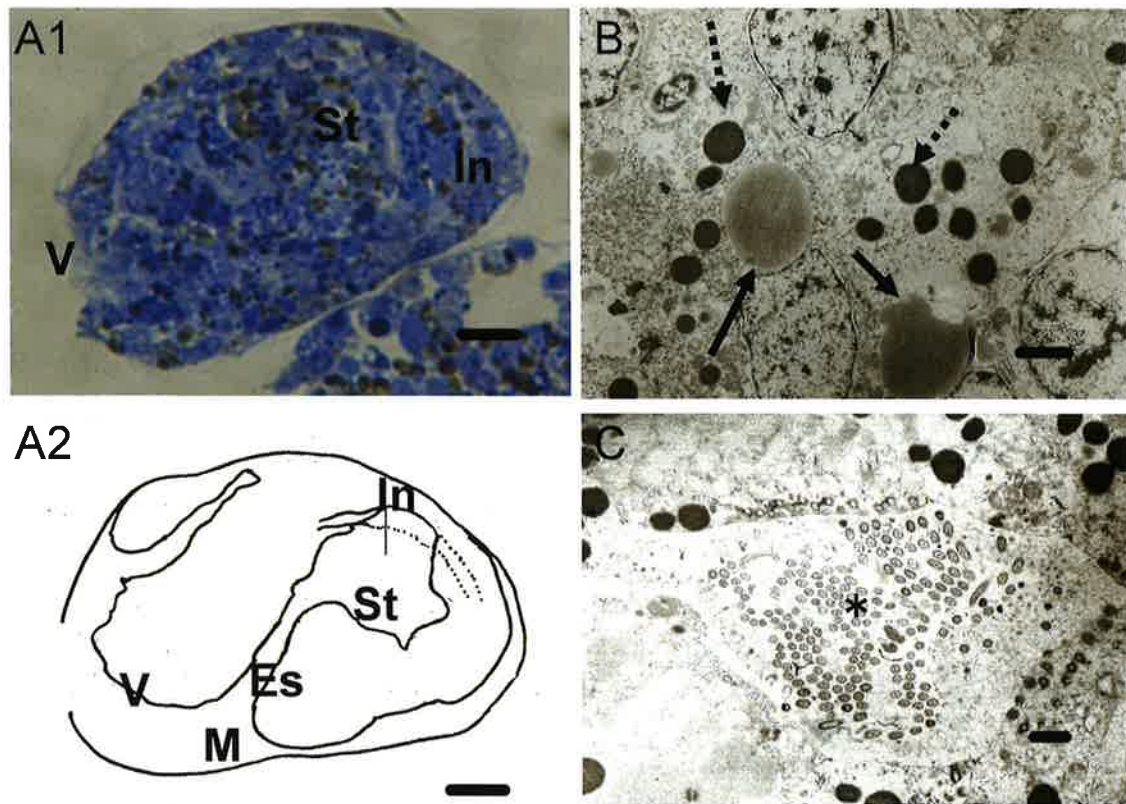


Fig.27. A D-shaped larva(1 day post-hatch) of the pen shell *Atrina pectinata* .  
A1; A light micrograph of a section stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars =10  $\mu$  m. B; A transmission electron micrograph showing two types of yolk granules with lower (arrow) or moderate (dotted arrow) electron density in an undifferentiated cell. Scale bar = 1  $\mu$  m. C; A transmission electron micrograph showing the primitive stomach. Numerous cilia were seen in the lumen (asterisk). Scale bar = 1  $\mu$  m. Es, esophagus ; In, Intestine ; M, mouth ; St, stomach; V, velum.

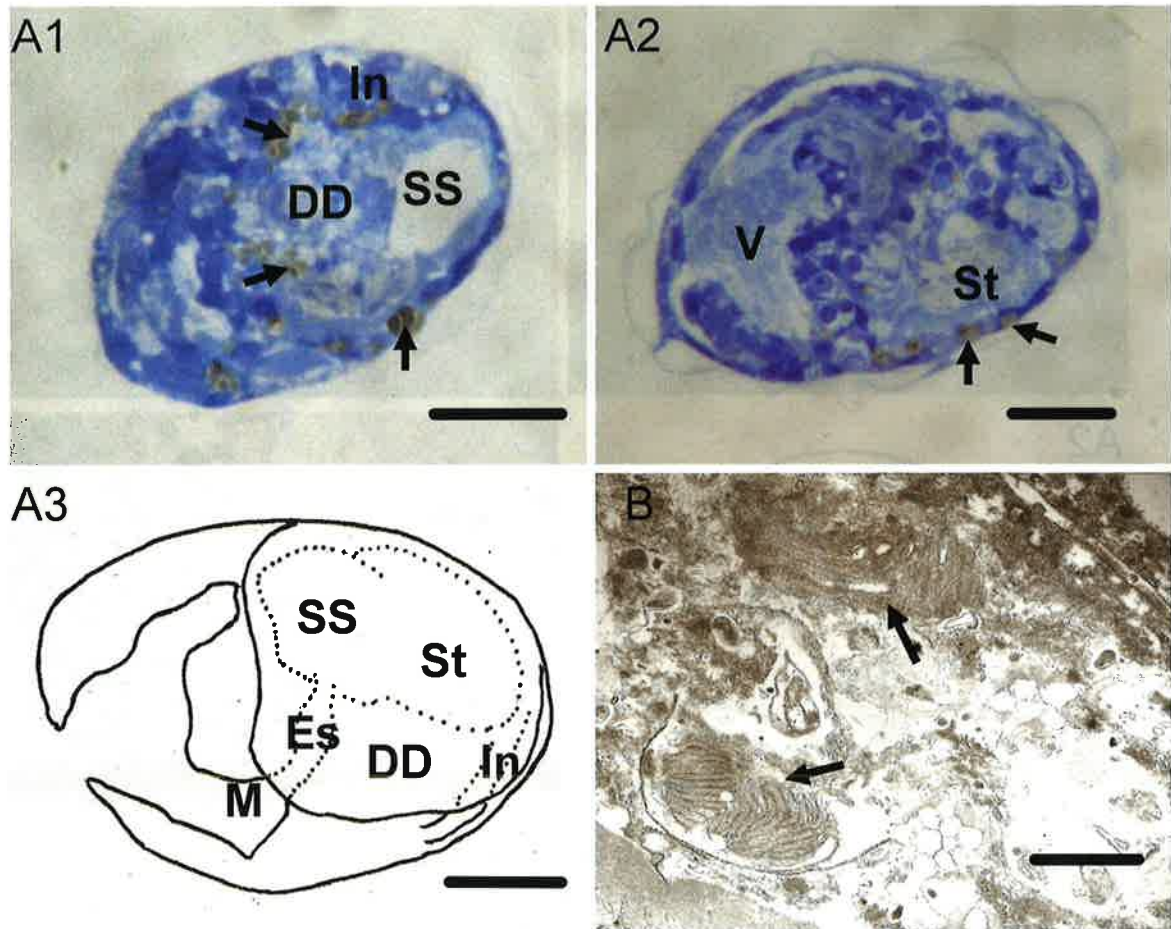


Fig. 28. A D-shaped larva (5 days post-hatch) of the pen shell *Atrina pectinata* . A1,2; A light micrographs of section stained with toluidine blue. A1 and A2 were cut from the same individual. Epithelial cells of stomach and digestive diverticula containing lipid droplets (arrows) were seen. A3; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars = 10  $\mu$  m. B; A transmission electron micrograph of stomach. Debris of ingested microalgal cells (arrows) were seen in the gastric lumen. Scale bar = 1  $\mu$  m. DD, digestive diverticula; SS, style sac. Others are the same as in Fig. 27.

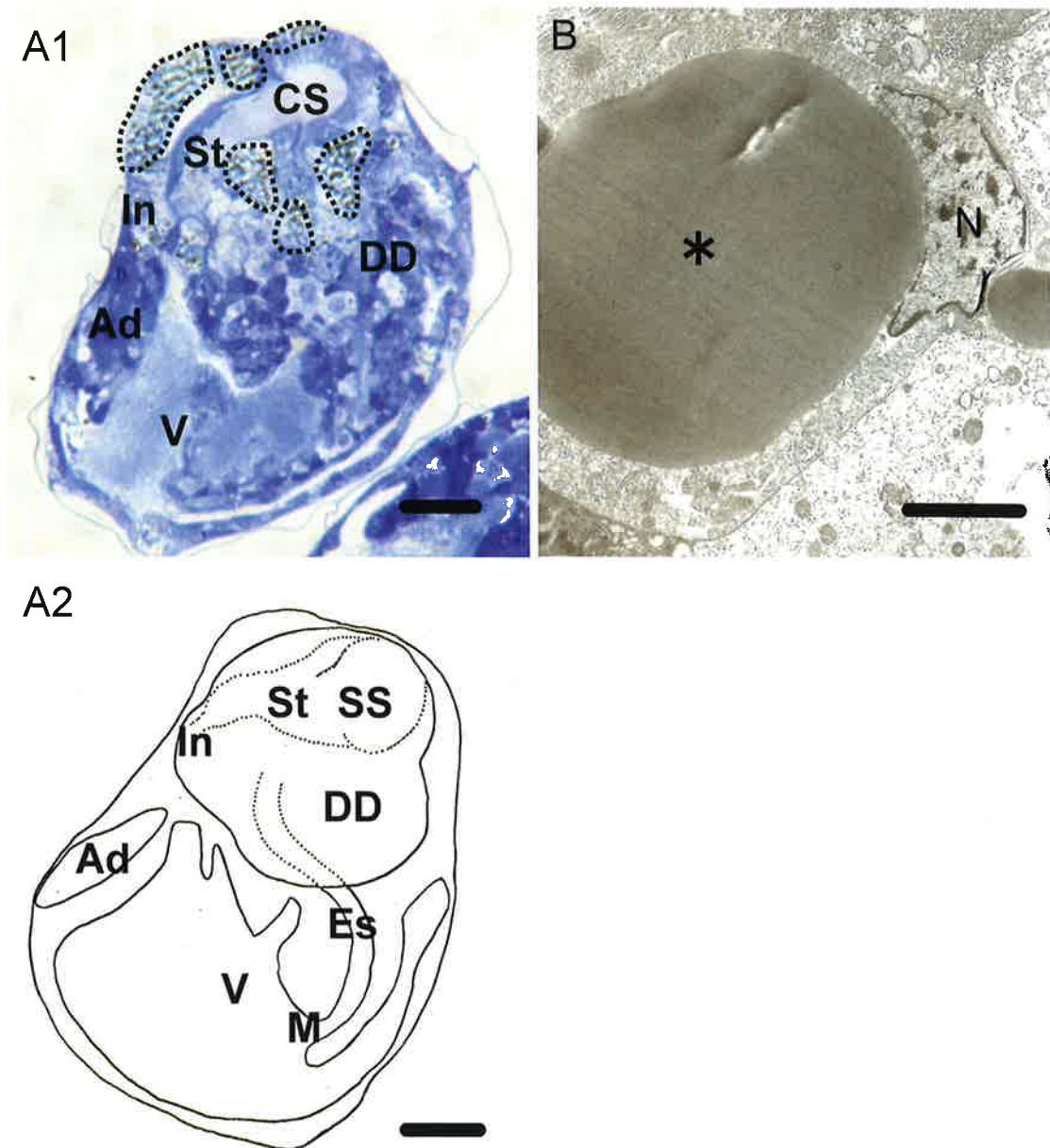


Fig.29. An umbo larva (10 days post-hatch) of the pen shell *Atrina pectinata*. A1; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. The crystalline style (CS) in the style sac and accumulation of lipid droplets in the epithelial cells of the stomach and digestive diverticula (areas enclosed in dotted lines) were seen. Scale bars = 20  $\mu$  m. B; Transmission electron micrographs of a stomach epithelial cell filled with lipid droplet (asterisk). N, nucleus. Scale bar = 2  $\mu$  m. Ad; adductor muscles. Other abbreviations are the same as in Fig. 28.

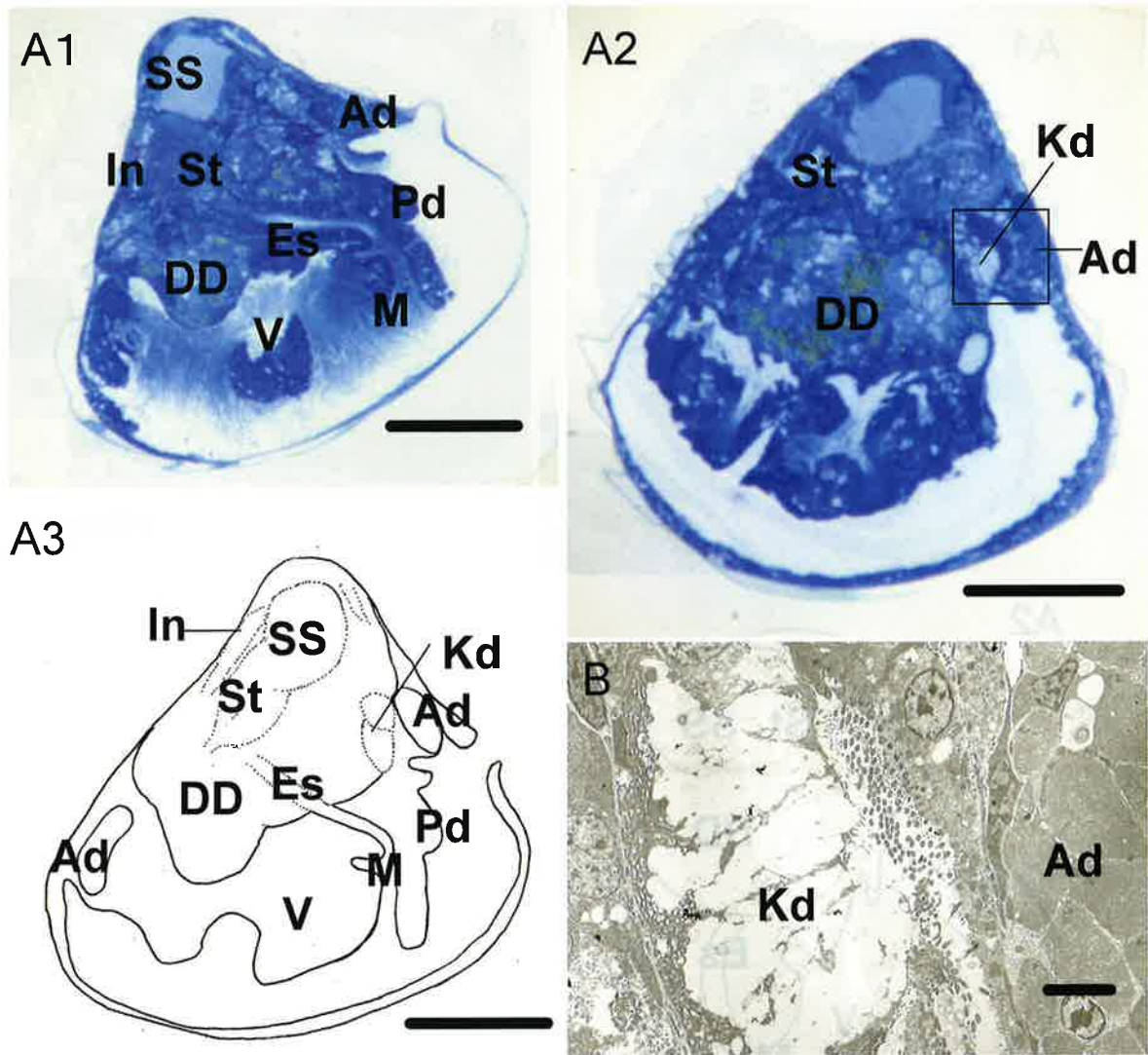


Fig.30. An umbo larva (29 days post-hatch) of the pen shell *Atrina pectinata*. A1,2; Light micrographs of sections stained with toluidine blue. A1 and A2 were cut from the same individual. Open square Indicates the electron micrograph area. A3; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars =100  $\mu$  m. B; A transmission electron micrograph of the primitive kidney. Scale bar = 2  $\mu$  m. Kd, kidney; Pd, pedal organ. Other abbreviations are the same as in Fig. 29.

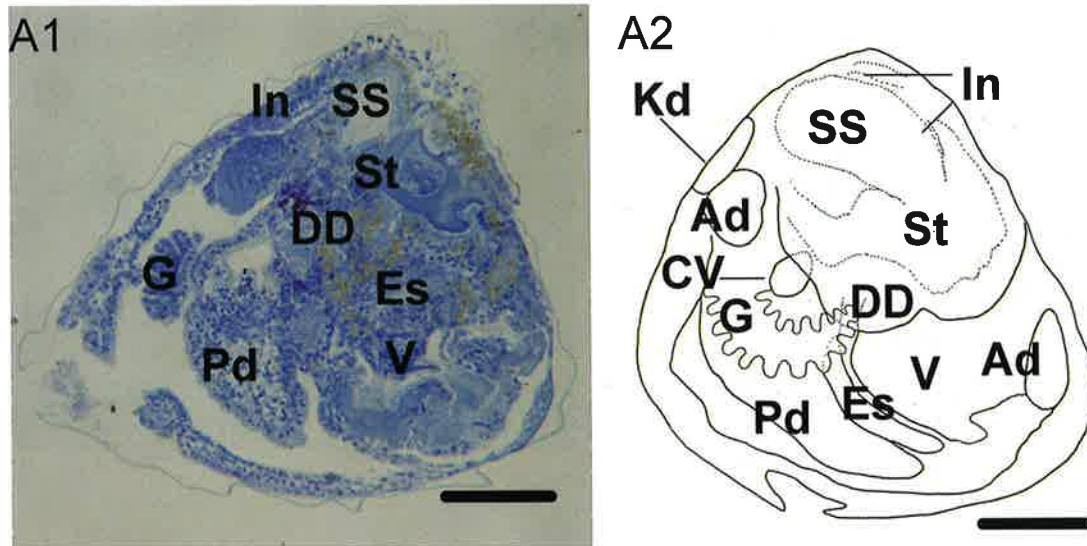


Fig.31. A pedveliger larva (35 days post-hatch) of the pen shell *Atrina pectinata*. A1; A light micrograph of a section stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bar =100  $\mu$  m. CV, cardiac vesicle; G, gill. Other abbreviations are the same as in Fig. 30.

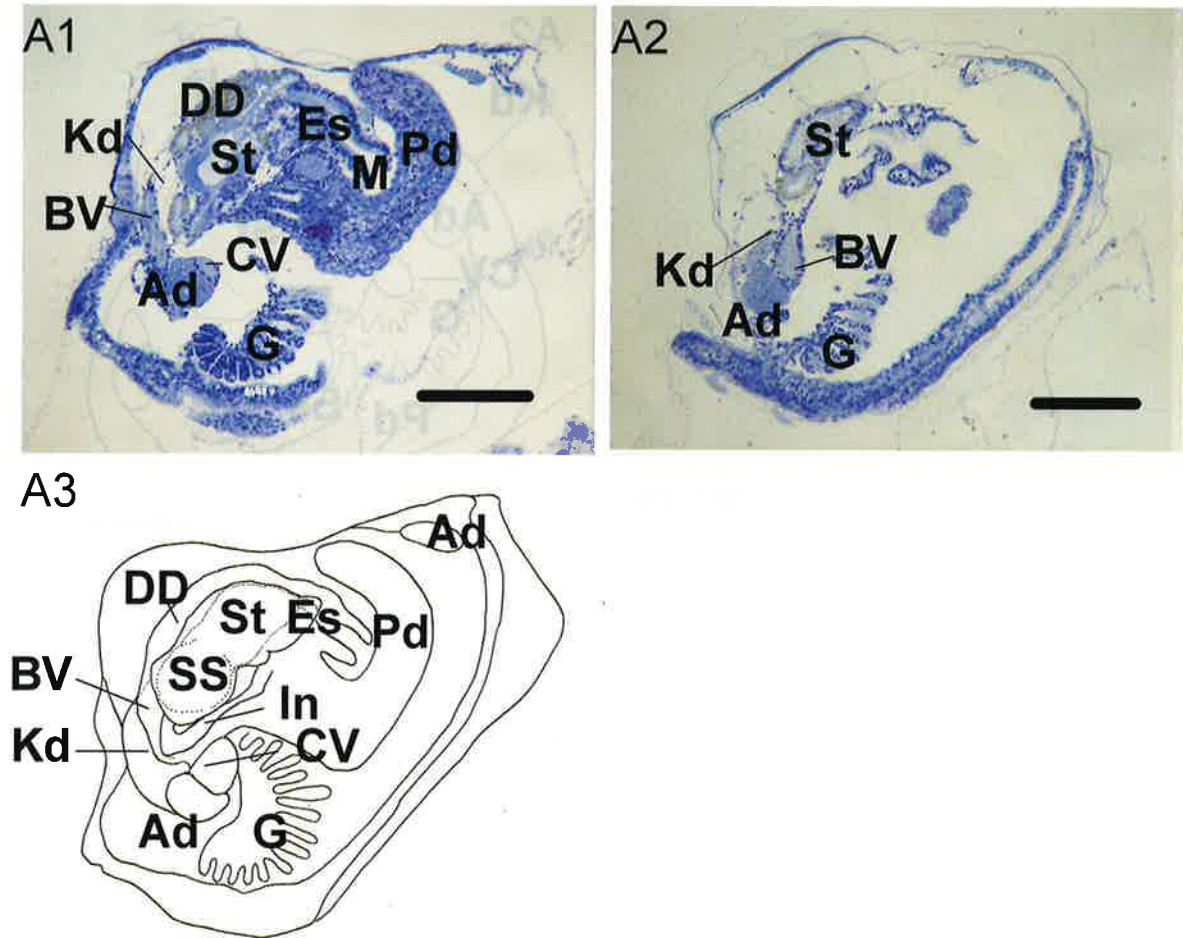


Fig.32. An early juvenile (35 day post-hatch) of the pen shell *Atrina pectinata*. A1,2; Light micrographs of sections stained with toluidine blue. A1 and A2 cut from the same individual. A3; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bar =100  $\mu$  m. BV, blood vessel. Other abbreviations are the same as in Figs. 31.



#### (4) トリガイ (*Fulvia mutica*)

トリガイ *Fulvia mutica* は、陸奥湾～朝鮮半島に分布する殻長100mm程度になる有用二枚貝である。水深10m前後の砂泥底に生息し、成長が早く1年で商品サイズとなる殻長80mm程度になるため増養殖対象種として有望であるが漁獲変動が大きく、種苗生産された稚貝を用いる海面養殖での安定生産の試みが進められている(岩尾ら, 1991, 1995, 1998; 岩尾・藤原, 2000)。トリガイは高水温に弱く減耗する要因として指摘され(野上ら, 1981) 稚貝の中間育成や親貝の収穫期が課題とされているが、浮遊幼生期にもしばしば大量斃死が発生し、長崎県で行った種苗生産実験結果では生産成績は必ずしも安定せず、種苗の安定供給に課題が残っている(大橋ら, 2006, 2007)。本種の浮遊幼生期の大量減耗の要因としては細菌感染(藤原ら, 1993)があげられるが、この報告は環境水中の細菌の増加と斃死の進行について検討したものであり、幼生への感染の確認や感染部位の特定等を行われていない。これは、他の貝類と同様にトリガイ浮遊幼生期の器官形成過程や発達の特徴については明らかされていないため、本種浮遊幼生に生起する内的要因と環境要因が整理できないためと考えられる。そこで、浮遊幼生を組織学的に観察し、消化器官を中心に器官形成過程とその特徴について明らかにすることを試みた。

## 材料と方法

### 浮遊幼生の飼育と採材

試料は2006年6月10日に産卵誘発法で得た受精卵から孵化した浮遊幼生を用いた。親貝は同年3月に長崎県北松浦郡福島町地先で漁獲され、長崎県総合水産試験場の3t水槽内で *Pavlova lutheri* と *Chaetoceros calcitrans* あるいは *P. lutheri* と *C. gracilis* のを給餌して飼育したものをを用いた。飼育水は、オープニング1 $\mu$ mの濾材で濾過した25°Cの調温海水を用い、1～2日毎に浮遊幼生の状態を見ながら全量あるいは2/3量を換水した。餌料藻類は *Chaetoceros calcitrans* と *Pavlova lutheri* を用いた。

*C. calcitrans* は田崎真珠(株)製の濃縮市販品(約 $5 \times 10^8$  cells/ml)を購入し、1週間以内に使用した。*P. lutheri* は市販の液体培地(KW21, 宝製網, 熊本)を用いて照度3000lx, 気温20°Cの恒温室内で5～7日培養し、細胞密度が $6 \sim 9 \times 10^6$  cells/mlに達したものを使用した。また、特開2006-271208「二枚貝成熟卵を原料とする二枚貝浮遊幼生飼料である二枚貝成熟卵磨砕物の精製法」(大橋2006b)に準じて調製したマガキ卵磨砕物を日令10まで添加した。飼育水中の餌料密度は成長に応じて増加し、*C. calcitrans* は $5 \sim 10 \times 10^3$  cells/ml, *P. lutheri* は $3 \sim 10 \times 10^3$  cells/mlの範囲とした。浮遊幼生の殻長は着底までの15日間毎日30個体をオープニング20 $\mu$ mのネットで飼育槽から無作為に採取して測定した。

### 組織学的検討

組織学的検討に用いた供試個体は、2日毎に日令12まで殻頂測定と同様の方法で飼育槽から採取し、着底直後の稚貝は日令15で採取した。試料は氷冷下で2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド液(0.1Mカコジル酸緩衝, pH7.4)で前固定を行い、10% EDTA溶液で脱灰した後、1%四酸化オスミウム液で後固定を行った。固定試料はエタノール系列で脱水し常法に従ってSupprの樹脂に包埋した後厚さ1 $\mu$ mの光顕用切片と電顕用の超薄切片を作製した。光顕試料はトルイジン青で染色し、成長に伴う器官形成過程の観察を行った。超薄片は酢酸ウラニル-クエン酸鉛で染色し、JEOL JEM-1010型電子顕微鏡を用いて、各器官の微細構造の観察を行った。

