

アサリ養殖漁場における
夏季大量へい死要因の検討

Possible Causes for Summer Mass Mortality of
the Manila Clam *Ruditapes philippinarum*
in a Culture Area

長崎大学大学院生産科学研究科

松 田 正 彦

目 次

	頁
第1章 緒 言	42
第2章 アサリ養殖漁場環境とアサリの生理状態	46
1節 長崎県諫早市小長井町アサリ養殖漁場環境	46
2節 養殖漁場のアサリの肥満度，身入率，炭水化物および水分含量の季節的变化	48
3節 アサリの生理状態評価指標について	50
第3章 低塩分耐性について	60
1節 異なる低塩分における生残の変化	61
2節 低塩分曝露時の血リンパ浸透圧の変化	61
3節 低塩分に対する閉殻の役割	62
4節 低塩分曝露時の血リンパ浸透圧と水分含量の変化	63
第4章 貧（無）酸素耐性について	71
1節 水温，溶存酸素濃度の違いによる酸素消費速度の変化	71
2節 異なる時期に漁獲されたアサリの無酸素耐性	74
3節 無酸素耐性と炭水化物含量の関係	75
4節 無酸素曝露時の炭水化物含量の減耗	77
第5章 環境悪化時のアサリ外套腔液有機酸含量の変化	96
1節 溶存酸素濃度と外套腔液有機酸含量の関係	96
2節 断続的貧酸素曝露時の外套腔液有機酸含量の変化	99
3節 低塩分曝露時の外套腔液有機酸含量の変化	100
4節 硫化水素曝露時の外套腔液有機酸含量の変化	103

第6章 漁場環境とアサリ外套腔液有機酸含量および生残との関係	117
1節 2003年アサリ養殖漁場低塩分時の外套腔液有機酸含量の変化	117
2節 2003-2004年アサリ養殖漁場貧酸素時の外套腔液有機酸含量の変化と生残	118
第7章 総合考察	131
謝 辞	136
参考文献	136

第1章 緒言

アサリ *Ruditapes philippinarum* は日本各地の内海、内湾の潮間帯から水深10mまでの浅海域に生息する産業上重要な二枚貝である。Fig. 1-1 に示したとおり1983年には日本全国で160,424トン、285億400万円を漁獲していたが、その後漁獲量は減少の一途をたどり、2001年は31,002トン、92億1,800万円の漁獲（1983年の漁獲量比19.4%、生産額比32.3%）まで減少し、近年は35,000トン前後の低水準で安定している。国内生産量の減少で、不足した国内への供給は中国、韓国等からの輸入40,731トン（2006年）に頼っている現状である。

このような状況から、平成15～17年度に水産総合研究センターや水産試験場等の専門家をメンバーとして設立された「アサリ資源全国協議会」では地域ブロック毎にアサリ漁業の現状について情報収集するとともに、過去になされた研究・事業の検証を進め、「国産アサリの復活に向けて」と題する提言を取りまとめた。提言ではアサリ生産の現状と問題点として、(1) 1980年代後半から続く全国的な生産量の長期減少、(2) 埋立、干拓などの海岸工事や河川改修、水質汚濁などによるアサリ生息地の消滅および底質の泥化、貧酸素・赤潮発生などの生息環境の悪化、(3) 過剰漁獲や稚貝の大量採取などの不十分な資源管理、(4) 各地のアサリ生息場所の減少による再生産機構の崩壊を挙げている。また、アサリ資源復活と安定生産のため取るべき方策として6項目を挙げ、(1) 母貝場・種場・育成場といった目的や機能を明確にした場の造成維持、(2) 外国産ではなく地元産種苗の適切な時期・場所への移植および波浪や食害からの保護育成、(3) 食害、貧酸素や硫化水素に伴う生理障害、台風や冬季風浪等に伴う打ち上げや航路等への掃き出しなどの大量死亡対策、(4) 稚貝の生息密度を含めたアサリ資源現存量の把握と計画的漁獲による資源の有効利用、(5) 漁業者の資源育成・管理の理解および実行を目的とした学習会や資源管理マニュアル作成などの普及・啓発、

(6) アサリの生理・生態、生息場の環境特性をよく理解するための先端技術等を取り入れた調査研究手法の高度化が示された（アサリ資源全国協議会提言検討委員会ほか 2006）。

アサリの調査・研究は大学、水産総合研究センター、水産試験場等で数多く行われてきたが、アサリの基本的な生理・生態については知見が少ない。そのため各地で資源増殖の目的で行われている稚貝の保護、種苗放流、資源管理、漁場造成などの取り組みの効果がうまく発現しない場合、その原因について不明確な場合が多く、結果としてアサリの資源量を回復させるに至っていない（アサリ資源全国協議会提言検討委員会ほか 2006）。

国内の生産量減少の原因は先に述べた提言でも、乱獲、環境悪化等さまざまな要因が考えられているが、「大量へい死」はその資源量増大を図る上で大きな阻害要因である。

柿野ら（1992）はアサリ等の二枚貝のへい死や資源の減少、活力低下等と関係する要因として、

- (1) 低水温または高水温、(2) 塩分の低下、(3) 降雨時の濁水による浮遊土の増加、(4) 溶存酸素濃度の低下、(5) 餌料量の低下、(6) 泥分の堆積、(7) 底質移動、(8) 貝類のへい死に伴う二次的な水質悪化、(9) 有害プランクトン、(10) 寄生虫、(11) 動物あるいは植物の群落による場の占有、(12) 食害、(13) 遺伝形質（一代雑種の出現）、(14) 重金属類や各種の薬剤、(15) 漁業者が採貝時にアサリに与える傷害（主として水管の切断と殻の破損）、(16) 細菌やウィルス等の疾病など多くの要因を挙げている。

また、「大量へい死」を論じる際、発生時期によって「夏季」と「秋季～冬季」の大きくふたつに分けられる。「秋季～冬季」のへい死について、柿野ら（1995）は東京湾盤洲干潟の冬季へい死要因を低水温と季節風による波浪および餌料不足と推察している。辻ら（1995）の舞鶴湾の事例では高密度と産卵後の疲弊の可能性が強いとしている。よってこの「秋季～冬季」のへい死については餌不足・高密度・産卵および低水温・波浪による衰

弱が要因と推察される。

しかし「夏季」のへい死要因については、証拠が残りやすい食害（食害痕）や泥分の堆積などの事例以外は大量へい死発生後に調査が行われ、調査時点での漁場の調査結果等からへい死要因が推測されている事例が多い。

長崎県諫早市小長井町では 1970 年代から客土覆砂によるアサリ養殖が営まれ、1988 年には 878 トン、2 億 9,000 万円を漁獲（Fig. 1-2）するなど漁家の主要な収入源となっていたが、近年夏季に度々大量へい死が発生し（平野ら 2005；山本ら 2005）、漁家経営を圧迫する要因となっている。へい死原因として高水温、貧酸素、赤潮、低塩分等の環境悪化が疑われているが、明らかになっておらず、へい死防止対策を行う上で大きな障害となっている。

アサリが生息する干潟～浅海域では水温、塩分その他の環境要因が大きく変動する。倉茂（1957）は朝鮮半島産のアサリを用い、水温、塩分、干出、貧酸素、濁度などの環境変化がアサリの生残にどのような影響を与えるのかについて耐性実験を行い、その環境耐性についての知見を示した。その後も、水温、塩分、溶存酸素濃度等の各種環境要素に対するアサリの耐性実験が個別の研究者によっておこなわれたが、それらの知見の集積が十分に図られていないのが現状である。また、各種環境変化に対する生理的応答について検討した実験例はあまりなく、アサリがどのような環境で影響を受け、へい死に至るのか、そのメカニズムを推察するための知見がほとんどない。

近年、多項目水質計などの測定機器の進歩でアサリ養殖漁場環境の長期間にわたる連続観測を行い、アサリ大量へい死前後の漁場環境の変化を捉えることが可能となった。

本研究は、日本各地のアサリ漁場や長崎県諫早市小長井町のアサリ養殖漁場で発生している夏季のアサリ大量へい死について、知見が少ない漁場環境悪化に対するアサリの生理的適応や耐性などを室内実験で明らかにし、同時に大量へい死時の

養殖漁場環境を多項目水質計等を用い調査することによって、へい死要因を特定し、アサリ漁業振興のためのへい死防除対策の一助とすることを目的に行った。

第 1 章では、アサリ漁業生産の現状と問題点、アサリの各種環境耐性や環境悪化に対する適応など基礎的な知見の集積や大量へい死が発生する漁場環境の把握の必要性を述べた。またこれらの実験・調査を行うことによって導き出されるへい死要因の特定について、その意義を述べた。

第 2 章ではアサリ養殖漁場の環境特性として、2003～2006 年の 4 ヶ年にわたって長崎県諫早市小長井町アサリ養殖漁場の漁場環境を観測し、水温、塩分、溶存酸素濃度の変化について述べた。また、漁場のアサリの肥満度、身入率（2 章で後述）、炭水化物含量、水分含量を 2004 年 8 月～2007 年 5 月まで定期的に調査し、その推移について述べ、アサリの生理状態評価指標としての有効性について検討した。

第 3 章ではアサリの低塩分耐性について、異なる低塩分における生残の変化、低塩分曝露時の血リンパ浸透圧および水分含量の変化、低塩分に対する閉殻の役割などについて室内実験を行い、曝露時に閉殻防御を図る塩分や、へい死に至る塩分を検討した。

第 4 章ではアサリの貧（無）酸素耐性について検討するため、水温別の酸素消費速度の差、異なる時期に漁獲されたアサリの無酸素耐性と炭水化物含量の関係、無酸素曝露時の炭水化物含量の減耗について実験・調査を行い、夏季高水温時の無酸素耐性やその変化などについて検討した。

第 5 章の環境悪化時のアサリ外套腔液の有機酸含量の変化では、アサリが環境悪化時、嫌気代謝を行い、外套腔液中に蓄積するコハク酸やプロピオン酸等の有機酸含量を指標に、高水温時、どの程度の貧酸素で生存に影響を受けるのか、また断続的な貧酸素曝露、低塩分および硫化水素の影響について室内実験を行い、それぞれ環境要因がアサリの生存に与える影響について検討した。

第6章の漁場環境とアサリの外套腔液有機酸含量および生残との関係では、2003年は夏季の低塩分時と貧酸素時に、2004年は夏季の貧酸素時に、第5章で述べた外套腔液中の有機酸含量を漁場のアサリから連続してサンプリングし、漁場環境要因がアサリの生存に与える影響を調査、検討した。

第7章では、第2章から第6章まで結果を受けて、長崎県諫早市小長井町のアサリ養殖漁場の夏季へい死要因についての考察とへい死防止対策への提言を述べた。

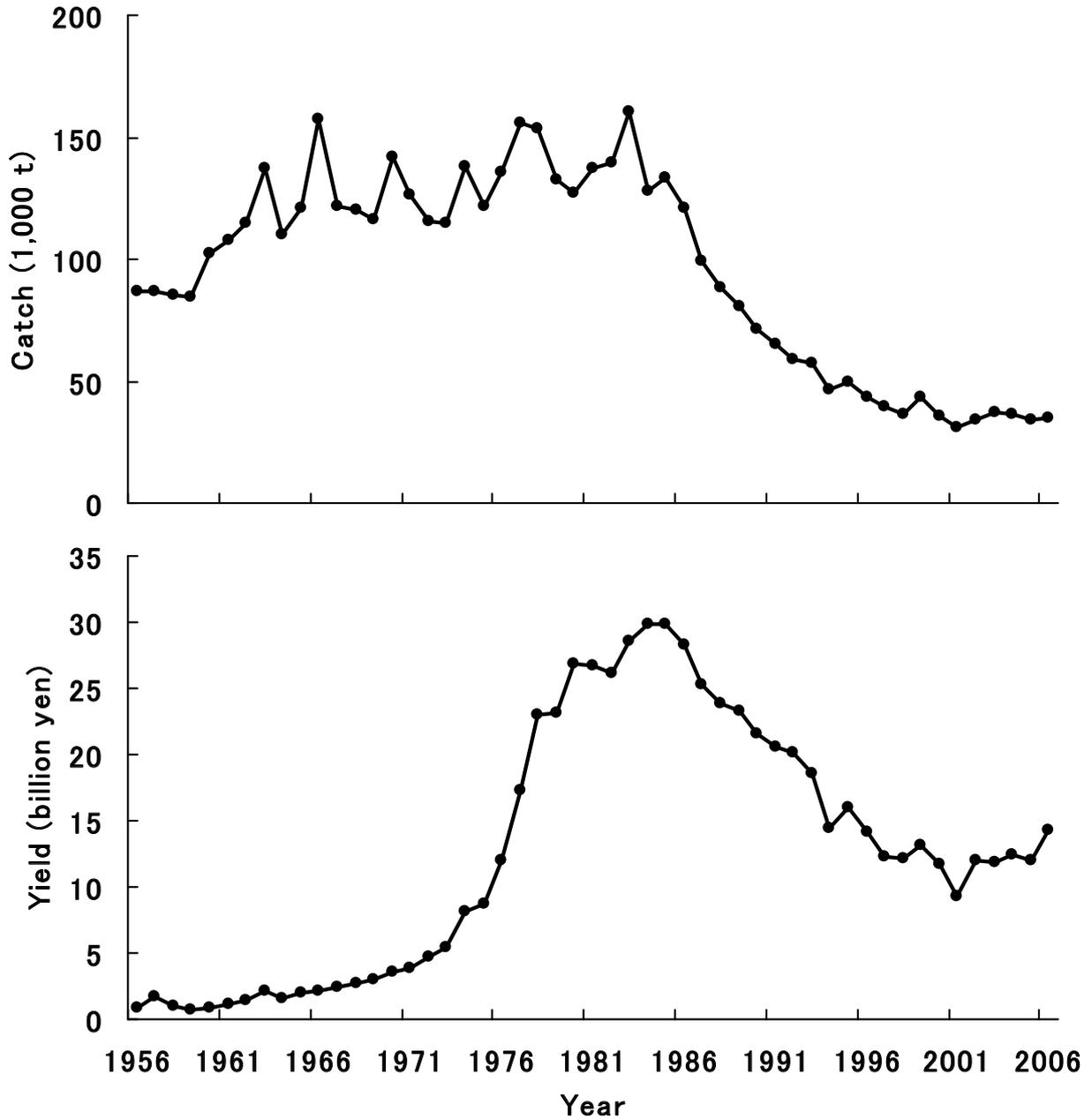


Fig. 1-1. Yearly changes in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* catch and yield in Japan from 1956 to 2006.

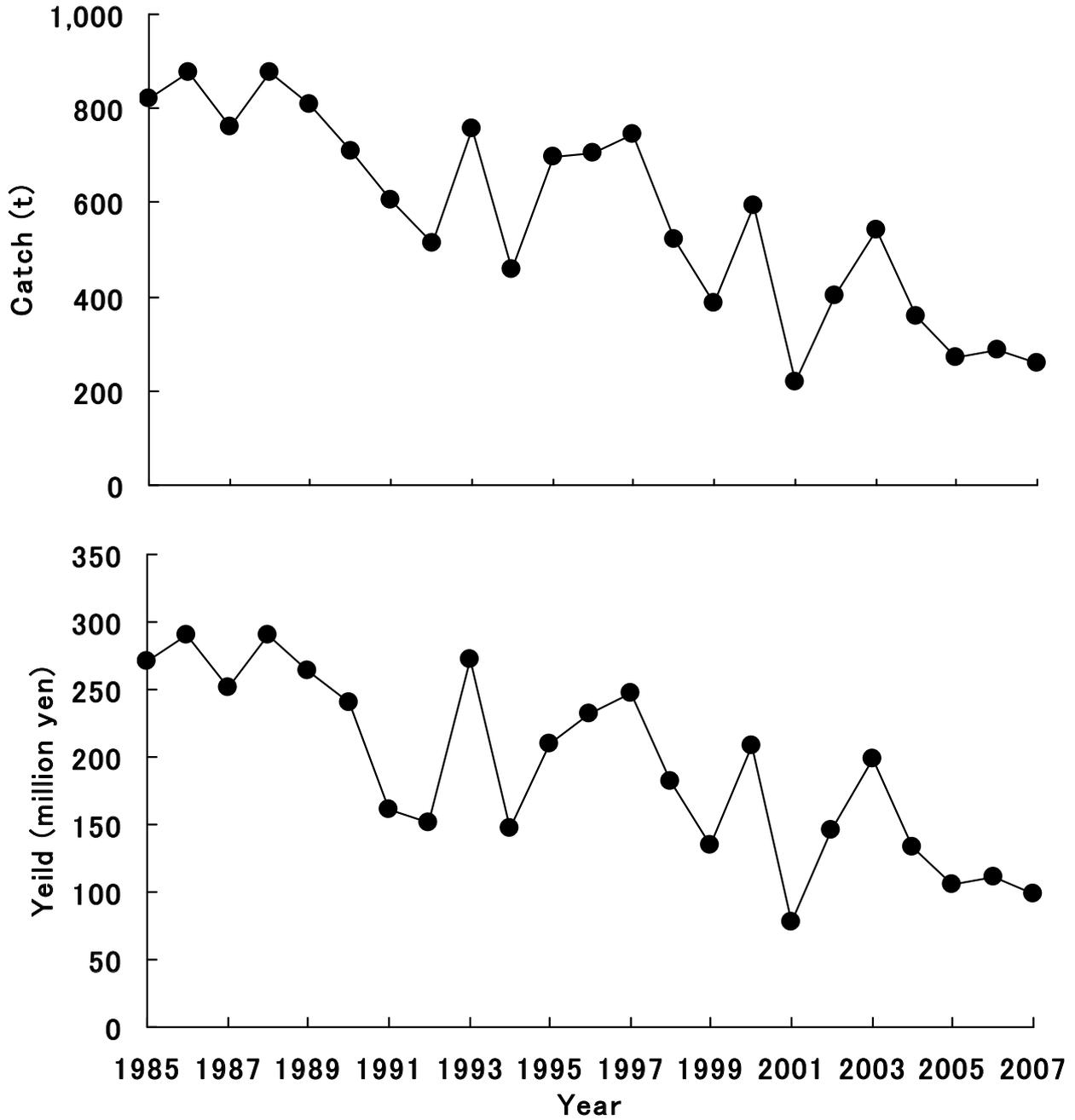


Fig. 1-2. Yearly changes in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* catch and yield in the Fishereis Cooperative Association of Konagai town from 1985 to 2007.

第2章 アサリ養殖漁場環境とアサリの生理状態

アサリの夏季大量へい死要因を検討するために、まず、へい死が発生する長崎県諫早市小長井町アサリ養殖漁場で2003～2006年の4ヵ年にわたって、水温、塩分、溶存酸素濃度（以下 DO）の推移を多項目水質計を用いて調査した。

また、養殖漁場のアサリの生理状態を把握するため、肥満度、身入率、炭水化物含量、水分含量を2004年8月～2007年5月まで定期的に調査し、それぞれの指標のアサリの生理状態評価指標としての有効性について検討した。

1 節 長崎県諫早市小長井町アサリ養殖漁場環境

材料および方法

長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場の調査点 A (Fig. 2-1) の最低水面（以下 CDL）、+60 cm の海底から約 5 cm 上に多項目水質計 DS4a (Hydrolab 社) を設置し、水温、塩分、DO の漁場環境データを2003年6月6日～11月27日、2004年3月5日～12月31日、2005年1月1日～10月26日、2006年6月1日～9月14日の期間30分毎に測定した。得られた測定データは太陽電池と携帯電話回線を利用した DOPA 送信ユニットを用いて、リアルタイムでモニターした。測定期間中、1～2週間に1回の割合でセンサーを引き上げて清掃、キャリブレーションを行うとともに、現場海水の採水および海洋観測により各データのクロスチェックと補正を行った。

データの解析は各年測定期間が重なり、アサリ夏季の大量へい死が懸念される各年 6 月～10 月（2006 年は 9 月 14 日で測定を終了したのでその日まで）の期間のデータを比較した。

各年の 6 月～10 月（2006 年は 9 月まで）の期間の水温、塩分、DO の平均、標準偏差 (SD)、最小値および最大値を以下のように示す、平均 ±

標準偏差（最小値～最大値）。

結果と考察

水温

各年の水温の推移を Fig. 2-2 に示す。

各年の水温について、2003 年は $24.4 \pm 2.6^{\circ}\text{C}$ ($14.20 \sim 34.0^{\circ}\text{C}$)、2004 年は $25.9 \pm 3.4^{\circ}\text{C}$ ($17.9 \sim 35.1^{\circ}\text{C}$)、2005 年は $25.9 \pm 2.2^{\circ}\text{C}$ ($16.0 \sim 34.0^{\circ}\text{C}$)、2006 年は $25.8 \pm 2.3^{\circ}\text{C}$ ($20.2 \sim 34.2^{\circ}\text{C}$) であった。

2003 年は 32°C 以上の高水温が最長で 1 時間（9 月 8 日）、 30°C 以上が 7 時間（9 月 8 日）、2004 年は 32°C 以上が 10 時間（8 月 12 日～13 日）、 30°C 以上が 65.5 時間（8 月 10 日～13 日）、2005 年は 32°C 以上が 2.5 時間（9 月 1 日）、 30°C 以上が 14 時間（8 月 16 日～17 日）、2006 年は 32°C 以上が 3 時間（8 月 24 日）、 30°C 以上が 8 時間（8 月 7 日）継続した。2003～2006 年の 4 年間における水温 32°C 以上の高水温の最長継続時間は 10 時間、 30°C 以上は 65.5 時間であった。

各年の水温の概況を記述する。

2003 年は梅雨時期が長く、冷夏の年であった。平均水温も 24.4°C と 2004～2006 年の平均水温 $25.8 \sim 25.9^{\circ}\text{C}$ と比較して約 1.5°C と低かった。

2004 年は降雨が少なく、酷暑の年であったが、平均水温は 25.9°C と 2005～2006 年の平均水温 $25.8 \sim 25.9^{\circ}\text{C}$ と差がなかった。しかし、水温 30°C 以上の最長継続時間が 8 月中旬に 65.5 時間と他の年（7～14 時間）と比較して顕著に長かった。

2005 年も暑い夏で、平均水温は 2004 年と同じ 25.9°C であったが、水温 30°C 以上の最長継続時間が 8 月中旬に 14 時間と 2004 年のような長時間の高水温の継続は観測されなかった。

2006 年は降雨の多い年であったが、平均水温は 25.8°C と 2004 年、2005 年と同等であった。しかしこの年も 2005 年同様 2004 年のような長時間の高水温の継続は観測されなかった。

塩分

各年の塩分の推移を Fig. 2-3 に示す。

各年の塩分について、2003年は 28.6 ± 3.4 psu (11.6~32.0 psu)、2004年は 29.9 ± 1.6 psu (13.5~32.3 psu)、2005年は 28.9 ± 2.8 psu (4.7~32.2 psu)、2006年は 24.4 ± 4.6 psu (6.5~31.2 psu)であった。

2003年は20 psu以下の低塩分が最長で20.5時間(7月25日~26日)、15 psu以下が2.5時間(6月29日)、2004年は20 psu以下が3時間(6月28日)、15 psu以下が0.5時間(6月28日)、2005年は20 psu以下が7時間(7月15日)、15 psu以下が2時間(7月12日)、10 psu以下が0.5時間(7月17日と7月18日)、2006年は20 psu以下が21.5時間(9月7日~8日)、15 psu以下が14.5時間(9月7日~8日)、10 psuが6.5時間(7月6日)継続した。2003~2006年の4年間における各低塩分の最長継続時間は20 psu以下で21.5時間、15 psu以下で14.5時間、10 psu以下で6.5時間であった。

各年の塩分の概況を記述する。

2003年は長梅雨、冷夏の年で平均塩分は28.6 psuと2004年の29.9 psuと比較して低かったが、2005年の28.9 psuと比較して顕著に低くはなかった。しかし、2006年の24.4 psuより高かった。20 psu以下の低塩分は6月下旬から7月下旬に頻繁に観測された。20 psu以下の低塩分継続時間は7月下旬に最長で20.5時間と2006年の21.5時間に次ぐ、低塩分の影響が大きい年であった。

2004年は降雨の少ない年であったため、20 psu以下の最長継続時間が3時間と低塩分の影響が小さい年であった。平均塩分は29.9 psuと28.6~28.9 psu(2003, 2005年)と比較して高めであった。

2005年は平均塩分は28.9 psuと降雨の少なかつた2004年の29.9 psuと比較して低かったが2003年の28.6 psuとほぼ同じであった。しかし、20 psu以下の最長継続時間が7時間と2003年の20.5時間と比較して短かった。

2006年は測定期間が6月1日~9月14日までと短かつたため、他の年と単純に比較できないが、平均塩分が24.4 psuと他の3カ年の28.6~29.9 psuと比較して顕著に低かった。また、各塩分の最長継続時間も20 psu以下が21.5時間、15 psu以下が

14.5時間、10 psuが6.5時間とそれぞれ2003~2006年の4カ年でもっとも継続時間が長く、低塩分の影響が最も大きい年であった。

溶存酸素濃度 (DO)

各年のDOの推移をFig. 2-4に示す。

各年のDOについて、2003年は 4.57 ± 1.77 mg/l (0.05~12.32 mg/l)、2004年は 5.06 ± 2.23 mg/l (0.04~16.03 mg/l)、2005年は 6.02 ± 2.23 mg/l (0.20~17.60 mg/l)、2006年は 5.45 ± 2.31 mg/l (0.07~20.96 mg/l)であった。

2003年はDO 1 mg/l未満の貧酸素が最長で15時間(9月5日~6日)、DO 2 mg/l未満が16時間(9月5日~6日)、2004年はDO 1 mg/l未満が10.5時間(8月12日~13日と8月14日)、DO 2 mg/l未満が15時間(8月12日)、2005年はDO 1 mg/l未満が6時間(8月15日)、DO 2 mg/l未満が11時間(8月14日~15日)、2006年はDO 1 mg/l未満が13時間(8月5日~6日)、DO 2 mg/l未満が14.5時間(8月5日~6日)継続した。

各年のDOの概況を記述する。

2003年は長梅雨、冷夏の年であったため、通常8月頃に観測されるDO 1 mg/l未満の貧酸素は、9月上旬に最長継続時間15時間を観測するなど、9月上旬にまとまった貧酸素が観測された年であった。

2004年は降雨の少ない酷暑の夏で、8月12日~14日にDO 1 mg/l未満の貧酸素が最長継続時間の10.5時間が2度観測されるなど、水温30℃以上が継続した8月中旬に貧酸素がまとまって観測された年であった。

2005年はDO 1 mg/l未満の最長継続時間が8月中旬の6時間と他の3カ年(10.5~15時間)と比べ、貧酸素環境が長時間継続しない年であった。

2006年は8月5日~6日にDO 1 mg/l未満の貧酸素が最長13時間継続したが、それ以外は8月1日に3.5時間の貧酸素が観測された程度で、大規模な貧酸素化が観測されなかつた年であった。

環境要因（水温、塩分、DO）とへい死発生時期

各年の水温、塩分、DOの推移 **Figs. 2-2, 2-3, 2-4** に示したが、図中に示したアサリ漁場での大量へい死時期（2003年9月7日～9日頃（へい死率7.7%）と2004年8月12日～13日（へい死率100%）と各環境要素との関係を見ると、塩分についてはへい死発生時期に概ね25 psu以上とアサリにとって生存に影響を与えるような低塩分（第3章で後述）は観測されなかった。しかし、水温については30℃以上の最長継続時間が2003年は9月8日（7時間）、2004年は8月10日～13日（65.5時間）とへい死発生時期直前～発生時期に観測されており、へい死との関連が疑われるため、第4章以降で関連について考察する。また、DOについては1 mg/l未満の貧酸素の最長継続時間が2003年は9月5日～6日（15時間）、2004年は8月12日～13日と8月14日（10.5時間）のへい死発生時期前後に観測されており、アサリにとって貧酸素と思われるDO 1 mg/l未満の環境（第5章1節で後述）とへい死等の関連が水温同様疑われるため、その関連についても第4章以降で考察する。