## 結果

### 浮遊幼生の飼育

採材した浮遊幼生の平均殻長の変化をFig.33に示す。浮遊幼生は日令12で着底期幼生が出現し、日令15で平均殻長 $296 \pm 38.1 \mu$ mに達し着底した。この間大量減耗等は観察されなかった。

### 外部形態

外部形態の推移をFig.34に示す。トロコフォア幼生は日令1で孵化した後、形態を変化させながら幼殻を分泌し (Fig.34 A), 水温25°C, 約24時間で殻長90 $\mu\text{m}$ のD型期幼生に変態した (Fig.34 B)。D型期幼生は日令4までに殻長110 $\mu\text{m}$ に達し (Fig.34C), 日令5, 殻長120 $\mu\text{m}$ に達すると殻頂部の膨出が始まり殻頂期幼生に変態した (Fig.34 D)。初期の殻頂期幼生は楕円形を呈していたが (Fig.34 E), 殻長200 $\mu\text{m}$ 前後からは殻頂部の隆起が進んだ。その後は殻頂部の隆起と縁辺部の伸張が続く, 殻長250 $\mu\text{m}$ を超えると着底期幼生となって (Fig.34 F) 殻長280 $\mu\text{m}$ 前後で着底稚貝に変態した (Fig.34 G)。

### 組織学的検討

D型期幼生に変態する直前のトロコフォア幼生 (日令2) は, 原口の陥入は確認されたが消化管原基は未発達で, 体組織全体にトルイジン青に染色されない直系1~3 $\mu\text{m}$ の卵黄顆粒の点在が確認された。(Fig.35) 日令2のD型期幼生 (殻長90 $\mu\text{m}$ ) では面盤が発達し, 口, 食道および胃腔の形成が確認されたが桿晶体囊は確認できなかった。消化盲囊は胃から膨出した組織として確認されたが消化空胞は見られなかった。また胃腔は未発達で胃内容物はみられなかった (Fig.36:A1-A3)。体の各所に存在する未分化の細胞には卵黄顆粒が存在していた。卵黄顆粒は電子密度のやや低い種類のものが確認された (Fig.35 B)。日令4 (殻長約110 $\mu\text{m}$ ) のD型期幼生では胃, 桿晶体, 桿晶体囊, 消化盲囊および腸管の形成が確認された (Fig.37:A1-A3)。胃には内容物が確認され, 胃上皮細胞には脂肪滴の蓄積が確認された (Fig.37 B)。ただ, イワガキ, クマサルボウガイおよびタイラギと異なり餌料藻類の細胞体は確認できなかった。胃上皮細胞および消化盲囊細胞にみられた脂肪滴は他種と比較すると染色性が異なり, トルイジン青で緑がかかった色調に染色された。卵黄顆粒は日令4まで確認された。桿晶体は胃腔の大部分を占めよく発達していた (Fig.37 C)。日令6 (殻長120 $\mu\text{m}$ ) の殻頂期初期幼生では桿晶体がさらに発達した。消化

盲囊は桿晶体を含む胃腔に比較すると発達がやや小型であった。胃上皮細胞および消化盲囊上皮細胞への脂肪滴の蓄積は進んだが, やや大型の顆粒が点在する形態を示し, イワガキ, クマサルボウガイおよびタイラギのように小型顆粒を多数蓄積する形態の細胞はみられなかった (Fig.38:A1,A2)。この傾向は着底期まで続き, 脂肪滴顆粒は成長に伴い大型化した。日令8 (殻長170 $\mu\text{m}$ ) では消化盲囊と桿晶体囊の発達が続き (Fig.38 :B1,B2), 日令10 (殻長220 $\mu\text{m}$ ) では桿晶体囊は消化盲囊に次ぐ大きさの器官となった。また, 閉殻筋周辺に腎組織が形成された (Fig.39)。日令12 (殻長250 $\mu\text{m}$ ) では面盤の一部が脱落して鰓組織の形成が確認され着底期幼生となった。匍匐肢が発達し, 匍匐肢内部には血洞の形成と血球の集積がみられ, 閉殻筋および匍匐肢基底部に腎組織と心囊の原基が形成されていた (Fig.40)。日令15の着底初期稚貝 (殻長280 $\mu\text{m}$ ) では着底・変態に伴い面盤が完全に脱落し, 腔所に鰓組織がよく発達していた。また閉殻筋に沿って心臓および血管系の形成がみられた。消化盲囊は相対的に体積が減少し, 桿晶体囊の発達が著しかった (Fig.41)。

### 考察

トリガイ浮遊幼生はイワガキやクマサルボウガイに比較すると成長が速く, 着底までの日数も短い。またD型期から殻頂期への移行時に大量減耗する事例も報告がなく, 前述した3種類とは異なる特徴を有すると考えられた。今回の組織学的観察では日令2 (殻長90 $\mu\text{m}$ ) までは消化器官は機能せず, 卵黄栄養を利用して器官形成を進めると考えられた。日令4 (殻長110 $\mu\text{m}$ ) のD型期幼生で胃, 桿晶体囊, および消化盲囊等の消化器官を形成するだけでなく桿晶体がすでに形成されており, この点が上記3種と大きく異なっていた。卵黄の吸収はタイラギと同様に速く日令4では消失したが, 早い段階で消化酵素を供給する桿晶体が機能することは餌料の消化をより効率的にしていると考えられた。このことはその後の成長を促

進する大きな要因であると考えられ、D型期から殻頂期への移行期に他種に見られない殻長の伸びを示すのもこのためかと考えられた。この消化能力に支えられて卵黄吸収後の栄養障害等が発生し難いものと推測され、卵磨砕物の添加は必要ないと考えられた。また殻頂期以後もトリガイ幼生では桿晶体の発達が著しく進み、一方で消化盲嚢の発達は殻頂期後期まで比較的緩やかであった。従ってトリガイの消化機構の特性は桿晶体が発達することによる高い消化能力に求めることができ、消化盲嚢による細胞内消化が占める割合が相対的に低いことにあると考えられた。すなわち桿晶体を早期に形成し発達させることによって獲得される高い消化能力は、本種に特徴的な速い成長と短期間での着底・変態を可能にしていると考えられる。蓄積される脂肪滴もイワガキ、クマサル

ボウガイおよびタイラギの3種と異なる染色性を示し、化学的に異なる成分を含有すると考えられた。一方で消化能力が高く成長が速いことは体内の代謝速度も早いと考えられ、水温や飼育環境による影響を受けやすいと考えられた。長崎県総合水産試験場で発生したトリガイ浮遊幼生の大量斃死は殻長サイズ等に依存する傾向は見られず、突然発生した後翌日には細菌の増殖が進んだ瀕死個体が出現することが病理組織学的に確認され、イワガキ浮遊幼生クマサルボウガイの大量斃死と様相が異なっている。今後は本種の成長特性を考慮して飼育管理や斃死要因の解明を進める必要があると考えられた。

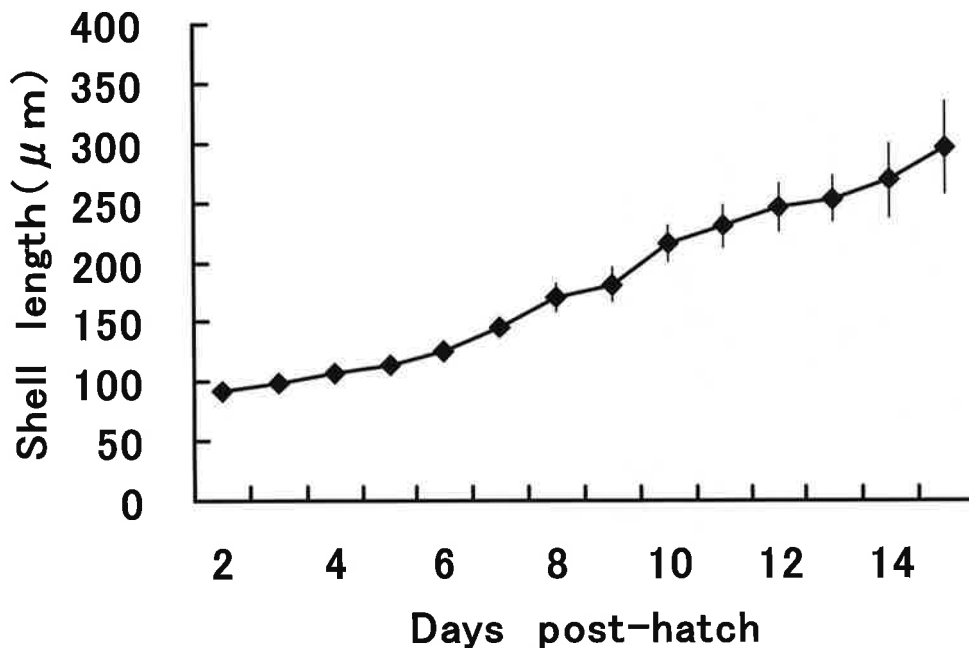


Fig.33. Change in average shell length of the larvae of the Japanese egg cockle *Fulvia mutica* (mean±SD).

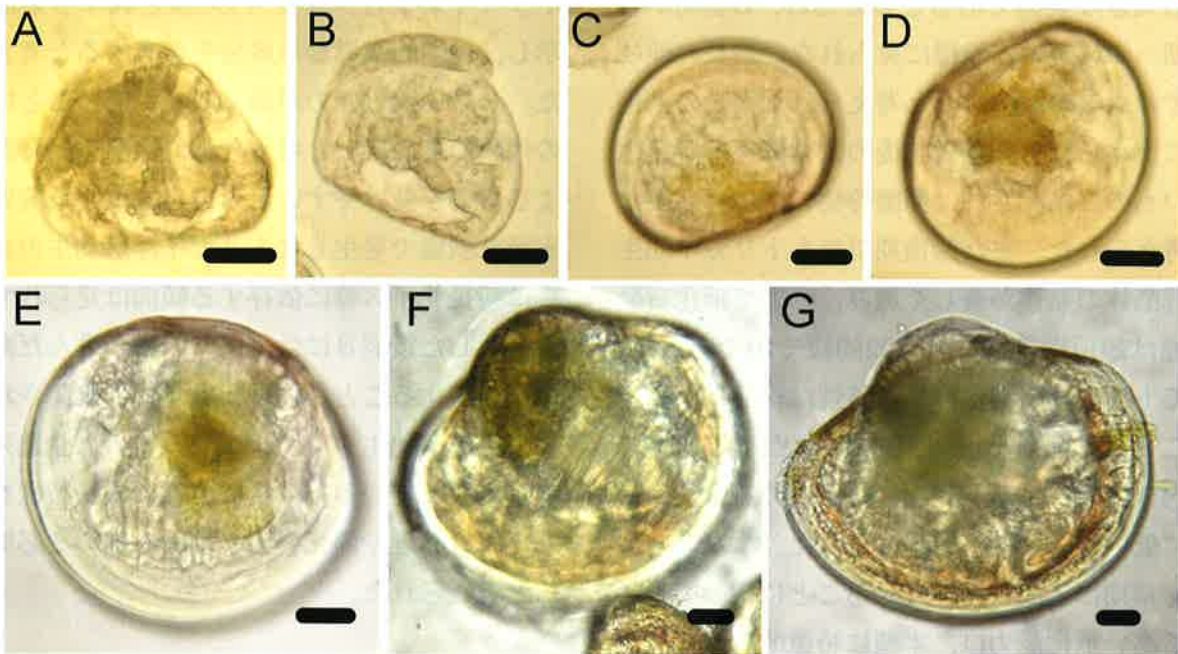


Fig. 34. Light micrographs showing the different developmental stages of the Japanese egg cockle *Fulvia mutica*. A-C; D-shaped larvae. D,E; Umbo-stage larvae. F; A settlement-stage larva. G; A newly settled juvenile. Scale bars=20  $\mu$  m.

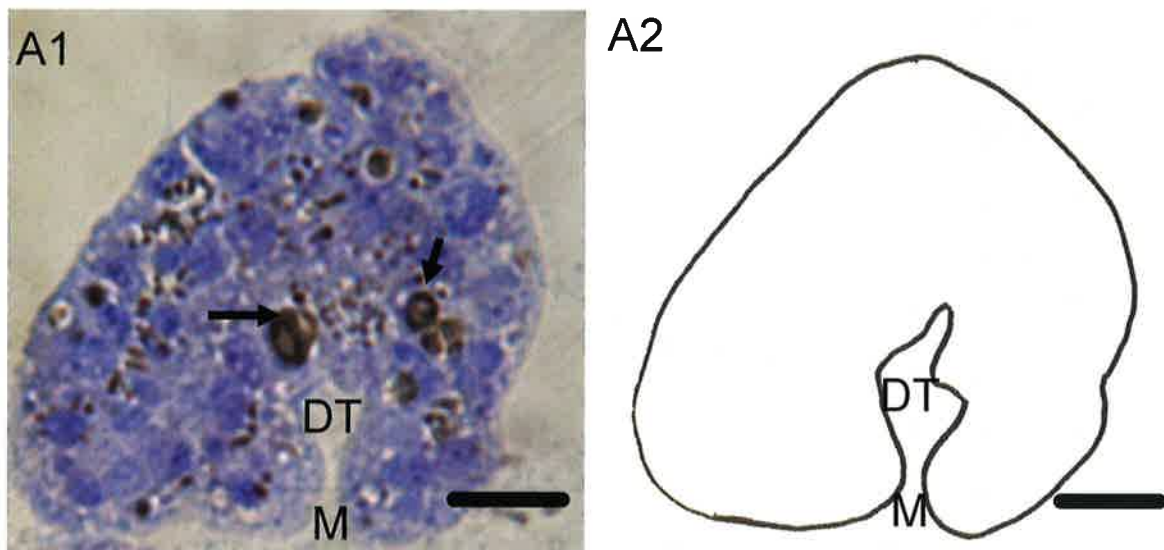


Fig. 35. A trochophore-larva of the Japanese egg cockle *Fulvia mutica*. A1; A light micrograph of a section stained with toluidine blue. Yolk granules (arrows) in an undifferentiated cells were seen. A2; A schematic drawing showing the primitive digestive tract (DT). Scale bars =10  $\mu$  m. M, mouth.

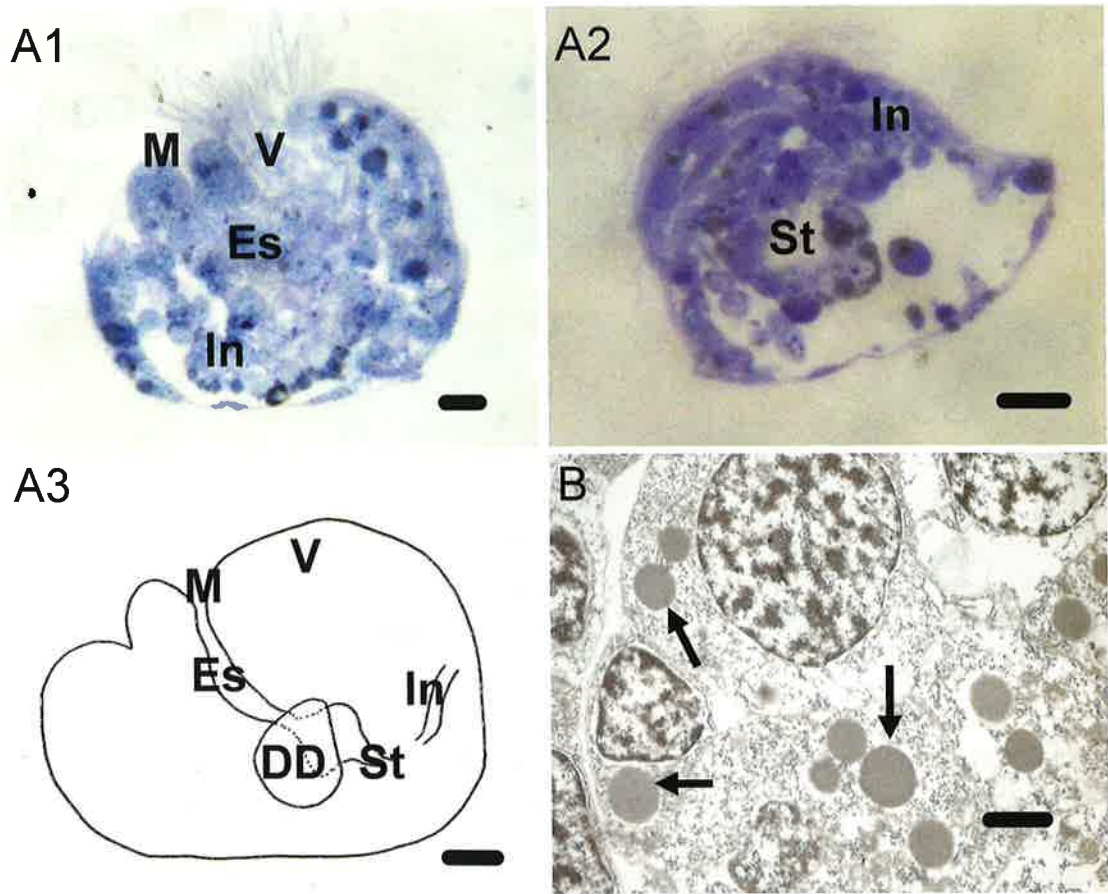


Fig. 36. A D-shaped larva (2 days post-hatch) of the Japanese egg cockle *Fulvia mutica*. A1,2; A light micrograph of section stained with toluidine blue. A3; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bar =  $10\ \mu\text{m}$ . B; A transmission electron micrograph showing yolk granules with moderate (arrows) electron density in an undifferentiated cell. Scale Bar =  $1\ \mu\text{m}$ . DD, digestive diverticula; Es, esophagus; In, Intestine; M, mouth; SS, style Sac; St, stomach; V, velum.

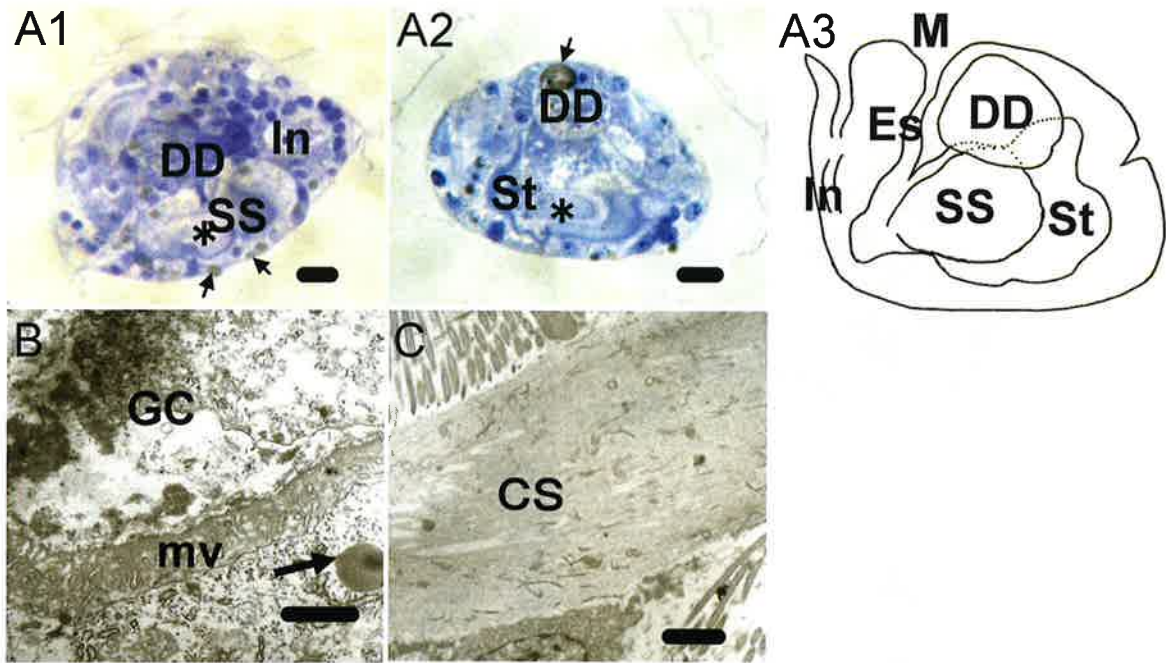


Fig. 37. A D-shaped larva (4 days post-hatch) of the Japanese egg cockle *Fulvia mutica*. A1,2; Light micrographs of sections stained with toluidine blue. A3: A schematic drawing showing the composition of digestive organs. The crystalline style (asterisks) in the style sac and lipid droplets (arrows) in the epithelial cells of the stomach and digestive diverticula were seen. Scale bars =  $10 \mu\text{m}$ . B; A transmission electron micrograph of stomach. Gastric contents (GC), microvilli (mv) and a lipid droplet in the epithelial cells (arrow) were seen. Scale bar =  $1 \mu\text{m}$ . C; A transmission electron micrograph showing the crystalline style (CS). Scale bar =  $1 \mu\text{m}$ . Abbreviations are the same as in Fig.36.

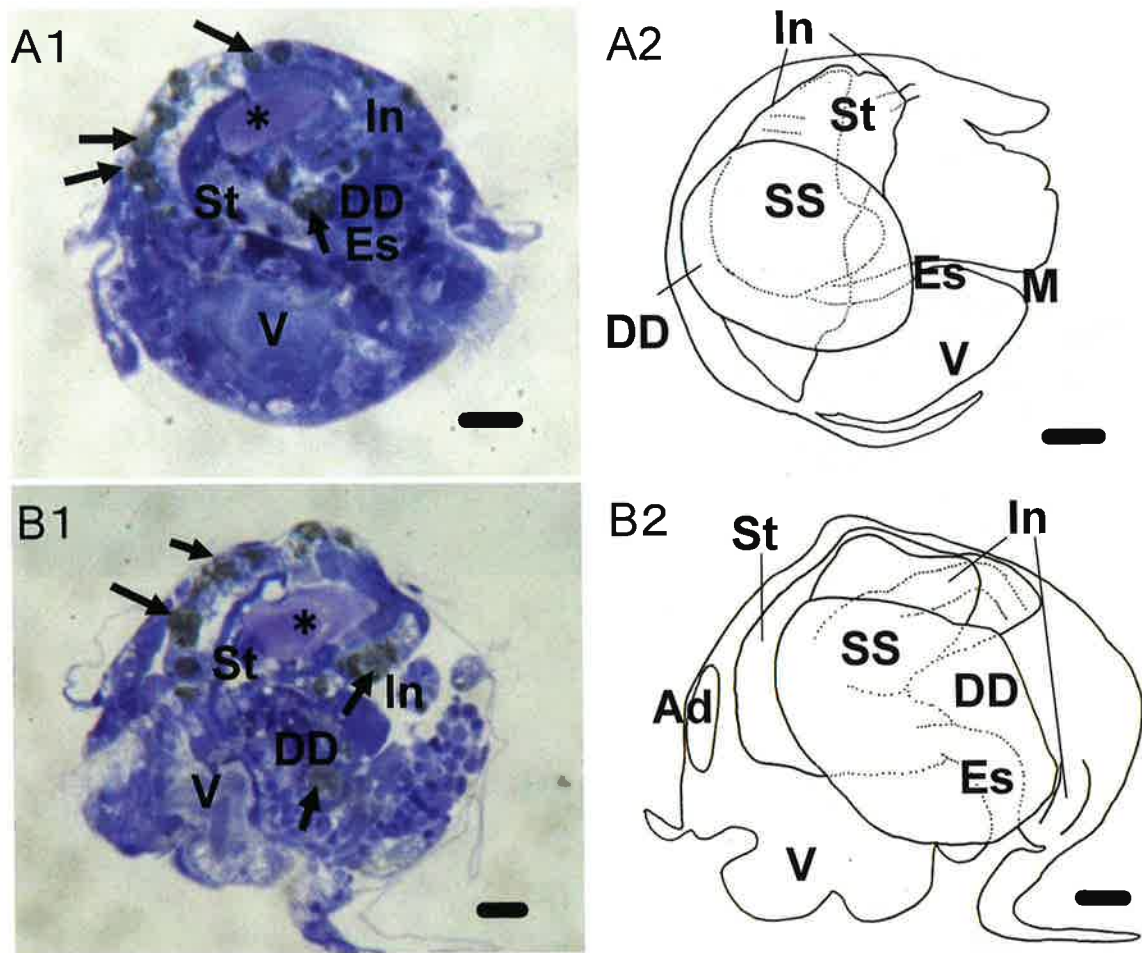


Fig. 38. Umbo larvae of the Japanese egg cockle *Fulvia mutica*. A1; A light micrograph of a section of an umbo stage larva (6 days post-hatch) stained with toluidine blue. A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. B1; A light micrograph of a section of an umbo stage larva (8 days post-hatch) stained with toluidine blue. B2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. Scale bars = 10  $\mu$  m. The crystalline style (asterisk) in the style sac and lipid droplets (arrows) in the epithelial cells of the stomach and digestive diverticula were seen. Ad, adductor muscles. Other abbreviations are the same as in Fig. 37.

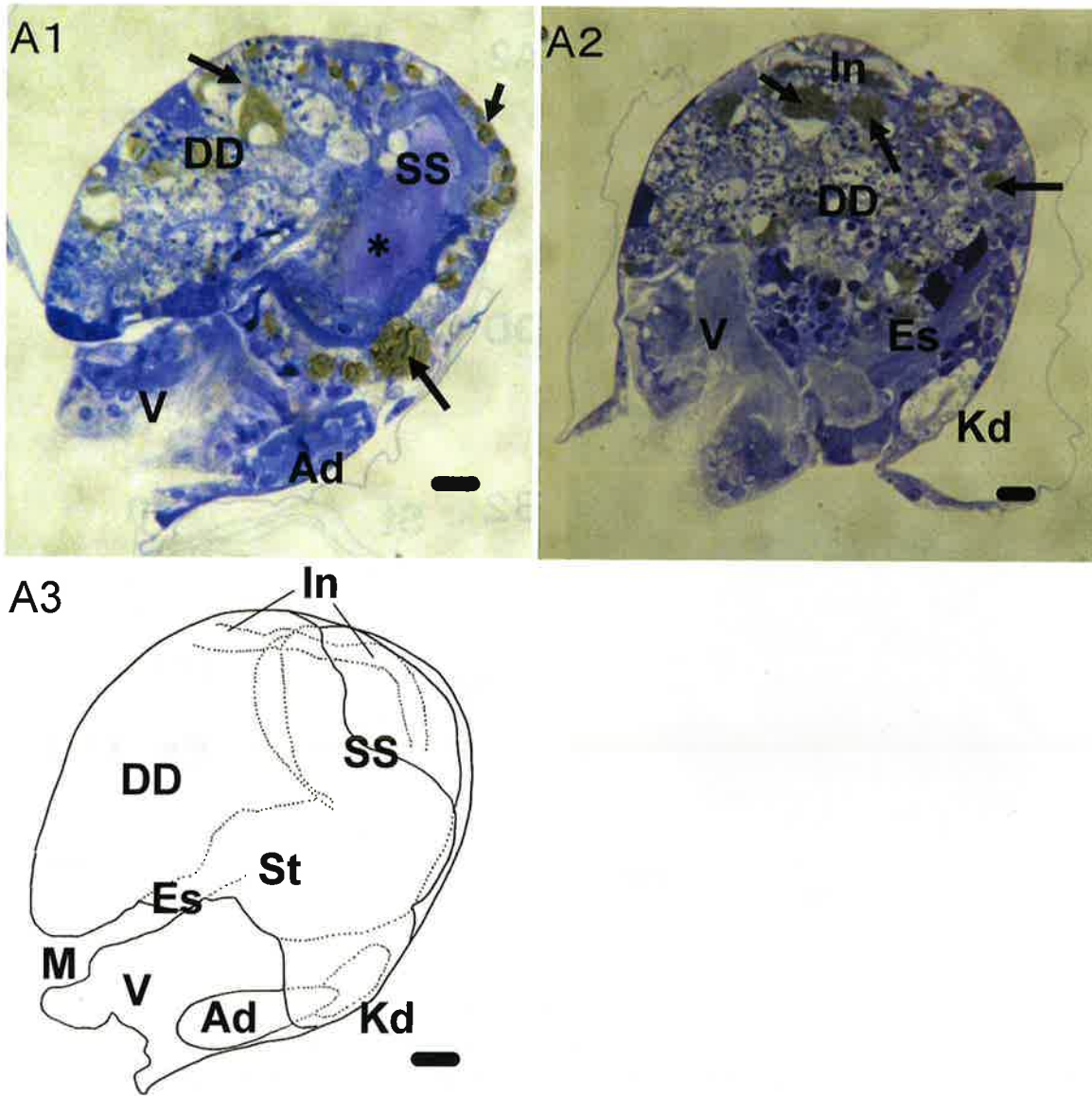


Fig.39. Umbo larvae (10 days post-hatch) of the Japanese egg cockle *Fulvia mutica*. A1,2; Light micrographs of sections stained with toluidine blue. A1 and A2 cut from the same individual. A3; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. The crystalline style (asterisk) in the style sac and lipid droplets (arrows) in the epithelial cells of the stomach and digestive diverticula were seen. Scale bars = 10  $\mu$  m. Kd, kidney. Other Abbreviations are the same as in Fig. 38.



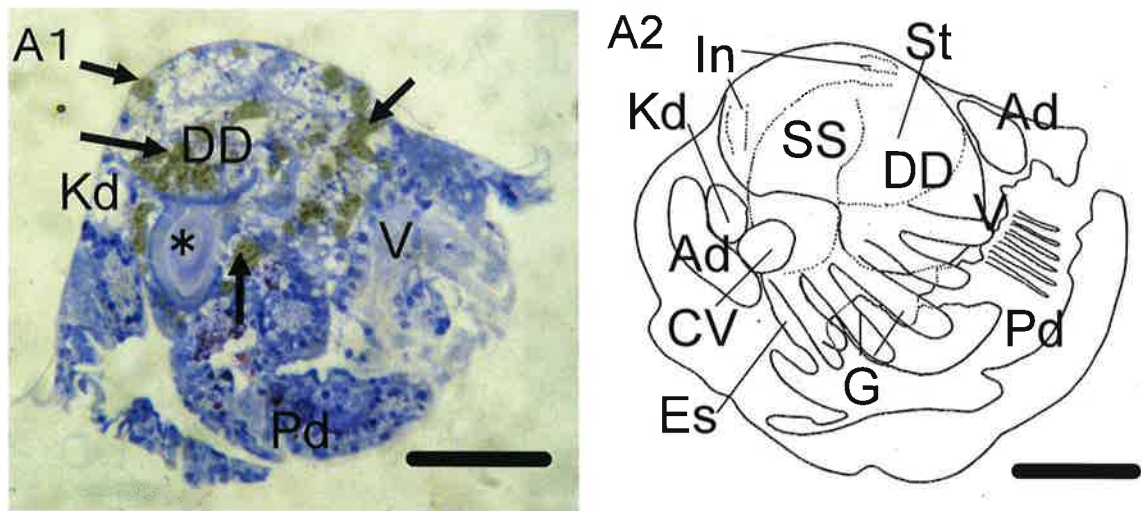


Fig.40. A pedvelger larva (12 days post-hatch) of the Japanese egg cockle *Fulvia mutica*. A1; A light micrograph of a section stained with toluidine blue A2; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. The crystalline style (astersk) in the style sac and lipid droplets (arrows) in the epithelial cells of the stomach and digestive diverticula were seen. Scale bar = 50  $\mu$  m. CV, cardiac vesicle; G, gill; Pd, pedal organ. Other Abbreviations are the same as in Fig. 39.

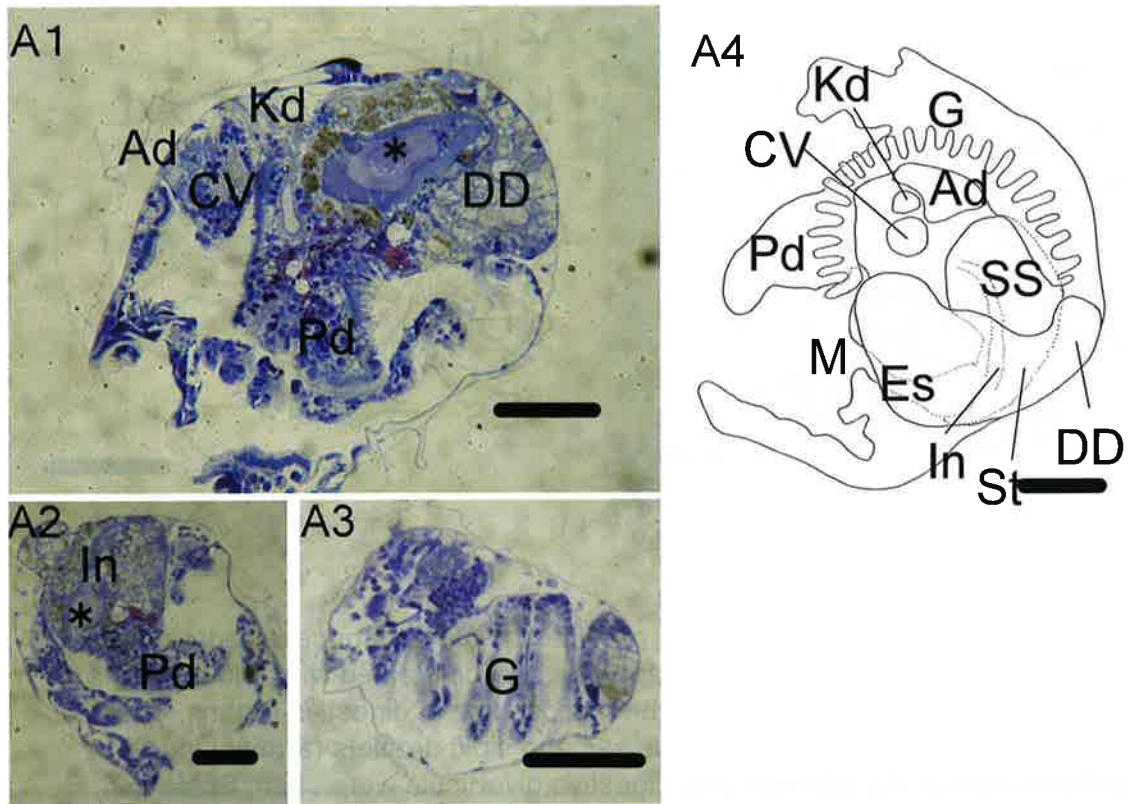


Fig. 41. A early juvenile (15 days post-hatch) of the Japanese egg cockle *Fulvia mutica*. A1-3; Light micrographs of sections stained with toluidine blue. A1-A3 were cut from the same individual. A4; A schematic drawing showing the composition of digestive organs. The crystalline style (asterisk) in the style sac and lipid droplets (arrows) in the epithelial cells of the stomach and digestive diverticula are seen. Scale bars =50  $\mu$  m. Abbreviations are the same as in Fig. 40.

## 第2章 組織学的知見の種苗生産への応用

### (1) クマサルボウガイ幼生に対する2種の微細藻類 *Chaetoceros calcitrans* および *Pavlova lutheri* の餌料効果の検証

長崎県では、有明海の特産有用種であるクマサルボウガイ *Scapharca globosa ursus* の種苗生産に2000年度から取り組んできたが、D型期幼生から殻頂期幼生への移行過程で成長停滞あるいは大量斃死の事例が観察され、種苗生産が安定しないことが課題となった（森ら2000, 2001；大橋ら2002）。佐賀県や山口県で行われたクマサルボウガイの種苗生産に関する報告では、いずれも *Pavlova lutheri* の単独給餌で良好な成績を上げている（異儀田ら, 1977；高見ら, 1981）。しかし長崎県では *P. lutheri* の単独給餌では生産ができず、*Chaetoceros gracillis* を併用する方法を採用しても十分な効果を得られなかった。*Chaetoceros* 属には、他に *C. gracillis*（長径6~8 $\mu\text{m}$ ）より藻体のサイズがやや小型の *C. calcitrans*（長径3~5 $\mu\text{m}$ ）が存在し、初期浮遊幼生の餌料として推奨されている（押尾ら1995）。そこで *C. calcitrans* をによる飼育成績の改善を試みるために、クマサルボウガイD型期幼生に対する *C. calcitrans* と *P. lutheri* の餌料効果の検討を行った。

### 材料と方法

供試したクマサルボウガイ浮遊期幼生は、2002年7月2日に孵化したD型期幼生（日令1, 平均殻長91.1 $\pm$ 3.4 $\mu\text{m}$ ）を用いた。親貝は諫早市小長井町地先で2001年に漁獲され、長崎県総合水産試験場地先の筏で垂下飼育されていた親貝37個体を用い、松田らの方法（松田・藤井, 2000）で受精卵を得た。飼育実験は2002年7月3日から開始し、*C. calcitrans* 給餌区（以下カリステランス区）、*P. lutheri* 給餌区（以下パブロバ区）、および無給餌区を設定した。飼育装置には200lポリカーボネイト水槽3槽を用い、実験水槽は25 $^{\circ}\text{C}$ の恒温水槽内に収容して飼育水温を維持した。浮遊幼生の密度は

0.5~0.85個体/mlとした。給餌は *C. calcitrans* は8 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/ml/day, *P. lutheri* は2 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/ml/dayとし、飼育水の交換は1回目は日令5で、以降は3日毎に浮遊幼生をオープニング20 $\mu\text{m}$ のネットで受けて全量を交換した。飼育期間は無給餌区が17日間、その他の区は21日間とした。浮遊幼生は2日毎に無作為に30個体を採集して殻長を測定するとともに、殻長の範囲によってD型期（殻長90~120 $\mu\text{m}$ 未満）、初期殻頂期（殻長120~150 $\mu\text{m}$ 未満）、後期殻頂期（殻長150 $\mu\text{m}$ 以上）の3段階に分け、各々の成長段階の幼生が出現する割合を求めた。また、実験終了時に実験水槽内のすべての浮遊幼生と斃死個体を取り上げ、生残個体と斃死個体の割合から実験終了時の生残率を求めた。

### 結果

各実験区の平均殻長の推移をFig.42に示す。カリステランス区では、日令8で殻長120 $\mu\text{m}$ に達した初期殻頂期幼生が確認され、日令12までの平均殻長は最も良かった。しかしその後は成長の停滞と大量斃死が発生した。実験終了時の生残率は7.7%であり、生残個体に占める殻長150 $\mu\text{m}$ の後期殻頂期幼生は6.6%であった。パブロバ区では日令7で初期殻頂期幼生に達した幼生が確認されたが、日令12までの平均殻長はカリステランス区に劣った。しかし日令13から18まではカリステランス区と変わらず19以降は成長が上回った。また日令15以降は殻長150 $\mu\text{m}$ を超える後期殻頂期幼生が増加した。実験終了時の生残率は59.3%であり、生残個体に占める殻長150 $\mu\text{m}$ の後期殻頂期幼生は17.2%で最大で殻長200 $\mu\text{m}$ の浮遊幼生が確認された。無給餌区では殻長105 $\mu\text{m}$ 以上に成長せず、日令17でほとんどが斃死したため実験を中止した。無給餌区の生残率は0.07%で殻頂期幼生は出現しなかった。次に各実験区毎における各成長段階の出現率の推移をTable1に示す。カリステランス区では日令11にはすべての幼生が初期殻頂期幼生に達したが、後期殻頂期に達した幼生は0.5%であった。パブロバ区では日令15に83.9%の

幼生が初期殻頂期幼生に達し、後期殻頂期幼生も徐々に増加して実験終了時に後期殻頂期に達した幼生は10.2%であった。しかし実験終了までD型期の幼生が存在し、その出現率は最低でも12.9%を占めた。無給餌区では初期殻頂期幼生に成長する個体は見られなかった。

## 考察

実験区別の成長を見ると、カリステランス区は殻長150 $\mu\text{m}$ 未満の初期殻頂期までは成長差も少なく良好な成長を示したが、後期殻頂期幼生に達したのは実験開始時の0.5%であった。一方パプロバ区は初期殻頂期の出現率ではカリステランス区に劣ったが、後期殻頂期幼生に達した浮遊幼生は実験開始時の10.2%であった。また生残率も3区の中で最も高かった。このことから*C. calcitrans*はD型期までの餌料として良好であると考えられた。また*P. lutheri*はD型期以降に餌料としての利用が価値が増すものと考えられた。D型期幼生は胃上皮細胞を主な栄養吸収の場としているが、桿晶体が未発達なD型期は餌料の消化能力が低く、摂餌した餌料の質が栄養吸収に大きく関与すると推察された。長径3 $\mu\text{m}$ 程度の*C. calcitrans*は餌料藻類としては小型であり、D型期幼生の餌料としては摂餌の容易さなどを含めて有効であったと考えられた。しかし、殻頂期幼生に成長した後は餌料価値が十分ではなく、その後の成長の停滞と大量減耗を引き起こしたと考えられた。*P. lutheri*はD型期幼生の餌料としてはやや大型で消化しにくかったと考えられた。しかし、細胞内消化を行い胃上皮細胞よりも高い消化・吸収能力を持つと考えられる消化盲嚢上皮細胞の発達によって餌料としての有効性が高くなりその後の成長を支えたと考えられた。ただ、成長にばらつきが見られたことから、初期殻頂期幼生に成長できなかった浮遊幼生は*P. lutheri*を有効に利用できず成長が停滞したのと考えられた。また、無給餌区の浮遊幼生は殻長100 $\mu\text{m}$ で成長が停滞し大量減耗が発生した。実験終了時の最大殻長は105 $\mu\text{m}$ であったこ

とから、これがクマサルボウガイ浮遊幼生が卵黄栄養によって成長できる上限殻長と考えられた。

*Pavlova lutheri*の単独給餌で良好な成績を上げている事例（異儀田ら,1977；高見ら,1981）においては着底が飼育開始から20日以内に確認されているが、今回の実験では最大殻長は200 $\mu\text{m}$ に留まり着底期幼生は出現しなかった。長崎県では飼育成績を向上させることを目的として今回供試した2種の餌料藻類を混合して給餌する飼育方法をアカガイの種苗生産に用い良好な結果を得ている（宮木ら, 1999）。クマサルボウガイでも一定の種苗生産結果を得ているが（森ら, 2000）アカガイに比較するとクマサルボウガイの生産は成績が非常に不安定であった。2種の餌料藻類を混合する方法は、初期の浮遊幼生が比較的摂餌しやすいサイズの小型の餌料藻類を用い、2種の餌料藻類が双方の欠点を補完したことが奏効した結果と考えられるが、今回の実験の結果は成長・生残率ともに十分な結果とは言えず、これらの餌料藻類を用いた給餌飼育の改良のみではクマサルボウガイ種苗生産に発生する問題は解決されないと考えられた。二枚貝浮遊幼生の餌料としては、他に*Isochrysis galbana*（長径5~8 $\mu\text{m}$ ）等があるが、初期浮遊幼生の餌料としては推奨されていない（押尾ら1995）。D型期幼生では消化吸收の主体は胃であるため、細胞内消化を行わない胃上皮細胞で吸収可能な餌料が必要であり、初期浮遊幼生の成長と生残に大きな影響を与えると推察される。組織学的観察においても、*P. lutheri*は細胞膜が破壊されない状態のものが浮遊幼生の胃内容物としてしばしば観察されることから、初期幼生にとっては必ずしも消化・吸収しやすい餌料ではないと考えられる。従って*P. lutheri*の単独給餌で良好な結果を得た事例（異儀田ら,1977；高見ら,1981）では胃内容物の状況を観察していないため、飼育に用いた*P. lutheri*が今回の実験で用いたものと比較はできないものの、単独で餌料として有効であったとは考えにくく、他に環境水中に存在するバクテリア等の関与も疑うべきであろう。今後は消化器官の発達をさらに考慮して、微細藻類のみに餌

料を限定せず新たな餌料の検討を進めることが重要であると考えられた。

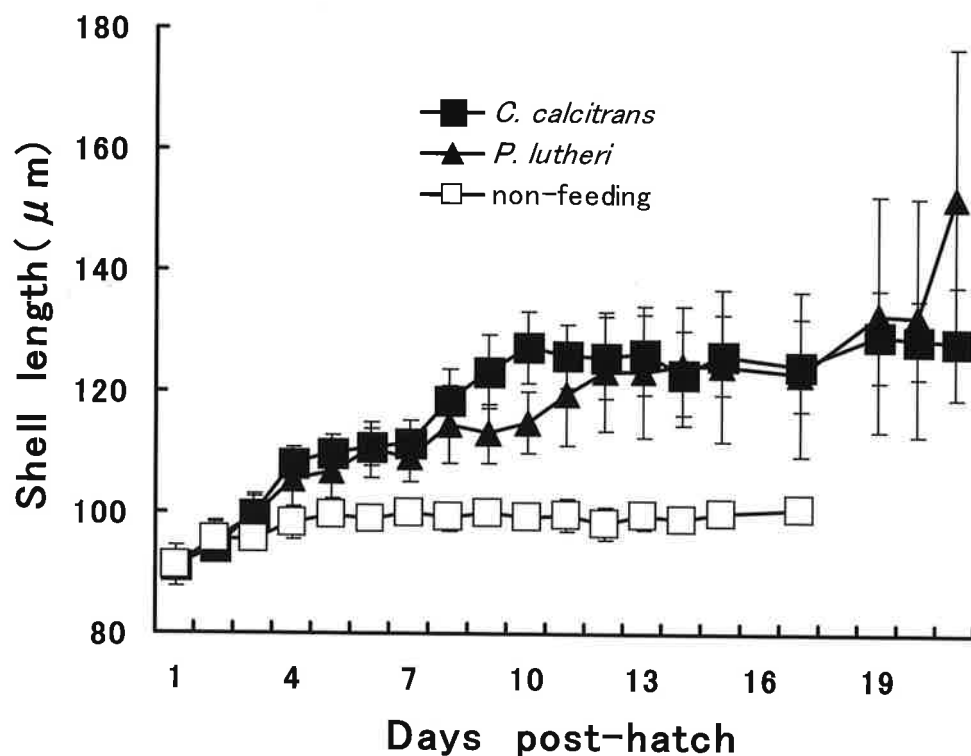


Fig. 42. Change in average shell length of the larvae of the ark shell *Scapharca globosa urusus* under different feeding conditions (mean  $\pm$  SD).

Table 1 Changes in the frequency of three larval stages under different feeding conditions (%)

Feeding conditions	larval stage	Days post-hatch										
		1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
<i>Chaetceros. Calcitrans</i>	D-larva	100	100	100	93.8	16.7	0	6.7	6.7	16.7	3.3	3.4
	Early Umbo larva	0	0	0	6.2	83.3	100	93.3	93.3	83.3	96.7	96.6
	late Umbo larva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pavlova. lutheri</i>	D-larva	100	100	100	96.6	60	70	36.7	12.9	38.7	14.5	17.3
	Early Umbo larva	0	0	0	3.4	40	30	63.7	83.9	54.8	65.5	65.5
	late Umbo larva	0	0	0	0	0	0	0	3.2	6.5	20	17.2
non-feeding	D-larva	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
	Early Umbo larva	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	late Umbo larva	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

## (2) クマサルボウガイ浮遊幼生の成長、生残に対するマガキ卵磨砕物の添加効果

有明海の特産有用種であるクマサルボウガイ *Scapharca globosa ursus* の種苗生産では、D型期幼生から殻頂期幼生への移行過程で成長停滞あるいは大量斃死の事例が観察されている（森ら2000, 2001；大橋ら2002）。そこで、浮遊幼生の組織学的検討を行ったところ、成長停滞や斃死の発生が卵黄吸収の終了期に多く見られ、卵黄から外部栄養への切り換えに問題のあることが推察された（大橋2003）。これらの結果をもとに、マガキを主とする二枚貝成熟卵に含まれる卵黄顆粒を浮遊幼生の餌料に添加する飼育法を考案したが（大橋2006a）、浮遊幼生の成長、生残に及ぼす効果を詳細に検証するには至っていない。本報では、マガキ卵黄顆粒を主体とする卵磨砕物（以下、卵磨砕物と略記）を餌料藻類とともにクマサルボウガイ浮遊幼生に給餌し、その成長・生残に対する有効性を確認したので報告する。

## 材料と方法

### 餌料藻類および卵磨砕物の調製

飼育実験の餌料藻類として *Chaetoceros calcitrans* と *Pavlova lutheri* を用いた。*C. calcitrans* は田崎真珠（株）製の濃縮市販品（約  $5 \times 10^8$  cells/ml）を購入し、1週間以内に使用した。*P. lutheri* はF培地（Guillard and Ryther, 1962）を用いて照度3000lx、気温20℃の恒温室内で5～7日培養し、細胞密度が  $6 \sim 9 \times 10^6$  cells/ml に達したものを使用した。卵磨砕物は、特開2006-271208（大橋2006b）に準じて2005年5月24日に諫早市小長井町地先で採集した養殖マガキから得られた成熟未受精卵を材料として用い調製した。すなわち、マガキ卵は切開法で海水中に放卵させたものを集めて滅菌海水で洗浄した後、オープニング5  $\mu$ mのネットを用いて圧搾濾過する方法で卵膜を除去して卵黄顆粒を集めた。卵黄顆粒はさらにオープニング1  $\mu$ mのネットを用いて圧搾濾過する方法で細粒化した。得られた卵磨砕物は1  $\mu$ m以下の顆粒で構成されていた。調製した

卵磨砕物は小容器に分注して-20℃の冷凍庫内で凍結保存し給餌時に必要量を解冻して用いた。卵磨砕物と *C. calcitrans* は、海水濃度屈折計（サリニティ（S/Mill-E）（株）アタゴ 東京）で塩分濃度を測定した後、1mlを70℃で乾燥させ、塩分を差し引いた乾燥重量を算出した。卵磨砕物の乾燥重量は  $9.0 \pm 0.3$  mg/ml、*C. calcitrans* のそれは  $41.4 \pm 1.3$  mg/mlであった。

### 供試貝および飼育方法

親貝は長崎県雲仙市国見町地先で2004年11月に採捕し、2005年5月まで長崎県諫早市小長井町地先の海底に設置したカゴ内で潜砂させて飼育した20個体（平均殻長  $112.2 \pm 6.4$  mm）を用い、2005年5月30日に人工産卵誘発法（松田・藤井2000）で受精卵を得た。受精卵は水温25℃のウォーターバス内に設置した500lポリカーボネイト水槽内で孵化させ、翌日D型期幼生（日令1）をオープニング20  $\mu$ mのネットで回収して供試した。飼育試験は2005年5月31日に開始し、期間は対照区の生残率が10%以下となった6月16日までの17日間とした。浮遊幼生飼育密度が0.9～1.1個体/mlになるように卵磨砕物投与区（試験区）と対照区を設け、25℃に調整した恒温水槽（200l）内に設置した30lポリカーボネイト水槽に收容した。飼育水は内径6mmのガラス管で40ml/minで通気し、ゆるやかに攪拌した。換水は浮遊幼生の全数をオープニング20  $\mu$ mのネットで回収して、調温した新鮮海水に再び收容する方法で毎日行った。餌料藻類は毎日換水後に *C. calcitrans* を  $5 \sim 10 \times 10^3$  cells/ml、*P. lutheri* を  $3 \sim 10 \times 10^3$  cells/ml、日令に応じて増加させ給餌した。試験区には餌料藻類に加えて、卵磨砕物を乾燥重量で2.7mg/l/dayとなるように、対照区には乾燥重量で同量の *C. calcitrans* をそれぞれ投与した。

殻長、殻頂期幼生出現率および生残率は、2日毎に回収した浮遊幼生から求めた。殻長は試験終了日を除いて60個体を測定し、終了日では試験区130個体、対照区200個体を測定した。殻頂期幼生出現率は各区60個体のうち殻長120  $\mu$ m以上の個