2 節 養殖漁場のアサリの肥満度、身入率、炭水化物および水分含量の季節的变化

材料および方法

長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場のほぼ中央に当たる調査点B (**Fig. 2-1**) のアサリを2004年8月31日から2007年5月1日まで大潮毎（11～1月の間は概ね月1回）にアサリ（殻長35.5 ± 2.1 mm, レンジ29.1～43.5 mm）を採取し、肥満度（Condition factor : 式1）と身入率（Soft body rate : 式2）を調査毎20個体について求めた。また、上記の供試20個体のうちそれぞれ10個体を軟体部の炭水化物含量と水分含量の分析に用いた。

分析に供したアサリ20個体は軟体部をメスで殻から切り離した後、JKワイパー（クレシア社）で表面の水分を取り去り軟体部湿重量（以下湿重）

を測定し、肥満度は、湿重（g）を殻長、殻高、殻幅（いずれもmm）の積で除し、10万倍して求めた（鳥羽・深山1991）。

肥満度 = 湿重 (g) ÷ (殻長 (mm) × 殻高 (mm) × 殻幅 (mm)) × 100,000 …… (式1)

身入率は湿重（g）をJKワイパーで水分を取り除いた殻重量（g）と湿重（g）の和で除し、100倍して求めた。

身入率 (%) = 湿重 (g) ÷ (湿重 (g) + 殻重量 (g)) × 100 …… (式2)

軟体部の水分含量（以下水分含量）は湿重を求めた軟体部のうち10個体を60℃、48時間乾燥器で乾燥させ軟体部乾燥重量（以下乾重）を測定し、湿重から乾重を減じた値を湿重で除し、100倍して求めた。

水分含量 (%) = (湿重 (g) - 乾重 (g)) ÷ 湿重 (g) × 100

残りの10個体の軟体部は1個体分ずつ30%水酸化カリウム溶液20 ml（100℃、1時間以上）に溶解し、試料溶液とした。得られた試料溶液をフェノール硫酸改良法（Kushwaha and Kates 1981）で分析し、湿重1 g当たりの炭水化物含量を求めた。

結果

アサリの肥満度、身入率、炭水化物および水分含量の調査日別平均値の推移を **Fig. 2-5** に示す。

肥満度の平均値は11.3～21.0の範囲で変動した。肥満度20を超えた調査日は2005年1月28日（平均肥満度：21.0）、同年10月17日（20.8）と12月19日（20.9）、2007年4月17日（20.3）と10月～4月にピークがみられたが、年によって肥満度およびピークの時期に違いがあった。一方、肥満度15を下回る時期は2004年8月31日（14.9）、2005年8月19日～9月16日（14.5～14.6）、2006年7月25日～8月22日（14.6～14.9）、2006年12月19日～2007年1月21日（11.3～13.0）と通常肥満度が高い時期である12月～1月に低い値を示した2006～2007年の冬季を除くと、毎年7月～9

月の夏季に低かった。

身入率の平均値は 26.1～42.8%の範囲で変動した。身入率 40%を超えた調査日は 2005 年 1 月 28 日 (平均身入率:40.8%), 同年 12 月 19 日 (42.8%), 2006 年 3 月 30 日 (40.2%) と 12 月～3 月の冬季から春季の間にピークがみられた。一方, 身入率 30%を下回る時期は 2005 年 9 月 16 日 (29.5%), 2006 年 12 月 19 日～2007 年 1 月 21 日 (26.1～28.5%) であった。しかし, 身入率 32%以下の時期を調べると, 2004 年 8 月 31 日 (31.2%) と 9 月 27 日 (31.3%), 2005 年 7 月 6 日 (31.3%) と 8 月 19 日～9 月 16 日 (29.5～30.3%), 2006 年 7 月 11 日～9 月 6 日 (30.2～31.8%), 2006 年 12 月 19 日～2007 年 1 月 21 日 (26.1～28.5%), 2007 年 2 月 5 日 (31.8%) と 3 月 8 日 (31.6%) と通常身入率が高い時期である 12 月～3 月に低い値を示した 2006～2007 年の冬季～春季を除くと, 毎年 7 月～9 月の夏季に低かった。

炭水化物含量の平均値は 11.3～79.0 mg/軟体部湿重 1 g (以下 mg/g) の範囲で変動した。炭水化物含量が 50 mg/g を超えた調査日は 2005 年 1 月 14 日～2 月 11 日 (平均炭水化物含量: 56.8～59.3 mg/g) と 3 月 15 日 (50.3 mg/g), 同年 12 月 19 日 (55.5 mg/g), 2006 年 5 月 12 日 (59.6 mg/g) と 6 月 12 日～8 月 7 日 (50.9～64.3 mg/g), 2007 年 1 月 21 日～5 月 1 日 (50.8～79.0 mg/g) と 2006 年の 6 月～8 月以外, 12 月～5 月の冬季から春季にピークがみられた。一方, 炭水化物含量が 30 mg/g を下回る時期は 2005 年 6 月 6 日 (29.3 mg/g), 同年 8 月 19 日～9 月 16 日 (25.7～28.5 mg/g), 同年 11 月 1 日 (11.3 mg/g), 2006 年 12 月 19 日 (24.0 mg/g) と各年炭水化物含量の低い時期には違いがあった。

水分含量の平均値は 75.4～81.5%の範囲で変動した。水分含量が 78%を下回った調査日は 2005 年 1 月 28 日 (平均水分含量: 77.7%), 同年 12 月 19 日 (76.0%), 2006 年 2 月 13 日 (77.8%), 同年 4 月 28 日～5 月 12 日 (77.2～77.5%) と 6 月 12 日～8 月 22 日 (75.8～77.8%), 2007 年 2 月 5 日 (77.9%), 同年 3 月 19 日～5 月 1 日 (75.4～76.9%) と 2006

年の 6 月～8 月を除くと 12 月～5 月の冬季から春季にピークがみられた。一方, 水分含量が 80%以上の時期は 2004 年 10 月 27 日～11 月 11 日 (80.9～81.4%), 2005 年 5 月 12 日～5 月 25 日 (80.0～80.2%), 同年 9 月 2 日～9 月 16 日 (80.3～80.4%), 同年 11 月 1 日 (81.3%), 2006 年 11 月 6 日～12 月 19 日 (80.7～81.5%) と 2005 年の 5 月を除き, 9 月～12 月の秋季を中心とした時期に水分含量が高かった。

考 察

肥満度や身入率は, 殻内容積を想定した殻長, 殻高, 殻幅の積や, 殻重量と湿重の和に対する湿重の割合を示している。萩田・石川 (1982) は三重県二見町のアサリの殻重, 水分含量, 湿重の比率の季節的変化を調べ, 殻重の比率は季節的変化があまりみられず, ほぼ安定しているとしている。殻長等や殻重量は全重量と比較し大きな変動がないとすると, 肥満度と身入率は湿重の変化に大きく左右される。

萩田・石川 (1982) は三重県二見町のアサリが 6～8 月は実入り (湿重) が多く, 10～4 月は実入りが少なく, 特に水温が最も低下する 12～2 月の冬季に最も実入りが少ないとしている。

しかし, 本調査結果では, 年によって多少の時期の違いがあるものの, 萩田・石川 (1982) の事例と違い, 20 を超える肥満度と 40%を超える身入率は 2005 年 10 月 17 日の肥満度を除くと, 冬～春の水温の低い時期に観察され, この時期に湿重が増加するようであった。

また, 肥満度 15 および身入率 32%以下の時期は 2006～2007 年の冬季～春季を除くと, 萩田・石川 (1982) の事例と相反し, 毎年 7 月～9 月の夏季に湿重は減少していた。

肥満度や身入率の季節的増減は性成熟, 炭水化物量等の栄養状態によって湿重が増減することによるものと思われる。九州海域のアサリは春と秋の 2 回の産卵期があるとされる (平木 1917; 高 1957)。小長井町のアサリ養殖漁場がある有明海で

は4～6月、10月～11月に産卵期(藤森 1929)、5月上旬～中旬および10月下旬～11月上旬に産卵盛期(田中 1954)があるとされる。7～9月の夏の時期の肥満度や身入率は、春～初夏の放精放卵で生殖巣が萎縮し、かつ高水温下の代謝量の増加(第4章で後述)および前節で示した貧酸素等による漁場環境の悪化で栄養状態も良い状況ではなかったため、これらの値が低い値を示したと推察される。また秋の放精放卵以降の11～12月の肥満度や身入率は、各年9月～10月にかけて肥満度と身入率が増加した後、放精放卵による消耗で11月以降のそれらは減少するが、春～初夏の放精放卵以降のような大きな落ち込みがなく、肥満度15、身入率32%を下回ったのは2006年12月19日のみ(肥満度11.3、身入率26.1%)であった。

アサリの炭水化物含量や水分含量の季節的变化は佐伯・熊谷(1980)や白石ら(1995)の報告があり、佐伯・熊谷(1980)は山口県秋穂町産のアサリの炭水化物含量は4月～7月に高く、10月～1月は低く、アサリ産卵期前後における肥満から衰退の時期と一致する。また水分含量は炭水化物含量の減少を補充し、逆に変動(10月～1月に増加)するとしている。一方、白石ら(1995)は福岡市産のアサリの炭水化物含量が3月～5月にかけて高く、6月に放精放卵で一度減少した後、8～9月に再度高くなり、10～11月の放卵放精で12月に向かって再び減少するなど、炭水化物含量は春と秋2回の産卵期の影響を受け変動するとしている。

本調査で炭水化物含量が50 mg/g以上の平均含量は2006年の6月～8月を除き、12月から5月の間に観察され、10月～12月にあるとされる秋産卵の影響で炭水化物含量が減少した後、冬季～春季の有明海でこの時期増殖する珪藻等の餌料を利用し、春産卵のため炭水化物含量の蓄積を図っていると推察される。また、2006年の夏季は前節で述べたが降雨の影響が強い年であったため、海域に流入する栄養塩により餌料環境が他の年よりも良かったのではないかと推察される。一方、炭水化物含量が30 mg/gを下回る低い時期は2005年6

月6日、同年8月19日～9月16日、同年11月1日、2006年12月19日と各年低い時期には違いがあるものの、2005年6月以外は8月～12月の時期に低く、秋の産卵期および夏季高水温や貧酸素等の漁場環境の悪化から低い値となったのではないかと推察される。

水分含量は佐伯・熊谷(1980)が示したとおり炭水化物含量の減少を補充するような変動を示し、2006年6月12日～8月22日の期間を除くと、水分含量が78%を下回った時期は、炭水化物含量が50 mg/g以上の時期と良く一致した。

水分含量が80%以上は2005年の5月を除き、9月～12月の秋季を中心とした時期に観察され、秋の産卵期および夏季高水温や貧酸素等の漁場環境の悪化から炭水化物含量が30 mg/gを下回った時期と良く対応した。

3 節 アサリの生理状態評価指標について

結果と考察

2 節で調査時期毎の変化を調べた肥満度、身入率、炭水化物含量、水分含量の調査日別平均値の関係を Fig. 2-6 に示した。統計的処理について、 $P < 0.05$ で相関の有意性について検定を行った(以下、特に言及しない限り統計処理には EXCEL 統計 Ver.6.0, エスミ社を使用)。

肥満度と身入率の関係では $r^2 = 0.96$ と有意できわめて高い正の相関 ($n = 56$) を示した。炭水化物含量と水分含量の関係では $r^2 = 0.71$ と有意で負の高い相関 ($n = 56$) を示した。Fig. 2-7 に調査日別の炭水化物含量の平均値を湿重 1g 当たりの百分率とし、同じく調査日別の水分含量の平均値および炭水化物含量と水分含量の平均値の和を示した。佐伯・熊谷(1980)が示したとおり、炭水化物含量が減少すると補充する形で水分含量が増加しており、このような理由で負の高い相関を示すと推察される。これ以外の相関 ($n = 56$) も有意であったが、肥満度と炭水化物含量 ($r^2 = 0.13$)、肥満度と水分含量 ($r^2 = 0.13$)、身入率と炭水化物

含量 ($r^2=0.16$), 身入率と水分含量 ($r^2=0.15$) はそれぞれ高い相関を示さなかった。

きわめて高い正の相関を示した肥満度および身入率をアサリの生理状態評価指標として利用する長所と短所について述べる。

これまで全国で肥満度が広く用いられてきたため、肥満度は知見の集積がある点に長所がある。しかし、身入率は肥満度と極めて高い正の相関があり、少なくとも今回供試した小長井町産アサリではほとんど誤差なく肥満度に変換し、他県の肥満度で評価した調査事例との比較が可能である。

アサリは地盤高が高いなど生息環境が良好でない場合、丸型指数(殻幅/殻長)が高くなり(西沢ら 1992; 柿野 1996)、丸型指数が高いアサリは殻長に対して相対的に殻の厚みが厚くなる(日向野未発表)としている。肥満度では殻内容積を想定した値を基準とし、殻長、殻高、殻幅の積を分母としているため、丸型指数の変化を比較的受けにくいと考えるが、身入率は丸型指数の増加、つまり殻が厚くなることによる殻重量の増加の影響を受けると考えられる。このため、肥満度は、単純に湿重(軟体部)の増減(例えば成熟など変化)を身入率よりも誤差なく捉えやすいと思われる。西沢ら(1992)は肥満度は季節的変動(水温、餌、成熟等)が大きいのに対し、丸型指数は成長の経過を累積した季節的な変動が小さい指標であるとしている。しかし長期的な生息環境の悪化などの変化を評価する場合、肥満度はほぼ湿重のみの増減で評価をしているため、殻の形に表れるこれらの変化を同時に求めることができる丸型指数とあわせて評価すべきと考えるが、身入率は殻重量と湿重の両方の変化を反映するため丸型指数を使用せずとも捉えることができると考える。身入率は、軟体部を殻から切除するためのメスやおよび殻や軟体部の余分な水分を取り去るためのタオルやワイプなどと100分の1g程度の表示が可能の簡易な電子天秤などがあれば測定できるが、肥満度はその他に殻長等を測定するノギス等が必要になる。また肥満度を数個体以上測定する際は殻長、殻高、

殻幅の3箇所をノギス等で計測し、個体識別した後、軟体部を取り出し電子天秤等で計測し、殻長等と湿重を間違いなく対応させる必要がある。殻長等の測定はノギスの操作によって誤差が生じやすく、通常のノギス(高価なデジタル表示のノギスを除く)では目盛りの読み間違いを起し、測定に慣れた人でないと正確に測定できない可能性もある。一方、身入率は軟体部を取り出し、殻重量と湿重を電子天秤等で求めるだけであるので、データの読み間違いや取り違えも起こりにくく、計測の手間や時間も少なくできる。

漁業者に対し、アサリの身入りの状況を伝える際、肥満度のような殻内容積を想定した指標を用いるよりも剥き身(軟体部)と、殻と剥き身の重量比のようなそれぞれ重量で比較した指標のほうが漁業関係者の感覚に合うようで、その測定の簡便さから現在、小長井町など県内のアサリの身入り状況を把握するのに身入率が用いられている。

測定に必要な器具、測定データの取り違え、測定にかかる時間等の少なさと過去他地域で広く用いられてきた肥満度との高い互換性から、現場でアサリの生理状態である「軟体部の充実や痩せ(身入り)」の状況を把握する場合、漁協職員や漁業者等多くの人が導入しやすく、測定が容易な身入率が有効である。

次に、高い負の相関を示した炭水化物含量および水分含量をアサリの生理状態評価指標として利用する長所と短所について述べる。

炭水化物含量はアサリの栄養蓄積状態を表し、後述(第4章)する無酸素耐性時間との相関関係もある。また、アサリが含有する炭水化物の大部分を占めるグリコーゲン(佐伯・熊谷 1980)は二枚貝の生理状態評価指標として有効であるとの知見もある(Gabbott and Stephenson 1974; Uzaki et al. 2003)。しかし、その測定には数多くの機材(分光光度計など高価な機材を含む)、水酸化カリウムや濃硫酸などの劇物を含む薬品類、安全正確に分析操作する熟練した技術や知識、手間や時間を要する。一方、水分含量は軟体部の湿重を測定した後、

乾燥器で乾燥し、乾重を求めるだけであるので、電子天秤や乾燥器など以外は特に必要なものはなく、その操作も簡単・安全で、手間もかからず、時間もアサリの場合、軟体部の乾燥にかかる2~3日以内で求めることができる。よって、炭水化物含量を分析するための分光光度計などの機器や劇薬を含む薬品がそろっており、その分析操作を行う熟練した技術と知識およびそれにかかる時間と手間をかけることができる研究機関等では、アサリの生理状態評価指標として栄養蓄積状態などを直接捉えることができる炭水化物含量の測定が有効だと考える。しかし、それらの設備や技術等を持たない場合や大量のサンプルを処理し、分析にかかる手間と時間を十分にかけることができない場合などは簡便で特別な技術を要しない水分含量を測定することによって、高い精度 ($r^2 = 0.71$ と負の高い相関) で炭水化物含量に変換し、栄養蓄積状態等の生理状態を把握できる。

また、水分含量の測定では、乾重が求められることから、湿重測定時の軟体部表面の水分の除去による誤差の影響がなく、精度が高いと考えられる乾燥肥満度や乾燥身入率、海外で養殖二枚貝の生理状態評価指標として精度が高く有効であるとされる The dry flesh weight : The dry shell weight ratio (Lucas and Beninger 1985) などに変換可能である。

以上の理由から、身入率と水分含量は幅広く簡便に使用できる有効なアサリの生理状態評価指標といえるため、数多くの試料を処理する研究者等はもちろんのこと、養殖現場で働く漁業者や漁協職員などが漁場環境 (収容密度, 餌料, 底質等) や生理状態等 (貧酸素耐性 (生残に関係) : 第4章2節以降で後述) を把握するために活用できるこれらの指標の利用を推奨したい。

炭水化物含量が高いと貧酸素耐性時間も長い (第4章3節で後述) との関係もあり、これらの指標、特に炭水化物含量とそれに変換可能な水分含量はアサリの死にやすさを図る指標となる。大量へい死の危険性を予知 (時期, 場所等) し、対

策 (漁獲, 移殖, 適正密度化, 底質改良等) を立てる上で重要な情報であるので、今後も継続的に調査し、アサリの生理状態を把握する必要がある。

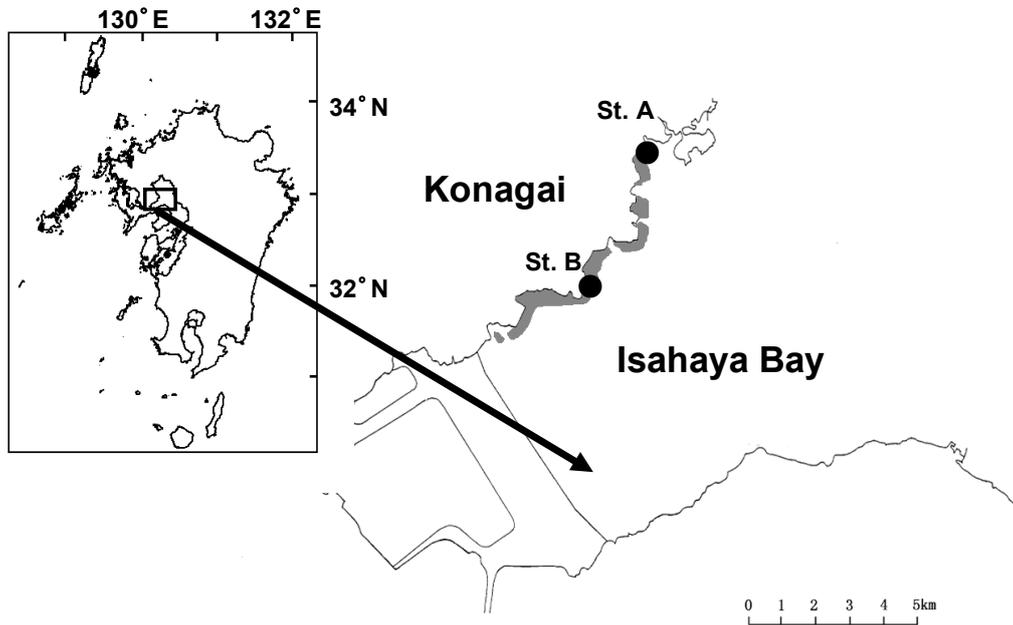


Fig. 2-1. Location of the monitoring stations A and B in Isahaya Bay, Kyushu, Japan. The shaded areas represent the Manila clam culture area.

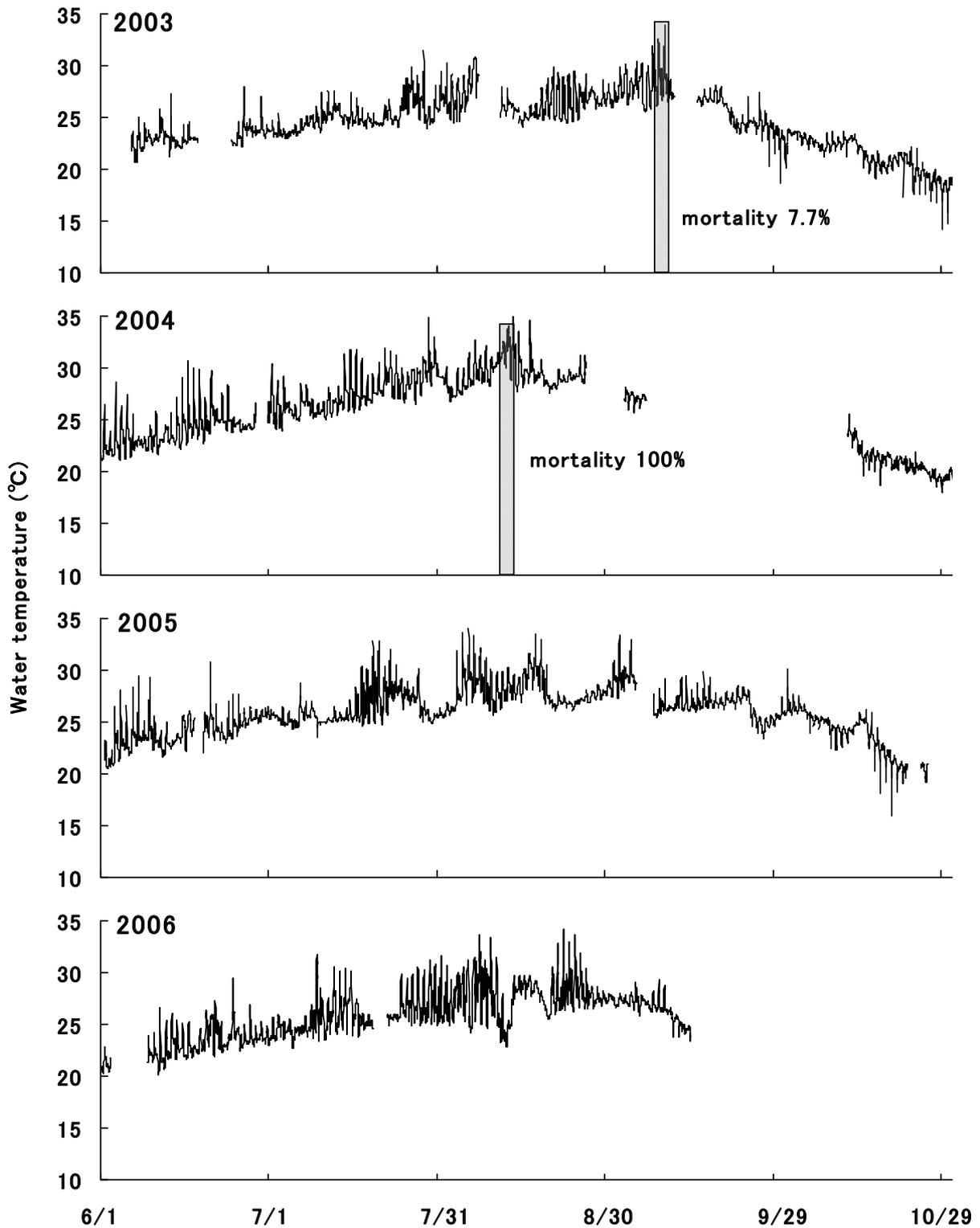


Fig. 2-2. Continuous records of bottom water temperature in the Manila clam culture area in Konagai shown in Fig. 2-1 (St. A) from June 2003 through October 2006. The grey bars indicate periods of mass mortality.

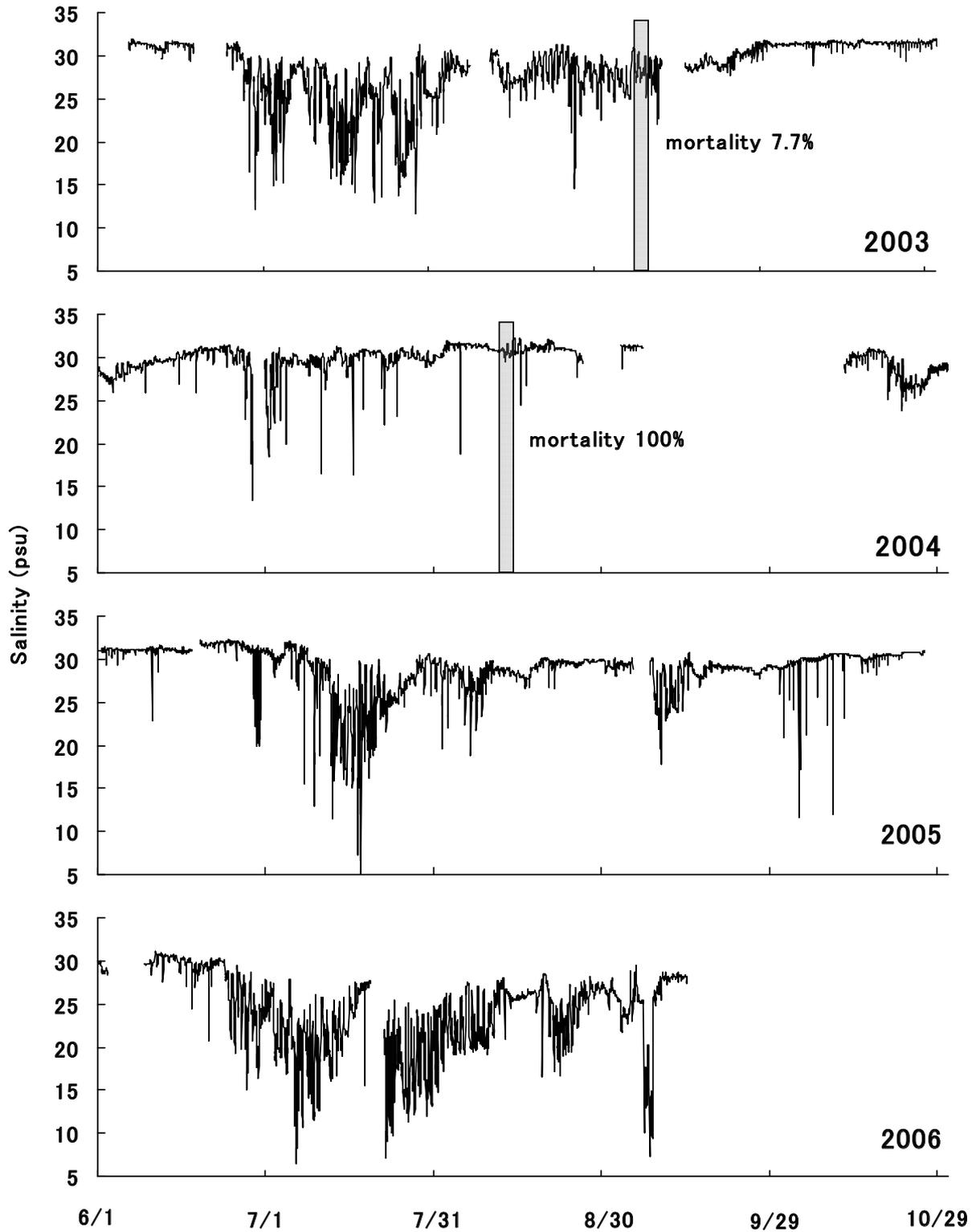


Fig. 2-3. Continuous records of bottom water salinity in the Manila clam culture area in Konagai shown in Fig. 2-1 (St. A) from June 2003 through October 2006. The grey bars indicate periods of mass mortality.