体数を求めた。生残率は実態顕微鏡下で生残および斃死数を計数して求めた。

### 組織学的検討

器官形成および脂肪滴体積測定のための組織学的検査に、殻長および生残率の調査と同様の方法で採取した浮遊幼生を固定して供試した。試料は2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド液(0.1 Mカコジル酸緩衝pH7.4)を用いて前固定し、10% EDTA溶液(pH7.4)で脱灰した後、1%四酸化オスミウム液(0.1Mカコジル酸緩衝pH7.4)を用いて後固定した。固定試料はエタノール系列で脱水し、Sppurの樹脂に包埋した後、厚さ1 $\mu$ mの光顕用切片および電顕用の超薄切片を作製した。光顕試料はトルイジン青で染色し組織観察に供するとともに、日令3, 7, 11において平均殻長に近い3個体を用いて厚さ1 $\mu$ mの連続切片を作製し、14~15 $\mu$ m毎の組織内に占める脂肪滴の面積を画像処理ソフト(Photoshop CS Adobe, U.S.A)を用いて求め、厚さを乗じて1個体ごとの脂肪滴体積を算出した。超薄切片は酢酸ウラニル-クエン酸鉛で二重染色し、透過電子顕微鏡(JEM 1010 日本電子(株), 東京)を用いて微細構造を観察した。

### 藻類餌料および卵磨砕物の化学成分

卵磨砕物と餌料藻類の粗灰分は600 $^{\circ}$ Cで灰化後恒量とすることにより測定した。粗脂肪含量はFolchらの方法(Folch et al 1957)で、粗タンパク質はKjeldahl法(菅原・副島 1977)で分析した。また、一般に、粗炭水化物含量は100から水分、粗タンパク質、粗脂肪、および粗灰分含量を差し引いたものが用いられるが、今回はその他(Others)として示した。これらの一般成分は、乾物換算値として示した。抽出した粗脂肪の一部はメチルエステル化した後、ガスクロマトグラフ(GC17A, 島津製作所, 京都)で分析し脂肪酸組成を求めた。餌料のアミノ酸組成は、試料10 mgを6N HClで加水分解し、アミノ酸分析計(ALC1000, 島津製作所, 京都)で求めた。ただし、*P. lutheri*については供

試料の細胞密度が低く試料量に制限があり、脂肪酸組成およびアミノ酸組成のみを測定した。

### 統計処理

殻長は逆数変換後nested-ANOVA法で、殻長期幼生出現率および生残率は逆正弦変換後検定で検定を行った( $p < 0.05$ )。脂肪滴体積は検定( $p < 0.05$ )を用いて実験区と対照区の比較を行った。

## 結果

### 飼育成績

平均殻長の推移をFig.43に示した。日令5以降の殻長は試験区が対照区を上回り、日令7以降は有意( $p < 0.05$ )な区間差が見られた。実験終了時における平均殻長は試験区および対照区でそれぞれ $180.2 \pm 44.0 \mu\text{m}$ および $119.1 \pm 9.9 \mu\text{m}$ であった。殻頂期幼生出現率と生残率をFigs. 44,45に示した。試験区ではいずれも日令7から殻長120 $\mu\text{m}$ に達した殻頂期幼生が出現し、日令9では91.7%、日令15ではすべての個体が殻頂期幼生へ変態した。一方、対照区では日令9で殻頂期幼生が初めて出現したが、日令11以降では増加せず、終了時の出現率は50.5%であった。生残率は両区とも日令13までは80%以上を示していたが、対照区では日令15に45.0%に、終了時では9.1%まで低下した。一方、日令17の試験区の生残率は78%であり、対照区より有意に高かった( $p < 0.05$ )。

### 組織学的検討

開始時(日令1)の浮遊幼生の胃および桿晶体囊は小型で未発達であったが、胃上皮には微絨毛と絨毛の形成が確められた。消化管上皮やそれ以外の未分化な細胞内には多数の卵黄顆粒が存在した(Fig.46)。これらの卵黄顆粒はトルイジン青に好染する小型で電子密度の高い顆粒と、トルイジン青に淡染する大型で電子密度の低い顆粒が認められた。小型で電子密度の高い顆粒は日令3で、大型で電子密度の低い顆粒は日令5でそれぞれ消失した。日令3では大型で電子密度の低い卵黄顆

粒の残存する細胞が点在して見られたが、桿晶体囊、胃、消化盲囊などの発達がみられた。胃上皮には桿晶体囊へ連なる繊毛を有する上皮細胞と、微繊毛と繊毛をともに具えた上皮細胞が存在し、胃上皮細胞に脂肪滴の蓄積が観察されるようになった。この脂肪滴はトルイジン青にほとんど染色されず、四酸化オスミウムに好染し、電子密度の低い卵黄顆粒に類似する染色性を示した (Fig.47)。日令7で卵黄顆粒の残存する細胞は確認されなくなり、脂肪滴の蓄積は胃上皮細胞だけでなく、消化盲囊上皮細胞にも認められるようになった。日令7以降は対照区で成長が停滞したため、その後の器官形成に伴う組織学的変化は試験区のみで観察した。なお、成長が停滞した対照区では顕著な病変や細菌等の増殖像は観察されなかった。殻長150  $\mu\text{m}$  (日令11) の浮遊幼生では桿晶体囊、閉殻筋、消化盲囊が発達し、脂肪滴の蓄積がさらに顕著となった。殻長200  $\mu\text{m}$  (日令15) では消化盲囊や消化管周辺に脂肪滴の蓄積がさらに進んだ (Fig.48)。日令3, 7および11における両区の浮遊幼生の胃、桿晶体囊上皮細胞および消化盲囊細胞内に蓄積された脂肪滴体積をFig.49に示した。試験区では脂肪滴体積は日令11まで増加傾向を示した (相関係数  $r=0.856$ ,  $p=0.003$ ) が、対照区に有意な増減はなかった。日令7および11における試験区の脂肪滴体積は対照区に比較して有意に大きかった ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ )。

#### 餌料藻類および卵磨砕物の化学成分

分析結果をTable 2-4に示した。卵磨砕物および*C. calcitrans*の一般成分は、それぞれ、粗タンパク質が16.5%, 9.8%, 粗脂肪が3.9%, 5.5%, 粗灰分が、31.7%, 31.2%, その他が47.9%, 53.5%であった。アミノ酸組成についてみると、卵磨砕物ではグルタミン酸、タウリンおよびアスパラギン酸がそれぞれ13.3, 11.9および9.7%, *C. calcitrans*ではロイシン、グルタミン酸およびアラニンがそれぞれ11.3, 9.9および9.5%, *P. lutheri*ではグルタミン酸、アスパラギン酸およびロイシンがそれぞれ12.7, 9.6および9.4%と高かった。脂肪

酸組成についてみると、卵磨砕物では飽和脂肪酸総量が27.6%, モノエン酸総量が15.6%, 不飽和脂肪酸総量が21.8%であり、リノール酸、EPAおよびDHAはそれぞれ1.3, 8.1および9.3%であった。*C. calcitrans*では飽和脂肪酸総量が21.1%, モノエン酸総量が30.6%, 不飽和脂肪酸総量が19.9%であり、リノール酸およびEPAはそれぞれ0.2および18.3%であった。また、*P. lutheri*では飽和脂肪酸総量が34.3%, モノエン酸総量が32.6%, 不飽和脂肪酸総量が13.8%であり、リノール酸、EPAおよびDHAはそれぞれ0.6, 8.4および1.7%であった。

餌料藻類と卵磨砕物を比較すると、卵磨砕物の粗タンパク質は16.1%で*C. calcitrans*の約2倍量であった。卵磨砕物のアミノ酸組成ではタウリンが特に多く*P. lutheri*の約7倍を示したが、*C. calcitrans*にはタウリンは検出されなかった。卵磨砕物の脂肪酸組成では、EPAは*C. calcitrans*のそれより低値であったが、DHAは*P. lutheri*の約6倍と高かった。また、卵磨砕物のリノール酸は*C. calcitrans*の約6倍、*P. lutheri*の約2倍であった。

#### 考察

これまで、クマサルボウガイの種苗生産は佐賀県 (異儀田ら1977) および山口県 (高見ら1981) で実施されたが、D型期から殻頂期幼生への変態期に成長停滞や大量減耗などの問題が発生した記載はなく、良好な種苗生産成績が得られている。しかし、長崎水試では1999年から同種の種苗生産に取り組んでいるが、アカガイに比較して浮遊幼生の成長が劣り、D型期から殻頂期幼生への変態期に顕著に成長が停滞し、その後に起こる減耗によって採苗率が著しく低いことが問題になった。そこで本研究でマガキ卵磨砕物を*C. calcitrans*および*P. lutheri*とともに投与したところ、試験区では日令7に殻頂期幼生が出現し日令15で変態が完了したが、対照区では殻頂期幼生へ変態する殻長120  $\mu\text{m}$ 前後で成長が停滞し、平均殻長は試験区より有意に小さかった。また、試験区の生残率が約80%を維持したのに対し、対照区では日令13以



降に急激に低下した。試験区の浮遊幼生の成長は、佐賀県や山口県の報告とほぼ同じであったことから、殻頂期幼生への変態が正常に行われていたことを示したものと考えられる。しかし対照区では、過去に発生した成長停滞と大量斃死現象を再確認できた。これらの結果から、長崎水試の飼育環境においてクマサルボウガイ浮遊幼生に発生した成長停滞と大量減耗は、経口的に摂取する卵黄栄養に類似した栄養素の不足が関与している可能性が高いと推察された。

餌料藻類の栄養価については、脂肪酸組成を指標に評価されることが多く、対数増殖期から定常期に達した細胞密度の高いものを使用することが推奨されている（押尾ら1995）。本研究でも対数増殖期から定常期に達したものを使用し、市販の微細藻類については購入から1週間以内に使用して栄養価の低下に配慮した。また、今回使用した2種類の餌料藻類にはEPAとDHAが含まれていることから、これらの栄養値に大きな問題はなかったと考えられる。一方、卵磨砕物は粗タンパク質含量が高く、粗脂肪含量も餌料藻類と同等であった。特に、仔稚魚の生残率の向上が認められているタウリン（陳ら2004,2005）と、脂肪酸のDHAおよびエゾアワビ着底稚貝の飢餓耐性に関与するとされている（Fukazawa et al 2005）。リノール酸の含量が高かった。おそらく、これらの栄養素が、成長や生残率の向上に有効に作用したものと推察された。

器官形成過程の組織学的観察では、日令3で消化器官の基本的な構造が形成されたが、各器官のサイズや発達を考慮すると、1 $\mu$ m以下の微細顆粒で構成される卵磨砕物は、卵黄吸収過程にある初期浮遊幼生が摂取するのに適した餌料であると考えられた。また、卵黄顆粒の残留状況から日令7までに卵黄吸収は終了したが、試験区と対照区の日令7以降の平均殻長および殻頂期幼生出現率に有意な差が見られたことから、マガキ卵磨砕物の摂取が卵黄消費後も器官の分化・形成、殻頂期幼生への変態、および生残率の向上に有効であったことも容易に推察される。さらに、日令

7および11の消化器官上皮細胞に蓄積される脂肪滴体積に有意差が認められたことは、卵磨砕物の摂取が器官形成を促進して餌料藻類の利用を向上させ、蓄積脂肪の増加を促進したこともうかがえる。いずれにせよ、添加した卵磨砕物が餌料として経口的に摂取され、器官形成と正常な成長を維持する効果のあることが示された。今後、クマサルボウガイと同様の問題を有する二枚貝の種苗生産において、この方法の有効性が検討されるべきであろう。

従来の二枚貝浮遊幼生の飼育では、成長速度や生残率を指標に成育状況の良否を判断してきた。このため、種苗生産成績の不振や大量減耗は、給餌する餌料藻類の培養状態の良否や大きさの適否（押尾ら1995）、あるいは飼育水中の病原体に注目されることが多く（森2005）、本研究で認められた現象については、原因を特定できないまま餌料の質の影響や細菌性疾病として結論づけられる例が多かった。一方、二枚貝浮遊幼生の器官形成過程について検討された事例が少なく（Bower and Meyer 1990）、D型期幼生からの器官形成過程に関する報告は見られない。また、消化管上皮細胞に蓄積される脂肪滴については、形態についての記述（Bower and Meyer 1990; 藤村ら1995）はあるが、その機能については言及されていない。これは二枚貝浮遊幼生が非常に小型で、器官の分化・形成などの発育過程を観察することが容易でないことに基づくが、二枚貝の種苗生産技術の確立には浮遊幼生の成育を正しく理解する必要がある。

**Table 2.** Proximate compositions of crushed mature oyster ova and *Chaetoceros calcitrans* (%)

	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Others*	Total
Crushed oyster ova	16.5	3.9	31.7	47.9	100.0
<i>C. calcitrans</i>	9.8	5.5	31.2	53.5	100.0

\* Values are calculated by 100-(crude ash+crude protein+crude lipid)

**Table 3.** Amino acid composition of crushed mature oyster ova, *Chaetoceros calcitrans* and *Pavlova lutheri* (%)

Amino acid	Crushed oyster ova	<i>C. calcitrans</i>	<i>P. lutheri</i>
Taurine	11.9	0.0	1.8
Aspartic acid	9.7	8.9	9.6
Threonine	4.6	4.1	5.1
Serine	5.4	4.0	4.5
Glutamic acid	13.3	9.9	12.7
Proline	3.7	5.9	5.0
Glycine	4.2	7.6	6.5
Alanine	3.6	9.5	7.7
Cystine	0.8	0.2	0.0
Valine	4.6	6.6	6.7
Methionine	2.6	2.1	2.1
Isoleucine	4.3	6.9	5.7
Leucine	6.9	11.3	9.4
Tyrosine	3.3	3.6	0.0
Phenylalanine	5.7	8.4	7.1
Histidine	2.3	2.3	2.2
Lysine	7.3	4.5	6.3
Arginine	5.9	4.3	7.5

**Table 4.** Fatty acid composition of crushed mature oyster ova, *Chaetoceros calcitrans* and *Pavlova lutheri* (%)

Fatty acid	Crushed oyster ova	<i>C. calcitrans</i>	<i>P. lutheri</i>
14:00	4.1	14.3	16.3
15:00	0.7	* <sup>1</sup>	*
16:00	21.5	6.8	17.6
17:00	1.3	*	*
18:00	*	trace <sup>2</sup>	0.4
20:00	trace	trace	trace
Total saturated	27.6	21.1	34.3
16:1n-7	5.2	30.2	27.3
18:1n-9	3.2	0.1	0.6
18:1n-7	5.2	0.3	4.5
20:1n-11	*	*	*
20:1n-7	0.4	*	*
20:1n-9	1.6	trace	0.2
Total monoenoic	15.6	30.6	32.6
18:2n-6	1.3	0.2	0.6
18:3n-6	*	*	*
20:2n-6	*	trace	*
20:4n-6	0.5	trace	0.1
Σ n-6	1.8	0.2	0.7
18:4n-3	1.9	1.4	3.0
20:4n-3	0.3	0.1	trace
20:5n-3	8.1	18.3	8.4
22:5n-3	0.4	trace	trace
22:6n-3	9.3	trace	1.7
Σ n-3	20.0	19.8	13.1
Total polyenoic	21.8	19.9	13.8

<sup>1</sup> Not detected. <sup>2</sup> Trace amounts under 0.05%.

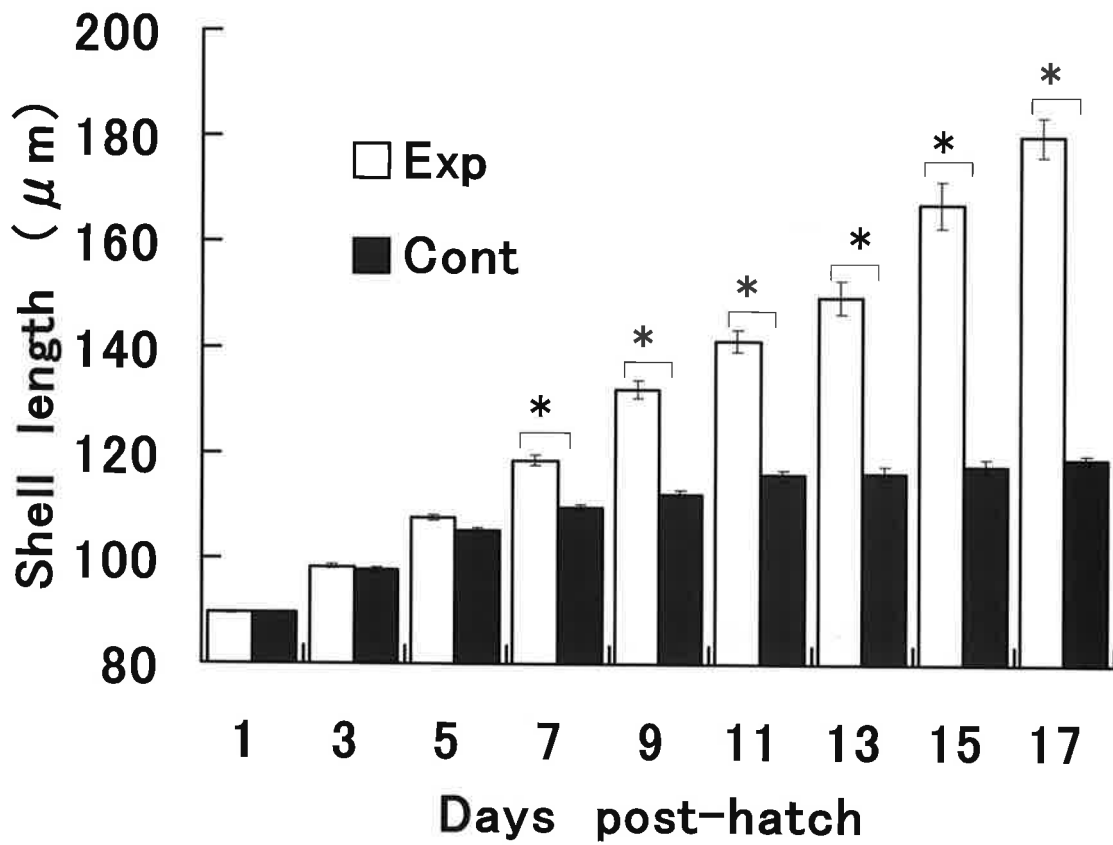


Fig.43. Growth of ark shell larvae. Experimental (Exp) and control (Cont) groups were fed with algae supplemented with crushed mature oyster ova and algae only, respectively (mean±SE). \* means significant difference by nested-ANOVA test ( $p < 0.05$ ).

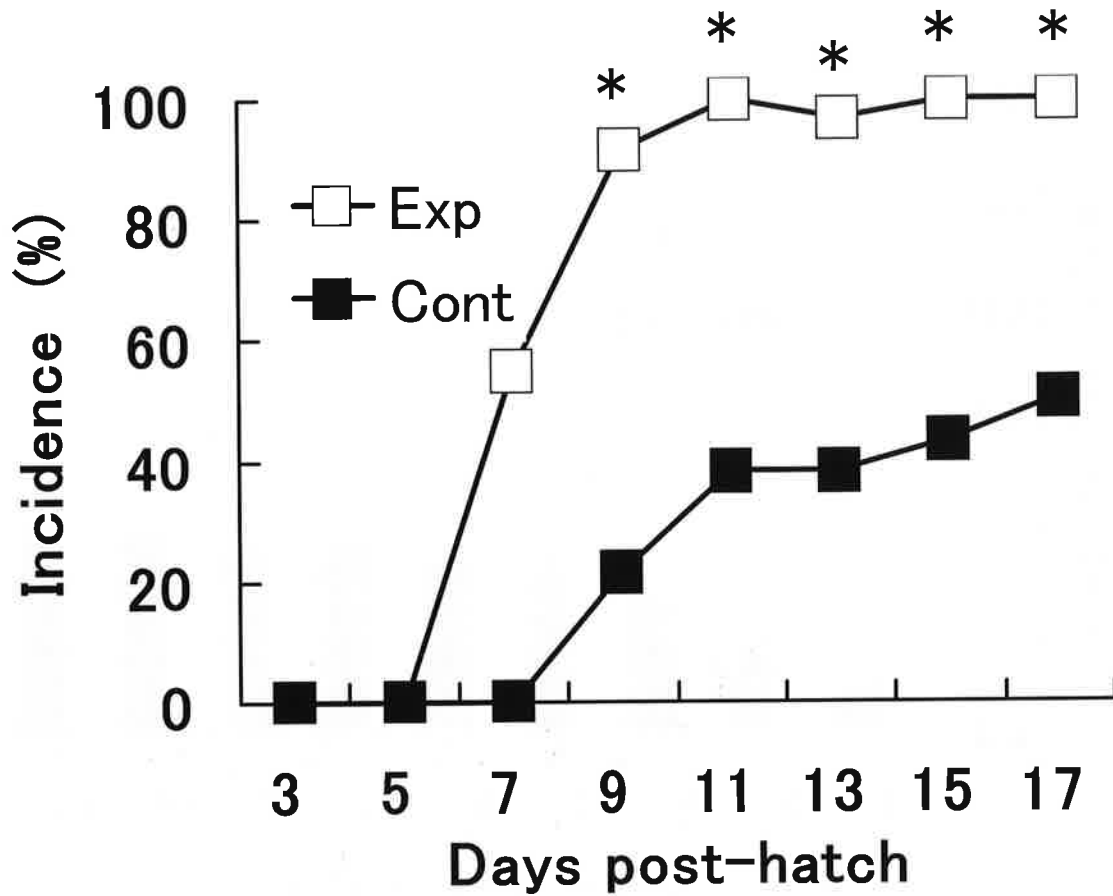


Fig.44. Incidence of umbo larvae in the experimental and control groups. \* means significant difference by *t*-test ( $p < 0.05$ ). Abbreviations are the same as in Fig. 43.

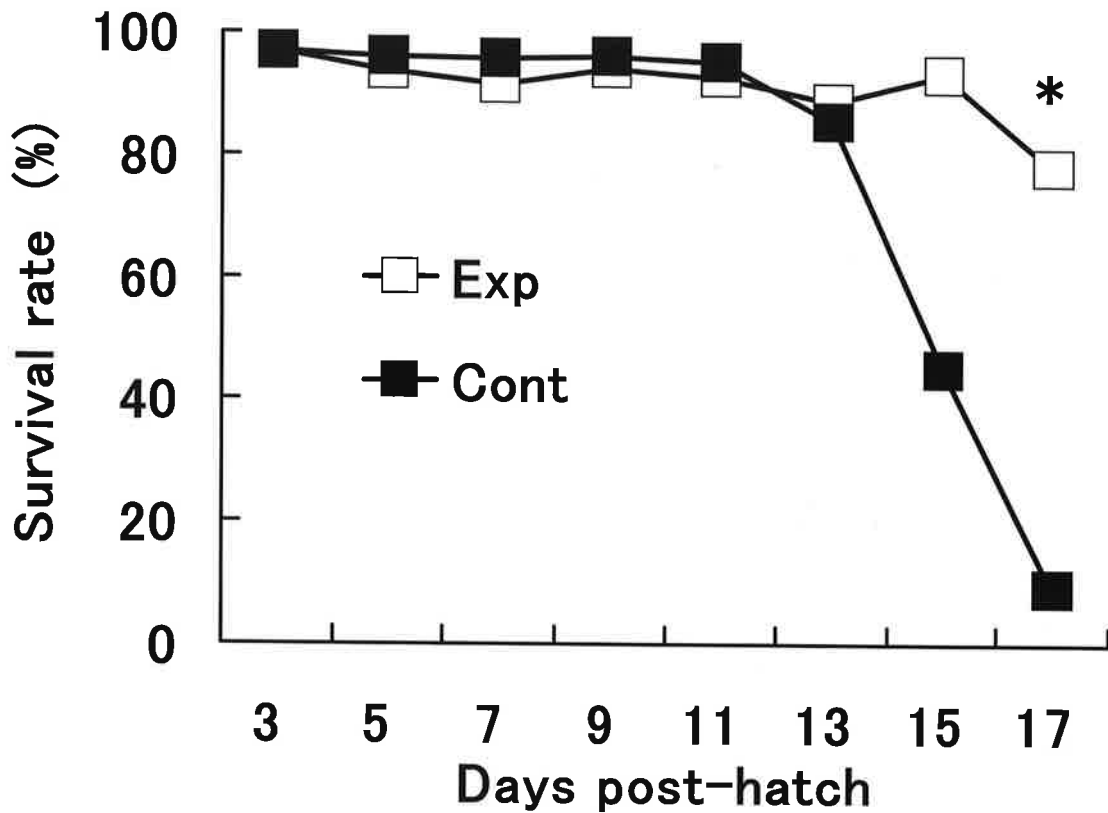


Fig.45. Changes in survival rates of experimental and control groups during rearing trial. \* means significant difference by *t*-test ( $p < 0.05$ ). Abbreviations are the same as in Fig. 43.

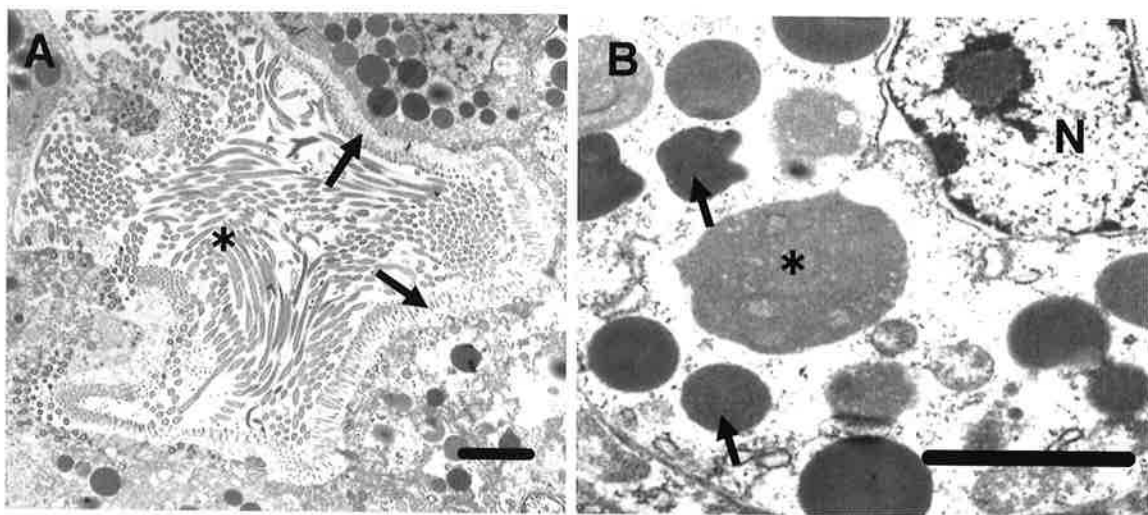


Fig.46 .Transmission electron micrographs of early D-shaped larvae (1d post-hatch). A; Gastric epithelial cells containing yolk granules. Cilia (asterisk) and microvilli (arrows) were observed. Scale bar = 1  $\mu$  m. B; Two types of yolk granules with lower(asterisk) or moderate (arrows) electron density in an undifferentiated cell. N; nucleus. Scale bar = 2  $\mu$  m.

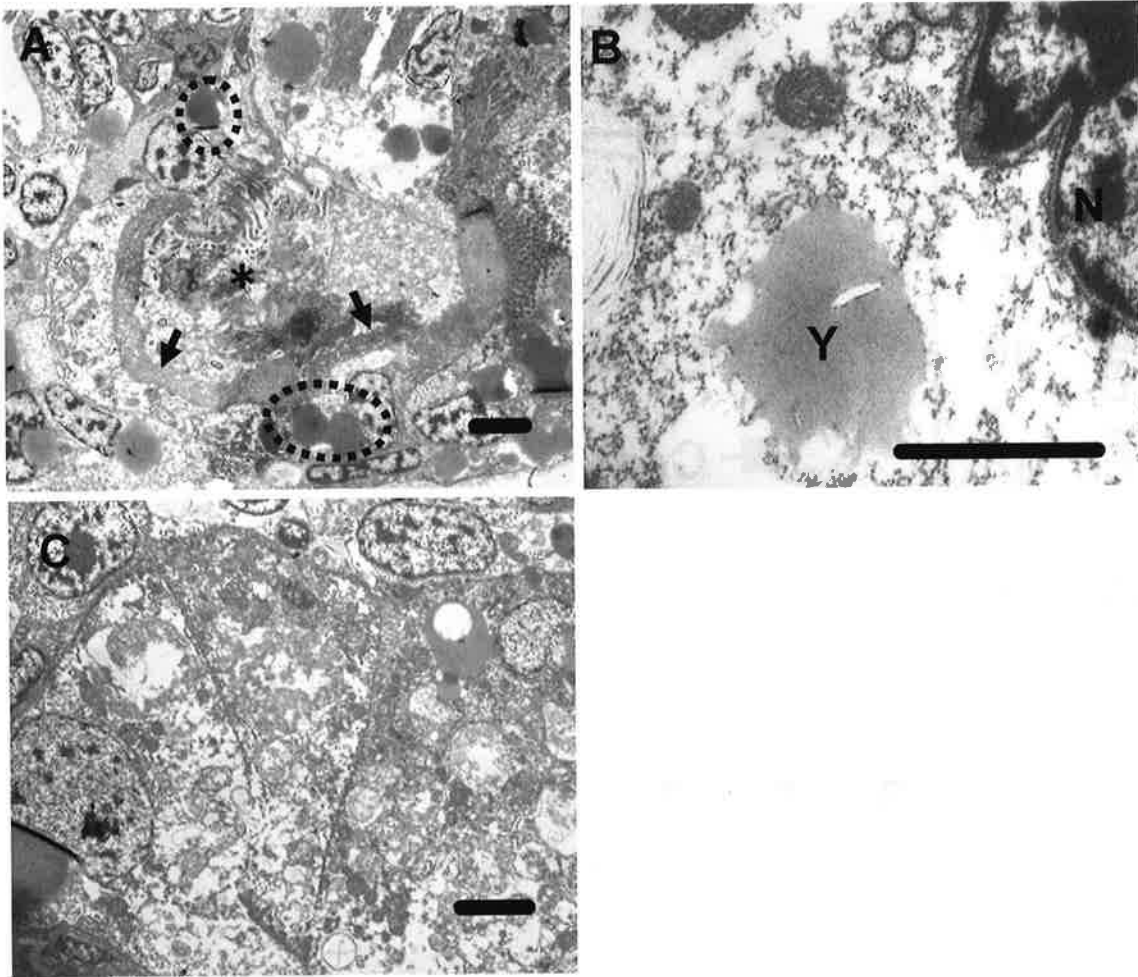


Fig.47. Transmission electron micrographs of D-shaped larvae (3d post-hatch)  
A; Stomach. Asterisk indicates gastric contents. Microvilli (arrows) and lipid droplets in the stomach epitelal cells (dotted oval areas) observed. Scale bar = 2  $\mu$  m.  
B; A yolk granule with lower electron density (Y) in the velum cell. N; nucleus. Scale bar = 500nm.  
C; Digestive diverticular epithelium. Numerous vacuoles associated with digestion and absorption of nutritive substances and lipid droplets were observed. Scale bar = 2  $\mu$  m.

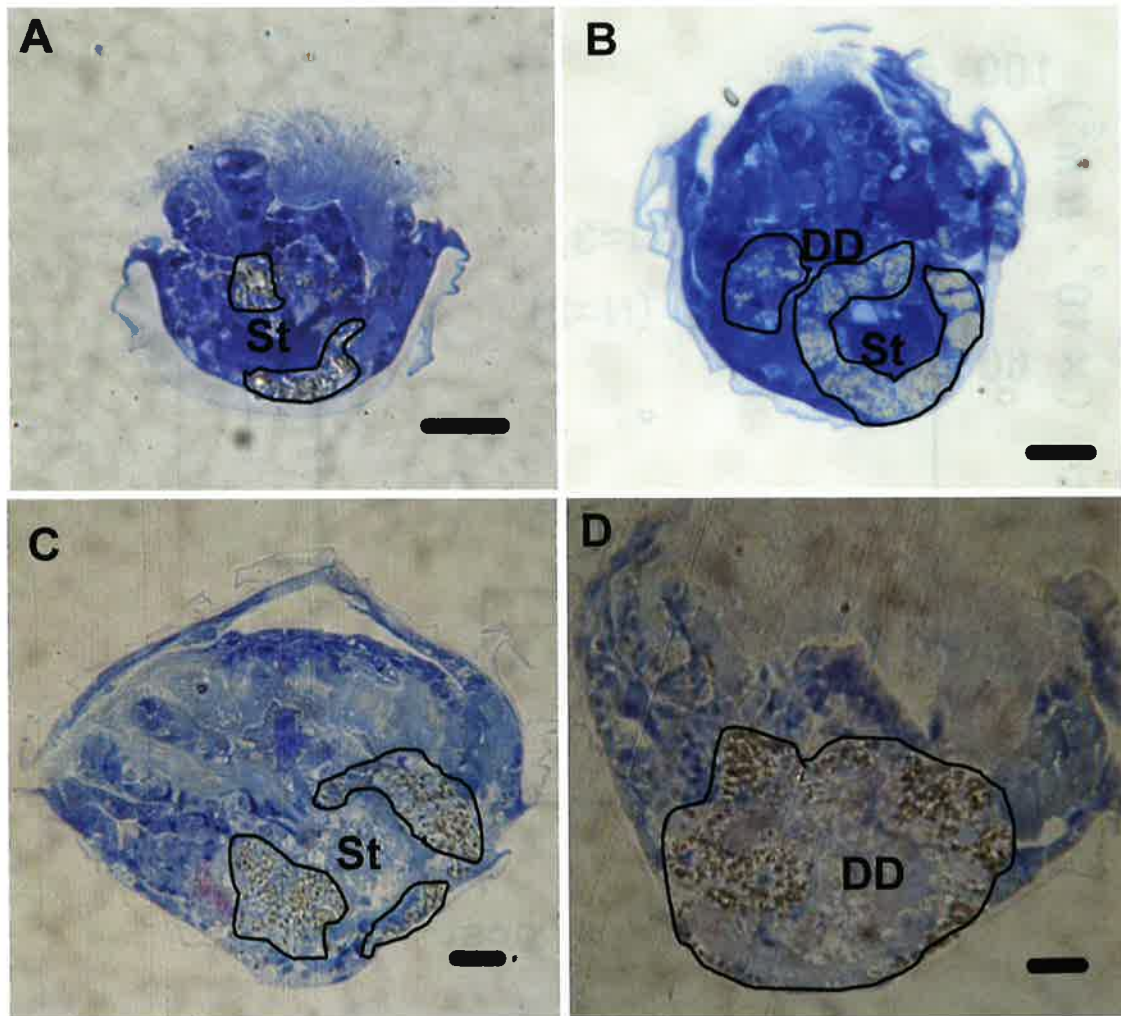


Fig.48. Light micrographs of the accumulation of lipid droplets in umbo larvae A, 120  $\mu$ m shell length; B, 150  $\mu$ m shell length ; C and D, 200  $\mu$ m shell length. Areas enclosed in solid line show epithelial cells of the style sac (SS), stomach (St) and digestive diverticula (DD) containing lipid droplets. Sections (C and D) were cut from the same individual. Toluidine blue staining. Scale bars = 20  $\mu$ m.

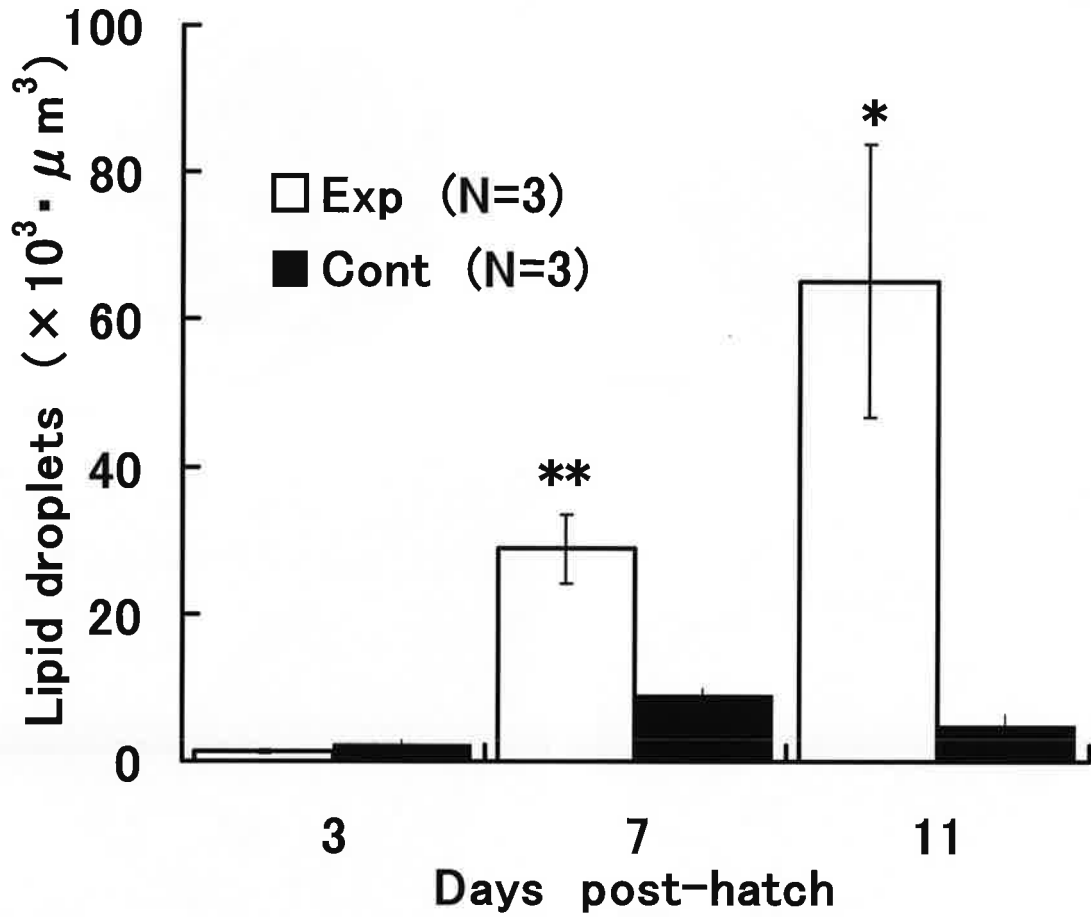


Fig.49. Change in the volume of lipid droplets with lapse of time (mean±SE). Significant difference between the dietary treatments (\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ ).



### (3) タイラギ浮遊幼生および着底稚貝の飼育

タイラギ *Atrina pectinata* は有明海および瀬戸内海を主産地とする大型二枚貝で、主に潜水器漁法により漁獲されるが、有明海では1980年代からその生産量が激減し、長崎県沿岸海域では1993年から13年連続で休漁を余儀なくされるなど、その漁業資源減少は深刻な状況にある。本種は漁業上の重要資源であることから1960年代に種苗生産の試みが始まり（穂山・前川1963）技術開発が鋭意続けられているが、浮遊幼生の飼育が非常に困難で（穂山・前川1963；濱本・大林1984；伊東義信ら1986；松田ら1998, 1999；大橋ら2004, 2005）、数十個体の稚貝が生産された成功例が過去に2例（明楽1998；川原ら2004）報告されているだけで種苗生産技術は未だ確立されていない。主な減耗要因として浮遊幼生が水面に浮上して斃死する現象が報告されており（濱本・大林1984）、これまでの成功例では少数の幼生を小型の飼育装置で飼育することで浮上して斃死する現象を軽減し稚貝を得ているが、著者らは主な改良点として浮遊幼生の栄養面に着目し、餌料藻類の他に貝類成熟卵の卵黄を主成分とする添加餌料（以下、卵磨砕物という）の使用を試みた。その結果1,484個体の着底稚貝の生産に成功し、着底稚貝の飼育方法についても若干の検討を行ったので、その概要を報告する。

## 材料と方法

### 親貝および採卵

種苗生産実験には2006年3月に岡山県より購入し、長崎県総合水産試験場地先の筏に真珠養殖用の丸籠に入れて垂下飼育していた瀬戸内海産タイラギ15個体（リシケタイラギ型、雄9個体、同、雌6個体、平均殻長 $227 \pm 21$ mm）を親貝として用いた。採卵は2006年7月6日に人工産卵誘発法（松田・藤井2000）で行い、雄1個体、雌3個体が放精および放卵し、受精卵約7,000万粒を得た。得られた受精卵は24°Cに調温したウォーターバス内に設置した海水を満たした500lポリカーボネイト水

槽に收容し孵化させた。受精卵を收容した水槽は止水式とし微通気を行った。受精率、孵化率はそれぞれ95%、96%であった。卵磨砕物の添加効果の検討には種苗生産実験と同群の親貝が2006年8月8日に自然放卵した受精卵のうち約2300万粒を用いた。得られた受精卵は500lポリカーボネイト水槽に收容し、同年8月9日に孵化した浮遊幼生を実験に用いた。受精率、孵化率はそれぞれ83.7%、84.2%であった。

### 浮遊幼生の飼育

飼育実験は2006年7月7日から開始した。孵化幼生（日令1）はD型期幼生への変態を待って、オープニング40 $\mu$ mのネットで孵化槽から回収し、約4個体/mlの密度で飼育装置に收容した。飼育装置は調温したウォーターバス内に設置した500lポリカーボネイト水槽2基を用いた。飼育は止水式で行い、飼育水の攪拌には小型水中ポンプ（プライムミオ50型、ニッソー、埼玉）を用い通気は行わなかった。飼育水はタイラギの生息する有明海の塩分濃度が低いことを考慮して、日令2から27までは1 $\mu$ mのカートリッジ式フィルター（1PA 東洋濾紙（株）東京都）で濾過した海水に5~20%の水道水を混合して塩分濃度を調整した海水を用いた。水道水を混合した海水は飼育装置と同じウォーターバス内で1日通気攪拌・調温して使用した。海水への水道水の混合率は、日令16までは20%、日令22までは10%、日令27までは5%とした。水道水を混合した飼育海水の塩分濃度は海水濃度屈折計（サリニティ（S/Mill-E）、アタゴ、東京）を用いて測定し、20%混合で27~28‰、10%混合で30~31‰、5%混合で32~33‰であった。飼育海水は毎日約半量を、約1週間ごとに全量を換水した。また、飼育海水の全量換水時に飼育水槽と攪拌装置の交換を行った。水温は日令1から8までは加温して25~26°Cの範囲を維持し、日令9から27までは冷却して24~25°C、日令27以降は26~27°Cの範囲を維持した。実験期間中の平均水温は $25.7 \pm 1.1$ °Cであった（Fig. 50 A）。

餌料は4種の餌料藻類（*Chaetoceros calcitrans*

, *Chaetoceros gracillis*, *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum toricornutum*) および後述する3種の貝類の卵磨砕物を用いた。餌料藻類および卵磨砕物の給餌量は Fig. 51 に示した。 *C. calcitrans* と *C. gracilis* は市販品 (*C. calcitrans* は 約  $5 \times 10^8$  cells/ml, *C. gracilis* は 約  $4 \times 10^8$  cells/ml, 田崎真珠 (株) 製) を用い、前者は日令1から日令15まで  $2 \sim 3 \times 10^4$  cells/ml/day の範囲で、後者は日令6から日令42まで  $8 \sim 16 \times 10^3$  cells/ml/day の範囲で浮遊幼生の成長と生残数を考慮して給餌量を調整した。 *P. lutheri* は市販の液体培地 (KW21, 宝製網, 熊本) を添加した高圧滅菌海水を用いて照度3,000lx, 気温20°Cの恒温温室で5~7日培養し、細胞密度が  $6 \sim 8 \times 10^6$  cells/ml/day に増殖したものをを用い、日令2から日令42まで  $2 \sim 9 \times 10^3$  cells/ml/day の範囲で浮遊幼生の成長と生残数を考慮して給餌量を調整した。 *Ph. toricornutum* は *P. lutheri* と同様の条件で培養し、細胞密度が  $2 \sim 3 \times 10^6$  cells/ml に増殖するまで培養したものを日令17から24まで  $2.5 \sim 5 \times 10^3$  cells/ml/day の範囲で給餌した。卵磨砕物は特開2006-271208 (大橋2006) に準じてマガキ, タイラギおよびマダカアワビ成熟卵から調製したものをを用いた。マガキ卵磨砕物は日令1から42まで、タイラギ卵磨砕物は日令3から9まで、マダカアワビ卵磨砕物は日令15から17ならびに日令30および34に、それぞれ  $0.09 \sim 0.36$  mg//day,  $0.03$  mg//day,  $0.13 \sim 0.25$  mg//day を添加した。給餌量は日令14から16が最も多かった。給餌は換水後に1日1回行った。

浮遊幼生は2日毎に飼育水槽から無作為に採集して殻長を測定するとともに軟体部の形態を観察した。

#### 浮遊幼生に対する卵磨砕物の添加効果の検討

卵磨砕物の添加効果を検討するための飼育実験は2006年8月10日に開始した。D型期幼生に変態した孵化幼生 (日令1) は、オープニング  $40 \mu$  m のネットで孵化槽から回収し、実験区  $5.2$  個体/ml, 対照区  $6.2$  個体/ml の密度で飼育装置に收容した。飼育装置, 調温水槽, 飼育水の攪拌装置および飼育水の交換方法は種苗生産実験と同様とし

た。飼育水は  $1 \mu$  m のカートリッジ式フィルター (1 PA 東洋濾紙 (株) 東京都) で濾過した海水に5~20%の水道水を混合して塩分濃度を調整した海水を用いた。水道水を混合した海水は飼育装置と同じウォーターバス内で1日通気攪拌・調温して使用した。水道水を混合した飼育海水の塩分濃度は海水濃度屈折計 (サリニティ (S/Mill-E), アタゴ, 東京) を用いて測定し、日令13までは27~30%, 日令14から25までは30~32%であった。水温は調温海水を用いて日令1から8までは25~27°Cの範囲を、日令9から25までは24~25°Cの範囲を維持した。実験期間中の平均水温は  $25.5 \pm 1.0$  °Cであった (Fig.52)。実験期間は両区の生残率が10%以下となった日令25までとした。

餌料は3種の餌料藻類 (*Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracillis*, *Pavlova lutheri*) および種苗生産実験に用いた3種の貝類の卵磨砕物を用いた。餌料藻類および卵磨砕物の給餌量は Fig. 53 に示した。 *C. calcitrans* と *C. gracilis* は市販品 (*C. calcitrans* は 約  $5 \times 10^8$  cells/ml, *C. gracilis* は 約  $4 \times 10^8$  cells/ml, 田崎真珠 (株) 製) を用い、実験区では前者は日令1から日令10および20から25まで  $1 \sim 4 \times 10^4$  cells/ml/day の範囲で、後者は日令11から日令25まで  $3 \sim 15 \times 10^3$  cells/ml/day の範囲で浮遊幼生の成長と生残数を考慮して給餌量を調整した。 *P. lutheri* は市販の液体培地 (KW21, 宝製網, 熊本) を添加した高圧滅菌海水を用いて照度3,000lx, 気温20°Cの恒温温室で5~7日培養し、細胞密度が  $6 \sim 8 \times 10^6$  cells/ml/day に増殖したものをを用い、日令1から日令25まで  $3 \sim 15 \times 10^3$  cells/ml/day の範囲で浮遊幼生の成長と生残数を考慮して給餌量を調整した。対照区は卵磨砕物の添加量を考慮して実験区の1.5~2倍量を給餌した。卵磨砕物はマガキ卵磨砕物は日令5から25まで、タイラギ卵磨砕物は日令1から13まで、マダカアワビ卵磨砕物は日令14から19まで、それぞれ  $0.09 \sim 0.27$  mg//day,  $0.03 \sim 0.06$  mg//day,  $0.25 \sim 0.5$  mg//day を添加した。両区とも給餌量は日令16が最も多かった。給餌は換水後に1日1回行った。浮遊幼生は2日毎に飼育水槽から無作為に採集して殻長を測定した。生残率

は実験開始時の飼育密度に対する日令11, 17, および25における飼育密度の割合で求めた。浮遊幼生の飼育密度は実験開始時および日令11では飼育水1ml中の, 日令17では2ml中の浮遊幼生数を5回測定した平均値として求めた。日令25における飼育密度は浮遊幼生数が減少していたため, 飼育水5ml中の浮遊幼生数を6回測定した平均値として求めた。

### 着底稚貝の飼育

飼育実験は, 日令35および36で浮遊幼生飼育水槽から回収した稚貝318個体を用いて2006年8月11日から開始した。このうち212個体は, 室内に設置した底面にオープニング200 $\mu$ mのネットを張った直径332mm $\times$ 高さ300mmのアップウェリング飼育装置(アップ-ウェリング, 田中三次郎商店, 福岡)を用いて日令118まで飼育した(室内飼育群)。飼育装置は海水を満たした500lポリカーボネイト水槽内に前述の装置を水深25cmとなるように設置した。飼育を開始した日令36から日令75までは底面のネット上に稚貝を直接撒いて飼育し, 潜入基質は用いなかった。日令76からは潜入基質としてアンスラサイト(粒径6mm)を用いた。飼育海水は電動ポンプ(RSD-10 レイシー, 東京)を用いて10 l/minの水量で揚水し, 日令75まではネット底面から上面に, 潜入基質の使用を開始した日令76以降は飼育装置上面から底面に向けて飼育海水を循環させた。給餌量はFig.54に示した。餌料は*C. gracilis*, *P. lutheri*, *Ph. toricornutum*を用い, 日令75までは*C. gracilis*を $2\sim 4 \times 10^4$  cells/ml/day, *P. lutheri*を $3\sim 6 \times 10^4$  cells/ml/dayを, 日令76以降は*Ph. toricornutum*を $3\sim 4 \times 10^4$  cells/ml/day, *P. lutheri*を $3\sim 6 \times 10^4$  cells/ml/dayの範囲で稚貝の成長と生残を考慮して給餌し, 常に飼育海水が餌料藻類で濁りを呈する状態を維持した。給餌は日令75までは1日1回, その後は自動給餌装置(浮遊珪藻自動培養給餌システム, ヤンマー, 大阪)を用いて1日4回に分けて行った。飼育海水の交換は, 日令75までは1日1回水槽容量と等量の海水を, その後は飼育水槽容量の約4倍量の海水を注入しオーバーフロー

させる方法で行った。水温は日令75までは調温海水を用いて25 $^{\circ}$ C前後に維持したが, その後は調温を行わなかった(Fig.50 B)。日令35および36で回収した稚貝のうち106個体は日令53から分養し, 570mm $\times$ 320mm $\times$ 90mmのポリエチレン製籠(エビ籠, 田中三次郎商店, 福岡)内にオープニング200 $\mu$ mのネットを敷いた飼育容器に潜入基質を用いずに收容して, 日令82まで長崎県総合水産試験場地先の筏に垂下(水深1m)して飼育した(海面飼育群)。さらに日令82までの生残稚貝から無作為に選んだ30個体を分養し, 砂を満たしたバケツ(ポリエチレン製, 容量15 l)に收容して同様に筏に垂下(水深5m)する方法で日令133まで飼育した。海面飼育群の飼育水温は長崎水試の筏における定点観測水温で示した(Fig.50 B)。

室内飼育群の生残率は, 日令75では実験区を含む飼育稚貝の総個体数に対する生残個体数の割合を用い, 日令118では飼育稚貝数に対する生残個体数の割合を用いて算出した。海面飼育群の生残率は実験に用いた個体数に対する生残個体数の割合を用いて算出した。

### 卵磨砕物および餌料藻類の化学成分

マガキ, タイラギおよびマダカアワビ成熟卵から調製した3種の卵磨砕物は一部を-20 $^{\circ}$ Cで保存し, アミノ酸組成および脂肪酸組成を測定した。*C. gracilis*, *P. lutheri*, についても同様の方法を一部を保存し, 脂肪酸組成を測定した。アミノ酸組成は, 試料10mgを6N HClで加水分解し, アミノ酸分析計(ALC1000, 島津製作所, 京都)で分析して求めた。脂肪酸組成は, Folchらの方法(Folch et al 1957)で粗脂肪を抽出しメチルエステル化した後, ガスクロマトグラフ(GC17A, 島津製作所, 京都)で分析して求めた。