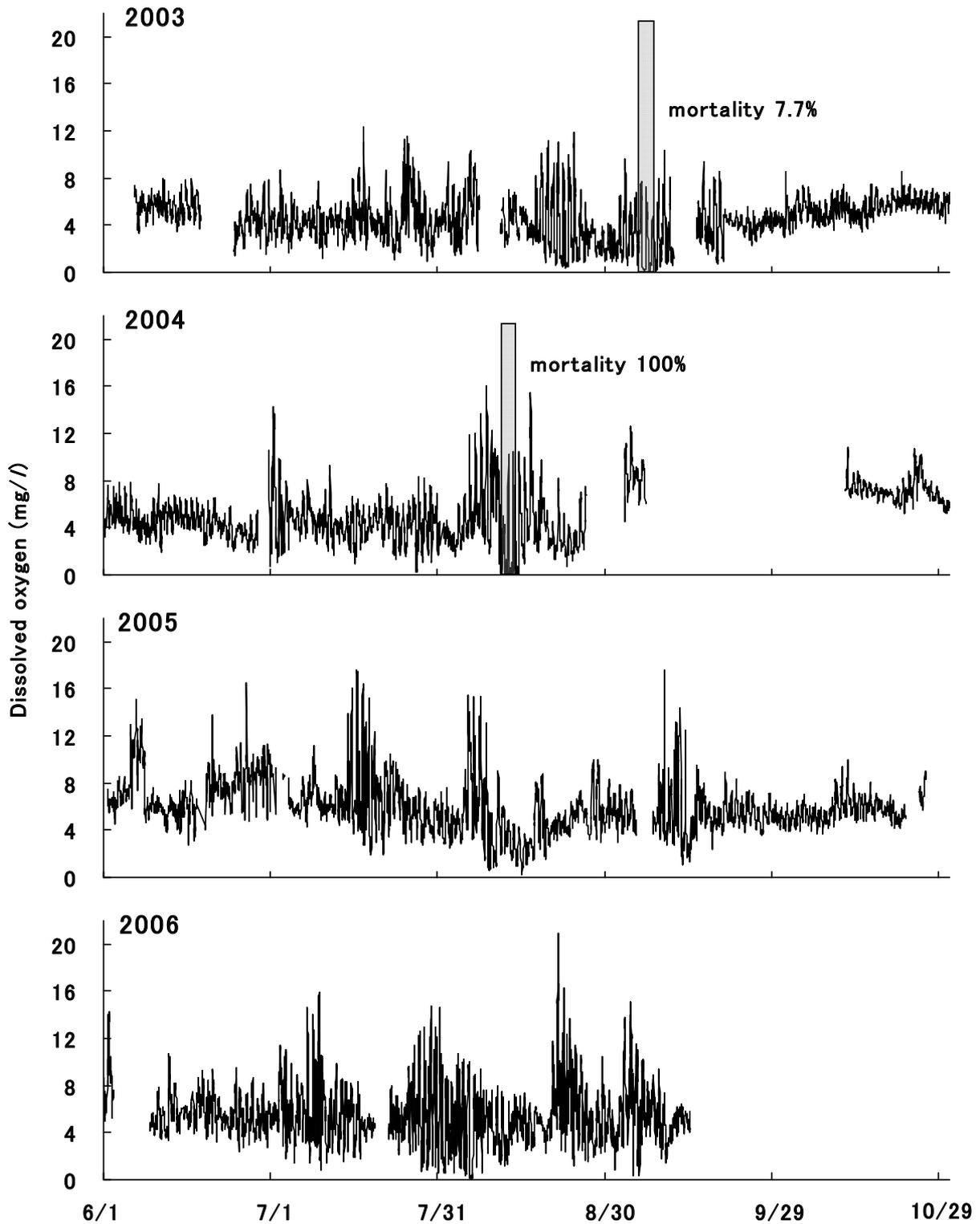


Fig. 2-4. Continuous records of bottom water dissolved oxygen concentration in the Manila clam culture area in Konagai shown in Fig. 2-1 (St. A) from June 2003 through October 2006. The grey bars indicate periods of mass mortality.

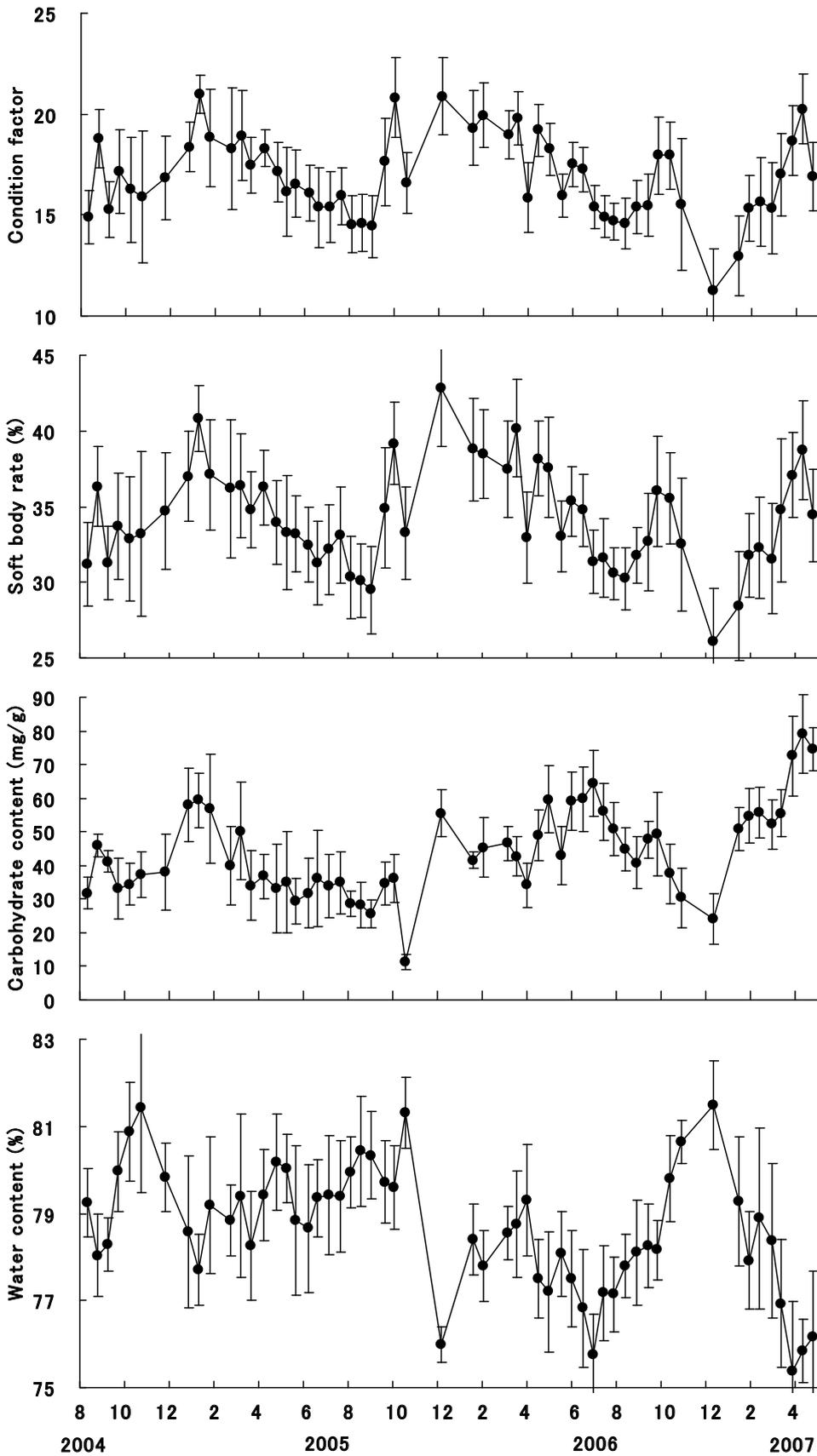


Fig. 2-5. Changes in condition indices (condition factor, soft body rate, carbohydrate content, tissue water content) of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* collected in the culture area shown in Fig. 2-1(St. B) from August 2004 to May 2007. Data are given as the mean \pm SD. N = 20 for condition factor and soft body rate, n = 10 for carbohydrate content and tissue water content.

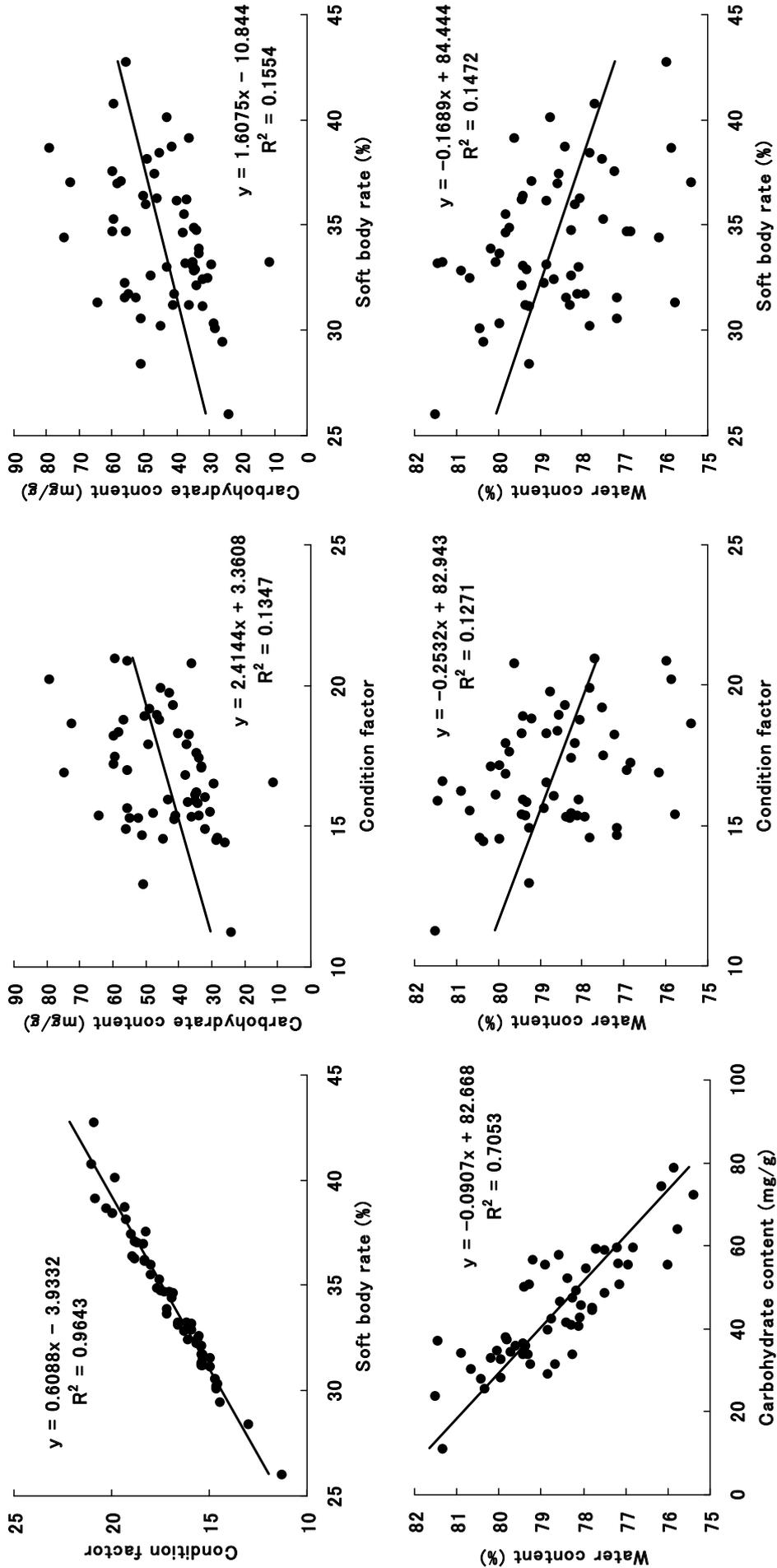


Fig. 2-6. Relationships mean values of the condition indices (condition factor, soft body rate, carbohydrate content and tissue water content) of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* collected in the culture area shown in Fig. 2-1 (St. B) from August 2004 to May 2007. N = 20 for condition factor and soft body rate, n = 10 for carbohydrate content and tissue water content.

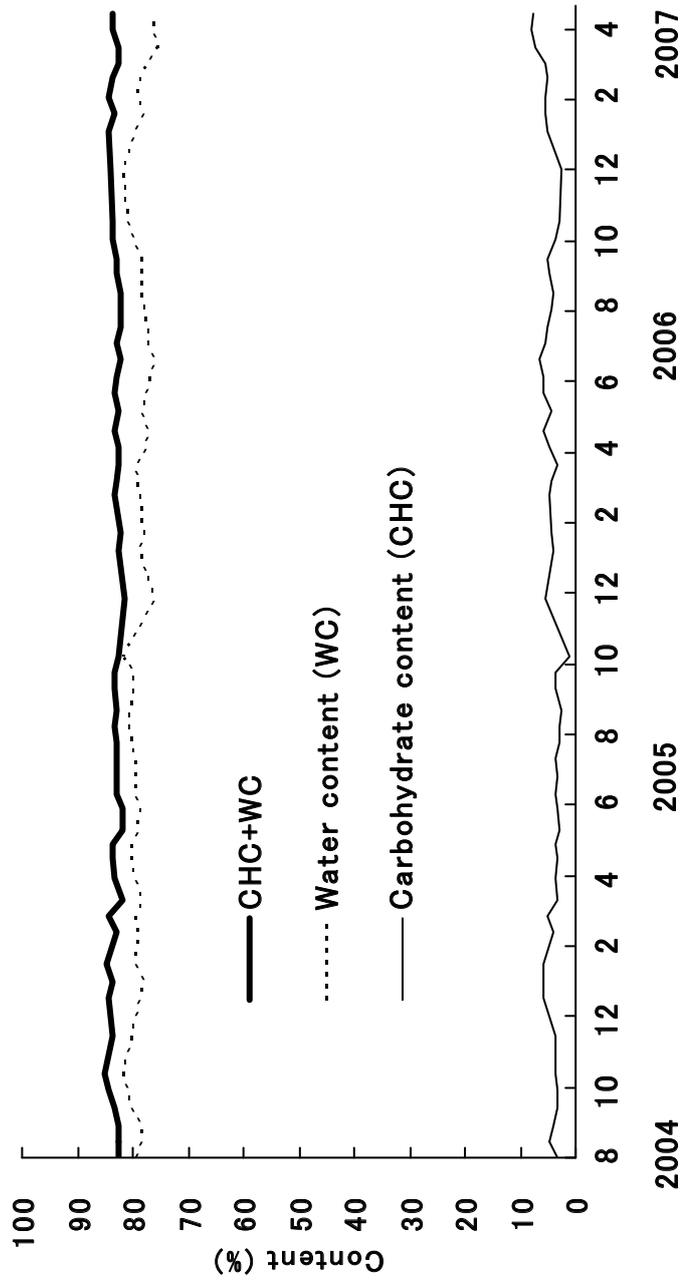


Fig. 2-7. Changes in mean carbohydrate content, tissue water content and the sum of these two parameters of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* collected in the culture area shown in Fig. 2-1 (St. B) from August 2004 to May 2007 (n = 10).

第3章 低塩分耐性について

アサリは陸水の影響による塩分変動が激しい干潟域等に生息しており（牧 1915, 藤森 1929）、高い塩分耐性をもつと推察される。倉茂（1942a）は朝鮮半島産アサリを用いて水温 6.0～13.7°C で塩分耐性の実験を行い、比重 1.015（21.9psu 程度）および 1.029（38.9psu 程度）の海水で 2 ヶ月飼育するとへい死率 7～23%となるが、1.018～1.027（25.8～36.3 psu 程度）ではへい死率は 2～7%にとどまると報告している。また、倉茂（1942a）は短期間のアサリの低塩分耐性について、水温 18.0～24.3°C で比重 1.000～1.023 までの 5 段階の塩分で 9 日間の耐性実験を行い、比重 1.015（22.0 psu 程度）の海水で飼育した場合、7 日目に初めてへい死が観察され、9 日後のへい死率は 5～15%にとどまったが、1.010（15.4 psu 程度）では 5 日後からへい死が始まり、9 日目までに生残個体が半減するという結果を得ている。さらに、1.005（8.8 psu 程度）ではへい死が観察される時間は早まり、3 日目からへい死し始め、9 日目にはほとんど全滅すると報告している。これらの実験結果から、アサリが一定の塩分耐性を持つことを示している。しかし、これらの研究ではアサリを低塩分に曝露し、その生残率の推移を観察することにとどまっている。

多くの海産無脊椎動物の体液は海水と等張であり、軟体動物等では海水の塩分変化に従い、体液の浸透圧が変化した場合、細胞は内部の溶質濃度が変化し、体液と等張となる（Lockwood 1973）。鈴木ら（1987）は体細胞が耐えられる浸透圧には限度があり、個体はその範囲内で浸透圧の変化に適応して生存でき、この浸透圧変化に対する適応能力は二枚貝の種類によって相違があり、このことは自然における生息分布を規定する一要素となっているとしている。

ヤマトシジミ *Corbicula japonica*（中村ら 1996）、アカガイ *Scapharca broughtonii*（沼口 1999）、マガキ *Crassostrea gigas*（Hosoi et al. 2003）等では、低

塩分曝露時の血リンパや体液等の塩分、軟体部の水分含量の変化などが調べられているが、低塩分がこれら二枚貝類の生残にどのように影響しているかについては十分に検討されていない。Funakoshi et al.（1988）はシナハマグリ *Meretrix pethechia/lis*、バカガイ *Maetra chinensis*、イタヤガイ *Pecten albicans* など 11 種について、貝殻に楔をはめ開殻状態にした貝類を 25～200%海水に 48 時間浸漬、その後 100%海水に戻し 1 週間の生残を調べるとともに、上記二枚貝を 25～200%海水に浸漬し、外套腔液および血リンパの浸透圧が外生水とほぼ等浸透になる時間によって閉殻能力を判定し、その生残と閉殻能力から塩分耐性を評価した上でそれぞれの生活環境や行動に応じた適応について考察している。しかし、アサリにおいては低塩分曝露時の血リンパ浸透圧や軟体部の水分含量の変化などと塩分耐性に関する詳細な知見はない。

本章では、低塩分がアサリの血リンパ浸透圧や軟体部の水分含量に与える影響について調べ、アサリの低塩分耐性について考察した。また、長崎県諫早市小長井町のアサリ養殖漁場において観測された 4 ヶ年（2003～2006 年）の塩分の推移（第 2 章 1 節）と、同漁場でしばしば発生する大量へい死との関連についても考察した。

1～4 節 共通の材料および方法

長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場（Fig. 2-1）で採取したアサリ成貝を実験材料とし、下記の 1～4 節の実験を実施した。供試個体は、実験に供するまで長崎県総合水産試験場の陸上水槽で *Nannochloropsis* sp. を給餌して蓄養（10 日間以内）した。

アサリ飼育水槽の水温を自然水温（14.9～27.7°C）から 2～3 日間かけて 25°C になるよう調整し、実験時の水温はすべて 25°C とした。実験開始直前の飼育水の塩分は 33.9～35.1 psu であった。

各実験に用いた低塩分海水の塩分調整は、曝気

により残留塩素を取り除いた水道水と濾過海水を混合することによって行った。換水（1節を除く）は1日毎にあらかじめ塩分、水温を調整した水槽にアサリを移し替える方法で行った。1日あたり3～4回実験水槽の塩分を確認し、設定値となるよう調整した。塩分の調整と確認には電導度計 Cond340i (WTW社) を用いた。

血リンパは、アサリの殻縁辺部をピンセットの先でわずかに開殻して、1 ml シリンジと 24～25G 注射針（テルモ社）を用いて前後閉殻筋から 0.1～0.5 ml 採取した。採取した血リンパおよび低塩分海水はアシストチューブ（容量 2 ml, アシスト社）に入れ、-35℃ で冷凍保存した。実験終了後、蒸気圧法オズモメーター5520型 (Wescor社) を用いて浸透圧を測定した。

水分含量は第2章2節と同様に求めた。

実験中は無給餌とした。へい死の判定は、開殻している個体の外套膜、閉殻筋にピンセットの先で刺激を加えた際の閉殻反応の有無によって行った。

以下、データは可能なかぎり平均値 ± 標準偏差 (SD) として示した。

統計処理について、1節の生存個体数の推移はノンパラメトリック Kaplan-Meier 法で解析し、log-rank test により、各塩分の生残曲線を比較した (SPSS 15.0 Advanced Models, SPSS社)。2節の血リンパ浸透圧の変化および4節の水分含量の変化については、一元配置分散分析 (ANOVA) により有意差の確認を行い、多重比較検定は2節がダネットの方法 (Dunnnett test)、4節がシェフェの方法 (Scheffé test) により $P < 0.05$ で有意差の検定を行った。

1節 異なる低塩分における生残の変化

材料および方法

実験は肥満度 12.9 ± 1.6 、殻長 30.7 ± 1.7 mm のアサリを用い、1999年11月に3回繰り返し行った。塩分 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 psu に調整した

低塩分海水を満たした 2 l ガラスビーカーにアサリを 10 個体ずつ収容した。実験開始から 96 時間後まで 24 時間毎に生残個体を計数し、へい死個体を取り上げた。換水は各塩分に調整した低塩分海水を各槽に 1 日あたり 25～30 l 注水してオーバーフローさせることによって行った。

結果

アサリを低塩分海水に曝露した時の生残率の推移を Fig. 3-1 に示す。塩分が 15 psu では3回の繰り返し実験とも 96 時間までアサリのへい死は観察されなかった。しかし、15 psu 未満では塩分が低いほど 48 時間以降の生残率が低下し、96 時間後の生残率は、12.5 psu では 60～80%、10 psu では 10%であった。また、7.5 psu 未満では 72 時間まで生残する個体はいなかった。15 および 12.5 psu と 10 psu 以下の生残曲線の間には有意差があった (log-rank test, Table 3-1)。

考察

アサリを水温 25℃、0～15 psu の 7 段階の低塩分海水に曝露した結果 (Fig. 3-1)、2 日間以上の曝露では 12.5 psu 以下でへい死個体が現れた。さらに、10 psu 以下の低塩分での生残率曲線 (Table 3-1) は、15 および 12.5 psu と有意に異なり、アサリのへい死がより早期に起こることがわかった。15 psu では4日間の曝露期間中へい死は認められなかった。これらより、2～3 日間という短期間でアサリの生残に影響をおよぼす低塩分限界は水温 25℃ においては 12.5 psu 以下と判断される。

2節 低塩分曝露時の血リンパ浸透圧の変化

材料および方法

2005年7月に塩分 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 30 psu に調整した低塩分海水を満たした 10 l ポリプロレン水槽に肥満度 16.6 ± 1.1 、殻長 36.0 ± 1.6 mm のアサリを各槽 55 個体ずつ収容した。実験開始から 1, 3, 5, 7, 9, 12, 24, 36, 48, 72

時間後に5個体ずつ取り上げ、血リンパを採取した。最終サンプリング時に各槽に残された10個体の生残状況を確認した。

結果

アサリを低塩分海水に曝露した時の血リンパ浸透圧の経時的変化を Fig. 3-2 に示す。塩分が25~30 psu では実験開始3時間以内に血リンパは外界水とほぼ等浸透となった。しかし、海水の塩分が低下するにつれて血リンパ浸透圧が外界水と等浸透となるまでの時間が延長し、22.5 psu では12時間、20 psu で36時間、17.5 psu で48時間、15 psu では72時間を要した。なお、10 および 12.5 psu では72時間後までに血リンパ浸透圧は外界水と等浸透にはならなかった。実験開始後、血リンパ浸透圧が曝露開始時の浸透圧と比較して有意に低い値になるまでの時間は、22.5~30 psu で1時間、20 psu で12時間、17.5 psu で24時間、15 psu で36時間、12.5 psu で48時間、10 psu で36時間であった。また、曝露開始72時間時点で観察されたへい死個体数は、10 psu では4個体、12.5 psu では1個体で、15 psu 以上ではへい死はみられなかった。

考察

多くの海産二枚貝は、外界水の塩分変化とともに体液の塩分が変動する浸透順応型動物であることが報告されている (Robertson 1964 ; 川本 1954 ; 村地・古川 1958 ; 中村ら 1996 ; 沼口 1999 ; Hosoi et al. 2003)。

本実験で、外界水と血リンパが塩分15~34 psu の範囲で等浸透 (Fig. 3-2) になったことから、アサリも広塩性浸透順応型動物と判断される。しかし、20 psu 以下の塩分では海水浸透圧の低下とともに、血リンパ浸透圧が低塩分に曝露する前の浸透圧と比べて有意に低下するのに要する時間、および外界水と等浸透になるまでの時間が顕著に延長した。

3節 低塩分に対する閉殻の役割

材料および方法

実験開始2日前に肥満度 14.9 ± 1.6 、殻長 33.1 ± 1.4 mm のアサリ約30個体を約7%の塩化マグネシウム六水和物 (和光純薬工業社) 溶液に浸漬し、閉殻筋が弛緩し開殻した個体の左右の殻の間に10.5 mm 角、厚さ約3.5 mm のモザイクタイルを挟み込み、瞬間接着剤アロンアルファ 253 (東亜合成社) で左右の殻の外側と接着させ、強制開殻状態とした。施術個体 (以下強制開殻貝) は実験開始まで流水海水中におき、へい死貝や楔に用いたモザイクタイルが脱落した個体を除いて、実験に用いた。2004年8月に塩分15 psu の低塩分海水を満たした10 l ポリプロピレン水槽に、強制開殻貝および通常の開殻状態のアサリ (以下通常貝) を各18個体収容し、15 psu 海水曝露後、通常貝は8, 21, 29, 45, 79時間後に、強制開殻貝は1, 3, 6, 9, 24, 57時間後3個体ずつ取り上げ血リンパを採取した。通常貝の殻開閉の観察は各サンプリング時に目視で行った。

なお強制開殻貝は、実験中強制開殻に用いたモザイクタイルの脱落などにより供試個体数が減少したため、24, 57時間後のサンプリング時、血リンパ採取は各2個体ずつとなった。

結果

通常貝と強制開殻貝を15 psu 海水に曝露した時の血リンパ浸透圧の推移を Fig. 3-3 に示す。通常貝は観察時、常に閉殻していた。強制開殻貝の血リンパ浸透圧は8~9時間でほぼ外界水と等浸透になった。しかし、通常貝は実験開始24時間後まで、血リンパの浸透圧はほとんど変化せず、それ以降徐々に血リンパの浸透圧が低下して79時間後に外界水と等浸透になった。

考察

二枚貝類は外界水の急激な環境変動に際し、貝殻を固く閉じて外界水の侵入を阻止し悪影響が軟

体部へおよぶのをある程度防いでいることが知られている(村地・古川 1958)。Funakoshi et al. (1988)も各種二枚貝の閉殻能力と低塩分における血リンパ浸透圧の変化を測定し、塩分変化が大きい潮間帯に生息するシナハマグリなどの二枚貝は閉殻により、急激な塩分変化に対応していると述べている。本実験で、塩分 15 psu に通常貝を曝露すると閉殻し続け、24 時間程度血リンパ浸透圧をほぼ曝露前の値に維持したのに対し、強制開殻により閉殻機能を制限した場合、血リンパが 8~9 時間で外界水とほぼ等浸透となった (Fig. 3-3)。これらのことからアサリにおいても急激な外界水塩分の低下に対して、閉殻が恒常性維持のための初期反応であると判断される。2 節の実験結果 (Fig. 3-2) で 22.5 psu 以上では低塩分海水曝露 1 時間後には血リンパ浸透圧が有意に低下したこと、一方 20 psu 以下の低塩分海水では血リンパ浸透圧が 12 時間以上にわたり有意に変化しなかったことから、持続的閉殻を引き起こす海水塩分の閾値は 20 psu 付近にあると考えられる。アサリに対する塩分の影響について、相島 (1993) は 6~7 月の梅雨時期 20 psu を下回る環境では閉殻によりアサリの潜砂率が低下するとしており、上記の推論を支持している。