## 結果

### 浮遊幼生の飼育

浮遊幼生の平均殻長の推移および生残率をFig.55に示した。平均殻長は日令1で $98.8 \pm 3.4 \mu$ m, 日令7で $133.2 \pm 8.4 \mu$ mを示し, 約1週間で殻頂期

幼生に成長した。その後日令13で $213.3 \pm 25.6 \mu\text{m}$ 、日令19で $303 \pm 39.5 \mu\text{m}$ 、日令25で $370 \pm 32.7 \mu\text{m}$ に達したが、日令25から29まではこの時期に発生した大量減耗に伴う形で成長の停滞が見られた。着底稚貝は日令35で初めて出現し、日令43までに合計1,484個体の着底を確認した。生残率は日令8, 17, 30でそれぞれ35%, 23%, 1.5%で、飼育開始から日令8までと、日令25～29の間で大きく減耗した。飼育開始から稚貝着底までの生残率は約0.04%であった。

各成長段階の浮遊幼生の外部形態をFig.56 A-Iに示した。受精卵は直径約 $60 \mu\text{m}$ の球形で (Fig.56 A)、水温 $24^{\circ}\text{C}$ 、受精後6時間で孵化した。孵化幼生は体長約 $60 \mu\text{m}$ のトロコフォア幼生であったが (Fig.56 B)、軟体部の形態を変化させながら幼殻を形成し (Fig.56 C)、孵化後24時間でD型期幼生に変態した (Fig.56 D)。D型期初期の幼生の殻長は $98.8 \pm 3.4 \mu\text{m}$ であった。D型期幼生は日令2から消化器官の着色が見られ、摂餌を開始したと考えられた。日令5では殻頂が丸みを帯び殻頂期に達したと考えられる個体が出現し、その下限サイズは $120 \mu\text{m}$ であった (Fig.56 E)。その後日令9 (平均殻長 $150.3 \pm 10.0 \mu\text{m}$ , Fig.56 F) では幼殻縁辺が広がる形で成長し、タイラギ殻頂期幼生に特徴的な形態を示すようになり、日令25までは平均日間成長量 $13.7 \mu\text{m/day}$ を示し急速に成長した (Fig.56 G)。しかし日令29までは前述したように成長が停滞した。

水面への浮上現象を伴う減耗は幼生飼育期間を通して常時観察され、特に飼育開始から殻頂期初期の日令8までが著しかった。水中ポンプによる無通気攪拌は浮上現象の発生を軽減したが、その効果は十分でなかった。また飼育期間中の斃死は浮上現象を伴うものの他に、飼育水槽壁面に付着するものや、幼生がからみあってフロック様の凝集物となって底面に沈降する態様のものが見られた。成長が良好であった日令9～25にかけては、それまでの減耗によって幼生の飼育密度が低下したこともあり、浮上現象を示す幼生が減少したが、成長停滞の前後から再び増加し、フロック様の沈

降斃死も増加した。観察された浮遊幼生の浮上数の増減は生残率の変化とよく対応していた。

飼育幼生数は日令25までに約33万個体まで減少したため、その後は2水槽を1水槽にまとめて飼育を継続したが、その後も減耗は続き、日令30までに約6万個体、生残率で約1.5%まで減少した。しかし、日令31で再び平均殻長が増加し $400.7 \pm 10.0 \mu\text{m}$ を示した。殻長 $400 \mu\text{m}$ の浮遊幼生では匍匐肢の形成が確認され、着底期に達したと考えられる幼生では、浮遊しながら匍匐肢を動かす様子と面盤の一部が脱落し鰓弁が形成されているのが観察された (Fig.56 H)。着底直後の稚貝は幼殻の周辺に真殻の形成が早急に進み、面盤が完全に脱落し鰓弁と匍匐肢の発達を観察された。真殻は幼殻と外観が異なり、着底時の幼殻部分が明瞭に観察された。着底稚貝は発達した匍匐肢を用いて活発に移動した (Fig.56 I)。

#### 浮遊幼生に対する卵磨砕物の添加効果の検討

実験区および対照区における浮遊幼生の平均殻長の推移および生残率をFig.57に示した。両実験区とも日令5で殻頂期幼生が出現し、日令11ですべての浮遊幼生が殻頂期幼生に成長した。実験区と対照区の平均殻長は日令7から19まで有意な差が見られたが (*t*検定,  $p < 0.05$ ) 実験区では日令21から成長が停滞し、実験終了時 (日令25) の平均殻長は実験区 $248.3 \pm 25.7 \mu\text{m}$ 、対照区 $294.0 \pm 39.2 \mu\text{m}$ であった。対照区では殻頂期への移行までに減耗が進み、日令13の生残率は実験区で82.7%であったのに対して対照区は24.2%であった。しかしその後実験区でも減耗が進み、日令18の生残率は実験区38.5%、対照区が8.1%となり、実験終了時の生残率は実験区2.6%、対照区4.9%であった。なお、両区とも実験終了後も飼育を継続したが、いずれも稚貝の生産には至らなかった。

#### 着底稚貝

着底稚貝は日令35で最初に確認され、着底直後と推定される稚貝の平均殻長は $1.2 \pm 0.1\text{mm}$ であった。着底稚貝の殻に残った幼殻の殻長組成を

Fig.58に示した。幼殻の平均殻長は $514.1 \pm 25.9 \mu\text{m}$ で、最小は $460 \mu\text{m}$ 、最大は $570 \mu\text{m}$ であった。

稚貝は幼殻縁辺から前方に大きく張り出す形で殻を形成し、軟体部では鰓弁および匍匐肢が発達していた。また閉殻筋に接して心臓および血管が形成されていた。着底稚貝は匍匐肢で活発に移動し、飼育装置底面の網目あるいは底面と壁面との境界等に粘液を分泌して体を固定していた。室内飼育群と海面飼育群の平均殻長の推移をFig.59に、外部形態をFig.60に示した。室内飼育群では稚貝の成長は速く、日令43（着底1週間後、Fig.60 A）の平均殻長は $6.2 \pm 1.8\text{mm}$ 、日令57（着底3週間後、Fig.60 B）では $16.3 \pm 4.5\text{mm}$ 、日令72（着底5週間後、Fig.60 C）では $26.0 \pm 5.5\text{mm}$ に達し、この間の平均日間成長量はそれぞれ $681.5$ 、 $845.9$ 、 $1212.6 \mu\text{m}$ であった。稚貝の匍匐行動は殻長 $15\text{mm}$ 前後から鈍化した。生残率は着底後約6週の日令75で $76.8\%$ となり、日令92まで斃死は見られなかった。しかしその後成長の停滞と斃死が発生し、日令118（着底約12週間後）の平均殻長は $37.6 \pm 3.7\text{mm}$ 、生残率は $71.6\%$ 、着底からの生残率は $55.0\%$ であった。衰弱した稚貝は外観的に消化盲嚢部の色調が淡くなり、外套膜が萎縮していた。

一方、海面飼育群では飼育開始時の平均殻長は $8.3 \pm 2.6\text{mm}$ で室内飼育群と差がなく、日令83で平均殻長が $31.7 \pm 1.9\text{mm}$ と室内飼育群をやや下回ったが生残率は $84.9\%$ であった。日令83から潜砂飼育に移行した30個体は良好な成長と生残を示し、日令133における平均殻長は $64.3 \pm 5.3\text{mm}$  (Fig.60 D) となり、この間の生残率は $100\%$ であった。

#### 卵磨砕物および餌料藻類の化学成分

分析結果をTable 5,6に示した。マガキ、タイラギおよびマダカアワビ成熟卵から調製した3種の卵磨砕物のアミノ酸組成は、マガキではグルタミン酸、フェニルアラニンおよびアスパラギン酸がそれぞれ $13.1$ 、 $10.4$ および $9.7\%$ 、タイラギではグルタミン酸、アスパラギン酸およびタウリンがそれぞれ $13.5$ 、 $10.5$ および $9.7\%$ と高かった。マダカアワビではタウリン、グルタミン酸およびアスパラギン酸がそれぞれ $13.4$ 、 $12.2$ および $8.4\%$

であった。脂肪酸組成についてみると、マガキでは飽和脂肪酸総量が $40.4\%$ 、モノエン酸総量が $15.4\%$ 、不飽和脂肪酸総量が $34.2\%$ であり、リノール酸、EPAおよびDHAはそれぞれ $1.2$ 、 $13.7$ および $12.8\%$ であった。タイラギでは飽和脂肪酸総量が $33.4\%$ 、モノエン酸総量が $16.4\%$ 、不飽和脂肪酸総量が $8.0\%$ であり、リノール酸、EPAおよびDHAはそれぞれ $1.2$ 、 $2.8$ および $0.9\%$ であった。マダカアワビでは飽和脂肪酸総量が $33.3\%$ 、モノエン酸総量が $17.7\%$ 、不飽和脂肪酸総量が $8.1\%$ であり、リノール酸、EPAおよびDHAはそれぞれ $0.6$ 、 $0.5$ および $0.05\%$ 未満であった。*C. gracilis*では飽和脂肪酸総量が $15.7\%$ 、モノエン酸総量が $21.8\%$ 、不飽和脂肪酸総量が $1.8\%$ であり、リノール酸、EPAおよびDHAはそれぞれ $0.4$ 、 $11.5$ および $0.5\%$ であった。*P. lutheri*では飽和脂肪酸総量が $16.4\%$ 、モノエン酸総量が $16.8\%$ 、不飽和脂肪酸総量が $3.6\%$ であり、EPAおよびDHAはそれぞれ $21.3$ および $4.4\%$ で、リノール酸は検出されなかった。アミノ酸組成では、タイラギおよびマダカアワビでタウリンの含有率が高かった。脂肪酸組成ではマガキおよびタイラギでリノール酸含有率が、マガキ、*C. gracilis*、および*P. lutheri*でEPA含有率が、マガキでDHAの含有率が高かった。

## 考察

タイラギの種苗生産は浮遊幼生から稚貝に至る飼育に成功した2例についても、得られた稚貝数が数十個体（明楽1998）あるいは10個体（川原ら2004）に止まっており、量産が極めて困難な種として位置付けられてきた。上記の2例を含む過去の試験結果では、浮遊幼生が飼育水の表面に浮かび上がって斃死する現象が大量減耗の主要因とされており（明楽1998；濱本・大林1984；伊東ら1986；川原ら2004；松田ら1998；吉田1964）、浮遊幼生の浮上を防止する方法を開発することが飼育上の主要な改良点とされてきた。しかし、浮遊幼生の大量減耗が発生する殻長サイズや餌料条件等については他の二枚貝類と同様に扱われ、

格別の関心が払われることはなかった。

著者らによる本種のこれまでの飼育例（大橋ら2004, 2005）では、D型期幼生の終期と考えられる殻長110 $\mu$ m前後で全滅状態に陥ったが、他の報告からもほぼ同様の状況であることが推察された（伊東ら1986；中川・木藪2002；中川・平川2003,2004,2005；小川・井本1995,1996；山賀2000）。濱本ら（濱本・大林1984）は殻長110 $\mu$ m前後で全滅する現象について、浮上現象による斃死を主要因としながらも餌料の栄養価値にも疑問を投じている。この殻長サイズはD型期から殻頂期への変態期にあたり、クマサルボウガイでも大量斃死や成長停滞が発生する（大橋2003）。クマサルボウガイではこの時期は卵黄吸収の終了期にあたるということが明らかになっており（大橋2003）、この時期にマガキ成熟卵から調製した卵磨砕物を経口的に補給することで安定した成長と高い生残率を得ることが可能である（大橋ら2007）。今回のタイラギ浮遊幼生の飼育実験においてはクマサルボウガイ浮遊幼生で得られた結果を応用し、マガキ卵から調製したものを主とする卵磨砕物（大橋2006 a,b）の添加を試みたところ種苗生産実験では稚貝の生産に至った。添加効果の検討実験では、稚貝の生産には至らなかったものの日令13における生残率に差が見られ殻長も日令7以降有意差が見られた。種苗生産実験ではタイラギ浮遊幼生の減耗は殻頂期初期の日令8までが最も大きく、卵磨砕物の添加効果の検討実験においても対照区が日令13までに24.2%まで減耗した。これは、クマサルボウガイ浮遊幼生で見られた大量斃死と成長阻害現象の発生時期と類似していた。これらの結果からタイラギにおいてもクマサルボウガイと同様な問題が存在していた可能性が高いと考えられ、卵磨砕物の添加によって殻頂期幼生への移行が正常に進行した個体の増加がその後の生残に寄与し、種苗生産実験では従来と比較してより多くの着底稚貝を得る結果に至った可能性が高いと考えられた。用いた3種の卵磨砕物は、アミノ酸組成ではタウリン含有率が高く、脂肪酸組成ではリノール酸、EPA、DHAの含有が確認された。タウ

リンは、魚類種苗生産において成長および飢餓耐性への効果が確認されており（陳ら2004,2005）、リノール酸はエゾアワビの飢餓耐性に関与することが報告されている（Fukazawa et al 2005）。EPA、DHAは餌料藻類の栄養価の指標となっている（押尾ら1995）。マガキおよびタイラギ卵磨砕物のリノール酸含有率は*C. gracilis*の約3倍を示し、マガキ卵磨砕物のEPA含有率は、*C. gracilis*、および*P. lutheri*より低かったが、DHA含有率は高かった。これらのことから用いた卵磨砕物は良好な栄養源であったと考えられた。ただ、種苗生産実験では稚貝に成長した割合は0.04%であり、卵磨砕物の効果の検討実験においても殻頂期までの生残率は向上したが、その後に成長が停滞して減耗し稚貝の生産には至らなかった。クマサルボウガイ（大橋ら2005a,2006）やイワガキ（大橋ら2005b）で卵磨砕物を添加して行った種苗生産では、殻頂期に成長した後は大きな減耗が見られず良好な成績を得ていることから、タイラギに対する卵磨砕物による栄養強化は殻頂期までの成長には効果を示したが、その後は効果が不十分であったと考えられた。これまでの種苗生産実験では、殻頂期以前に大きく減耗する事例が多く示されており（稚山・前川1963；濱本・大林1984；伊東義信ら1986；松田ら1998,1999；大橋ら2004,2005）殻頂期幼生への成長率の向上が今回の稚貝の生産に寄与したことは明らかであると考えられたが、殻頂期に発生する成長停滞の解消および成長促進の方法については今後の検討が必要である。

着底時の幼殻長および着底までの幼生の飼育期間について、本種は他の二枚貝類に比較すると非常に大型で長期間であるとされている。室内飼育実験における着底可能な幼殻長は600~700 $\mu$ mと報告されているが（川原ら2004）、天然稚貝の調査から得られた結果では殻長444~940 $\mu$ mと幅があることが示唆されている（島崎ら1985）。今回得られた人工稚貝の着底時の幼殻長は既報（明楽1998,川原ら2004）に比較するとかなり小型であったが、天然稚貝から得られた値の範囲内にあり、得られた稚貝の個体数から見ても正常な着底が行

われたと考えられた。川原ら（2004）はタイラギ幼生が日令33以降殻長600 $\mu$ mを越えても着底しないことについて、ムラサキイガイの幼生で見られるような変態に一定の準備期間を必要とする現象との類似、および餌料の栄養面の影響の双方の可能性を論じている。今回の結果ではより小型の浮遊幼生が日令35で着底しており、ムラサキイガイ浮遊幼生との類似性が関与している可能性は低く、餌料の栄養面の影響が大きいと考えられた。また今回の飼育で日令25から発生した成長停滞を防止することができれば、着底までに要する期間はさらに短縮できる可能性があると考えられた。

稚貝の着底基質に関して、潜入する基質がない場合や基質に泥を用いた場合に斃死が見られたことから、稚貝の生残に基質の有無や種類が影響する可能性が指摘されている（川原2004）。しかし、今回得られた稚貝は潜入できない状態で殻長20mm前後まで飼育した期間（39日間）の生残率が76.8%を示し、少なくとも限られた期間の飼育では基質の有無が生残へ与える影響は小さいと考えられた。報告例が少なく実験条件も異なることから今後さらに検討する必要があるが、初期稚貝は小型で殻が薄く、基質に潜入させると回収が困難であることが報告されており（明楽1998）、生残に大きな影響を与えないのであれば、種苗生産の工程上は一定のサイズまで潜入基質を用いなくて飼育する方法がより実用的であると考えられた。ただ、殻長15mm前後から見られた匍匐行動の鈍化や、海面飼育群に見られた潜砂飼育開始後の良好な成長、生残を考慮すると、タイラギ稚貝の潜砂特性はその後の成長、生残に有利に働くと考えられた。したがって人為的な取り扱いに耐える殻長サイズを考慮したうえで、なるべく早く基質に潜入させる飼育方法の検討が今後必要であろう。

イワガキやクマサルボウガイでは、今回のタイラギと同様な餌料条件で2ヶ月程度飼育してもタイラギ稚貝に発生したような顕著な成長停滞や斃死の発生は見られない。このことは成長が極めて速いタイラギ稚貝の飼育に、人工的に生産される

餌料藻類のみを用いることは栄養的に問題があることを示唆しているのかもしれないし、別の要因が関与している可能性も否定できない。今後実用レベルのタイラギ種苗生産を可能にするには餌料の質の改善を行い、室内飼育期間を短縮し早期に海面を利用する方法などを組み合わせるなどして稚貝の効率的な飼育方法を確立する必要があると考えられた。

**Table 5.** Amino acid compositions of crushed mature ova of *Crassostrea gigas*, *Atrina pectinata*, and *Haliotis madaka* (%)

	<i>C. gigas</i>	<i>A. pectinata</i>	<i>H. madaka</i>
Taurine	6.8	9.7	13.4
Aspartic acid	9.7	10.5	8.2
Threonine	4.6	4.3	5.7
Serine	5.4	4.9	4.5
Glutamic acid	13.1	13.5	12.2
Proline	3.9	3.4	4.4
Glycine	4.2	3.8	3.5
Alanine	3.8	0.0	5.1
Cystine	0.8	8.5	1.1
Valine	4.6	4.3	5.1
Methionine	2.7	2.6	2.5
Isoleucine	4.3	4.0	4.5
Leucine	6.8	6.3	7.4
Tyrosine	3.3	3.3	3.3
Phenylalanine	10.4	5.7	4.2
Histidine	2.4	2.4	2.0
Lysine	7.3	7.7	6.5
Arginine	5.8	5.1	6.4
Total	100.0	100.0	100.0

**Table 6.** Fatty acid compositions of crushed mature ova of *Crassostrea gigas*, *Atrina pectinata*, and *Haliotis madaka*, and the 2 species of microalgae *Chaetoceros gracilis* and *Pavlova luthri* (%).

	<i>C. gigas</i>	<i>A. pectinata</i>	<i>H. madaka</i>	<i>C. gracilis</i>	<i>P. luthri</i>
C14:0	4.9	2.6	8.3	11.4	7.0
C15:0	0.5	*	*	0.2	*
C16:0	29.6	23.1	22.9	3.6	8.7
C17:0	0.8	*	*	* <sup>1</sup>	*
C18:0	3.2	7.6	2.1	0.4	0.7
C20:0	1.5	0.1	0.1	0.1	*
Total Saturated	40.4	33.4	33.4	15.7	16.4
C16:1n7	7.0	4.9	5.4	21.3	15.1
C18:1n9	3.7	4.1	0.3	0.2	*
C18:1n7	4.4	6.2	9.3	0.3	1.7
C20:1n11	*	*	*	*	*
C20:1n7	*	*	*	*	*
C20:1n9	0.3	1.2	2.7	*	*
Total Monoenoic	15.4	16.4	17.7	21.8	16.8
C18:2n6	1.2	1.2	0.6	0.4	*
C18:3n6	*	*	*	*	*
C20:2n6	2.3	trace	*	*	*
C20:4n6	0.6	2.0	4.5	0.5	*
n-6 series	4.1	3.2	5.1	0.9	*
C18:4n3	3.2	0.8	0.1	0.5	*
C20:4n3	0.4	0.2	0.3	*	*
C20:5n3	13.7	2.8	1.5	11.5	21.3
C22:5n3	trace <sup>2</sup>	0.1	1.1	0.1	*
C22:6n3	12.8	0.9	trace	0.5	4.4
n-3 series	30.1	4.8	3.0	12.6	25.7
Total Polyenoic	34.2	8.0	8.1	13.5	25.7

<sup>1</sup> Not detected. <sup>2</sup> Trace amounts under 0.05%.



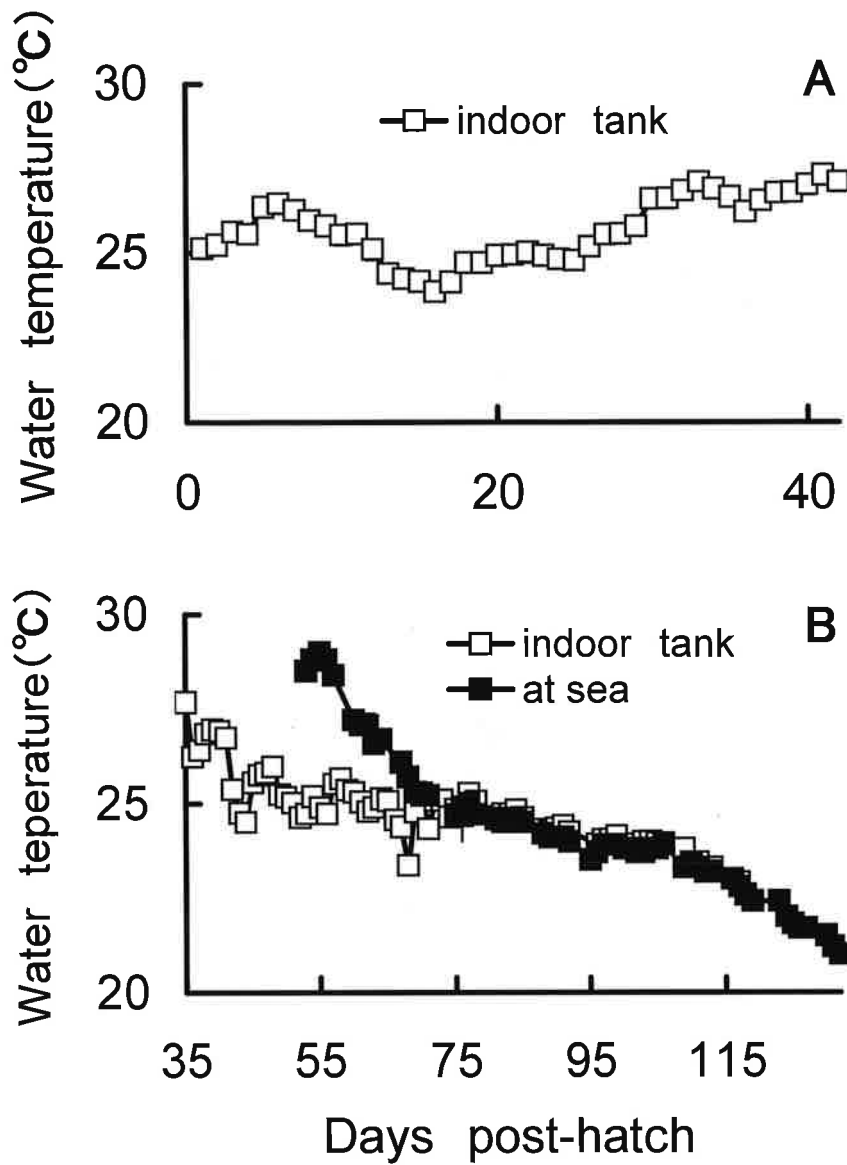


Fig. 50. Water temperature during larval (A) and juvenile (B) rearings of the pen shell *Atrina pectinata*. Open and closed squares represent indoor rearing and rearing at sea, respectively (mean  $\pm$  SE).

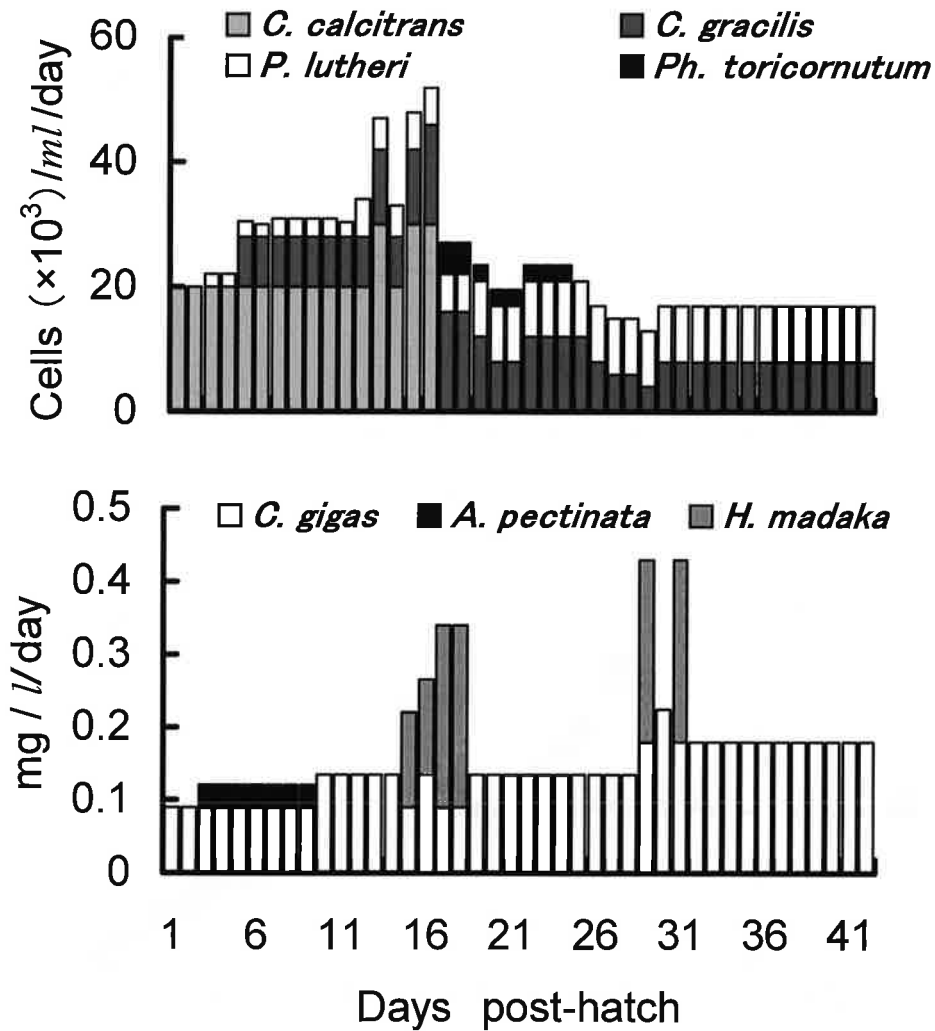


Fig. 51. Feeding regimen for the pen shell *Atrina pectinata* during larval rearing on microalgae and crushed mature ova.  
*C. calcitrans*; *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis*; *Chaetoceros gracilis*,  
*P. lutheri*; *Pavlova lutheri*, *Ph. toricornutum*; *Phaeodactylum toricornutum*,  
*C. gigas*; *Crassostrea gigas*, *A. pectinata*; *Atrina pectinata*, *H. madaka*; *Haliotis madaka*.