4 節 低塩分曝露時の血リンパ浸透圧と水分含量の変化

材料および方法

2006 年 4~5 月に塩分 10, 15, 22.5 psu に調整した低塩分海水を満たした 10 l ポリプロピレン製水槽 3 槽に殻長 34.2 ± 1.9 mm のアサリを投入した (肥満度はそれぞれ 10 psu は 19.2 ± 1.3 , 15 psu は 15.9 ± 1.7 , 22.5 psu は 19.8 ± 1.3)。收容個体数は塩分 10 psu および 15 psu は 100 個体、塩分 22.5 psu では 120 個体とした。塩分 10 および 15 psu では開始時, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 時間後に、塩分 22.5 psu では開始時, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 72 時間後に供試個体を 10 個体

ずつ取り上げた。取り上げた 10 個体のうち 5 個体は血リンパ採取, 5 個体は水分含量測定のために用いた。

また、各サンプリング時にアサリの生残状況を確認し、へい死個体はその都度取り上げた。

結果

低塩分海水に曝露した時の血リンパ浸透圧と水分含量の推移を Fig. 3-4 に示す。

10 psu 海水中では 60 時間後に生残個体の血リンパ浸透圧は外界水とほぼ等浸透となり安定した。曝露開始時 $78.3 \pm 1.4\%$ であった水分含量は、96 時間後にはこれより有意に高い $88.3 \pm 0.7\%$ を示した。血リンパ浸透圧が安定した 60 時間後の水分含量 ($85.0 \pm 3.3\%$) と、72 時間後の水分含量 ($87.2 \pm 0.9\%$) および 96 時間後の水分含量に有意差はなかった。

15 psu 海水中では 60 時間後に血リンパ浸透圧が外界水とほぼ等浸透となり安定した。曝露開始時 $80.6 \pm 0.9\%$ であった水分含量は、36 時間後には開始時より有意に高い値 ($86.6 \pm 1.9\%$) となり、以降同様な水準で推移した。血リンパ浸透圧が安定した時点の値 (60 時間, $86.1 \pm 0.9\%$) とそれ以降の値には有意差はなかった。

22.5 psu 海水中では 6 時間後に血リンパ浸透圧が外界水とほぼ等浸透となり、以後安定した。曝露開始時 $79.2 \pm 0.9\%$ であった水分含量は血リンパ浸透圧が外界水とほぼ等浸透となった 6 時間後には $83.0 \pm 0.6\%$ まで増加し、開始時より有意に高い値となった。水分含量はその後減少に転じ、48 時間後に $81.5 \pm 0.4\%$, 72 時間後に $81.4 \pm 1.0\%$ と 6 時間後の水分含量に対し有意に低い値となった。

15 および 22.5 psu 海水中では実験中のアサリのへい死は観察されなかった。10 psu 海水中では、36 時間後に 2 個体、48 時間後に 3 個体、60 時間後に 5 個体、72 時間後に 5 個体、最終サンプリング時の 96 時間後に 4 個体のへい死が観察された。

考 察

低塩分曝露時の血リンパ浸透圧と水分含量の変化を観察した実験 (Fig. 3-4) では、塩分が 22.5 psu では血リンパ浸透圧が外界水とほぼ等浸透となる時点で水分含量は最大値となり、それ以降やや減少した。多くの海産無脊椎動物は外界水と体液が等浸透であり、低塩分海水に曝露されると、まず体内に水が取り込まれることによって体重が増加し、ついで曝露前の状態近くまで回復するとされる (Lockwood 1973)。今回の現象は、外界水の浸透圧の低下によって体内に水が浸透し体重が増加した後、水分平衡や容積調節機能が働き、細胞内の水分が排出されたことによると考えられる。しかし、15 psu および 10 psu では血リンパ浸透圧が外界水とほぼ等浸透となった 60 時間後以降、水分含量には有意な変化がみられなかった。一方、15 psu では本実験および 1 節 (Fig. 3-1) で 96 時間後までへい死個体がみられなかったのに対して、10 psu では本実験で 36 時間以降、1 節 (Fig. 3-1) で実験開始後 24 時間～48 時間の間にアサリのへい死が起り始めた。これらの結果から、アサリが 96 時間生存できる塩分の下限は 15 psu 付近にあると思われる。また、10 psu において、へい死開始時期と血リンパ浸透圧および水分含量が有意に変化し始めた時期がよく一致している。これはまず血リンパの急激な浸透圧低下を防ぐために閉殻し (Funakoshi et al. 1988)、外界からの海水や酸素供給が遮断される。その結果、嫌気代謝が生存限界近くまで進行することになる。その後、嫌気代謝のためのエネルギー供給物質の減少や閉殻筋の疲労などにより開殻が起り、外界水の浸入により細胞内浸透圧が生存を維持できない状態まで低下し、へい死する可能性があると考えられる (Hochachka 1984 ; 鈴木ら 1987)。

本実験および 1～3 節の結果から、アサリは曝露直後に強固な閉殻防御反応を示す塩分は 20 psu 以下であり、10 psu 以下の低塩分では 2～3 日間で大量へい死が発生する可能性があると考えられる。

諫早湾が低塩分となる梅雨時期の底層水温は

2003～2006 年の 4 年間の小長井町のアサリ養殖漁場環境調査 (第 2 章 1 節, Fig. 2-2) では 24.9～26.1°C であり、本章の実験水温 25°C とほぼ同様の値であった。すなわち、実験における水温設定は妥当であったと考えられる。

養殖漁場環境調査 (第 2 章 1 節, Fig. 2-3) から、アサリが外界水の塩分低下に対して閉殻行動を示す 20 psu 以下の低塩分最大継続時間は、2003 年、2004 年、2005 年、2006 年それぞれで 20.5 時間、3 時間、7 時間、21.5 時間であった。

2003 年は 20 psu 以下の低塩分が最長で 20.5 時間 (7 月 25 日～26 日)、15 psu 以下が 2.5 時間 (6 月 29 日)、2004 年は 20 psu 以下が 3 時間 (6 月 28 日)、15 psu 以下が 0.5 時間 (6 月 28 日)、2005 年は 20 psu 以下が 7 時間 (7 月 15 日)、15 psu 以下が 2 時間 (7 月 12 日)、10 psu 以下が 0.5 時間 (7 月 17 日と 7 月 18 日)、2006 年は 20 psu 以下が 21.5 時間 (9 月 7 日～8 日)、15 psu 以下が 14.5 時間 (9 月 7 日～8 日)、10 psu が 6.5 時間 (7 月 6 日) 継続した。2003～2006 年の 4 年間における各低塩分最長継続時間は 20 psu 以下で 21.5 時間、15 psu 以下で 14.5 時間、10 psu 以下で 6.5 時間であった。

また、少なくとも数日間生存できる塩分の下限と考えられる 15 psu を下回る塩分の最大継続時間はそれぞれ 2.5 時間、0.5 時間、2 時間、14.5 時間であった。さらに、実験 1 で生残曲線が 12.5 および 15 psu の曲線と有意に異なった 10 psu 以下の塩分は 2005 年が 0.5 時間、2006 年が 6.5 時間にとどまった。

しかしそれにも関わらず、長崎県が行った調査 (未発表) では、調査漁場で 2003 年 9 月上旬に推定 7.7%、2004 年 8 月中旬に 100% のへい死が観察された (第 2 章 1 節, Fig. 2-3)。一方、大量へい死が起こった時には海水の塩分は高値を維持しており、また 2003 年、2004 年とも 15 psu 以下の低塩分が観測された時期に目立ったへい死が観察されなかったことから、低塩分だけでは両年のアサリの大量へい死を説明できない。養殖漁場環境調査 (第 2 章 1 節, Figs. 2-2, 2-4) から 2003 年のへ

い死直前時には平均水温 25.9°C (レンジ 25.5～26.8°C), 平均 DO 0.28 mg/l (0.15～0.84 mg/l) の貧酸素環境が 15 時間程度, 2004 年のアサリ全滅直前時 (後述の第 6 章 2 節, Fig. 6-7) には平均水温 31.3°C (30.0～34.1°C), 平均 DO 0.08 mg/l (0.03～0.70 mg/l : 期間中 20 分観測された 1.72～2.98 mg/l を除く) の貧酸素環境が約 14 時間程度継続したことが観測されていることから, これらのアサリ大量へい死については低塩分より貧酸素や高水温の影響が大きいと考えられる。

本章の実験は 3～4 日間の連続した低塩分曝露実験であり, 長期間の低塩分環境が及ぼす生理的影響や, 長時間の閉殻に伴う酸素欠乏やエネルギー消耗等の影響については今後の検討課題と考える。また, 梅雨期の大出水で比重 1.010 (水温 25°C で 17.3 psu 程度) 以下の低塩分が 8 日間継続し, 周辺漁場で平均 29% のアサリがへい死した福岡県有明海海域の事例 (山下ら 1989) 等もあることから, 15～20 psu 程度の塩分が長期間にわたって継続した場合, アサリ大量へい死が引き起こされる可能性は否定できず, 今後もアサリ漁場海水の塩分のモニタリングが必要である。

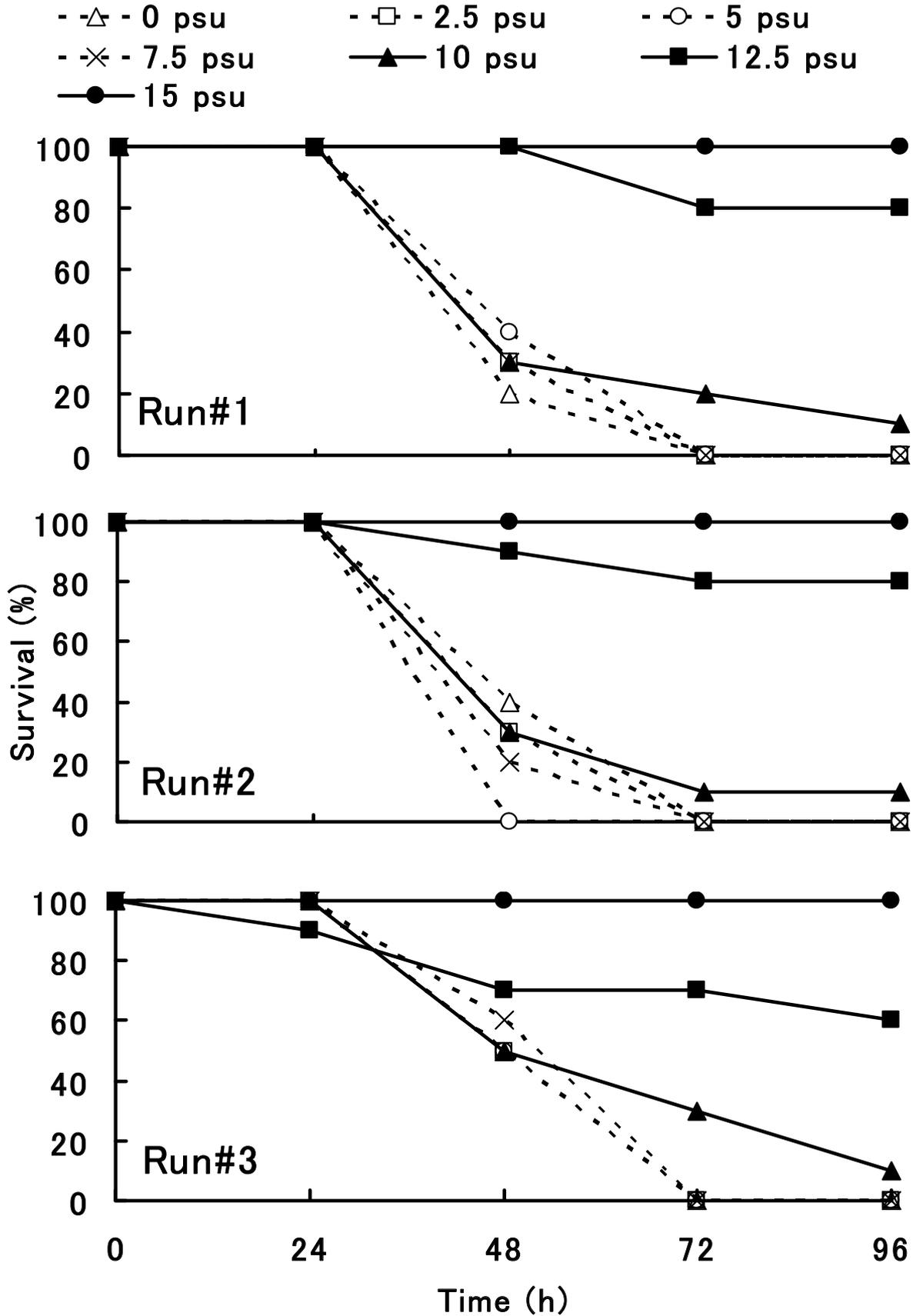


Fig. 3-1. Changes in survival of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to low-salinity seawater. Ten clams were used for each salinity exposure run. Results of statistical analyses are given in Table 3-1.

Table 3-1. Statistical comparison of the survival curves of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* shown in Fig. 3-1 with *log-rank* test

Run#1							
	0 psu	2.5 psu	5 psu	7.5 psu	10 psu	12.5 psu	15 psu
0 psu							
2.5 psu	NS						
5 psu	NS	NS					
7.5 psu	NS	NS	NS				
10 psu	NS	NS	NS	NS			
12.5 psu	***	***	***	***	***		
15 psu	***	***	***	***	***		NS

Run#2							
	0 psu	2.5 psu	5 psu	7.5 psu	10 psu	12.5 psu	15 psu
0 psu							
2.5 psu	NS						
5 psu	*	NS					
7.5 psu	NS	NS	NS				
10 psu	NS	NS	NS	NS			
12.5 psu	***	***	***	***	**		
15 psu	***	***	***	***	***		NS

Run#3							
	0 psu	2.5 psu	5 psu	7.5 psu	10 psu	12.5 psu	15 psu
0 psu							
2.5 psu	NS						
5 psu	NS	NS					
7.5 psu	NS	NS	NS				
10 psu	NS	NS	NS	NS			
12.5 psu	*	*	*	*	*		
15 psu	***	***	***	***	***		*

*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; NS $P > 0.05$.

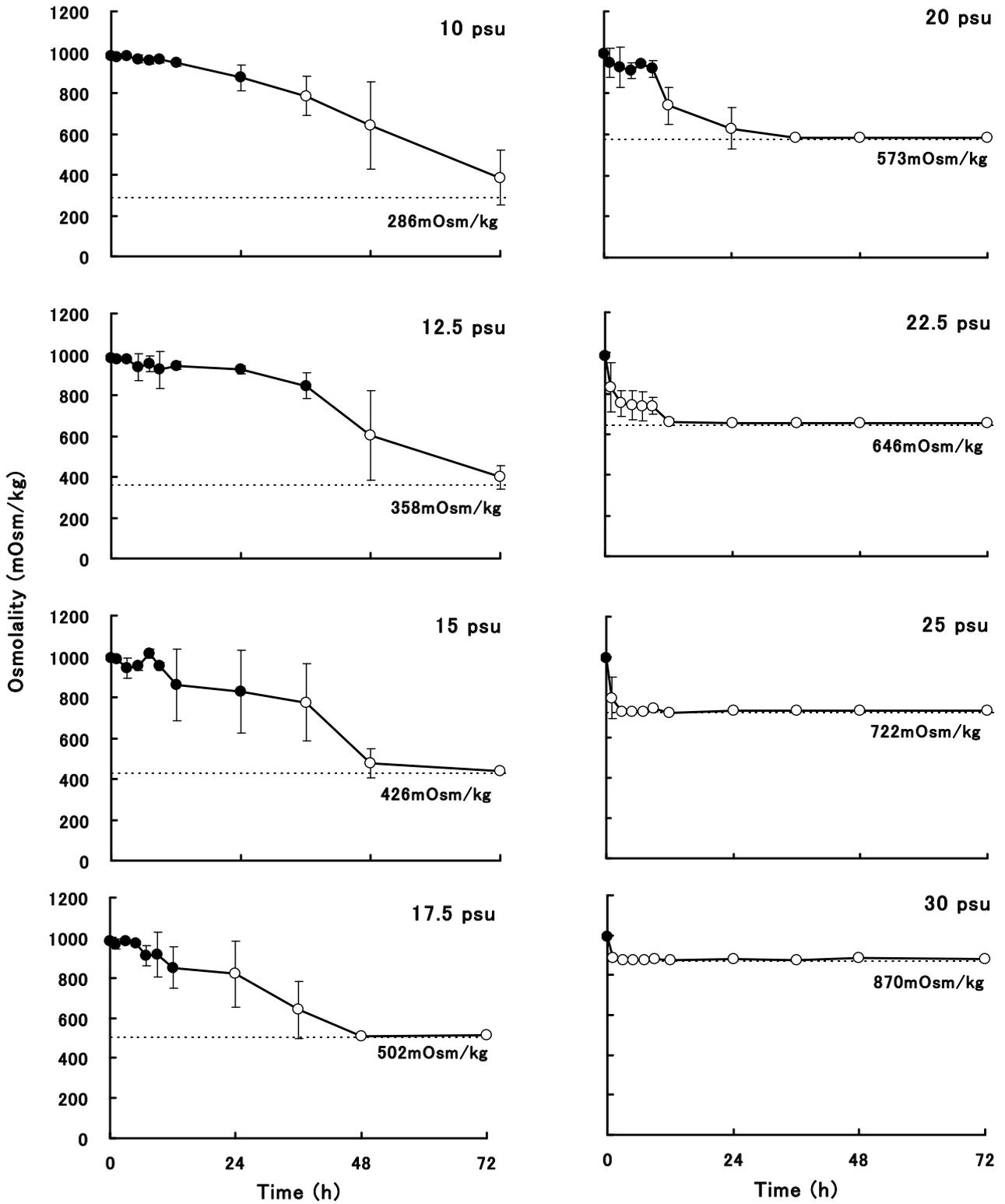


Fig. 3-2. Changes in hemolymph osmolality of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to low-salinity seawater. Data are given as the mean \pm SD (n = 5). Open symbols indicate significant difference from the corresponding 0 h value (*Dunnnett* test, $P < 0.05$). Horizontal broken lines indicate the ambient osmolality.

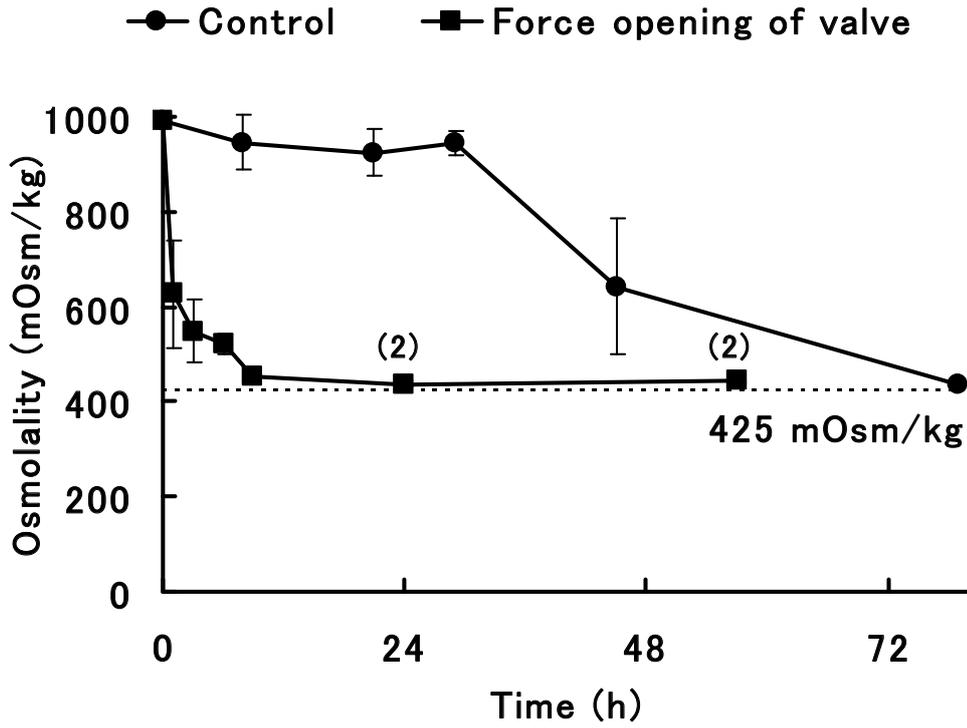


Fig. 3-3. Effect of forced opening of the valves on hemolymph osmolality in the Mania clam *Ruditapes philippinarum* exposed to 15 psu seawater. Data are given as the mean \pm SD ($n = 3$, except the 24 h and 57 h data for the treated group, where $n = 2$). The horizontal broken line indicates the ambient osmolality.

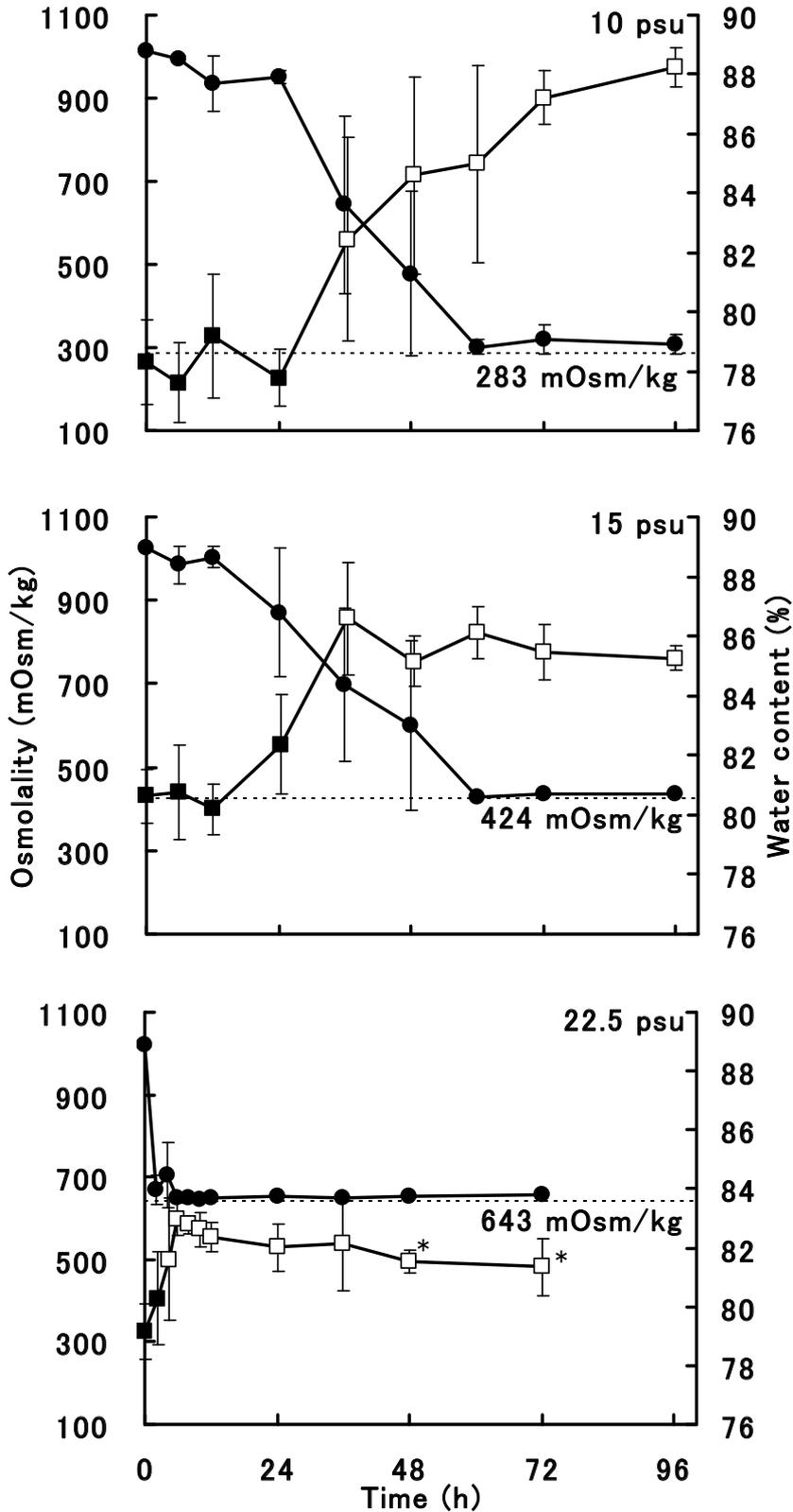


Fig. 3-4. Changes in hemolymph osmolality and tissue water content of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* reared in 10, 15 and 22.5 psu seawater. Data are given as the mean \pm SD (n = 5). Circles and squares represent hemolymph osmolality and tissue water content, respectively. Open symbols indicate significant difference from the corresponding 0 h value (*Scheffé* test, $P < 0.05$). Asterisks indicate significant difference from the value when the hemolymph osmolality became iso-osmotic with the ambient seawater (6 h in the 22.5psu series, *Scheffé* test, $P < 0.05$). Horizontal broken lines indicate the ambient osmolality.