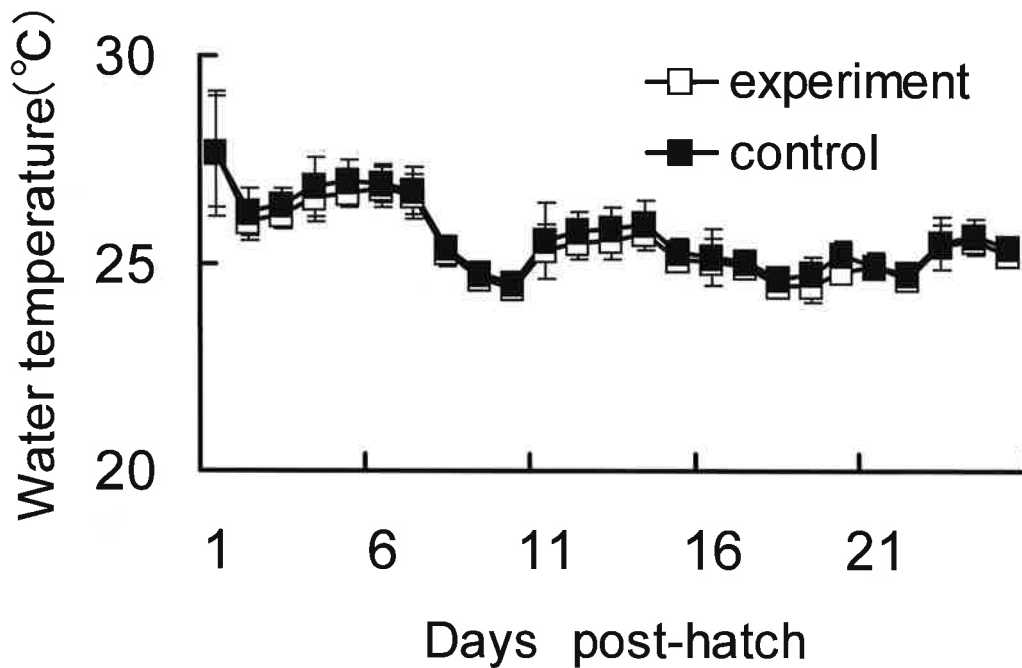


Fig. 52. Water temperature in experimental larval rearing tanks of the pen shell *Atrina pectinata* fed with algae supplemented with crushed mature ova and algae only (mean  $\pm$  SD) .

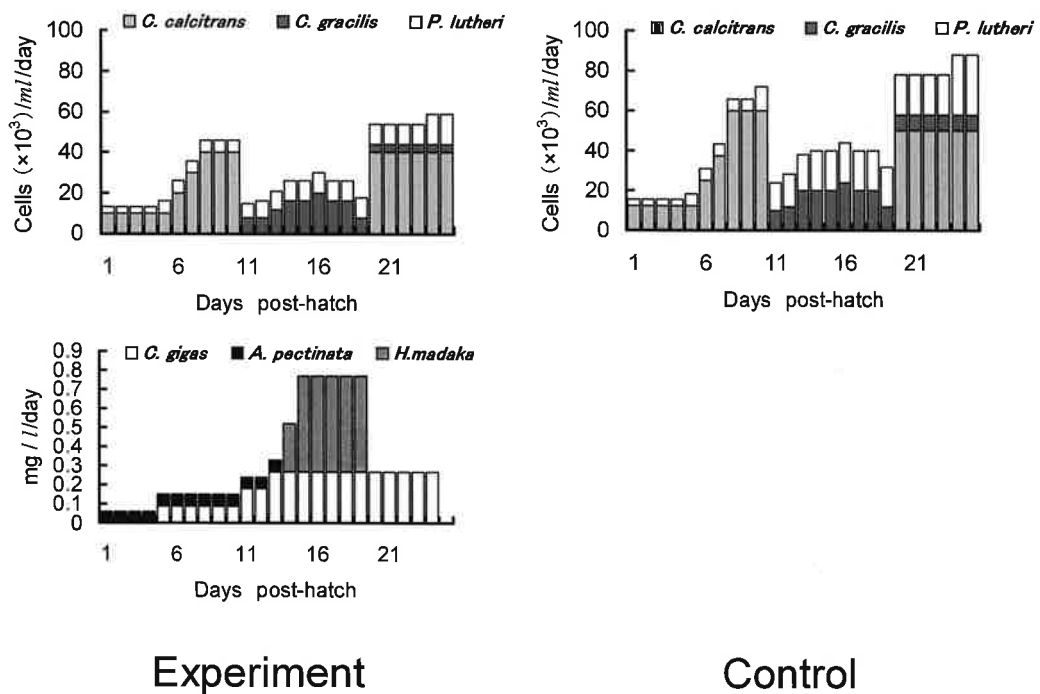


Fig. 53. Feeding regimen for the pen shell *Atrina pectinata* in the experimental (left) and control (right) .  
*C. calcitrans*; *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis* ; *Chaetoceros gracilis*, *P. lutheri* ;  
*Pavlova lutheri*, *Ph. toricornutum* ; *Phaeodactylum toricornutum* , *C. gigas*; *Crassostrea gigas*  
*A. pectinata*; *Atrina pectinata*, *H. madaka*; *Haliotis madaka* .

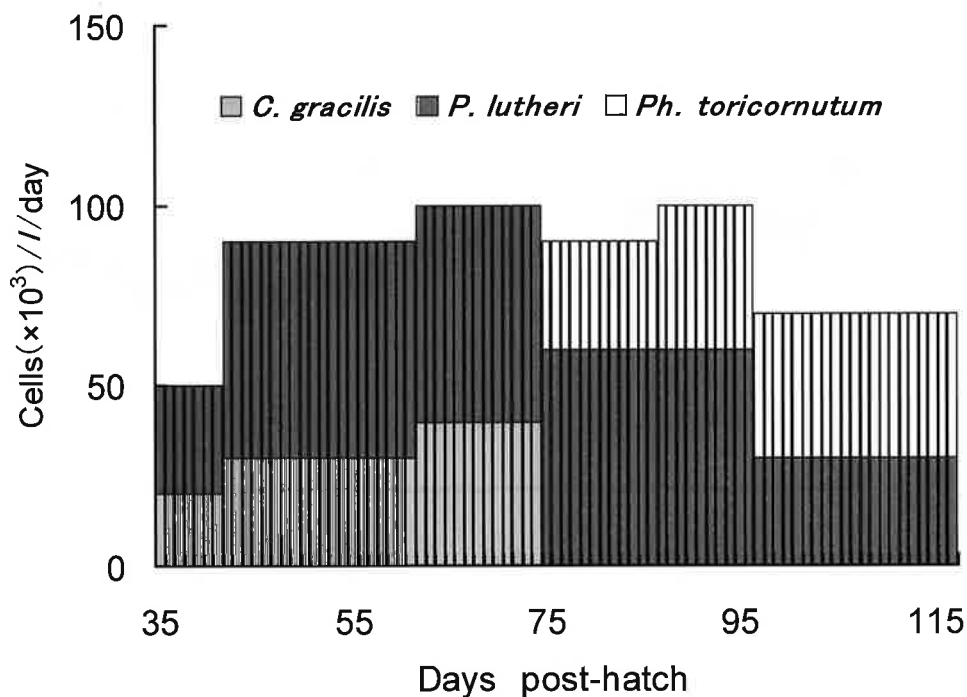


Fig. 54. Feeding regimen for the pen shell *Atrina pectinata* during juvenile rearing on microalgae. *C. calcitrans*; *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis*; *Chaetoceros gracillis*, *P. lutheri*; *Pavlova lutheri*, *Ph. toricornutum*; *Phaeodactylum toricornutum*.

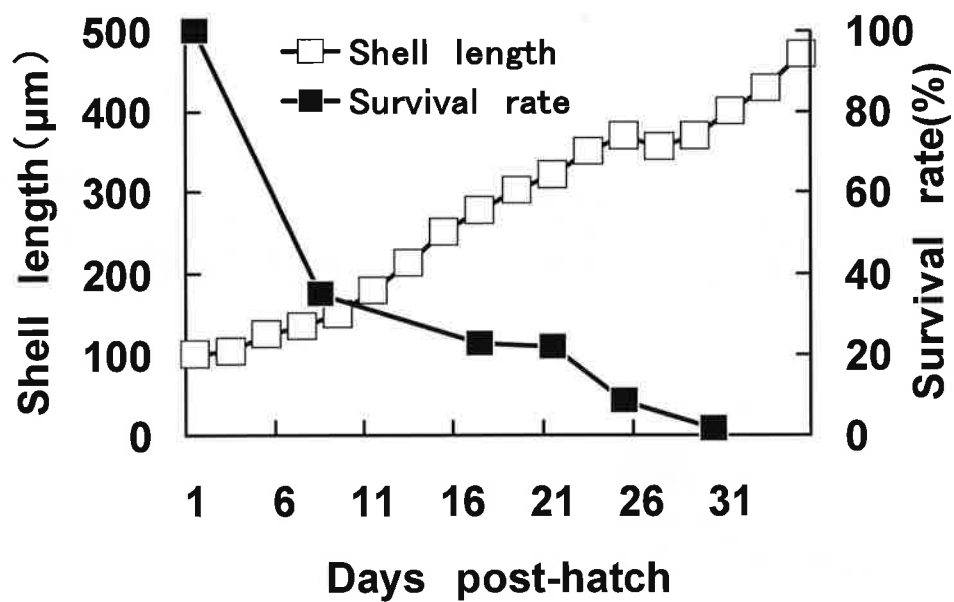


Fig. 55. Changes in growth and survival rate during larval rearing of the pen shell *Atrina pectinata*. Open and closed squares represent shell length and survival rate, respectively.

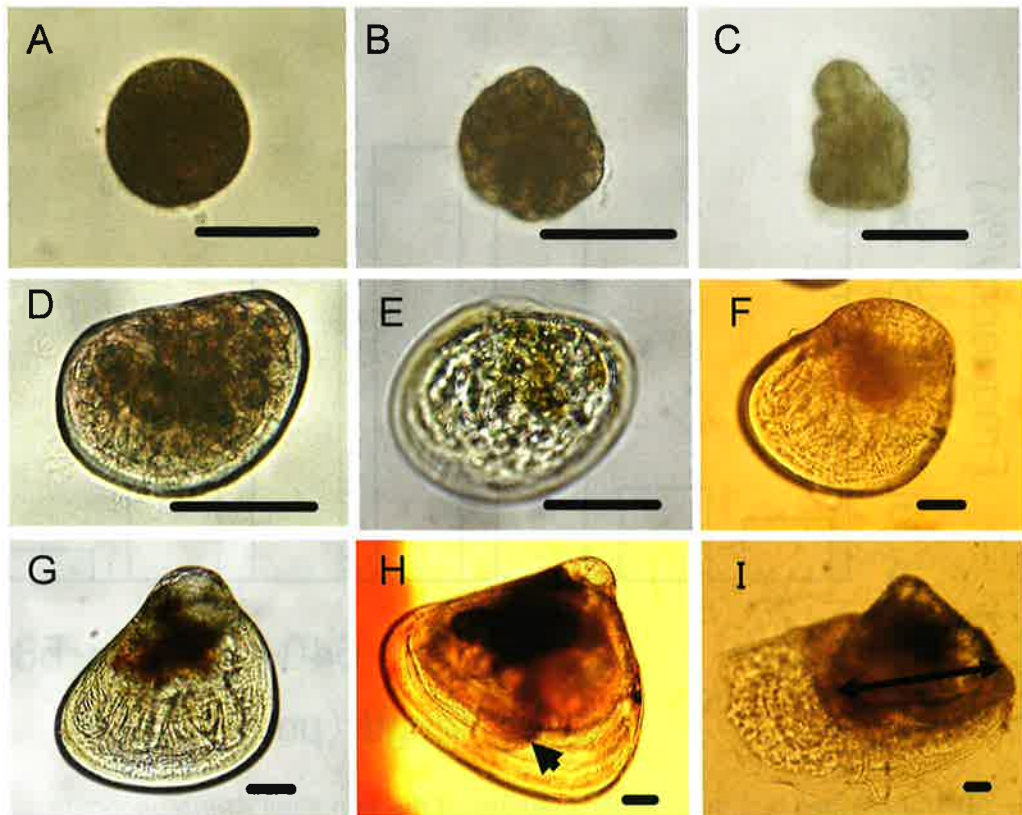


Fig. 56. Light micrographs showing the fertilized egg, larvae and juveniles of the pen shell *Atrina pectinata* at different developmental stages. A; A fertilized egg. B; A trochophore larva. C; A trochophore larva undergoing metamorphosis. D; A D-shaped larva. E-G; Umbo-stage larvae. H; A settlement-stage larva. Primitive pedal organ (arrow) was observed. I; A newly settled juvenile. Arrow-line indicates larval shell length. Scale bars=50  $\mu$ m.

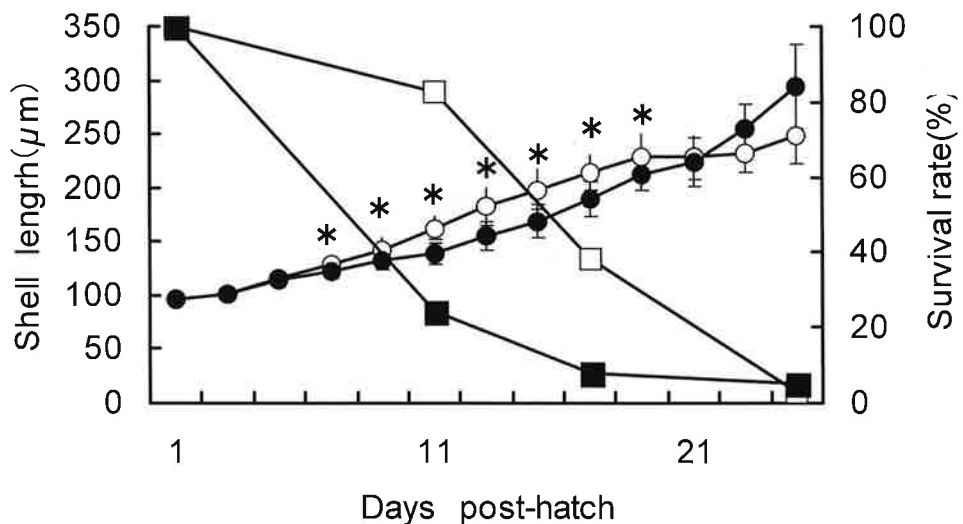


Fig. 57. Changes in growth and survival rates during rearings of experimental (open) and control (closed) larvae of the pen shell *Atrina pectinata*. Circles represent shell length (mean  $\pm$  SD) and squares represent survival rate. \* means significant difference by *t*-test ( $p < 0.05$ ).

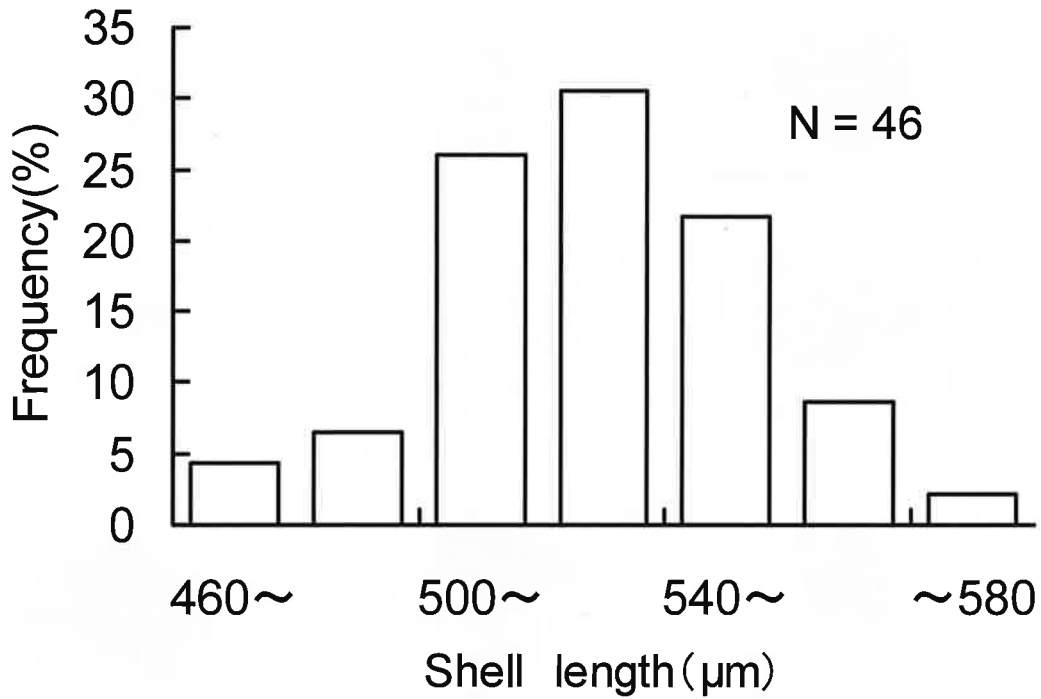


Fig. 58. Larval shell length in early juveniles of the pen shell *Atrina pectinata*.

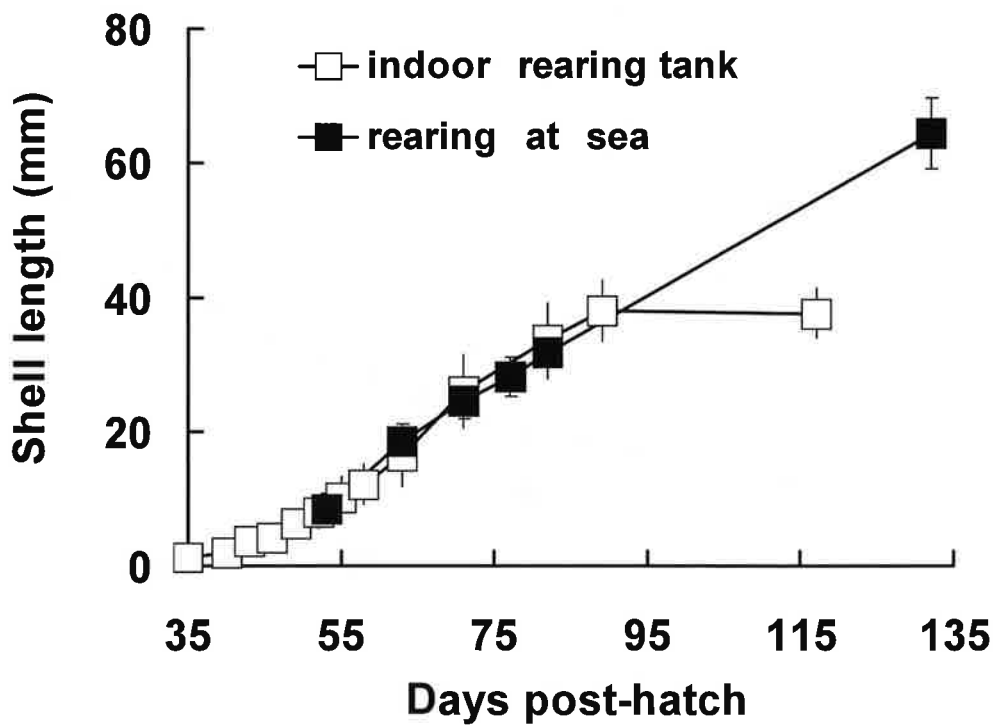


Fig. 59 Growth of juveniles of the pen shell *Atrina pectinata* in the indoor rearing tank and suspended container at sea. Open and closed squares represent the indoor rearing tank and rearing at sea, respectively (mean  $\pm$  SD).

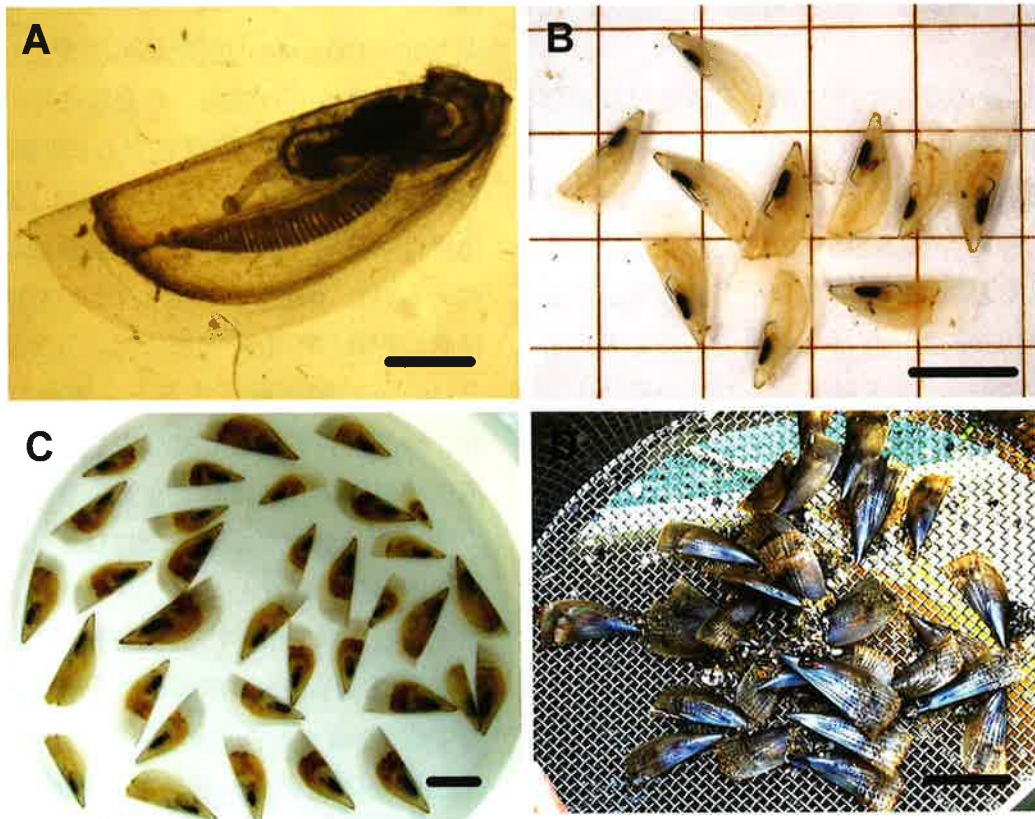


Fig. 60. Juveniles of the pen shell *Atrina pectinata* at different size distinction. A;43days post-hatch. Scale bar =1mm. B; 57days post-hatch. Scale bar =10mm. C;72days post-hatch. Scale bar =10mm. D; 133days post-hatch. Scale bar =50mm.