第4章 貧（無）酸素耐性について

潮間帯および浅海に生息するアサリなどの二枚貝は、低塩分や貧酸素、干出など環境の変化に対し、第3章でも述べたように閉殻によって順応するが、閉殻時には外部の酸素を取り入れて利用できないため、無気呼吸を維持し、代謝を低くして比較的長期間生存する事が知られている（日向野2005）。アサリの貧（無）酸素耐性については倉塚（1942b）、柿野（1982）、萩田（1985）、中村ら（1997b）によって室内実験で調べられており、水温25℃以下ではほぼ無酸素の環境においても半数がへい死するのに2日以上を要している。このように、25℃以下の水温では高い耐性を持つアサリが、夏季の高水温期に想定した25℃を超える水温でどのような貧（無）酸素耐性を示すかなどの知見は品川ら（2002）以外見当たらない。

本章ではへい死が発生する高水温時に貧（無）酸素がどのようにアサリの生存に影響を与えるかを明らかにするため、室内実験により水温、DO等の変化にともなうアサリの酸素消費速度（代謝）の変化、異なる時期に漁獲されたアサリの高水温時の無酸素耐性と主なエネルギー貯蔵物質である炭水化物含量の関係、高水温・無酸素曝露時の炭水化物含量の減耗を調べ、高水温・貧（無）酸素がアサリをどのように衰弱させ、生存に影響を与えるのかを検討した。

1 節 水温、溶存酸素濃度の違いによる酸素消費速度の変化

アサリの水温別の酸素消費速度については海老原・村田（1967）や磯野ら（1998）などの数少ない知見があるのみで、大量へい死が発生する高水温時に、アサリの代謝がどのようになるのか解明されているとはいえない。本実験は水温別に15～30℃の酸素消費速度を求め、高水温（水温30℃）がアサリの代謝に与える影響を評価するため行った。

材料および方法

長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場（Fig. 4-1）で採取したアサリ成貝を実験材料とした。供試個体は、実験に供するまで水産総合センター養殖研究所の陸上水槽で *Pavlova lutheli*, *Chaetoceros gracilis* を給餌して蓄養した。

実験水温は15、20、25、30℃でアサリ飼育水槽の水温を自然水温（17.5～18.4℃）から2～3日間かけて各実験水温になるよう調整した。

実験は2004年12月、2005年12月および2006年11月に行った。アサリ（殻長 35.1 ± 1.9 mm、実験終了時の肥満度 13.2 ± 3.6 ）を1個体ずつ、内容量約210 mlの蓋付きの容器（以下チャンバー）に収容し、空気が入らないように濾過海水でチャンバー内を満たし、各実験水温に調整した恒温水槽に置き、溶存酸素計928および酸素電極1302（Strathklevin社）でチャンバー内のDOをモニターした。チャンバーの側面にはマグネチックスターラーを装着してチャンバー内の海水を攪拌しながら、DOの変化を記録した（Fig. 4-2）。実験は有酸素の環境（DO 4.5 mg/l以上）からアサリの酸素消費によってDOが1 mg/l未満となるまでを目安に可能な限り0 mg/lに近づくまで行った。実験水温15℃ではアサリ20個体を1回、20℃では12個体を2回ずつ、25℃では6個体を2～3回（のべ15回）、30℃では6個体を3回ずつ実験した。実験終了後にアサリの殻長等の計測および第2章2節同様乾重（60℃で24時間送風乾燥）を測定した。

結果

チャンバー内のDO測定結果の事例を各水温1例ずつFig. 4-3に示す。

（15℃の例）

実験開始時2基のチャンバー内のDOは8.02 mg/l（実線）と7.73 mg/l（破線）であった。実線のチャンバー内のDOは実験開始10時間後（0.54 mg/l）まで低下したが、その後、DOは15分間変化がなかった（以下、DOの変化がない状態を「休止」と表現する）。しかし、その後、低下と休止を

繰り返し、12時間後 (0.37 mg/l) までDOは低下した。

一方、破線のチャンバー内のDOは実験開始4時間51分後 (2.91 mg/l) まで低下したが、その後1時間休止した。そしてまた10時間30分後 (0.61 mg/l) までDOは低下し、その後休止した。

(20°Cの例)

実験開始時2基のチャンバー内のDOは6.83 mg/l (実線) と6.58 mg/l (破線) であった。実線のチャンバー内のDOは実験開始1時間14分後 (DO 3.78 mg/l) まで低下したが、その後、3時間33分間休止した。しかし、また6時間14分後 (1.15 mg/l) までDOは低下し、その後再度休止した。

一方、破線のチャンバー内のDOは実験開始3時間後 (2.53 mg/l) まで低下したが、その後17分間休止した。そしてまた4時間22分後 (1.42 mg/l) までDOは低下し、その後再度31分間休止、その後もこのような変化を繰り返した。

(25°Cの例)

実験開始時3基のチャンバー内のDOは6.72 mg/l (2点鎖線), 6.34 mg/l (実線) と6.11 mg/l (破線) であった。2点鎖線のチャンバー内のDOは実験開始54分後 (6.33 mg/l) までなだらかに低下したが、その後実験終了時の4時間30分後 (1.09 mg/l) まで低下し続けた。

一方、実線のチャンバー内のDOは実験開始3時間10分後 (1.04 mg/l) まで低下したが、その後実験終了時まで休止した。

また、破線のチャンバー内のDOは実験開始2時間後 (2.25 mg/l) まで低下したが、その後41分間休止した。そしてまた3時間45分後 (0.80 mg/l) までDOは低下したが、その後再度実験終了時まで休止した。

(30°Cの例)

実験開始時3基のチャンバー内のDOは5.56 mg/l (破線), 5.42 mg/l (2点鎖線) と4.59 mg/l (実線) であった。破線のチャンバー内のDOは実験開始1時間39分後 (0.89 mg/l) まで低下したが、その後39分間休止した。そして2時間39分後 (0.62

mg/l) まで再度低下した後、DOの低下と休止を繰り返し、実験終了時の5時間後 (0.38 mg/l) まで低下した。

一方、2点鎖線のチャンバー内のDOは実験開始1時間30分後 (1.46 mg/l) まで低下したが、その後2時間6分間休止した。そして4時間後 (1.13 mg/l) まで再度低下した後、45分間休止後、実験終了時 (1.05 mg/l) となった。

また、実線のチャンバー内のDOは実験開始2時間後 (0.98 mg/l) まで低下したが、その後49分間休止した。そしてまた3時間27分後 (0.52 mg/l) まで再度低下した後1時間3分間休止後、実験終了時 (0.38 mg/l) となった。

以上の例のようにアサリは外界(チャンバー内)の酸素を消費する時間帯と消費しない時間帯を交互に発現させてチャンバー内の溶存酸素を節約して消費しているようであったが、個体差が大きく、酸素を消費しない時間帯を計算に入れてDO別の酸素消費速度を求めるのが困難であったため、15分毎およびDO低下の勾配が大きく変わる変曲点のDO読み取り値から、DO低下時についてのみ勾配を求め、見かけの酸素消費速度を計算した。結果をFig. 4-4示す。DOが飽和に近いDO 6 mg/lの各水温の乾重1g、1時間あたりの酸素消費速度をそれぞれの近似曲線から求め、Table 4-1に示した。なお、DO 6 mg/lの酸素消費速度から各水温間の Q_{10} (温度係数)を求め、Table 4-2に示す。また、同様にDO 1 mg/lの各水温の酸素消費速度をTable 4-1に、各水温間の Q_{10} をTable 4-2に示した。

考 察

アサリの酸素消費速度に関する知見については、水温20~25°Cで酸素消費速度は最大となり、30°Cで急速に減少するとした海老原・村田(1967)や組織レベル(in vitro)で水温5~50°Cの酸素消費速度を調べ、水温5~25°Cは Q_{10} がほぼ一定の2で増加し、25°Cを超えても消費速度は増加するが、25~30°Cの間は5~25°Cの範囲における Q_{10} から

予測される値 (2.0) を大きく下回り 1.1 にとどまるとしている磯野ら (1998) などがある。

今回の実験では、十分に酸素がある環境 (DO 6 mg/l) で、水温 30°C では 2.01 mg/gDW/h と 20~25°C (1.02~1.13 mg/gDW/h) と比較して見かけ上 1.78~1.97 倍、15°C (0.66 mg/gDW/h) と比較して見かけ上 3.06 倍、酸素消費速度 (代謝速度) が大きくなった。前述の海老原・村田 (1967) の実験では水温 25°C から 30°C の間に急激な酸素消費速度の減少が報告されているが、本実験では水温 20~25°C の見かけの酸素消費速度と比較して 30°C のそれは減少せず、反対に増加していた。de Zwaan and Eertman (1996) は温度の上昇によって酵素の触媒能力が増加し、種の耐性範囲内では細胞内温度の 10°C の増加によって、代謝は 2~3 倍 (Q_{10} が 2~3) となるとしている。アサリの温度耐性については中村ら (1997b) は 30 日間の曝露試験で水温 30°C ではへい死個体が全くなかったとしており、水温 30°C はアサリの温度耐性範囲内とすると、海老原・村田 (1967) の 25~30°C 間の急激な酸素消費速度の減少よりもむしろ、本実験の増加という結果の方が妥当であると考えられる。

また、水温 20°C と 25°C の見かけの酸素消費速度は 1.02 ~ 1.13 mg/gDW/h と顕著な増加はみられず、水温によって大きく代謝が変動する変温動物のアサリでなぜこのような結果となったかは不明である。

アサリの酸素消費速度の測定については磯野ら (1998) が指摘しているように、閉殻の周期性 (藤井 1979) によって酸素消費速度は影響を受ける (Kim et al. 1999)。今回の実験でも前述したように酸素を消費しない期間 (休止期間) があり、DO の違いによる酸素消費速度を正確に求めるのは難しい。磯野ら (1998) はこの閉殻の問題を避けるためアサリの軟体部を細断し、組織レベルの酸素消費速度を測定しているが、この酸素消費速度は水温 5°C から 40°C まで増大し続けるなどアサリの呼吸運動や心拍動などの生理学的な過程を含む個体レベルの酸素消費速度とは異なった変化をする

ことが考えられるとしており、 Q_{10} が大きく変化した 30°C 以上はアサリの個体レベルの酸素消費速度を直接反映したものとは言えないと思われる。

前述したが de Zwaan and Eertman (1996) は Q_{10} が 2~3 となるとしている。また、磯野ら (1998) も水温 5~25°C の範囲で Q_{10} はほぼ 2 で一定であったとしている。今回の結果から求めた Q_{10} は 25°C 周辺の 20~25°C で 1.23, 25~30°C で 3.17 とこれらの知見と差があったが、15~20°C で 2.42, 15~30°C で 2.11, 20~30°C で 1.97 と、25°C の見かけ上の酸素消費速度を除いて Q_{10} を求めると、これらの知見とよく一致した。

閉殻等による酸素消費速度の変動および今回の水温 25°C 周辺の Q_{10} の大きな変動 (20~25°C で 1.23, 25~30°C で 3.17) についてはこれ以上言及することが難しい。 Q_{10} (25°C 周辺を除く) の値などから今回の実験の温度別の酸素消費速度が妥当であるとする、有酸素下では水温 30°C の酸素消費速度が 20°C の時の約 2 倍となるなど、30°C を超える高水温時アサリの代謝が高いことが示唆された。

一方、DO 1 mg/l では 15, 20, 25, 30°C の各水温の酸素消費速度はそれぞれ 0.28, 0.28, 0.39, 0.49 mg/gDW/h であり、水温 30°C の酸素消費速度は 25°C の 1.26 倍、20°C の 1.72 倍、15°C の 1.76 倍であった。また、同じ水温で DO 別の酸素消費速度を比較すると、15°C では DO 1 mg/l の酸素消費速度は DO 6 mg/l の酸素消費速度の 42.4%, 20°C では 27.9%, 25°C では 34.3%, 30°C では 24.3% であった。日向野 (2005) は二枚貝は環境悪化時に無気呼吸を維持し、代謝を低くして比較的長期間生存するとしている。有酸素では高水温ほど代謝が大きい、DO が低い場合、高水温ほど必要な酸素が不足するため、有酸素と比べ代謝を低くし (一部嫌気代謝している可能性もあるが)、その厳しい環境に順応すると考えられた。

このように DO が十分ではない場合、代謝を下げるなどの順応が図られるが、それにも限界があり、DO 1 mg/l の Q_{10} は 20~25°C で 1.86, 25~30°C

で1.60, 20~30°Cで1.72と水温の上昇に従い、代謝が増加する。このことから、中村ら(1997a)がヤマトシジミ高水温時の貧酸素耐性が弱くなる要因として酸素要求量が増大するためとしているように、高水温時に貧(無)酸素となった場合アサリの呼吸生理に大きな負担となるのではないかと推察する。

2 節 異なる時期に漁獲されたアサリの無酸素耐性

柿野(1982)は実験水温と季節による生理条件によってアサリの貧酸素耐性は大きく異なることを推察しているが、水温、DO等の条件を一定にし、その変化を詳細に調べた事例はない。

また、夏季の貧酸素環境を想定した水温25°Cを上回る高水温の貧酸素耐性についてはヤマトシジミ(中村ら1997a)やシズクガイ *Theora fragilis* (玉井1993)では室内実験で調べられているが、アサリについての知見は品川ら(2002)以外見当たらない。

今回、「大量へい死が発生する時期のアサリの無酸素耐性時間は果たして短いのか？」など大量へい死がアサリの季節的な生理状態によるものなのか、環境要因によるものかを推察するため、夏季の水温を想定した28°Cで2003~2006年の4ヶ年の7月~10月(2004年は8月~10月)の無酸素耐性を評価することとした。

材料および方法

2003~2006年の7月~10月の期間(2004年のみ8月~10月)に長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場A~Cの3漁場(Fig. 4-1)で採取したアサリ成貝を実験材料とした。採取されたアサリは長崎県総合水産試験場の陸上水槽で1~2日間、実験水温の28°Cに無給餌で馴致し、実験に用いた。

2003年はA漁場で採取したアサリ(殻長 36.8 ± 2.3 mm), 2004年はB漁場のアサリ(34.6 ± 2.0 mm,

8~10月), 2005年はC漁場のアサリ(33.2 ± 1.7 mm), 2006年はB漁場のアサリ(34.1 ± 1.5 mm)をそれぞれ供試個体とした。

実験は水温28°Cで行い、2003年は上面を発泡スチロールで蓋をした2 lガラスビーカー、2004~2006年は3 l広口T型瓶(蓋付き)に濾過海水を満たし、実験水温に設定したウォーターバス内に設置して、アサリ10個体(2003年7月30日の実験は8個体、同年9月24日の実験は9個体)を収容し、窒素で曝気し、飼育水中のDO 0.1 mg/l未満の無酸素とした環境に72時間曝露し無酸素区とした。また、空気曝気により常時DO 5 mg/l以上とした対照区を設け、無酸素区同様に10個体(2003年7月30日の実験は8個体、同年9月24日の実験は9個体)のアサリを収容し実験を行った。アサリの生残状況は実験開始後8, 24, 32, 48, 56, 72時間後に観察し、へい死貝はその都度取り上げた。DOの測定は溶存酸素計Oxi340i(WTW社)を用い30分毎に行った。実験は無給餌で行い、換水は無酸素区、対照区とも8~12回/日を目安に行った(Fig. 4-5)。供試個体の生死の判定は第3章と同様とした。

結果と考察

実験の結果をFig. 4-6に示す。

2003年A漁場アサリ無酸素区の72時間後の生残率は7月14日が80%, 7月30日が25%, 8月11日が0%, 8月27日と9月10日が30%, 9月24日と10月23日が0%で、対照区は7月14日~9月10日までが100%, 9月24日が89%, 10月23日が90%であった。

2004年B漁場アサリの無酸素区の生残率は8月31日が60%, 9月14日が100%, 9月27日が50%, 10月12日が30%, 10月27日が0%で、対照区は8月31日~10月27日まで100%であった。

2005年C漁場アサリの無酸素区の生残率は7月6日が20%, 7月21日が100%, 8月6日が50%, 8月17日が100%, 9月2日~10月17日までが0%で、対照区は7月6日~10月4日まで100%,

10月17日が90%であった。

2006年B漁場アサリの無酸素区の生残率は7月11日が40%、7月25日が70%、8月7日が90%、8月22日と9月6日が100%、9月22日が20%、10月5日が80%、10月21日が20%で、対照区は7月11日～10月21日まで100%であった。

各年実験日毎の32, 48, 56, 72時間後の生残率の推移をFig. 4-7に示す。

72時間の生残率は各年変動が大きく、傾向がつかみにくい。56時間生残率は生残率がいずれの時期も80%以上の2006年を除き、7～8月は比較的高く、9～10月に低下する傾向であった。48時間生残率も56時間生残率と同様の傾向であった。32時間生残率は全ての実験日で100%であった。2004年、2006年を除くと、2003年は9～10月にかけて、2005年は10月の生残率が低下する傾向であった。

アサリの貧酸素耐性は柿野(1982)が実験水温と季節による生理条件によって大きく異なることを推察しているが、今回の実験のように水温28℃と一定の水温条件で耐性試験を実施しても何らかの生理状態の違い(次節で後述)で無酸素耐性は変化することが明らかになった。Table 4-3に示したとおり、小長井町アサリ養殖漁場での大量へい死は7～9月、特に8月に多く発生している(平野ら2005;山本ら2005)。今回の試験結果から7～8月頃のアサリは、へい死が発生しない10月頃のアサリよりも無酸素耐性が高く、生理状態が顕著に低い状況ではないと考えられることから、夏季大量へい死がアサリの生理条件のみによって引き起こされているのではなく、何らかの環境要因に大きく支配され、引き起こされていることが明らかとなった。

3節 無酸素耐性と炭水化物含量の関係

前節で漁場での採取時期によって、一定水温の無酸素曝露実験においてもその耐性が変化することが明らかとなった。この無酸素耐性の変化がど

のような生理条件によって起こるのであろうか。黒田ら(1998)はアサリが貧酸素や苦潮に対してどの程度耐性を示すかは、嫌気代謝に切り替わる溶存酸素濃度の閾値やその時点で蓄積しているグリコーゲンの量とその消費速度によって影響されると考えられるとしている。Uzaki et al. (2003)もグリコーゲン含量は貧酸素曝露時の生理状態の指標と思われるとしている。このように貧酸素耐性との関連があると考えられる炭水化物含量と時期的に変化する無酸素耐性との関係を調べることとした。

材料および方法

前述の第4章2節の無酸素耐性実験の供試個体と同じ群のアサリのそれぞれ10個体の炭水化物含量を調べた。

軟体部の処理、水酸化カリウム30%溶液への溶解は第2章2節と同様の方法で処理した。

分析方法は2003年のA漁場の試料については、定法に従いムタローゼ・GOD法(グルコースC II-テストワコー, 和光純薬社)を用いて分析し、2004年のB漁場と2005年のC漁場および2006年のB漁場の試料については第2章2節と同様にフェノール硫酸改良法で分析した。

得られた軟体部湿重1g当たりの炭水化物含量各10個体の平均値の第4章2節で調べた水温28℃、DO 0.1mg/l未満の無酸素曝露後、へい死が出現した32, 48, 56, 72時間後の生残率との関係を調べた。

炭水化物含量と各曝露時間毎の生残率および半数致死時間(LT₅₀)との関係はP < 0.05で相関の有意性の検定を行った。

結果と考察

2003～2006年の無酸素耐性実験に用いた養殖漁場の各年毎のアサリの炭水化物含量の推移をFig. 4-8に示す。

2003年A漁場の各調査日の炭水化物含量の平均値は11.7～31.1 mg/gの範囲であった。実験開始

時の7月14日に 27.1 ± 11.1 mg/gであった炭水化物含量は7月30日に 31.1 ± 10.0 mg/gと最大値を示した。8月11日～9月10日の期間は平均 $27.7 \sim 29.1$ mg/gとほぼ横ばいの状況であったが、9月24日に 23.3 ± 7.9 mg/gとやや減少し、実験終了時の10月23日には最小値の 11.7 ± 3.8 mg/gと減少した。

2004年B漁場の各調査日の炭水化物含量の平均値は $31.8 \sim 45.9$ mg/gの範囲であった。実験開始時の8月31日に最小値 31.8 ± 4.8 mg/gであった炭水化物含量は9月14日に 45.9 ± 3.5 mg/gと最大値を示したが、9月27日に 41.2 ± 3.2 mg/g、10月12日に 33.0 ± 9.0 mg/gと減少し、実験終了時の10月27日には 34.4 ± 6.2 mg/gとなった。

2005年C漁場の各調査日の炭水化物含量の平均値は $17.1 \sim 41.8$ mg/gの範囲であった。実験開始時の7月6日に 28.7 ± 3.2 mg/gであった炭水化物含量は8月17日に 41.8 ± 19.1 mg/gと最大値を示したが、9月2日に 22.3 ± 3.1 mg/g、9月16日に 17.1 ± 3.4 mg/g（最小値）と減少し、実験終了時の10月17日には 18.1 ± 5.1 mg/gとなった。

2006年B漁場の各調査日の炭水化物含量の平均値は $37.5 \sim 64.3$ mg/gの範囲であった。実験開始時の7月11日に最大値の 64.3 ± 9.8 mg/gであった炭水化物含量はその後減少し、9月6日に 40.8 ± 7.7 mg/gとなった。その後9月22日に 47.8 ± 5.5 mg/g、10月5日に 49.3 ± 12.4 mg/gと増加したが、実験終了時の10月21日には最小値 37.5 ± 8.8 mg/gに減少した。

各年、漁場の違いや生息密度や水温、DOや餌料などの環境の差から、炭水化物含量の増減には違いがあるが、7～8月のデータがほとんどない2004年を除けば、7～8月に含量が高く、9月から10月にかけて低い傾向であった。

2003～2006年のアサリの調査日別の平均炭水化物含量と第4章2節の実験日別の32、48、56、72時間後の生残率との関係をFig. 4-9に示した。

72時間後生残率では不明瞭であるが、炭水化物含量30 mg/g前後で各曝露時間の生残率に差があ

ると考えられたため、含量30 mg/g以上と以下でそれぞれ生残率との相関を求めた。含量30 mg/g以下では56時間後生残率で $r^2=0.67$ 、48時間後で $r^2=0.60$ 、32時間後で $r^2=0.44$ とそれぞれ正の有意な相関（ $n=11$ ）であったが、72時間後生残率では有意な相関が認められなかった。また、含量30 mg/g以上でもそれぞれ有意な相関が認められなかった（ $n=17$ ）。

炭水化物含量30 mg/g以上では、72時間曝露後の生残率で変動が大きく傾向がつかみにくいが、曝露56時間以内の生残率では含量とは横ばいかもしくはわずかに右肩上がりの関係で、無酸素耐性に大きな変化はないと考えられた。相関が認められた32～56時間後生残率の含量30 mg/g以下では炭水化物含量の低下に従い、曝露時間別の生残率も低下する傾向であったが、72時間後生残率ではその関係が不明瞭であった。なぜ、72時間曝露と56時間以下の曝露でこの様な差となったのかは不明であるが、72時間という長時間の無酸素曝露で、後述の4節（Fig. 4-11）の無酸素曝露時の炭水化物含量の顕著な減少や第5章以降で述べる嫌気代謝時の代謝産物蓄積の影響が可能性として考えられる。いずれにしろ、水温 28°C 、72時間の無酸素曝露はそれより短い曝露時間と比べ、アサリの生存に強い影響を与える環境と考えられた。

56時間以下の曝露では含量30 mg/g前後で生残率に差があり、含量30 mg/g以上で概ね60%以上の生残率であったこと、含量30 mg/g以下の回帰直線（Fig. 4-9）から求めた32～56時間曝露後の含量30 mg/gでの生残率は86.6～100%といずれも高い値を示したことから、アサリの無酸素耐性維持の目安は炭水化物含量30 mg/g以上と考える。

また、実験終了時までの生残率が50%以下の実験時、観察時間毎の生残率の推移から半数致死時間（以下 LT_{50} ）を求め、 LT_{50} と炭水化物含量との関係をFig. 4-10に示した。

曝露時間別生残率と同じく、炭水化物含量30 mg/g以上と以下でそれぞれ LT_{50} との相関を求めたところ、 $r^2=0.72$ と正の有意な相関（ $n=10$ ）で

あった。一方、含量 30 mg/g 以上では有意な相関が認められなかった ($n=9$)。含量 30 mg/g 以下の回帰直線 (Fig. 4-10) から各耐性時間で半数生残に必要な炭水化物含量を計算すると、24時間で4.5 mg/g、48時間で19.7 mg/g、72時間で34.9 mg/g となった。

黒田ら (1998) は三河湾においてアサリを収容したカゴを漁場に設置、同時に水温、DO 等を連続観測し、定期的に生残とグリコーゲン含量を調べた結果、漁場で貧酸素化が進み、無酸素が頻繁に観測されるようになるとグリコーゲン含量が 33 mg/g から 18 mg/g に急減し、アサリがほぼ全滅したとしている。Uzaki et al. (2003) も三河湾において同様の調査を行い、貧酸素化し、グリコーゲン含量が 27.8 mg/g から 21.4 mg/g に減少したのち全滅した例と、それぞれ別の漁場でのグリコーゲン含量が 34.0 mg/g でへい死率 13.3%、15.7 mg/g で 57.3%と差が出たことを示している。野外調査の結果であるため単純な比較はできないが、佐伯・熊谷 (1980) が述べているように、グリコーゲンが炭水化物の大部分 (鴻巣ら (1965) は 9 割としている) を占めることを前提とすると、Fig. 4-9 の炭水化物含量が 30 mg/g 前後の変化で各耐性時間別の生残率に大きな差があったことと三河湾での野外調査の知見は良く一致する。

貧酸素時にアサリがへい死するメカニズム (例えばエネルギー不足など) は明らかになっていない。黒田ら (1998) も嫌気代謝による生存の限界とグリコーゲン含量がどのように関連するのか、生死を分けるグリコーゲン含量の閾値が存在するのかは不明であるが、アサリ漁場の管理にとって重要であり、今後明らかにする必要があるとしている。

これらのへい死の生理的メカニズムやグリコーゲン含量の閾値等の課題は現在も明らかになっていない。しかし、アサリの貧酸素耐性を高めるためには、本実験・調査の結果からアサリの生理状態 (栄養状態) を飼育条件の改善等 (飼育密度、底質改善) により炭水化物含量 30 mg/g 以上 (第

2章3節, Fig. 2-6 の回帰直線から水分含量 79.9% 以下) を目安に維持することが有効であると考え

る。今回の実験では、水温 28°C、窒素曝気による無酸素状態でアサリを曝露した。養殖現場では第 2 章 1 節で示したが、水温 30°C 以上が 65.5 時間、DO 1 mg/l 未満の貧酸素が 15 時間程度連続して観測された。これらの漁場水温は実験水温よりも高いが、貧酸素の連続継続時間は短く、LT₅₀ が 24 時間として必要な炭水化物含量は Fig. 4-10 の 30 mg/g 以下の回帰直線から計算すると 4.5 mg/g ときわめて低い値であった。しかしこのような低い炭水化物含量でアサリが漁場の高水温・貧酸素等の環境悪化に耐えることができるとは通常考えられない。前述の炭水化物含量 30 mg/g 以上 (Fig. 4-10 の 30 mg/g 以下の回帰直線からの計算で 34.9 mg/g) の栄養状態と仮定した場合、LT₅₀ は 72 時間と長時間の無酸素耐性を持つが、実際養殖漁場でこのような長時間の貧酸素の継続が観測されておらず (第 2 章 1 節, Fig. 2-4) 貧 (無) 酸素によるアサリの大量へい死を想定できない。しかし 2003 年、2004 年の貧酸素・高水温時にへい死が発生 (へい死率 7.7%、100%) していることから、単純な窒素曝気による高水温・無酸素以外に養殖漁場ではアサリのへい死を速める環境要因が付加される可能性が考えられ、これらの要因の究明は今後の課題と考える。

4 節 無酸素曝露時の炭水化物含量の減耗

貧酸素等の環境悪化時のアサリの主なエネルギー貯蔵物質である炭水化物 (グリコーゲン) の減耗については、漁場観測を行い、変化する DO とアサリのグリコーゲン含量とを調査した黒田ら (1998)、Uzaki et al. (2003) の知見があり、漁場で貧酸素が頻繁に観測されるようになるとグリコーゲン含量が減少する状況を示している。しかし、室内実験で貧 (無) 酸素とし、アサリの炭水化物含量の減耗の状況を詳細に調べた知見はない。本

実験では夏季高水温時に無酸素がアサリの主なエネルギー物質の炭水化物をどのように減耗させ、衰弱させるのかを把握することを目的に実験を行った。

材料および方法

2006年8月～9月に長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場 (Fig. 4-1) で採取したアサリ成貝および未成貝を実験材料とした。採取されたアサリは長崎県総合水産試験場の陸上水槽で1日間、実験水温の30°Cに馴致し実験に用いた。

実験は2006年8月～9月に3回、無給餌で行った。

1回目と2回目の実験は水温30°C、窒素で曝気し、DO 0.1 mg/l 未満とした海水を満たした蓋付き1 l 広口 T 型瓶 (以下瓶) 6本にアサリ成貝 (1回目殻長 34.5 ± 1.6 mm, 2回目 33.8 ± 1.1 mm) を各20個体収容し、無酸素状態となるよう蓋で閉じた (無酸素区)。

DOの測定には溶存酸素計 Oxi340i (WTW 社) を用いた。

アサリを無酸素で封入した瓶は水温30°Cのウォーターバス中に侵漬し、水温を管理した。

換水は24時間毎に行い、新たに無酸素海水を満たした瓶にアサリを移し換える方法で行った。

サンプリングは無酸素曝露後12, 24, 36, 48, 60, 72時間後に行った。24, 48時間後のサンプリングは換水と同時に行い、瓶から腐敗が進み分析不能なアサリを除き無作為に10個体取り出し、分析に用い、瓶内に残されていた生存個体は換水し、引き続き実験に用いた。12, 36, 60時間後および実験終了となる72時間後のサンプリングは1瓶のすべての個体を取り出し、分析不能なアサリを除き無作為に10個体を分析に用いた。生残状況の観察は24時間毎の換水時に行い、へい死個体はその都度取り上げた。生死の確認は第3章と同様に行った。

サンプリングしたアサリは湿重を測定した後、閉殻筋を採取して、第2章2節同様にフェノール

硫酸改良法で炭水化物含量を求め、残りの軟体部の湿重および2章2節同様乾重を測定し、水分含量を求めた。

また、水温30°Cで空気曝気を施した有酸素海水 (DO 5 mg/l 以上) でアサリ20個体を72時間飼育し、対照区とした。対照区は72時間後のみ10個体サンプリングし、無酸素区同様分析した。

なお、2回目の実験時には瓶内の海水中で繁殖する細菌等がアサリの生存に与える影響を除外するため無酸素区および対照区の飼育海水に6 ppm となるようクロラムフェニコール (和光純薬工業社) を添加した (de Zwaan and Babarro 2001)。

3回目の実験はアサリ成貝 (32.0 ± 2.3 mm) と未成貝 (14.3 ± 1.1 mm) を用い、1, 2回目の実験と同様に無酸素とした1 l 瓶3本に各10個体を収容し、24, 48, 72時間後にサンプリングした (無酸素区)。サンプリングした成貝は1, 2回目の実験と同様に湿重量を測定した後、足と外套膜を採取して炭水化物含量を、残りの軟体部で水分含量を求めた。稚貝は軟体部重量が小さいため、軟体部すべてを試料として炭水化物含量を同様に求めたため、水分含量は求めなかった。対照区を1, 2回目の実験同様に設け、72時間後に成貝、稚貝ともサンプリングし、無酸素区同様分析した。換水は1, 2回目の実験同様24時間毎に行い、生残状況をその際に観察した。なお、2回目の実験同様に無酸素区および対照区にクロラムフェニコールを添加した。

統計処理は、実験毎の炭水化物含量と水分含量のそれぞれの変化については一元配置分散分析 (ANOVA) により有意差の確認を行い、多重比較検定はダネットの方法 (Dunnett test) により $P < 0.05$ で有意差の検定を行った。また、実験終了時72時間後の無酸素区と対照区の炭水化物含量と水分含量については t -検定 (t -test) により $P < 0.05$ で有意差の確認を行った。炭水化物含量と水分含量の関係については $P < 0.05$ で相関の有意性の検定を行った。

結果

へい死状況は1回目の実験で、無酸素区では36時間後までへい死個体はみられなかったが、48時間後からへい死個体が現れ、へい死率は48時間後5.7%、60時間後42.9%、実験終了時の72時間後62.9%となった。

2回目の実験で無酸素区では48時間後までへい死個体はみられず、60時間にへい死個体が現れたが、72時間後のへい死率は1.7%とわずかであった。

3回目の実験で無酸素区では48時間後に稚貝でへい死個体がみられ、72時間後に稚貝で10%、成貝で10%のへい死率であった。

なお、対照区では実験1~3回目の成貝、稚貝とも72時間後の実験終了時までへい死個体はみられなかった。

供試個体の炭水化物含量、水分含量の推移をFig. 4-11に示す。

炭水化物含量は1回目の実験では開始時 41.3 ± 5.0 mg/g (湿重)が無酸素区は36時間後以降統計的に有意に減少し、72時間後 14.1 ± 4.0 mg/gと開始時から減少率は65.9%となった。対照区も72時間後有意に減少し、 34.2 ± 5.7 mg/gと17.2%減少した。

2回目の実験では開始時 36.4 ± 8.9 mg/gが無酸素区は24時間後以降有意に減少し、72時間後 13.2 ± 2.9 mg/gと開始時から63.7%減少した。対照区も72時間後有意に減少し、 26.9 ± 6.8 mg/gと26.1%減少した。

3回目の実験の足では開始時 25.4 ± 5.4 mg/gが無酸素区で24時間後以降有意に減少し、72時間後 14.6 ± 2.9 mg/gと開始時から42.4%減少した。対照区は72時間後も有意変化せず、 24.1 ± 3.6 mg/gと減少は5.1%にとどまった。外套膜では開始時 31.5 ± 10.5 mg/gが無酸素区で48時間後以降有意に減少し、72時間後 17.2 ± 3.4 mg/gと開始時から45.6%減少した。対照区は72時間後も有意変化せず、 27.3 ± 9.8 mg/gと13.4%の減少となった。稚貝は開始時 27.4 ± 2.3 mg/gが無酸素区で24時間後以降有意に減少し、72時間後 17.5 ± 2.5 mg/gと開始

時から36.1%減少した。対照区は72時間後も有意変化せず、 26.0 ± 4.7 mg/gと減少は5.1%にとどまった。

水分含量は1回目の実験では開始時 $77.3 \pm 0.8\%$ が無酸素区で60時間後以降有意に増加し、72時間後 $79.6 \pm 1.1\%$ となった。対照区は72時間後も有意に変化せず $77.1 \pm 1.4\%$ となった。

2回目の実験では開始時 $77.3 \pm 0.7\%$ が無酸素区で36時間後 $79.1 \pm 1.4\%$ と有意に増加し、72時間後 $79.3 \pm 0.8\%$ となった。対照区は72時間後 $78.0 \pm 1.2\%$ となったが、有意な変化ではなかった。

3回目の実験(成貝)では開始時 $80.5 \pm 1.8\%$ が無酸素区で72時間後有意に増加し $82.1 \pm 0.9\%$ となった。対照区は72時間後も有意に変化せず $80.6 \pm 1.1\%$ となった。

なお、実験終了時72時間後の炭水化物含量と水分含量は3回の各実験の各部位、稚貝とも無酸素区と対照区で有意な差があった(Fig. 4-11)。

考察

実験終了時(72時間後)の炭水化物含量減少率は1回目の実験で無酸素区が65.9%、対照区が17.2%と無酸素区が対照区の3.8倍、2回目の実験で無酸素区が63.7%、対照区が26.1%と2.4倍、3回目の試験では無酸素区、対照区の減少率はそれぞれ、足が42.4%と5.1%で8.4倍、外套膜が45.6%と13.4%で3.4倍、稚貝は36.1%と5.1%で7.1倍となった。実験終了時の無酸素区の炭水化物含量の減少が有酸素下の対照区と比較して閉殻筋で2.4~3.8倍、外套膜で3.4倍となった。また、足と稚貝は7.1~8.4倍と、足の部分や稚貝で対照区の減少率がそれぞれ5.1%と小さかったことから差がより大きくなった。

また、それぞれの実験時の炭水化物含量の推移について、1回目と2回目および3回目の外套膜は直線的に減少するのではなく、それぞれ24時間程度、炭水化物含量がほとんど減少しない横ばいの期間があった(Fig. 4-11)。この期間は嫌気代謝によるグリコーゲン等の炭水化物の消費が行われ

ていないが、アスパラギン酸等をもとにエネルギー生産 (Hochachka 1984) を行っているのではないかと考えられる。炭水化物含量が横ばいの期間は、1回目では開始時～24時間後 (41.3～38.1 mg/g)、2回目では24～48時間後 (21.5～20.6 mg/g)、3回目の外套膜では24～48時間後 (23.9～23.2 mg/g) であった。1回目は実験開始当初から、2回目と3回目の外套膜は炭水化物含量が21.5～23.9 mg/gと減少した後の24～48時間後にこのような期間が観察されたことから、嫌気代謝時に炭水化物とアスパラギン酸等のどちらをまず利用するのかは推測できない。1回目の実験では無酸素海水中にクロラムフェニコールを添加しなかったため、(へい死率が2、3回目と大きく異なり) 実験条件に差があると仮定し、1回目を除き考察する。無酸素状態でまず炭水化物をエネルギー源として利用し、20～25 mg/g 程度まで含量が減少した後、アスパラギン酸等を活用し、その後また炭水化物を消費するとした場合、アサリにとって炭水化物含量20～25 mg/g という値は生存するために維持すべき生理状態である可能性が考えられる。3回目の実験の足や稚貝ではこのような横ばいの減少が観察されなかった。3回目の実験では炭水化物含量の測定を24時間毎に行ったので、アスパラギン酸等を利用した状況を捉えることができなかつたとも考えられるが、足や稚貝は無酸素時利用できるエネルギー貯蔵物質を炭水化物以外あまり持たない可能性もある。これら無酸素時の物質代謝の優先順位や生存に必要な閾値等については、同様の試験を行い、炭水化物含量だけでなくアミノ酸含量の分析等を行うことによって明らかにできると考えられる。

アサリは足の血体腔 (血洞) に血リンパを出し入れし、足の形状を変え、末端錨を形成 (小池1999) し、潜砂などを行う。そのため足は大きく変形しない閉殻筋や外套膜より血リンパを保持する空隙部分が多いこと、また、実験開始時の炭水化物含量は閉殻筋 (36.4～41.3 mg/g) や外套膜 (31.5 mg/g) と比べ足は25.4 mg/g と低いことなどから、

足は通常主に活用される炭水化物等の貯蔵場所ではない可能性が高い。そのため炭水化物等のエネルギー源を利用する際、閉殻筋や外套膜などの部分から利用し、エネルギーの減耗が激しくない有酸素の環境では足の炭水化物はあまり消費されず、エネルギーの減耗が激しい無酸素下の嫌気代謝時に利用されたことから、無酸素時と有酸素時の減少の差が8.4倍と大きくなったと考える。

一方、稚貝については実験開始時の炭水化物含量は閉殻筋 (36.4～41.3 mg/g) や外套膜 (31.5 mg/g) と比べ27.4 mg/g と少し低く、軟体部重量が小さいことから炭水化物含量全体が小さいこととなる。稚貝は成貝の様に深く潜砂することもできず、地盤高の高いところに着底することもあることから、成貝以上に高水温や干出、低塩分などの厳しい環境に耐える必要があると考えられる。量として少ない炭水化物等のエネルギーを成貝以上に厳しい環境で有効に利用する能力を獲得したため、足と同様に無酸素時と有酸素時の減少の差が7.1倍と大きくなった可能性があるが、これらの可能性については成貝の足も含めて、追試等を行い検証していく必要がある。

実験1回目、2回目および実験3回目 (足と外套膜) の無酸素区の炭水化物含量と水分含量の関係を Fig. 4-12 に示す。

相関係数は1回目が $r^2=0.54$ ($n=80$)、2回目が $r^2=0.42$ ($n=80$)、3回目の外套膜が $r^2=0.57$ ($n=50$) と高い負の相関があったが、3回目の足は $r^2=0.19$ ($n=50$) と相関は高くなかつた。相関はいずれも有意であった。

炭水化物含量と水分含量は第2章3節 (Fig. 2-6) でもそうであったように負の相関があるとされる (佐伯・熊谷1980)。また、中村 (1998) はヤマトシジミを無酸素状態で飼育すると、顕著にグリコーゲンが減少し、水分がグリコーゲンの減少分を補うと思われるとしている。今回の実験でも第2章3節 (Fig. 2-6) と同様に炭水化物が減少すると、水分がその消失部分と置き換わり、増加しているのではないかと推察された。

二枚貝は貧酸素など環境悪化時に無気呼吸を維持し、代謝を低くして比較的長期間生存する事が知られている（日向野 2005）。de Zwaan (1983) は、二枚貝は有酸素ではグルコース 1 mol 当たり ATP 37 mol を生ずるが、嫌気代謝の場合、最終代謝産物のプロピオン酸となるまでに ATP 6.43 mol を生ずることを示している。また、Hochachka (1984) も理論的にプロピオン酸への嫌気代謝で ATP 6 mol を生ずるが、無酸素状態のカキの心臓の ATP 収率はより一層低いとしており、有酸素時の代謝と比べて嫌気代謝では効率が悪い。今回の実験結果でも無酸素区の炭水化物含量の減耗が対照区と比べて大きく、実験水温 30°C という高水温・無酸素の環境でのアサリ体内中のエネルギー貯蔵物質の減耗は激しいと推察された。

最後に実験毎の生残率について考察する。

実験終了時（72 時間後）のへい死率は 1 回目の実験では 62.9%、2 回目は 1.7%、3 回目の成貝、稚貝とも 10% となった。実験開始当初の閉殻筋の炭水化物含量は 1 回目 41.3 mg/g、2 回目 36.4 mg/g とへい死率が高かった 1 回目の実験の方が炭水化物含量が高かった。また 3 回目の外套膜で 31.5 mg/g、稚貝で 27.4 mg/g とこちらもへい死率が高かった 1 回目の方が炭水化物含量は高かった。前節で炭水化物含量 30 mg/g 前後では、含量が高いほど無酸素耐性が高くなる傾向があったが、これらの結果からそれは当てはまらない。

また、実験終了時（72 時間後）の閉殻筋の炭水化物含量も 1 回目 14.1 mg/g、2 回目 13.2 mg/g とへい死率が高かった 1 回目の実験の方が炭水化物含量は高かった。このため、1 回目の実験時のへい死は炭水化物含量が生存の閾値を下回った単純なエネルギー不足によるものとは考えられない（2 回目の実験結果から、無酸素時の生存の閾値は実験室環境（クロラムフェニコール添加）では閉殻筋炭水化物含量 13.2 mg/g 以下と推測）。

このように実験 2~3 回目の生残率が高くなった原因は河口性二枚貝 *Macoma balthica* を用いた de Zwaan and Babarro (2001) の無酸素実験の例と

同様に無酸素海水に添加した 6 ppm のクロラムフェニコールの作用によると考えられる。無酸素時アサリは飼育水中に老廃物等を排出するが、de Zwaan and Babarro (2001) が指摘しているように、その老廃物等を利用し嫌気性細菌等が増殖しアサリに障害を与えると同時に、硫化水素等の有害物質を産生し影響を与えると考える。クロラムフェニコールの添加によりこれらの細菌の増殖を抑制し、有害物質の産生を抑えられたため 2, 3 回目の実験のへい死率が低かったと考えられる。単純に無酸素がアサリに与える影響を評価する場合、その他の環境要因（細菌の増殖および有害物質の飼育水中の蓄積等）の影響を排除するためにはクロラムフェニコールの添加が有効であると考えられる。しかし、養殖漁場などの現場環境では前節でも可能性を指摘したが、これらの環境要因の影響も考慮する必要があることから、クロラムフェニコールを添加しない実験についても価値があると考えられ、その実験目的に応じて添加の有無を判断すべきと考える。

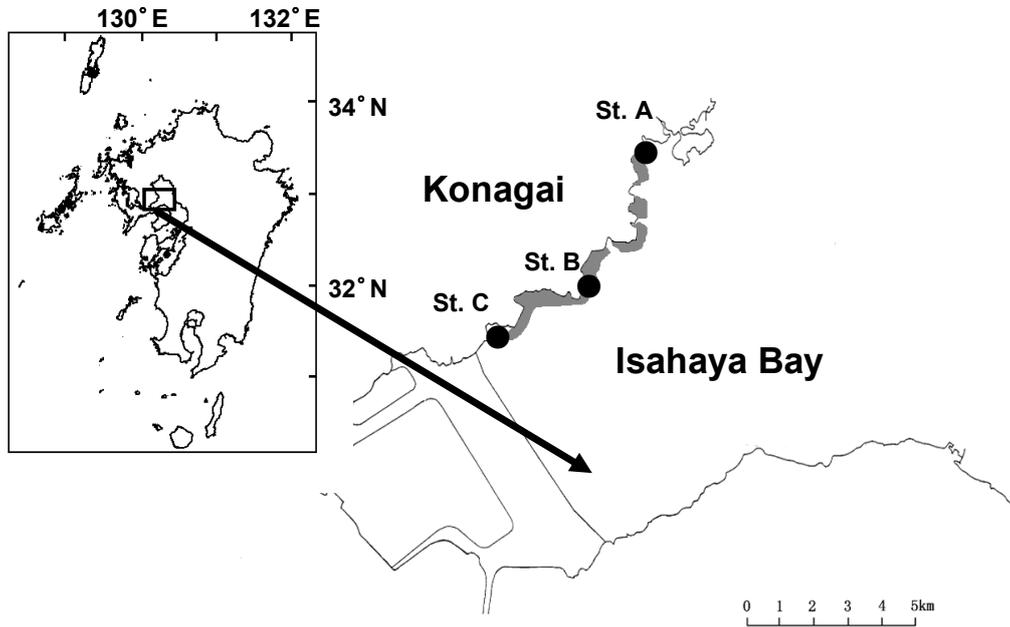


Fig. 4-1. Location of the monitoring stations A, B and C in Isahaya Bay, Kyushu, Japan. The shaded areas represent the Manila clam culture area.

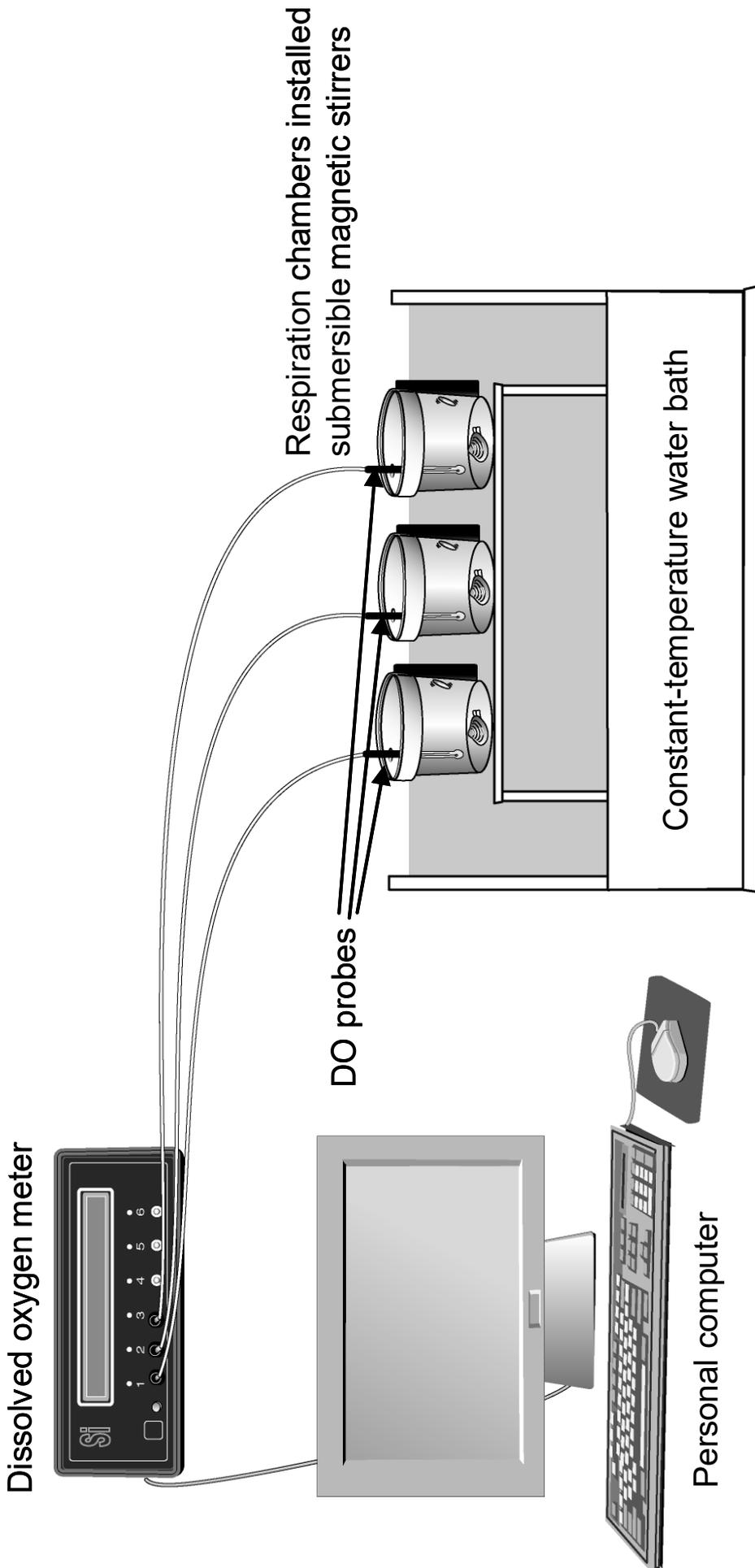


Fig. 4-2. Diagram of the experimental setup used for measurement of oxygen consumption rate of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*.

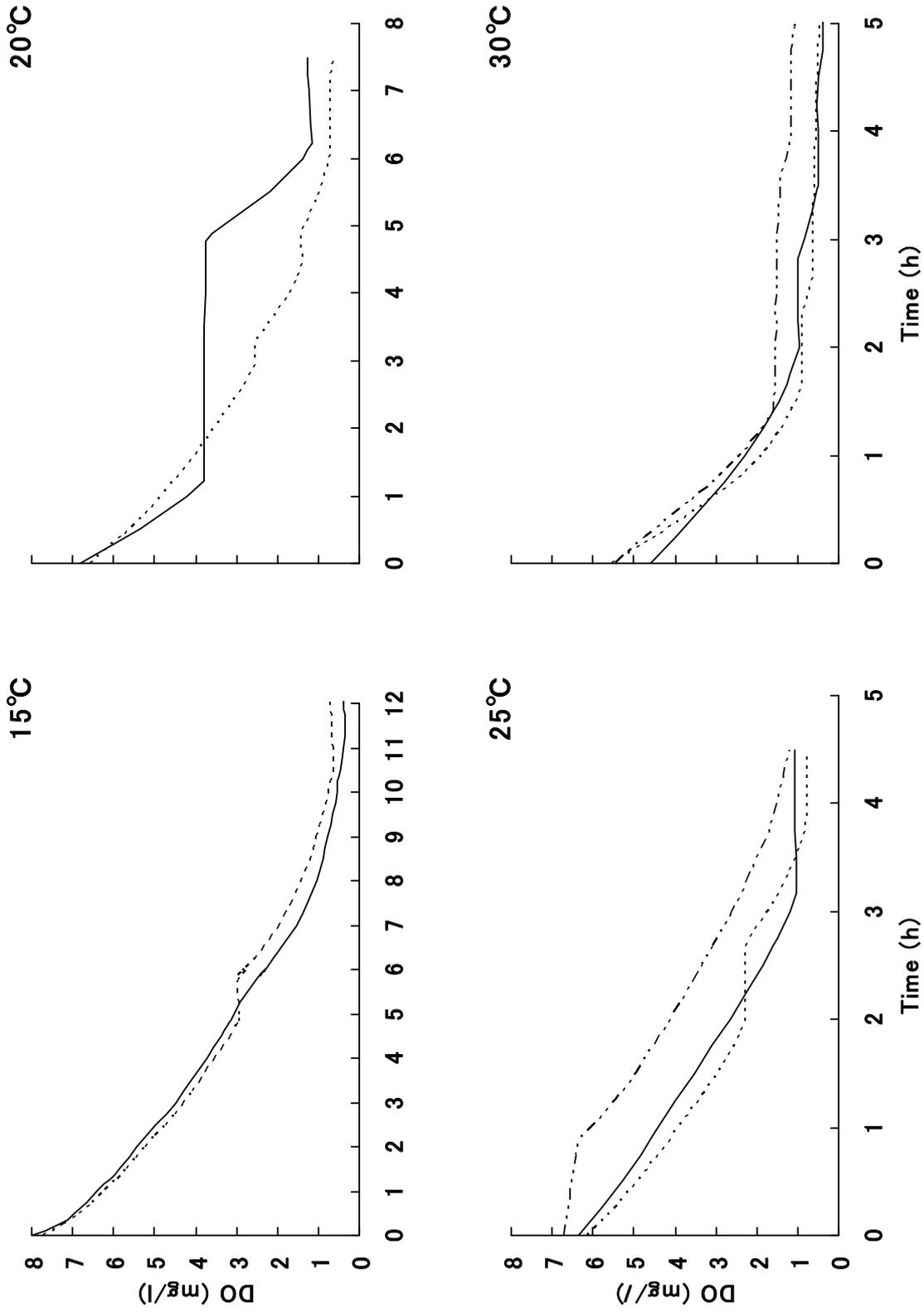


Fig. 4-3. Typical records of the changes in dissolved oxygen concentration of experimental seawater of the chambers containing the Manila clam *Ruditapes philippinarum* at 15, 20, 25 and 30°C.

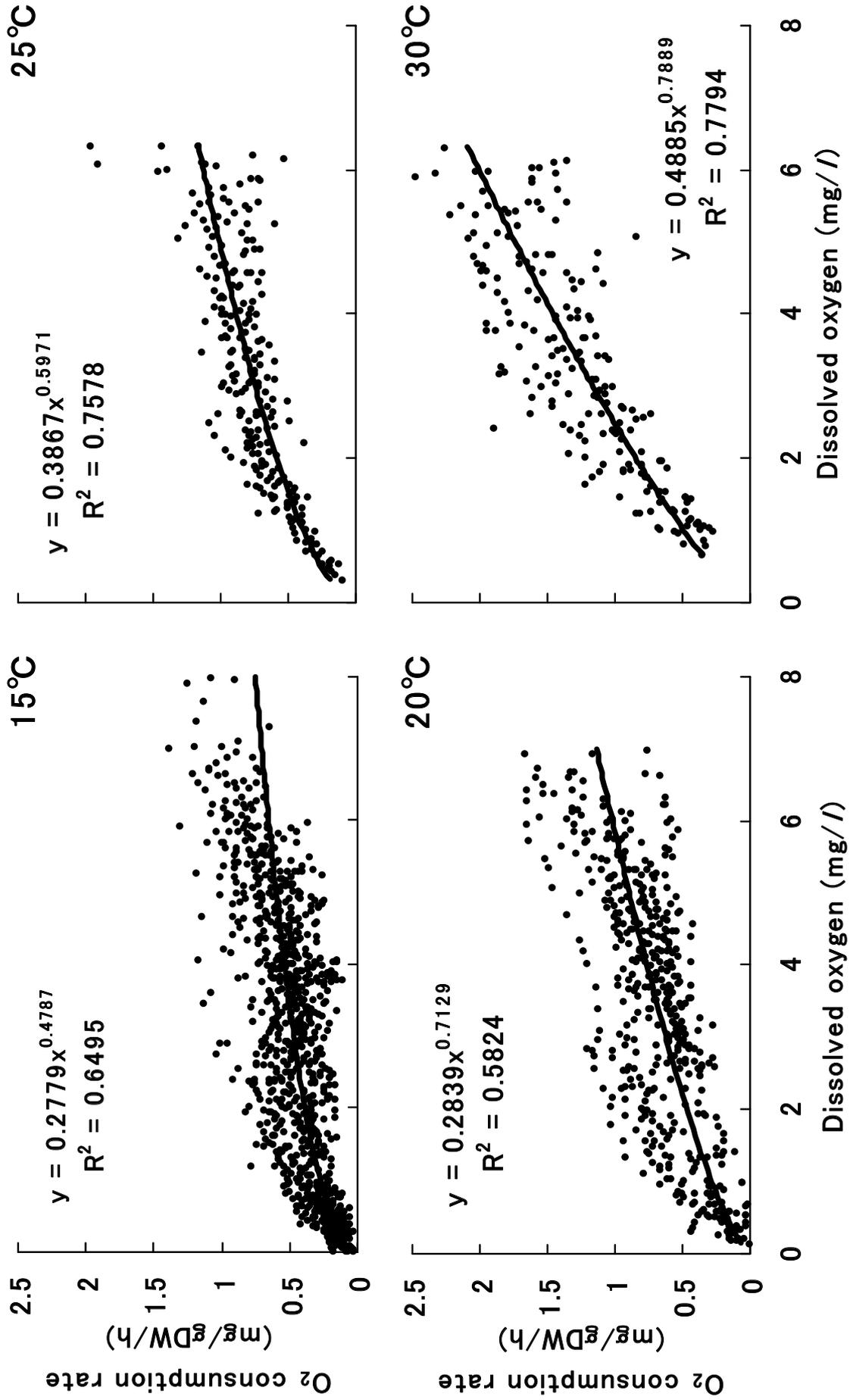


Fig. 4-4. Relationships between dissolved oxygen concentration and estimated oxygen consumption rate of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* at 15, 20, 25 and 30°C.