### 第3章 総合考察

#### (1) 二枚貝4種の浮遊幼生における器官形成過程の組織学的特徴

##### 卵黄顆粒の消長

いずれの種も発生開始から日令2程度までは体組織のほとんどの細胞に卵黄顆粒が見られ、器官形成は卵黄栄養によって進められていると考えられた。一方で卵黄顆粒を消費する期間は種によって異なり、イワガキやクマサルボウでは日令5まで卵黄顆粒が確認できたが、タイラギやトリガイでは日令2でほぼ消失した。しかしこの間に到達する殻長は4種とも100~105 $\mu\text{m}$ とほぼ同じであり、クマサルボウガイで行った無給時実験でも100 $\mu\text{m}$ で成長が停止したことから、卵黄顆粒の栄養によって進められる器官形成の進捗の度合いは同程度であると考えられた。ただ、イワガキやクマサルボウガイでは餌料摂取と卵黄栄養を併用する期間が長く、この間に十分量の適した栄養の摂取ができるか否かは殻頂期幼生への変態・成長に大きく影響すると考えられた。タイラギは餌料摂取と卵黄栄養を併用する期間は短い但其後も急速に成長する。一方で消化器官の発達過程は卵黄吸収の遅い種類と大きな差はなく、速い成長を維持するためには十分量の適した栄養の摂取が必要であることを示唆していると考えられた。このことは殻頂期幼生への変態・成長に餌料栄養が支配的に関わっていると考えられ、他の種類に比較して飼育が困難な要因の一つであると考えられた。トリガイは卵黄消費後すみやかに桿晶体が形成されることで餌料の消化能力が上昇すると考えられ、このことが栄養源として利用できる餌料の幅を広げていると推察された。その結果、適応できる餌料環境が広がり、上記3種でみられるような殻頂期への変態・成長時の減耗をおこさない理由と考えられた。

##### 消化管形成過程の比較

イワガキ、クマサルボウガイ、タイラギ、トリガイの浮遊幼生は、いずれも50~60 $\mu\text{m}$ の受精

卵からトロコフォア幼生で孵化し、孵化後約24時間で70~100 $\mu\text{m}$ のD型期幼生に変態した。トロコフォア幼生からD型期への変態に伴い、いずれの貝類も原口陥入を始点とする消化管腔の形成によって消化管原基が形成されたが、変態直後の消化管は未発達で摂餌による栄養摂取はできないと考えられた。特にトリガイではD型期初期にも消化管の形成は不十分であった。日令2~3、殻長90~110 $\mu\text{m}$ 前後に成長すると、消化管から消化盲囊、桿晶体囊が膨出して形成され、餌料の摂取と消化が組織学的に確認できるようになった。イワガキ、クマサルボウガイではD型期から消化盲囊の発達が著しく進んだが、タイラギ、トリガイは前述する2種に比較すると発達が後れた。ただトリガイでは桿晶体の形成がこの時期に確認された点で他の3種と大きく異なった。いずれの種も殻長120 $\mu\text{m}$ に達すると殻頂部が膨出し殻頂期幼生への変態が開始された。殻頂期への移行期には器官形成的には大きな変化は見られなかったが、イワガキ、クマサルボウガイ、タイラギは殻長150 $\mu\text{m}$ に達すると桿晶体の形成が桿晶体囊内に確認され、消化盲囊の発達が進んだが、トリガイでは桿晶体の発達が著しかった。イワガキ浮遊幼生の組織学的観察結果からD型期幼生は当初胃を栄養吸収の主体とするが成長に伴い消化盲囊が発達し、殻頂期幼生に成長するとその体積比が逆転して、消化盲囊が主たる消化・吸収器官となることがわかった。また、この時期は同時にトリガイを除く3種において桿晶体が形成される時期にあたり、桿晶体の出現によって増大した消化能力と消化盲囊の発達が相まって成長促進に有効に機能すると考えられた。トリガイは桿晶体が早期に発達したが一方で消化盲囊の発達はやや後れ、他の3種類とは異なる発達の様相を示した。このことは分類上翼形亜綱に分類されるイワガキ、クマサルボウガイ、タイラギに対してトリガイは異歯亜綱に分類されていることから（波部ら、1994）進化の過程でより効率的な消化吸收方法を獲得したためと考えられ、このことがトリガイの非常に早い成長を可能にしていると考えられた。この点で



タイラギの成長と消化器官の形成過程の関連をみると、本種の消化器官の形成はイワガキやクマサルボウガイと異なるところがなく、速やかな成長は餌料環境やその他の要因に依存していると考えられた。このことがこれまで同種の種苗生産が困難であった主な理由かもしれない。

### 脂肪滴の蓄積

消化管上皮細胞への脂肪滴の蓄積は摂餌の開始とほぼ同時にいずれの種でも確認された。この脂肪滴の蓄積は、脂質以外の栄養素の吸収も同時に進行していることを示すものと考えられる。D型期には主に胃上皮細胞に脂肪滴の蓄積がみられ、その後消化盲嚢の発達に伴って消化盲嚢上皮細胞へも脂肪滴の蓄積が進んだ。クマサルボウガイでは、卵磨砕物による栄養強化の結果、脂肪滴の含有量に有意な差を確認しており脂肪滴の蓄積は幼生の殻頂期への変態・成長に深く関わっていると考えられた。脂肪滴の蓄積は、組織観察においていずれの種も着底変態まで増加していると考えられることから、蓄積栄養として着底・変態にも関与するものと考えられる。脂肪滴の染色性は卵黄顆粒の1つの型に類似しておりその構成成分は卵黄に類似している推察された。また、イワガキ、クマサルボウガイ、タイラギの脂肪滴は同様な染色性を示し構成成分が類似すると考えられた。従来、脂肪滴については組織学的な観察による記載はあるものの(Bower and Meyer 1990; 藤村ら1995)その機能や成分組成についてはこれまで全く論議されていない。今後はさらに詳細な機能や成分組成について検討を進める必要がある。

## (2) 組織学的知見の種苗生産への応用

### 卵磨砕物の利用

第1章における4種の有用二枚貝浮遊幼生の器官形成過程の比較から、いずれの浮遊幼生もD型期終了までに卵黄吸収と餌料摂取が同時に行われる時期を有し、トリガイを除くとこの時期に生じる卵黄栄養の不足とそれに伴う器官形成、とりわけ消化器官の形成が影響され栄養吸収の不足によっ

て殻頂期幼生への成長・変態が阻害され大量減耗に至ると考えられた。また、トリガイを除く3種では殻頂期に桿晶体を獲得することがその後の速やかな成長を支えていると考えられた。これまで原因不明であったD型期から殻頂期に発生する減耗(団ら,1983)は、卵黄栄養の枯渇と本来それを補うに足る経口的栄養摂取の不足が要因であると考えられた。一方、受精卵あるいは初期幼生の観察によって、イワガキ、クマサルボウ、タイラギの成熟卵は染色性の異なる2種の卵黄顆粒で構成されることがわかった。トリガイについては卵の組織観察を行っていないため比較ができなかったが、トロコフォア幼生の体組織にみられた卵黄顆粒は他の3種と同様に2種の卵黄顆粒で構成されていることから、ほぼ同様の構成を示すと推察された。この卵黄顆粒は直径が0.5~1 $\mu$ mの球形で、初期幼生の栄養吸収器官である胃上皮細胞によって取り込むことができると期待された。また、染色性が類似することから同種卵ではなくても同様の効果があることが期待された。このため大量入手が可能なマガキ成熟卵を圧搾磨砕し卵膜を除去して得られた卵黄顆粒(卵磨砕物)を浮遊幼生の添加餌料として用いることを試みたところ、クマサルボウガイでみられた殻頂期への移行期に発生する斃死現象に対して有効であり、種苗生産が困難なタイラギにおいても同様な効果によると考えられる生残・成長の向上が認められた。このことは、これまで十分に解明されていなかった浮遊幼生の器官形成過程上の特性が明らかにされ、種苗生産の成績を向上させるための対応が可能になった事例と考えられる。マガキとタイラギの卵磨砕物の化学成分を比較するとアミノ酸組成は、マガキではグルタミン酸、フェニルアラニンおよびアスパラギン酸が、タイラギではグルタミン酸、アスパラギン酸およびタウリンが多く、脂肪酸組成ではマガキでリノール酸およびDHAが、タイラギではリノール酸が餌料藻類より多かった。餌料藻類にはタウリンやリノール酸はほとんど含まれず、これまで栄養価の指標とされてきたDHAとEPAの含有量のみでは餌料の質は確保できない

と考えられる。今後は、これらの知見をもとに対象とする二枚貝浮遊幼生のさらに詳細な栄養要求を解明し、効果の高い添加餌料を開発する必要があると考えられる。

### 種苗生産技術への形態学的、生理学的知見の応用の必要性

二枚貝浮遊幼生に限らず消化器官の発達と栄養摂取は密接に関係している。特に幼稚仔では体諸器官の機能が未発達であるために成長に伴う変化の影響を受けやすい。魚類稚仔魚では体諸器官の発達と栄養要求との関連に関する知見が多くみられる。しかし、貝類については浮遊幼生期の器官形成についてほとんど報告がなく、種苗生産現場では各消化器官の発達状態も不明なまま飼育を行っている現状にある。その一方で種苗生産の成績判定は餌料藻類の栄養価のみに依存し、種苗生産工程における大量減耗が餌料培養の良否で結論付けられる事例が多くみられる。餌料藻類の栄養価についてもDHAおよびEPA含量以外の判定基準は検討されておらず、実際には培養餌料においてこの栄養価を正しく判定しながら利用することは不可能に近い。この点でも貝類の種苗生産は不適切な指標に基づいて問題解決を図ることを余儀なくされており、魚類種苗生産に比較して方法論的にも技術的にも大きく後れていると言わざるを得ない。今後は他の有用種についてもさらに詳細な諸器官の構造や機能の解明を進め、形態学的、生理学的基礎に立つ二枚貝類の種苗生産技術を確立することが必要であろう。

### 謝辞

本研究をまとめるにあたり、原稿の御校閲をいただき終始御指導頂いた長崎大学水産学部教授吉越一馬博士に厚く感謝の意を表す。また、原稿の御校閲をいただき有益な御助言を賜った長崎大学水産学部教授北村等博士、金井欣也博士ならびに准教授Cyril Glenn Satuito博士に深謝の意を表す。

本研究の機会を与えてくださった元長崎県総合水産試験場長小坂安廣氏、濱口博彦氏、ならびに同総合水産試験場長池田修二氏、同総合水産試験場次長池田義弘氏、研究を進めるにあたり有益な御助言と協力をいただいた同水産部漁政課参事藤井明彦博士、東京海洋大学准教授大迫一史博士、労を惜しまず御協力をいただいた同総合水産試験場介藻類科塚原淳一郎科長、桐山隆哉主任研究員、岩永俊介主任研究員ならびに介藻類科職員一同、宮城県水産研究開発センター松浦裕幸研究員、同雄勝町雄勝湾漁業協同組合千葉勝昭課長、長崎市佐世保市水産センター新山洋主任技師に心からお礼申し上げます。また有益な助言と御指導をいただいた独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所清本節夫主任研究員、同瀬戸内海区水産研究所浜口昌巳室長、同西海区水産研究所前野幸男室長、(株)田崎真珠海洋生物研究所長鬼木浩所長、同あこや研究開発室北原研司課長ならびに神奈川県環境農政部水産課滝口直之副技幹に深謝する。

最後に本研究の一部は農林水産省農林水産技術会議 先端技術を活用した農林水産研高度化事業「大型二枚貝タイラギの環境浄化型養殖技術の開発」によったことを記して感謝の意を表す。

### 参考文献

- 明楽晴子 (1998) タイラギの種苗生産の技術開発について. うみうし通信, 18, 8-9.
- 稚山展志・前川兼佑 (1963) タイラギ *Atrina pectinata japonica* (REEVE) その他二枚貝の人工採苗に関する予察的研究. 山口内海水試調研業績, 13 (1), 81-91.
- Bower, S.M. and G.R.Meyer (1990) Atlas of anatomy and histology of larvae and early juvenile stages of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 111, pp. 51.
- 団勝磨・関口晃一・安藤裕・渡辺浩 (1983) 無脊椎動物の発生 (上), 培風館, 東京 pp.333-342.
- Elston, R and Leibovitz, L. (1980) Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American

- oyster, *Crassostrea vieginica*. *Can. J. Aquat. Sci.*, 37, 964-978.
- Elston, R (1981) dinosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic : diagnostic tools and management futures. *Aquaculture*, 24, 53-62
- Folch, J., M. Lee and G. H. S. Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem* 226, 497-509.
- 藤村卓也・和田浩爾・岩城俊昭 (1995) アコヤガイ幼生の消化器官系の発達. *VENUS* 54 3, 203-223.
- Fukazawa, H., H. Takami, T. Kawamura and Y. Watanabe (2005) The effect of egg quality on larval period and postlarval survival of an abalone *Haliotis discus hannai*. *J. Shellfish Res.*, 24, 1141-1147.
- 藤原正夢・上野陽一郎・岩尾敦志 (1993) トリガイ浮遊幼生の斃死要因と考えられる *Vibrio* 属細菌について. *魚病研究* 28 (2) 83-90
- Guillard, R. R. L. and Ryther, D (1962) Studies of Marine Planktonic Diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *detonula cofervacea* (cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8, 229-239
- 波部忠重・奥谷喬司・西脇三郎 (1994) 軟体動物学概説 (上巻). サイエンティスト社, 東京, pp. 87-122.
- 濱本俊策・大林萬鋪 (1984) タイラギの人工採卵と幼生飼育に関する問題点. *栽培技研*, 13 (2) , 13-27.
- 異儀田和弘・北島博郷・伊東義信 (1977) クマサルボウ *Scapharca globosa* (REEVE) の幼生および稚貝の飼育と形態について. 昭和51年度佐賀水試業務報告書, 19-26.
- 石田稔 (1994) トリガイ種苗生産, 平成4年度愛媛県中予水産試験場事業報告書, 63-64.
- 石田稔 (1995) トリガイ種苗生産, 平成5年度愛媛県中予水産試験場事業報告書, 63.
- 伊東義信・野田進治・伊藤史郎 (1986) タイラギ種苗生産試験. 昭和55~58年度佐賀県栽培センター事業報告, 28-41.
- 岩尾敦志・西広富夫・藤原正夢 (1991) トリガイ養殖の可能性について. 京都海洋センター研報, 14, 14-19.
- 岩尾敦志・藤原正夢・藤田真吾 (1993) トリガイ養殖に関する研究-I. 京都海洋センター研報, 16, 28-34.
- 岩尾敦志・西広富夫・藤原正夢 (1995) トリガイ養殖に関する研究-II. 京都海洋センター研報, 18, 57-61.
- 岩尾敦志・西広富夫・藤原正夢 (1998) トリガイ養殖に関する研究-III. 京都海洋センター研報, 20, 25-28.
- 岩尾敦志・藤原正夢 (2000) トリガイ養殖に関する研究-IV. 京都海洋センター研報, 22, 10-14.
- 川原逸郎・山口忠則・大隈斉・伊藤史郎 (2004) タイラギ浮遊幼生の飼育と着底・変態. 佐有水研報22, 41-46
- 松田正彦・藤井明彦・森 洋治・桐山隆哉 (1998) 介類種苗生産技術開発事業, 平成9年度長崎県総合水試事業報告書, 72-73
- 松田正彦・藤井明彦・森 洋治・桐山隆哉 (1999) 介類種苗生産技術開発事業, 平成10年度長崎県総合水試事業報告書, 51-52
- 松田正彦・藤井明彦 (2000) タイラギ, アカガイに対する産卵誘発方法としての止水と紫外線照射海水の効果. 長崎県水試研報26, 9-15.
- 宮木廉夫・山田敏之・竹本悟郎・中田 久・荒川敏久・松田正彦・藤井明彦 (1999) 魚介類種苗量産技術開発研究事業, 平成10年度長崎県総合水試事業報告書, p80-81.
- 森勝義 (2005) 水産増殖システム, 貝類・甲殻類・ウニ類・藻類 (森勝義編). 恒星社厚生閣, 東京, pp. 121-291.
- 森 洋治・藤井明彦・桐山隆哉 (2001) 介類種苗生産技術開発事業, 平成12年度長崎県総合水試事業報告書, 72-73.
- 森 洋治・松田正彦・桐山隆哉・藤井明彦 (2000) 介類種苗生産技術開発事業, 平成11年度長崎県総合水試事業報告書, 49-50.
- 中川彩子・木藪仁和 (2002) 浅海増養殖に関する研究, (4) タイラギ種苗生産研究. 平成13年度大分県海洋水産研究センター浅海研究所事

業報告書, 11-12.

中川彩子・平川千修 (2003) 浅海増養殖に関する研究, (3) タイラギ種苗生産研究. 平成14年度大分県海洋水産研究センター浅海研究所事業報告書, 11-12.

中川彩子・平川千修 (2004) 浅海増養殖に関する研究, (4) タイラギ種苗生産研究. 平成15年度大分県海洋水産研究センター事業報告書, 205-207.

中川彩子・平川千修 (2005) 浅海増養殖に関する研究, (4) タイラギ種苗生産研究. 平成16年度大分県海洋水産研究センター事業報告書, 195-197.

中川彩子・平川千修 (2005a) 浅海増養殖に関する研究 (1) ミルクイガイ種苗生産研究, 平成15年度大分県海洋水産研究センター事業報告書, 195-197.

中川彩子・平川千修 (2005b) 浅海増養殖に関する研究 (4) イワガキ種苗生産研究, 平成15年度大分県海洋水産研究センター事業報告書, 208-211.

中川彩子・平川千修 (2006a) 浅海増養殖に関する研究 (1) ミルクイガイ種苗生産研究, 平成16年度大分県海洋水産研究センター事業報告書, 173-175.

中川彩子・平川千修 (2006b) 浅海増養殖に関する研究 (4) イワガキ種苗生産研究, 平成16年度大分県海洋水産研究センター事業報告書, 180-182.

中川浩一・桑村勝士 (1998) 浅海性二枚貝増養殖技術開発研究 (アカガイ・トリガイ) 平成8年度福岡県水産海洋技術センター事業報告書, 264-266.

野上和彦・梅沢 敏・阪口清次・福原 修 (1981) トリガイ *Fulvia mutica* (REEVE) の酸素消費量と高水温期におけるへい死との関連について南西海区水研業績第103号.19-28.

小川浩・井本有治 (1995) タイラギ種苗生産試験. 平成6年度大分県浅海漁業試験場事業報告書, 1-2.

小川浩・井本有治 (1996) タイラギ種苗生産試験. 平成7年度大分県浅海漁業試験場事業報告書, 1-2.

大橋智志 (2003) クマサルボウ浮遊期幼生の成長

に伴う消化器官の発達と初期餌料の検討. 長崎水試研報29,15-20.

大橋智志 (2006a) 特開2006-271209 「二枚貝成熟卵磨砕物の添加による二枚貝浮遊幼生飼育法」.

大橋智志 (2006b) 特開2006-271208 「二枚貝成熟卵を原料とする二枚貝浮遊幼生飼料である二枚貝成熟卵磨砕物の精製法」.

大橋智志・藤井明彦・桐山隆哉 (2002) 介類種苗生産技術開発事業, 平成13年度長崎県総合水試事業報告書, 72-73.

大橋智志・藤井明彦・桐山隆哉 (2004) 有明海特産二枚貝類の種苗生産技術開発事業, 平成15年度長崎県総合水試事業報告書, 78-79

大橋智志・岩永俊介・藤井明彦・桐山隆哉 (2005) 有明海特産二枚貝類の種苗生産技術開発事業, 平成16年度長崎県総合水試事業報告書, 83.

大橋智志・岩永俊介・藤井明彦・桐山隆哉 (2005) ながさき型新水産業創出事業 (カキ養殖の高度化技術開発試験), 平成16年度長崎県総合水試事業報告書, 118-119.

大橋智志・岩永俊介・藤井明彦・桐山隆哉 (2007) 有明海特産二枚貝類の種苗生産技術開発事業, 平成17年度長崎県総合水試事業報告書, 85-86.

大橋智志・岩永俊介・川口 健・中田 久・矢田武義・藤井明彦・桐山隆哉 (2006) 有明海特産二枚貝類の種苗生産技術開発事業, 平成17年度長崎県総合水試事業報告書, 73-74.

大橋智志・岩永俊介・大迫一史・吉越一馬 (2007) クマサルボウガイ浮遊幼生の成長, 生残に対するマガキ卵磨砕物の添加効果. 水産増殖 (印刷中)

押尾明夫, 關 哲夫, 谷口和也 (1995) 二枚貝の餌料となる微小藻類の培養ハンドブック, 水産庁東北水研藻類増殖研資料, 3-8.

菅原 潔・副島正美 (1977) 蛋白質の定量法 (瓜屋郁三, 志村憲助, 中村道徳, 船津 勝編), 東京大学出版会, 東京, p22-73.

高見東洋, 中村達夫 (1981) クマサルボウガイの人工種苗生産に関する研究-I. 昭和55年度山口県内海水産試験場報告, 27-32.

陳 昭能, 竹内俊郎, 高橋隆行, 友田 努, 小磯雅彦, 桑田 博 (2004) マダイ仔魚の成長および飢餓耐性に及ぼすタウリン強化ワムシの効果. 日水誌, 70, 542-547.

陳 昭能, 竹内俊郎, 高橋隆行, 友田 努, 小磯雅彦, 桑田 博 (2005) ヒラメ仔魚の成長に及ぼすタウリン強化ワムシの効果. 日水誌, 71, 342-347.

Tubiash, H.S.ら (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile viviparous mollusks.

*J. Bacteriol.*, 90, 1036-1044

Tubiash, H.S.ら (1970) associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile viviparous mollusks. *J. Bacteriol.*, 103, 272-273

島崎大昭・杉原雄二・山下康夫 (1985) タイラギ漁場の形成条件・特に付着器質に関する研究. 佐賀県有明水試昭和58年度指定調査研究総合助成事業報告書, 14-19.

薬師寺房憲・村田憲之・久枝弘幸・千葉眞佐光 (2002a) イワガキ養殖技術開発試験, 平成12年度愛媛県中予水試事業報告書, 105-114.

薬師寺房憲 (2003) イワガキ養殖技術開発試験, 平成14年度愛媛県中予水試事業報告書, 114-123.

薬師寺房憲 (2004) 養殖業総合対策事業 (イワガキのブランド化), 平成15年度愛媛県中予水試事業報告書, 109-115.

薬師寺房憲・逢坂和則・松岡学 (2002b) イワガキ養殖技術開発試験, 平成13年度愛媛県中予水試事業報告書, 116-123.

吉田裕 (1964) 貝類種苗学. 北隆館, 東京, p128-132.

吉田裕・井上泰 (1954) タイラギの生物学的研究 (概要). 山口内海水試研究業績, 6 (3).

山賀賢一 (2000) タイラギ種苗生産試験. 平成11年度香川県水産試験場事業報告, 61-62

タイラギ類, アサリ, トリガイ等の多くの有用種について行われているが, 対象種や生産地域によって生産が安定しないことがある。その主な原因は浮遊幼生の減耗によるものであり, 減耗要因として餌料藻類の種類や培養状態, 細菌による感染症などが指摘されているが浮遊幼生の諸器官の形態や生理面から検討を行った報告は少ない。これは二枚貝浮遊幼生が非常に小型であるため諸器官の観察が難しく, 発達に伴う各器官の形成過程や体構造の変化について知見が乏しいことによるものである。特に幼生の微細構造は未解明な部分が多く, 魚類の稚仔魚で行われているような詳細な構造あるいは器官形成過程の観察知見は乏しい。このため諸器官の発達やその特性に適合する飼育技術の検討も行われていない。本研究は消化器官を中心とする浮遊幼生期の諸器官の形成過程を明らかにし, 得られた知見を種苗生産技術の改良に応用することを目的として行った。

## 第1章. 浮遊幼生の組織学的検討

本章ではイワガキ, クマサルボウガイ, タイラギ, トリガイの4種の有用二枚貝の浮遊幼生を飼育し, 成長に伴う器官形成および体組織の形態変化を消化器官を中心に組織学的に検討した。採取した卵・浮遊幼生・初期稚貝は顕微鏡あるいは電顕で観察し, 各器官の微細構造の観察を行った。いずれの種においても, 初期D型期幼生は卵黄を有し, 概ね日令5前後まで卵黄顆粒が体各部の細胞内に確認された。食道, 胃および腸管は日令2までに形成され, その後摂餌が確認された。日令3以降では胃および桿晶体囊上皮細胞への脂肪滴の蓄積が見られるようになり, 成長に伴い消化盲囊上皮細胞にも蓄積が進んだ。イワガキ, クマサルボウガイ, タイラギでは組織学的には殻長150  $\mu$ mに成長するまで桿晶体の形成は確認されなかったが, トリガイは桿晶体が殻長110  $\mu$ mのD型期に形成される点で他の3種と異なった。桿晶体の形成後は成長が速くなりイワガキ, クマサルボウガイでは消化盲囊が発達し盲囊構造が明瞭になった。イワガキを用いて消化器官の体積の変化を比

## 要約

二枚貝類の種苗生産はカキ類, アカガイ類, ホ

較した結果、D型期には胃および桿晶体囊の体積が消化盲囊より有意に大きい、桿晶体の形成期に両者の体積が同等となり、その後は消化盲囊の体積が大きくなる傾向を示した。トリガイでは他の3種に比較して桿晶体囊および桿晶体の発達が顕著だった。殻頂期には消化器官の他に腎組織および匍匐肢の原基が形成され、タイラギおよびトリガイでは匍匐肢の発達が著しかった。

## 第2章 組織学的知見の種苗生産への応用

クマサルボウガイやイワガキでみられるD型期から殻頂期幼生への移行期に発生する減耗は、組織学的観察結果から卵黄吸収の終了期とほぼ一致し、卵黄栄養の不足が関与する可能性が高いことが示唆された。そこでクマサルボウガイD型期幼生の添加餌料として、マガキ成熟卵を圧搾・磨砕して得た卵黄磨砕物（卵磨砕物）を用い経口的な卵黄栄養の補給を試みた。その結果、卵磨砕物を添加した実験区では平均殻長、生残率、殻頂期変態率、脂肪滴蓄積量が対照区に比較して有意に高かった。このことから殻頂期幼生への変態時には餌料藻類に加えて卵黄に類似した栄養が必要であり、他種の卵黄を経口的に供給することで解決されることが示された。また消化管上皮細胞に蓄積される脂肪滴量は成長・変態と密接に関係しており、栄養摂取状態の指標となることが示された。この知見をタイラギに応用したところ既往成績の100倍以上の着底稚貝が得られた。タイラギは種苗生産が困難な種であり稚貝が得られた飼育例はこれまでに2例しかないが、卵磨砕物の添加により殻頂期幼生への成長が促進されたことが奏効したと考えられた。ただクマサルボウガイやイワガキに比較すると殻頂期幼生までの生残率が低く殻頂期幼生の減耗には十分な効果が得られなかったことから、卵黄栄養の添加のみでは不十分であり、他の栄養物質の不足や浮遊幼生の生態的な特徴が関与する可能性が考えられた。

## 第3章 総合考察

本章では4種の有用二枚貝浮遊幼生の器官形成過程からその共通性と特徴、および得られた知見

の種苗生産上の応用について考察した。いずれの浮遊幼生もD型期初期に食道、胃、桿晶体囊、消化盲囊および腸管を形成し摂餌を開始するが、D型期幼生は卵黄吸収と餌料摂取が同時に行われる時期を有していた。この時期に卵黄栄養の不足が生じると正常な器官形成、特に消化器官の形成が遅延もしくは阻害され、結果的に栄養摂取に不具合が生じ殻頂期幼生への成長・変態の阻害による大量減耗に至ると考えられた。消化器官の発達では、トリガイはD型期に桿晶体が形成され、その後も発達が著しいことが特徴的であり、このことが速い成長に関与すると考えられた。トリガイを除く3種では桿晶体の形成は殻頂期にみられ、消化盲囊の発達と相まってその後の成長が速まると考えられた。これらの結果は、栄養摂取のしくみは同様でも種によって消化器官の発達状況に差異があることを示し、これは各種の生息環境への適応や進化過程（イワガキ・クマサルボウ・タイラギは糸鰓類、トリガイは真弁鰓類）にも関係すると推察した。