Table 4-1. O₂ consumption rates of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* at dissolved oxygen concentrations (DO) 1 and 6 mg/l at 15, 20, 25 and 30°C

Water temperature (°C)	DO 1 mg/l	DO 6 mg/l
	O ₂ consumption rate (mg/gDW/h)	O ₂ consumption rate (mg/gDW/h)
15	0.28	0.66
20	0.28	1.02
25	0.39	1.13
30	0.49	2.01

Table 4-2. The calculated Q₁₀ from Table 4-1

Water temperature (°C)	DO 1 mg/l Q ₁₀	DO 6 mg/l Q ₁₀
15-20	1.04	2.42
20-25	1.86	1.23
25-30	1.60	3.17
15-25	1.39	1.72
15-30	1.46	2.11
20-30	1.72	1.97

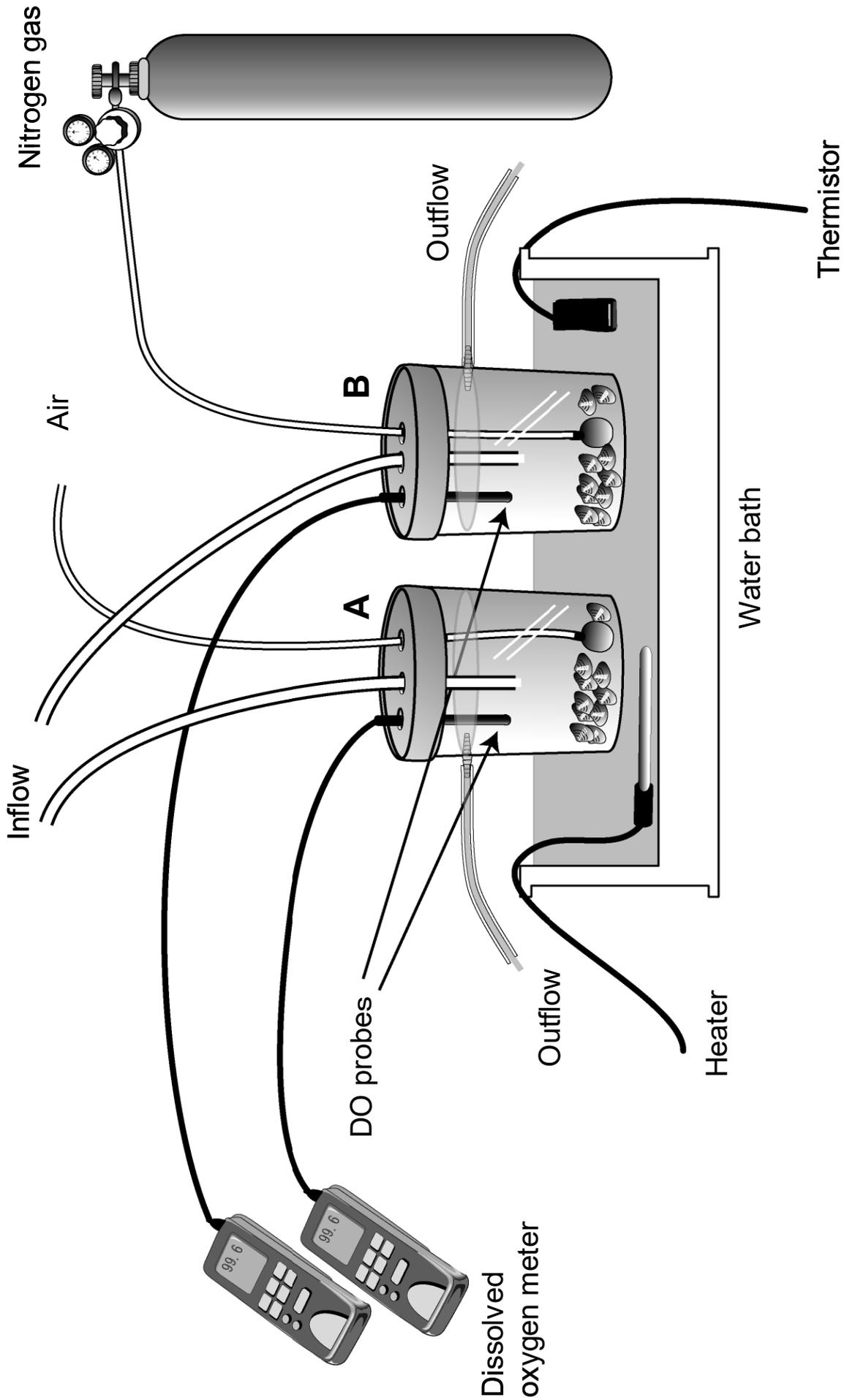


Fig. 4-5. Diagram of the experimental setup used for anoxic seawater exposure of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. (A) Control; (B) Anoxia.

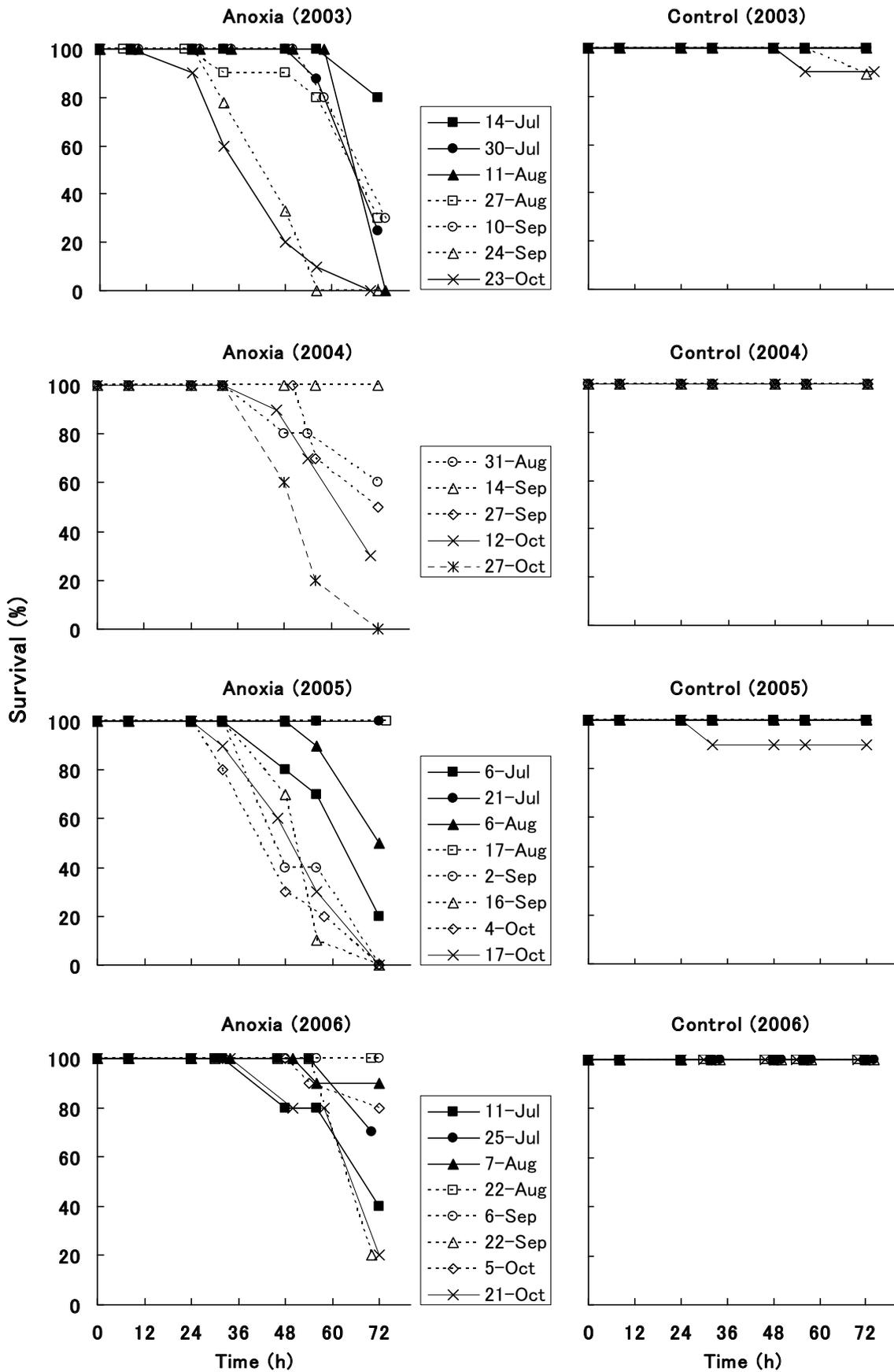


Fig. 4-6. Changes in survival of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to anoxia from 2003 to 2006 (n = 10, except 30-July (n = 8) and 24-Sep. (n = 9), 2003). Dissolved oxygen concentrations of anoxia and control were maintained below 0.1 mg/l and over 5 mg/l, respectively, at 28°C.

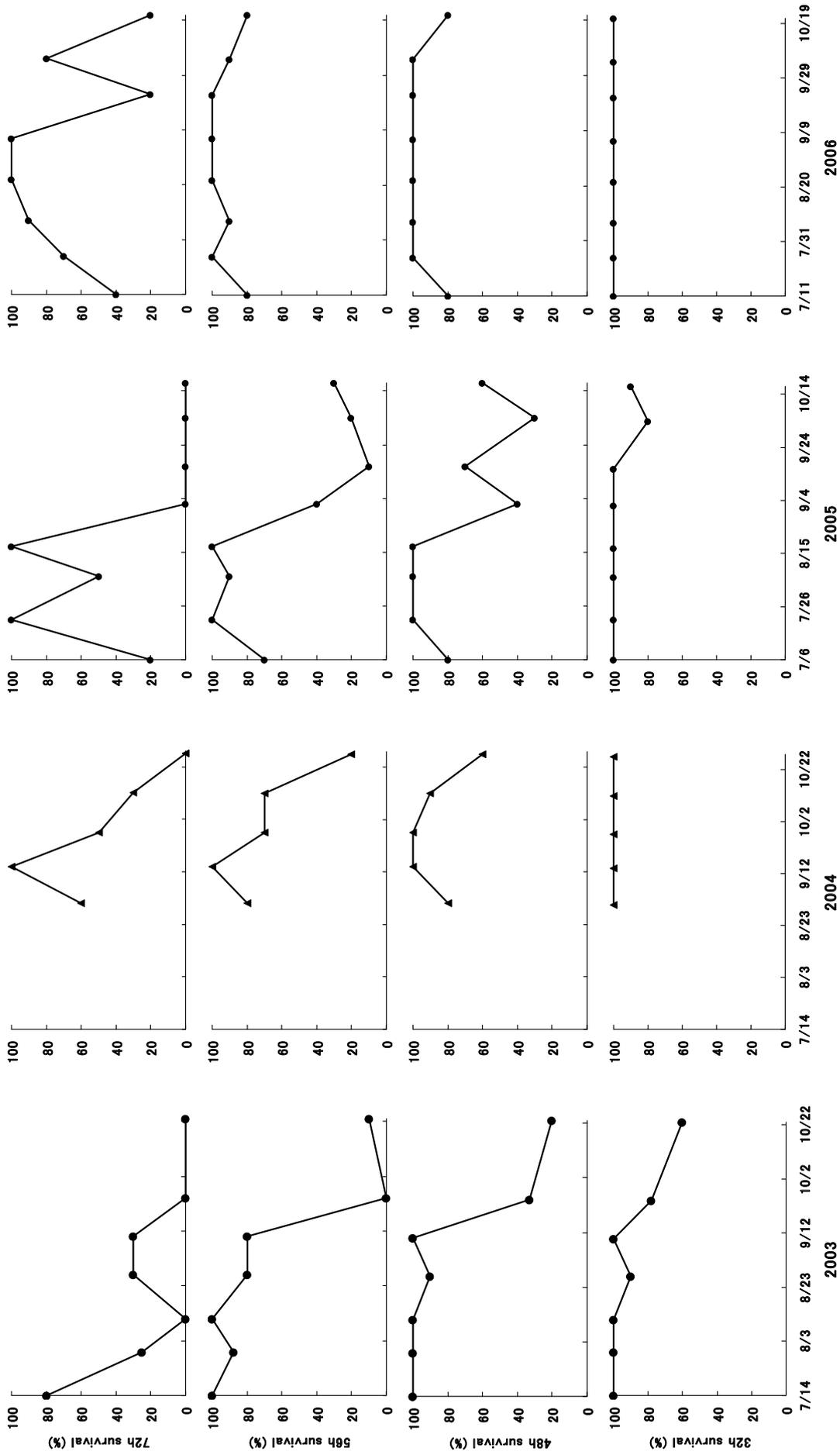


Fig. 4-7. Changes in 32, 48, 56 and 72h survival of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to anoxia shown in Fig. 4-6.

Table 4-3. The mortality of the Manila clam culture area in Konagai

Year	Period of mortality	Mortality area	Estimated mortality (%)
1998	Late July	Whole area	40
1999	Late August	A part of area (The head of the bay)	10
	Late September	Whole area	27
2000	Early August	Whole area	24 - 100
2001	Late July	A part of area (The middle of the bay)	24 - 85
2002	Early August	A small part of area (The mouth of the bay)	10 - 40
2003	Early August	A small part of area (The head of the bay)	38 - 66
	Early September	A part of area (The head of the bay)	15 - 100
2004	Mid-August	Whole area	10 - 100

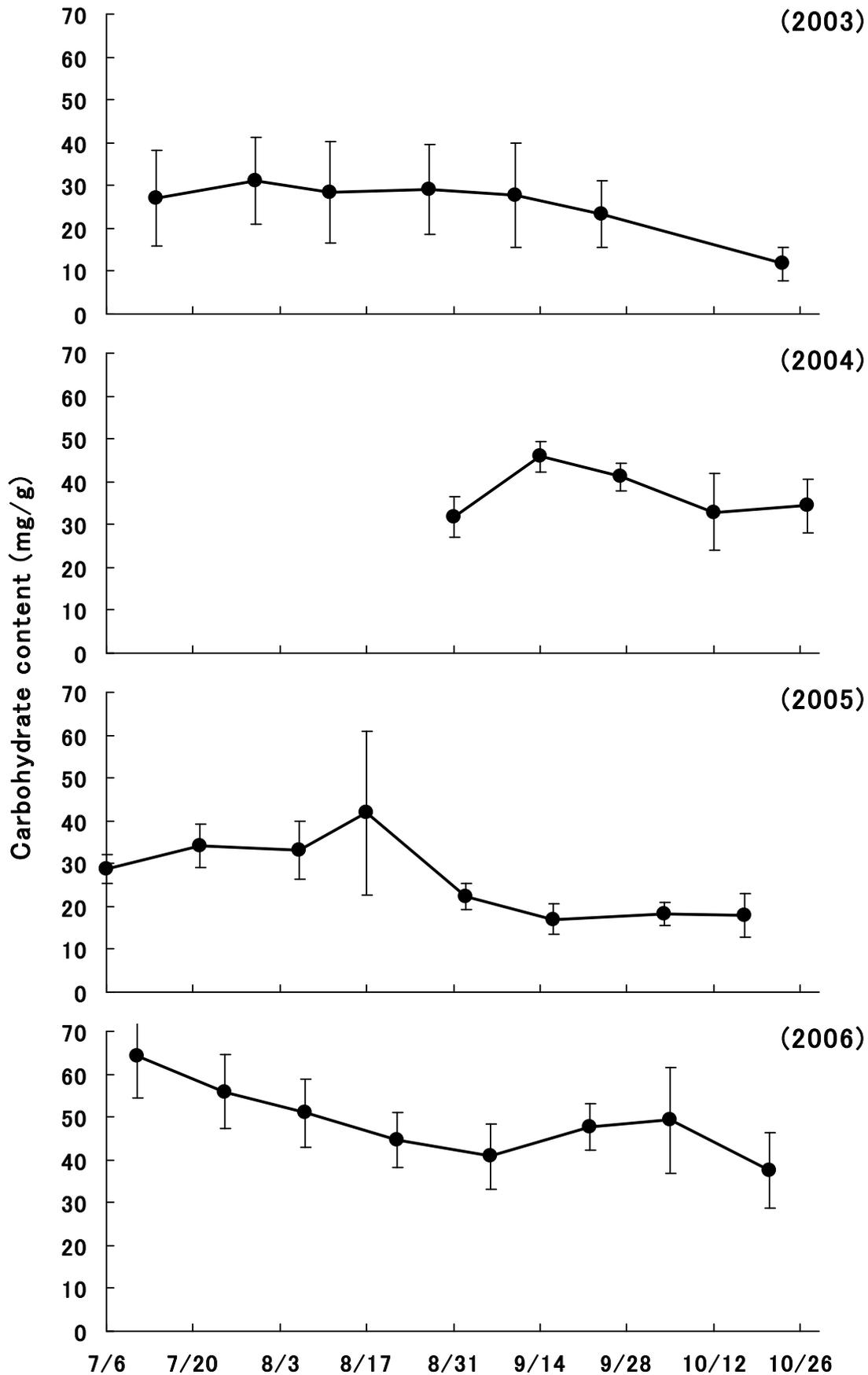


Fig. 4-8. Changes in carbohydrate content of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* used for the anoxia tolerance experiments shown in Fig. 4-6. Data are given as the mean \pm SD (n = 10).

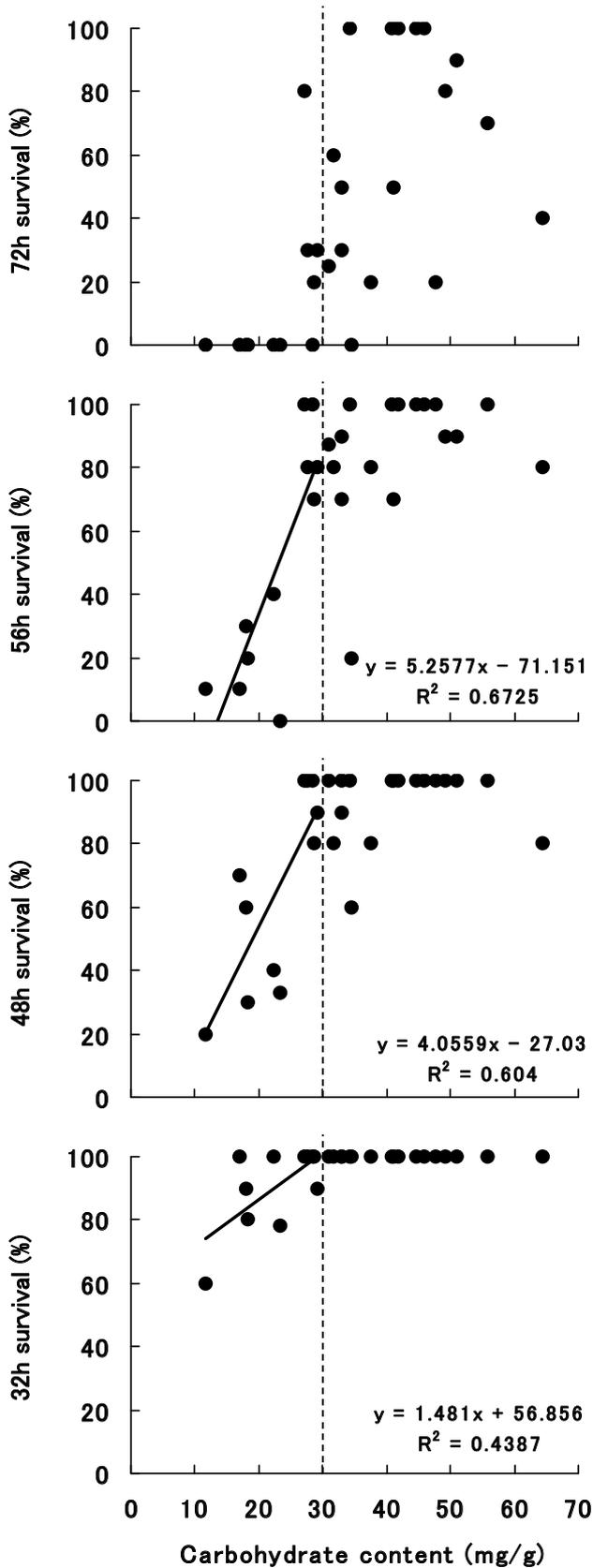


Fig. 4-9. Relationships between carbohydrate content and each time survival (32, 48, 56 and 72h) of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to anoxia from 2003 to 2006. Dissolved oxygen concentration was maintained below 0.1 mg/l at 28°C. Vertical broken lines indicate carbohydrate content of 30mg/g. Regression lines were calculated only for the carbohydrate content below 30mg/g.

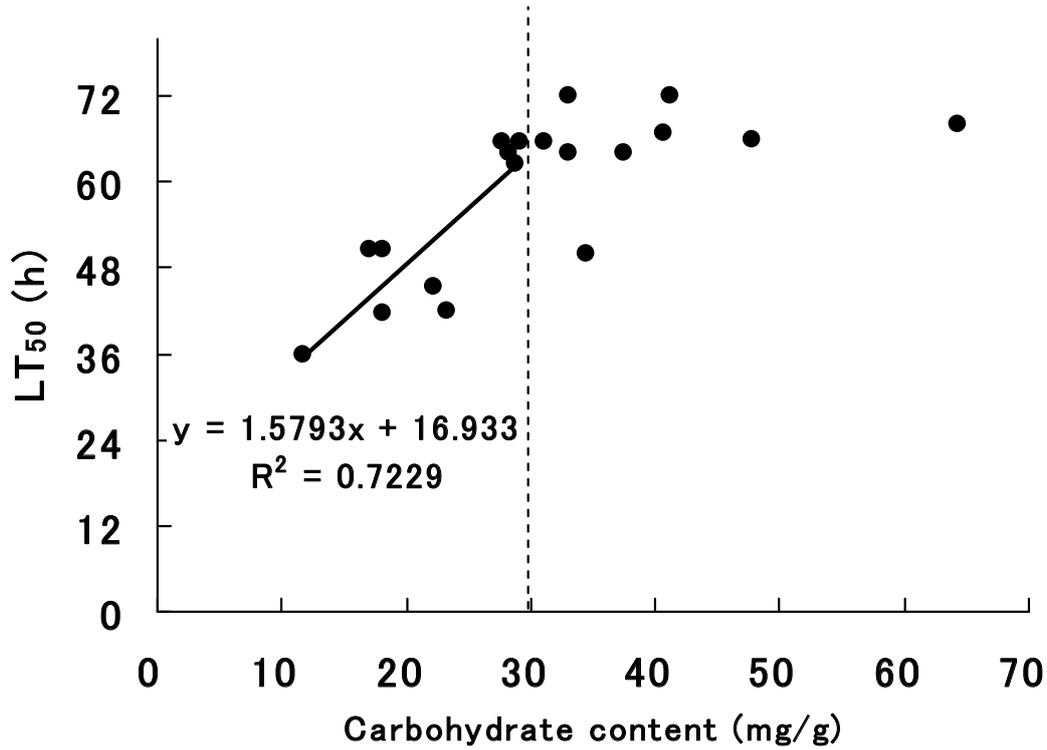


Fig. 4-10. Relationships between carbohydrate content and LT₅₀ of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to anoxia from 2003 to 2006. Dissolved oxygen concentration was maintained below 0.1 mg/l at 28°C. Vertical broken line indicates carbohydrate content of 30mg/g. Regression line was calculated only for the carbohydrate content below 30mg/g.

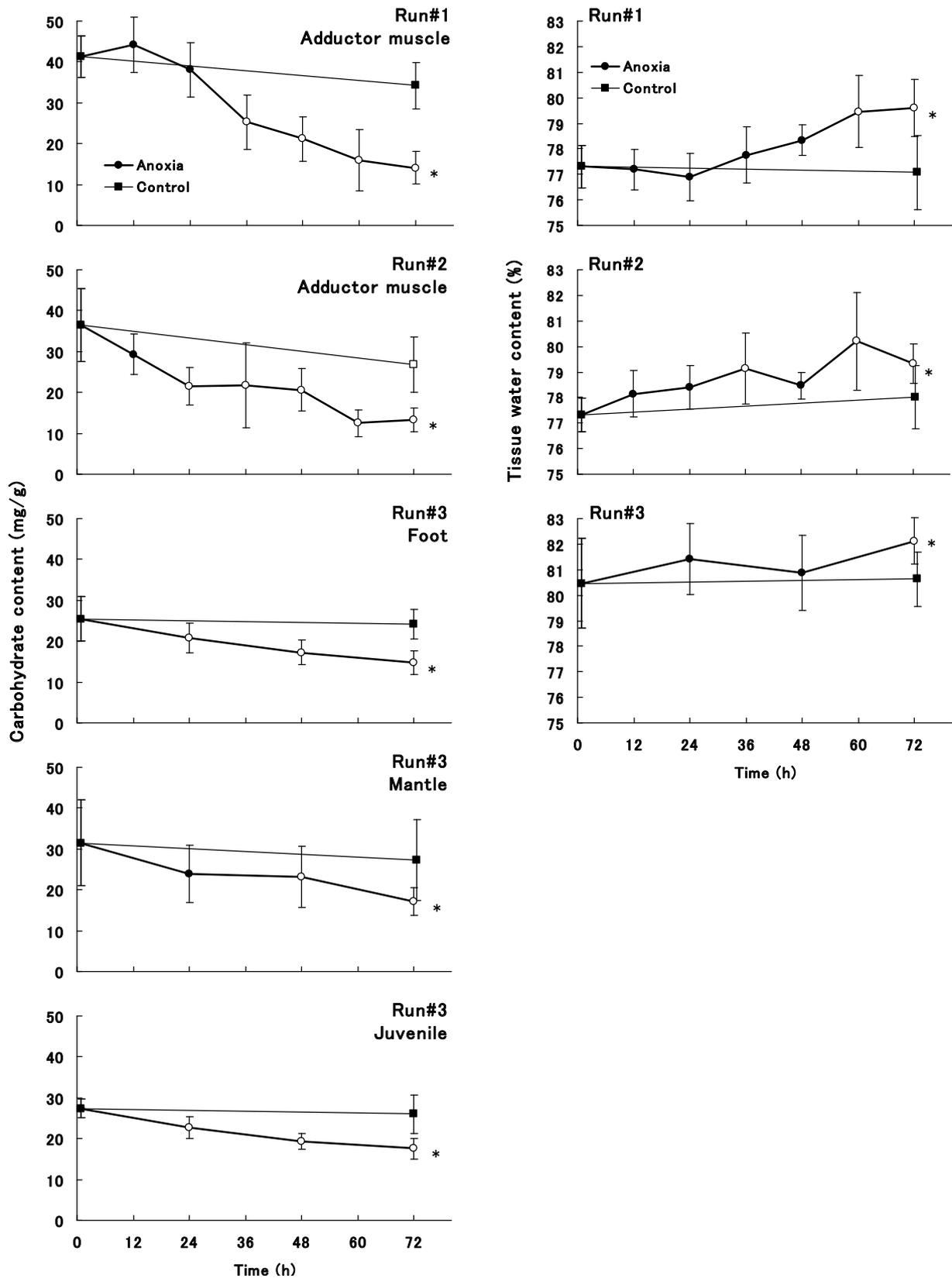


Fig. 4-11. Changes in carbohydrate content and tissue water content of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to anoxia. Dissolved oxygen concentrations of anoxia and control were maintained below 0.1 mg/l and over 5 mg/l, respectively, at 30°C. Data are given as the mean ± SD (n = 10). Open symbols indicate significant difference from the corresponding 0h value (Dunnnett test, $P < 0.05$). Asterisks indicate significant difference between 72h value of anoxia and control (t -test, $P < 0.05$).

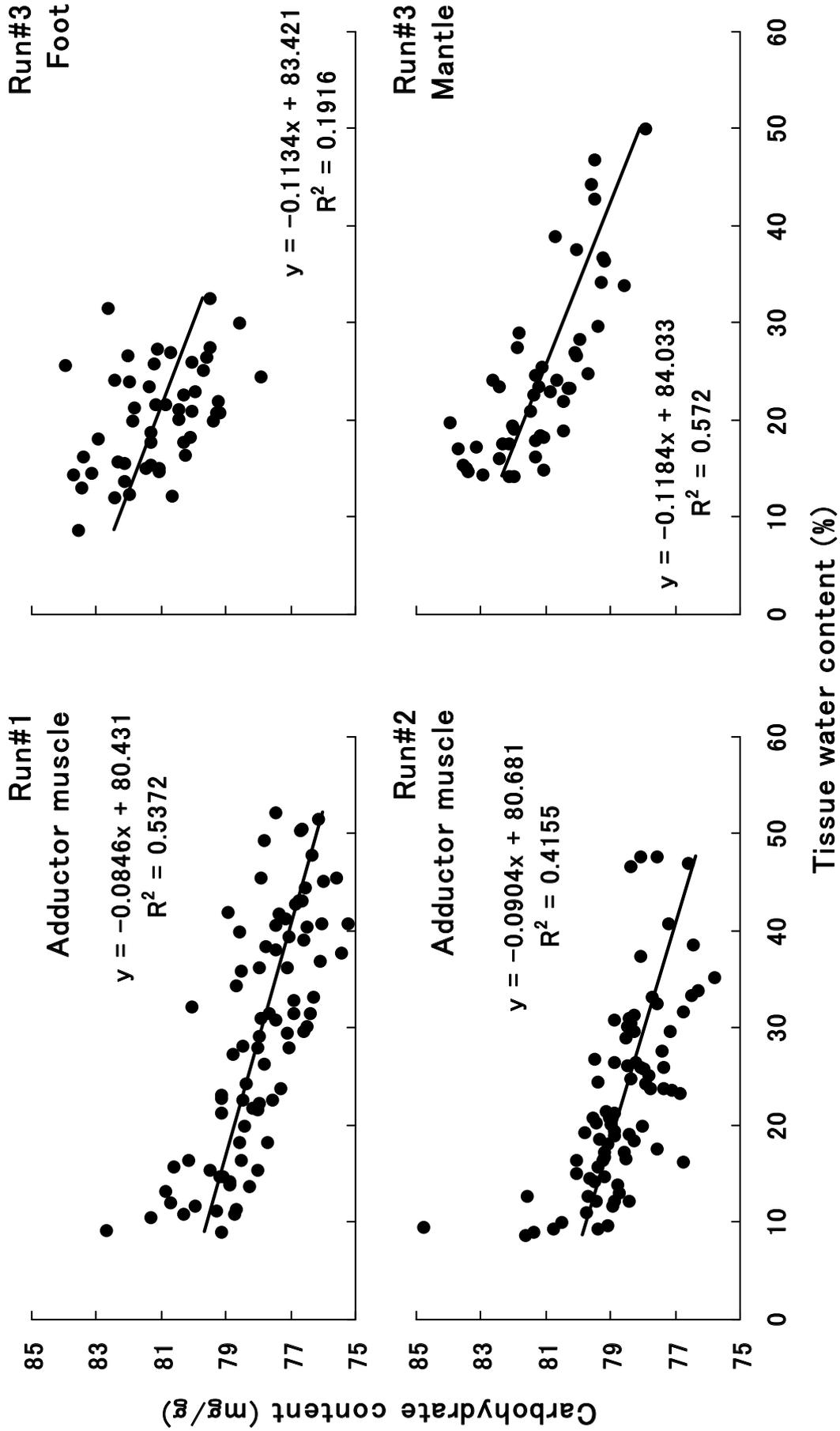


Fig. 4-12. Relationships between carbohydrate content and tissue water content of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Data are given as the mean (n = 10).

第5章 環境悪化時のアサリ外套腔液有機酸含量の変化

二枚貝は貧酸素など環境悪化時に無気呼吸を維持し、代謝を低くして比較的長期間生存する事が知られている(日向野 2005)。その際、嫌気代謝ではグリコーゲンとアミノ酸(アスパラギン酸等)を貯蔵物質として利用し、コハク酸、プロピオン酸など様々な有機酸などを代謝産物として得ながら生命維持に必要なエネルギーを得ている

(Hochachka 1984)。中村(1998)は無酸素下においてヤマトシジミが著しい耐性を示し、この時に最終代謝産物としてプロピオン酸が蓄積することを示した。また、品川ら(2002)はアサリが無酸素下でまず後述の外套腔液中にコハク酸を蓄積し、その後、へい死直前にはプロピオン酸、酢酸が外套腔液中に高濃度で蓄積することを室内実験で示した。

二枚貝類において有機酸等の体内への蓄積の知見は無酸素(de Zwaan et al. 1995; 中村 1998)、空中露出(de Zwaan 1983; 高橋ら 2000)などがある。アサリについての知見は空中露出(鴻巣ら 1967; Ali et al. 1999)があるが、その他は無酸素に曝露した品川ら(2002)以外見当たらない。

本章では嫌気代謝時に生産されるアサリ外套腔液中の有機酸含量を指標に、どのような環境要因がアサリを嫌気代謝に追い込み、生存を脅かすのか実験的に明らかにすることを目的とし、1) 溶存酸素濃度(貧酸素)、2) 断続的な貧酸素、3) 低塩分、4) 硫化水素がアサリに与える影響について検討した。

1 節 溶存酸素濃度と外套腔液有機酸含量の関係

材料と方法

2005年11月および2006年2月に長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場(Fig. 4-1)で採取したアサリ成貝を実験材料とした。供試個体(殻

長 32.2 ± 1.4 mm, 重量 6.3 ± 0.9 g) は、実験に供するまで水産総合センター養殖研究所の陸上水槽で *Pavlova lutheli*, *Chaetoceros gracilis* を給餌して蓄養した。

実験は2005年12月および2006年2月に水温 30°C で行った。アサリは自然水温 ($12.0 \sim 16.7^{\circ}\text{C}$) から2~3日間かけて実験水温 30°C に馴致した。

実験水温に調整した恒温槽中に濾過海水を満たした飼育槽(容量約3 l)を設置し、各実験区にアサリを20~25個体収容しDOを0.5, 1, 2 mg/lとなるようDOコントローラMC-7W(飯島電子工業社)を用いて空気と窒素でDOを設定値に調整し、溶存酸素計928および酸素電極1302(Strathklevin社)で飼育槽内のDOを1時間毎に記録した(Fig. 5-1)。各DOへの浸漬時間は48時間までとし、12時間毎または24時間毎に5個体ずつ(DO 0.5 mg/l 区の48時間後サンプルのみ3個体)サンプリング、メスにより前閉殻筋を切断して、わずかに開殻し、殻の隙間から滴り落ちてくる外套腔液(Fig. 5-2)を0.15~0.5 ml採取し、5%トリクロロ酢酸溶液0.5 mlで固定後、 -35°C で凍結保存し、後日、HPLC有機酸分析システム(solvent delivery unit: LC-10A, detector: CDD-6A, column oven: CTO-10A, auto-injector: SCL-10A, data processor: C-R6A, 全て島津社)を用いてコハク酸、酢酸、プロピオン酸等(Fig. 5-2)の含量を測定した。アサリが実験途中でへい死し、サンプリングができなくなった場合は、実験を中止した。生死の確認は第3章と同様に行った。

実験には無酸素区と対照区を設け、無酸素区は窒素で曝気し、DO 0.1 mg/l未満とした海水を満たした蓋付き500 ml広口T型瓶3本にアサリ5個体ずつを収容して無酸素状態となるよう蓋で閉じ、 30°C 恒温槽内に設置した。対照区は空気曝気し、DO 6.0 mg/l以上とした海水(2 l容ディスポカップ)を恒温槽に設置し、アサリを17個体収容した。対照区は試験区同様DOを1時間毎に記録したが、無酸素区は飼育槽密閉のためDOを測定しなかった。無酸素区は12時間毎に、対照区は24および

48 時間後に 5 個体ずつサンプリングし、試験区同様各種有機酸含量を測定した。

なお、アサリ外套腔液の有機酸の変化については、一元配置分散分析 (ANOVA) により有意差の確認を行い、多重比較検定はダネットの方法 (Dunnnett test)、標本数の都合でダネット法での有意差検定が不可能だった場合はシェフェの方法 (Scheffé test) により $P < 0.05$ で有意差の検定を行った。

結 果

各試験区の DO は 0.5 mg/l 区は 0.54 ± 0.16 mg/l, 1 mg/l 区は 1.00 ± 0.04 mg/l, 2 mg/l 区は 1.97 ± 0.09 mg/l, 対照区は 6.26 ± 0.06 mg/l であった。

水温 30°C, 各 DO のアサリ外套腔液の有機酸含量の推移を Fig. 5-3 に示す。

無酸素区の開始時の有機酸含量はコハク酸 0.10 ± 0.07 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 0.12 ± 0.03 $\mu\text{mol/ml}$, プロピオン酸 0 $\mu\text{mol/ml}$ であった。24 時間後にはコハク酸 6.00 ± 3.41 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 0.33 ± 0.07 $\mu\text{mol/ml}$, プロピオン酸 1.00 ± 0.16 $\mu\text{mol/ml}$ と有機酸 3 種とも有意に増加した。しかし、48 時間後サンプリング予定だった残り 5 個体中 3 個体が 24 時間後にへい死したため、実験は 24 時間で打ち切った。

0.5 mg/l 区 (平均 DO 0.54mg/l) の開始時の有機酸含量はコハク酸 0.11 ± 0.04 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 0.09 ± 0.01 $\mu\text{mol/ml}$, プロピオン酸 0 $\mu\text{mol/ml}$ であった。36 時間後コハク酸が 2.29 ± 1.38 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 0.19 ± 0.08 $\mu\text{mol/ml}$, と有意に増加したが、プロピオン酸は 0.22 ± 0.27 $\mu\text{mol/ml}$ と増加したものの有意な変化ではなかった。なお 48 時間後はへい死によるサンプル個体数の減少で、3 個体の分析となったため、ダネット法による統計的差違を検討できなかったが、コハク酸 4.41 ± 3.05 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 0.24 ± 0.23 $\mu\text{mol/ml}$, プロピオン酸 0.16 ± 0.24 $\mu\text{mol/ml}$ となり、シェフェ法による有意差検定ではコハク酸のみ開始時と比較して有意に増加した。

1 mg/l 区 (平均 DO 1.00 mg/l) の開始時の有機酸含量はコハク酸 0.31 ± 0.20 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 $0.11 \pm$

0.01 $\mu\text{mol/ml}$, プロピオン酸 0 $\mu\text{mol/ml}$ であった。12 時間後コハク酸が 1.84 ± 1.55 $\mu\text{mol/ml}$ と増加したが、有意な変化ではなかった。その後も 48 時間まで有意な変化がなく、48 時間後にコハク酸 0.27 ± 0.21 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 0.13 ± 0.03 $\mu\text{mol/ml}$ となり、プロピオン酸は検出されなかった。

2 mg/l 区 (平均 DO 1.97 mg/l) の開始時の有機酸含量はコハク酸 0.16 ± 0.18 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 0.11 ± 0.03 $\mu\text{mol/ml}$, プロピオン酸 0 $\mu\text{mol/ml}$ であったが、48 時間後まで有意な変化がなく、48 時間後にコハク酸 1.10 ± 1.51 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 0.15 ± 0.05 $\mu\text{mol/ml}$, プロピオン酸 0.05 ± 0.12 $\mu\text{mol/ml}$ となった。

対照区 (平均 DO 6.26 mg/l) の開始時の有機酸含量はコハク酸 0.63 ± 1.00 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 0.11 ± 0.04 $\mu\text{mol/ml}$, プロピオン酸 0 $\mu\text{mol/ml}$ であったが、48 時間後まで有意な変化がなく、48 時間後にコハク酸 0.22 ± 0.14 $\mu\text{mol/ml}$, 酢酸 0.17 ± 0.03 $\mu\text{mol/ml}$ となり、プロピオン酸は検出されなかった。

へい死は無酸素区が 24 時間後 10 個体中 3 個体へい死し、実験を中止した。

0.5 mg/l 区は 24 時間後 20 個体中 1 個体, 36 時間後 14 個体中 3 個体, 48 時間後 6 個体中 3 個体がへい死し、時間経過とともにへい死する割合が高まった。

1 mg/l 区は 24 時間後 15 個体中 1 個体, 48 時間後 9 個体中 3 個体がへい死した。

2 mg/l 区は, 48 時間後 9 個体中 3 個体がへい死した。

対照区は 48 時間後もへい死個体がみられなかった。

考 察

水温 30°C で 48 時間後 (無酸素区は 24 時間後) までにアサリ外套腔液中の各種有機酸が実験開始時の含量から有意に増加したのは、無酸素区の曝露 24 時間後のコハク酸 (平均含量: 5.96 $\mu\text{mol/ml}$), 酢酸 (0.33 $\mu\text{mol/ml}$), プロピオン酸 (1.00 $\mu\text{mol/ml}$) と 0.5 mg/l 区の 36 時間後のコハク酸 (2.29 $\mu\text{mol/ml}$), 酢酸 (0.19 $\mu\text{mol/ml}$) と 48 時間後のコ

ハク酸 (4.41 $\mu\text{mol/ml}$) であった。これらの有機酸含量の有意な増加は DO が 0.1 mg/l 未満の無酸素および 0.54 mg/l (0.5 mg/l 区) では、飼育環境中の DO が不足し、アサリが生存に必要なエネルギーを生産するために嫌気代謝を行い、代謝産物であるこれらの有機酸が蓄積した結果であり、生存するのに厳しい環境であると考えられた。一方、DO が 1.00 mg/l 以上の 1 mg/l 区、2 mg/l 区および対照区では開始時から 48 時間後まで各有機酸含量が有意に変化することがなく、嫌気代謝を継続的に行うような環境ではなかったと考えられる。

倉茂 (1942b) が朝鮮半島産アサリで行った実験では、殻長 3.0~3.3 cm のアサリを用い平均水温 22.5°C(17.2~24.3°C)と 23.0°C(21.4~25.7°C)で 2 回の実験を行い、平均 DO 0.43~0.47 ml/l (0.61~0.67 mg/l) となると 3 日間は生存できるが、4 日後からへい死個体が現れ、9 日経過するとほぼ全滅(へい死率 96%と 98%) するとしている。また、殻長 1.7~2.1 cm のアサリを用い平均水温 18.4°C(15.2~20.7°C)と 19.6°C(17.1~22.0°C)で 2 回の実験を行い、平均 DO 0.19~0.22 ml/l (0.27~0.31 mg/l) で 3~4 日後からへい死個体が現れ、7 日後にはへい死率が 74~88%になり、平均 DO 0.54~0.55 ml/l (0.77~0.79 mg/l) では 4~5 日後からへい死個体が現れ、7 日後にはへい死率が 22~28%になるが、平均 DO 0.90~0.98 ml/l (1.29~1.40 mg/l) では 7 日後のへい死率が 0~2%と何ら異常を示さないとしている。萩田 (1985) は水温 20°C、0.36 mg/l 以下の DO で 4 日間へい死せず、その期間中飼育水中の酸素がほとんど消費されなかったとしている。また、中村ら (1997b) は水温 25°C、DO 1 mg/l 以下の環境にアサリを 14 日間曝露してもへい死する個体はなく、生存に与える影響はほとんどないとしている。

本実験は夏季の高水温時発生する貧酸素を想定して行ったため、水温 30°Cとこれらの実験と水温条件が異なり、単純に比較できないが、環境中の酸素不足で嫌気代謝を行わざるをえない場合に数日間しか生存できないと仮定すると、DO 0.5 mg/l

以下と 0.8 mg/l 以下で 4 日後からへい死が始まった倉茂 (1942b) の実験結果は本実験の嫌気代謝時の DO 条件とよく一致する。また萩田 (1985) の DO 0.36 mg/l 以下で飼育水中の酸素がほとんど消費されなかったとしているが、この DO ではアサリは嫌気代謝を行ったと想定すると本実験結果と矛盾しない。

これらから、高水温時(水温 30°C)、DO 0.5 mg/l 程度の環境では、アサリは酸素不足のため嫌気代謝を行い、しばらくは生存が可能であるが、長期間継続した場合、有機酸等の代謝産物の蓄積やエネルギー貯蔵物質の減少などにより死亡に至ると考えられる。DO 1 mg/l 以上ではいずれの試験区のアサリの外套腔液有機酸含量も 48 時間後有意に増加しておらず、水温 30°C、DO 1 mg/l 以上の環境では嫌気代謝は継続しないと考えられる。よって、水温 30°C、DO 1 mg/l 以上ではアサリの生存に大きな影響はないと考えられ、夏季貧酸素時アサリの生存を維持するための DO の目安は 1 mg/l 以上と示唆された。

しかし、本実験では実験中に対照区のみへい死が観察されなかったが、無酸素区、0.5 mg/l 区、1 mg/l 区、2 mg/l 区で実験中に供試個体がへい死した。有機酸含量が有意に増加した無酸素区のコハク酸、酢酸、プロピオン酸の含量は実験終了時の 24 時間後それぞれ 5.96 $\mu\text{mol/ml}$ 、0.33 $\mu\text{mol/ml}$ 、1.00 $\mu\text{mol/ml}$ まで、0.5 mg/l 区の実験終了時の 48 時間後のコハク酸と酢酸はそれぞれ 4.41 $\mu\text{mol/ml}$ 、0.24 $\mu\text{mol/ml}$ までしか増加しておらず他の試験区もそれ以下の値であった。品川(未発表)は室内実験をもとにアサリが無酸素環境継続時へい死する外套腔液有機酸含量の目安をコハク酸 18.00 $\mu\text{mol/ml}$ 以上、酢酸 1.20 $\mu\text{mol/ml}$ 以上、プロピオン酸 2.00 $\mu\text{mol/ml}$ 以上としているが、本実験ではこれらより低い含量でへい死した。有機酸含量が有意に増加せず、嫌気代謝が確認できなかった 1~2 mg/l 区においてもへい死していることから、このへい死は DO が不足したいわゆる「酸欠死」ではなく、自然水温の 12.0~16.7°Cから実験水温の 30°Cに 3

日間程度の馴致期間で昇温したストレスが原因ではないかと思われる。このため、今回得られた結果も、この生理的障害の影響を受けた可能性が残るため、今後、水温30℃前後の高水温期のアサリを供試個体個体として、再度検討する必要がある。

2 節 断続的貧酸素曝露時の外套腔液有機酸含量の変化

材料および方法

2004年3月に長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場 (Fig. 4-1) で採取したアサリ (殻長 36.9 ± 1.7 mm, 肥満度 16.8 ± 2.3) を実験材料とした。2003年8月に観測された断続的な貧酸素時の底層水温 (後述の第6章2節, Fig. 6-4, 6-5) を考慮して実験水温は25℃とし、アサリを現場水温約16℃から3日間かけて実験水温に馴致した後、実験に供した。

実験は30 l ポリカーボネイト製水槽 (蓋付き) に34個体収容し、後述の2003年8月の調査時 (第6章2節) の養殖漁場環境を再現するため、1日24時間のうち窒素曝気によるDO 0.5 mg/l 以下を目安とした貧酸素に約10時間、空気曝気によるDO 5 mg/l 以上を目安とした有酸素に約14時間という環境の水槽内にアサリを3日間置き、試験区とした。実験は水温25℃、塩分34 psu 程度、換水は14時間の空気曝気時に3回転を目安に行った。また、常時空気曝気によるDO 5 mg/l 以上を目安とした有酸素の環境の10 l 水槽にアサリ13個体を収容して、対照区とした。実験水温、塩分、換水条件などは試験区と同じとした。実験水槽中の水温とDOは溶存酸素計Oxi340i (WTW社) を用いて、試験区は10分毎、対照区は30分毎に測定・記録した。アサリ外套腔液のサンプリングは、試験区が開始時、5、10、24、29、34、48、53、58、72時間後に、対照区が開始時、24、48、72時間後に行った。両試験区とも開始時および72時間後は各5個体の、その他のサンプリング時には3個体の外套腔液を第5章1節と同様の方法で採取

し、コハク酸、酢酸、プロピオン酸等の各有機酸含量を測定した。生死の確認は第3章と同様に行った。

統計処理は、24時間単位の各有機酸のデータ (例としては0、5、10、24時間後、次は24、29、34、48時間後などのデータの組み合わせ) で一元配置分散分析 (ANOVA) により有意差の確認を行い、多重比較検定はシェフェの方法 (Scheffé test) により $P < 0.05$ で有意差の検定を行った。

結果

実験水槽内の水温、DOと有機酸含量の推移を Fig. 5-4 に示す。実験水槽内の環境は、試験区の貧酸素時は水温 $25.1 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ($24.1 \sim 25.5^\circ\text{C}$)、DO 0.16 ± 0.19 mg/l ($0.05 \sim 1.66$ mg/l)、有酸素時は水温 $24.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ($23.8 \sim 25.2^\circ\text{C}$)、DO 5.78 ± 0.55 mg/l ($1.50 \sim 6.35$ mg/l) であった。対照区は水温 $24.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ($24.2 \sim 25.6^\circ\text{C}$)、DO 5.75 ± 0.36 mg/l ($4.85 \sim 6.83$ mg/l) であった。

実験開始時のアサリ外套腔液のコハク酸含量は 0.45 ± 0.49 $\mu\text{mol/ml}$ であったが、試験区で窒素曝気による1回目の貧酸素とした5時間後および10時間後のサンプリングではそれぞれ 4.25 ± 2.55 $\mu\text{mol/ml}$ 、 7.19 ± 2.41 $\mu\text{mol/ml}$ と増加し、その後有酸素として14時間経過した実験開始24時間後のサンプリングでは 0.52 ± 0.48 $\mu\text{mol/ml}$ と減少した。同様に2回目の貧酸素のコハク酸含量は29時間後 2.08 ± 1.36 $\mu\text{mol/ml}$ 、34時間後 5.64 ± 2.79 $\mu\text{mol/ml}$ と増加し、有酸素とした48時間後に 0.08 ± 0.04 $\mu\text{mol/ml}$ と減少、3回目の貧酸素の53時間後 2.01 ± 1.34 $\mu\text{mol/ml}$ 、58時間後 3.81 ± 0.54 $\mu\text{mol/ml}$ と増加、有酸素とした72時間後 0.37 ± 0.22 $\mu\text{mol/ml}$ と減少し、貧酸素時に増加、有酸素時に減少と増減を繰り返した。貧酸素に約10時間曝露された10時間後、34時間後および58時間後サンプリングのコハク酸含量がそれぞれその前後で最も高い値を示し、前後の有酸素時のサンプリング (例えば10時間後のサンプリングの場合、開始時と24時間後のアサリ) と比較して、それぞれ有意な差となっ

た。なお、酢酸の平均含量は実験中 $0.01 \mu\text{mol/ml}$ 以下と変化せず、プロピオン酸はサンプリング時全てで検出されなかった。一方、常時酸素下においた対照区のコハク酸含量は、開始時 $0.45 \pm 0.49 \mu\text{mol/ml}$ 、24 時間後 $0.53 \pm 0.10 \mu\text{mol/ml}$ 、48 時間後 $2.33 \pm 3.29 \mu\text{mol/ml}$ 、72 時間後 $1.31 \pm 0.77 \mu\text{mol/ml}$ と実験開始 48 時間後のサンプリングで最も高い値を示したが、統計的に有意な変化ではなかった。酢酸の平均含量は実験中 $0.01 \pm 0.02 \mu\text{mol/ml}$ とほとんど変化せず、プロピオン酸は試験区同様、全てのサンプリング時検出されなかった。なお、実験中、試験区、対照区ともに実験開始 34～48 時間後の間にそれぞれ 1 個体へい死した。

考 察

二枚貝は貧酸素時など環境悪化時に無気呼吸を維持し、代謝を低くして比較的長期間生存する事が知られている(日向野 2005)。その際、嫌気代謝ではグリコーゲンとアミノ酸(アスパラギン酸等)を貯蔵物質として利用し、コハク酸、プロピオン酸など様々な有機酸などを代謝産物として得ながら生命維持に必要なエネルギーを得ている(Hochachka 1984)。また、de Zwaan (1983) は潮間帯の固着性二枚貝 *Mytilus edulis* が空中曝露 24 時間で閉殻筋のコハク酸含量を嫌気代謝により急増させるが、海水への浸漬により好気代謝が可能となると、TCA 回路を正常に回転させることによって、蓄積されたコハク酸が消費され数時間で空中曝露前の含量に減少することを示している。本実験のアサリについても貧酸素に曝露されると、嫌気代謝をおこないコハク酸含量が増加するが、貧酸素が解消され、外界の酸素が利用できるよになると、蓄積されたコハク酸を消費し、速やかに含量がほぼ実験開始時のレベルまで減少させたものと推察する。これらの結果から、一日の内半日以内の断続的な貧酸素が数日継続しても、コハク酸含量を品川(未発表)の示した危険レベルの $18.0 \mu\text{mol/ml}$ 以上まで蓄積させるに至らなかったと考えられる。倉茂(1942b)も平均水温 $22.5 \sim$

23.0°C の実験で常時 $\text{DO } 0.5 \text{ ml/l}$ (0.7 mg/l) 以下で飼育すると 4 日後から死にはじめ、9 日後にはほぼ全滅するが、 $\text{DO } 0.5 \text{ ml/l}$ (0.7 mg/l) 程度に 1 日 20 時間、十分に DO のある普通海水で残り 4 時間、毎日飼育すると 20 日経過後も 10% 程度のへい死率にとどまり、更に 1 日における貧酸素曝露時間の割合が短くなると、20 日経過後もほとんど全部異常なく生残するとしている。品川(未発表)によると無酸素下でアサリの水温 25°C の半数致死時間 (LT_{50}) は 90 時間、水温 30°C では 43 時間と、水温 25°C では 30°C の 2 倍以上の時間生残している。本実験では 2003 年 8 月にアサリ養殖漁場で観測された断続的貧酸素時の底層水温 25°C (後述の第 6 章 2 節, Fig. 6-4, 6-5) という夏季としては低い水温設定としたため 1 日の内 10 時間の断続的貧酸素曝露が 3 日間継続しても、アサリの生存に大きな影響を与えなかった。しかし、アサリは貧酸素曝露時に閉殻し、摂餌することができず、より高い水温 (30°C 以上) では代謝が活発となり(第 4 章 1 節, Fig. 4-4) エネルギー消費が大きくなるため、夏季高水温時の断続的貧酸素曝露がアサリの生存に与える影響に関しては今後の検討課題と考える。

3 節 低塩分曝露時の外套腔液有機酸含量の変化

材料および方法

2005 年 10 月長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場(Fig. 4-1)で採取したアサリ(殻長 $32.7 \pm 1.6 \text{ mm}$ 、肥満度 17.0 ± 2.1)を実験材料とした。供試個体は、実験に供するまで長崎県総合水産試験場の陸上水槽で *Nannochloropsis* sp. を給餌して蓄養(10 日間以内)した。

実験時の水温は第 3 章同様 25°C とし、アサリ飼育水槽の水温を自然水温 ($23.1 \sim 24.3^\circ\text{C}$) から 1 日間かけて 25°C になるよう調整した。実験開始直前の飼育水の塩分は 33.9 psu であった。

各実験に用いた低塩分海水の塩分調整は、第 3 章と同様とした。

塩分 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 30 psu に調整した低塩分海水を満たした 10 l ポリプロレン水槽にアサリを各槽 23 個体ずつ収容した。実験開始から 5, 12, 24, 36, 48, 72 時間後に 3 個体 (10 psu の 72 時間後のみ 2 個体) ずつ取り上げ、アサリの殻縁辺部をピンセットの先でわずかに開殻して、1 ml シリンジと 24~25G 注射針 (テルモ社) を用いて外套腔液を外套腔から、血リンパを前後閉殻筋からそれぞれ 0.1~0.5 ml 採取した。採取した外套腔液は第 5 章 1 節と同様の方法でコハク酸、酢酸、プロピオン酸等の各有機酸含量を測定した。血リンパおよび低塩分海水は第 3 章と同様の方法で浸透圧を測定した。

最終サンプリング時に各槽に残された 8 個体の生残状況を確認した。生死の判定は第 3 章と同様に行った。

換水は 1 日毎にあらかじめ塩分、水温を調整した水槽にアサリを移し替える方法で行った。塩分の確認・調整は第 3 章 2~4 節と同様とした。

実験中は無給餌とした。

外套腔液中の有機酸含量および血リンパ浸透圧の変化については、一元配置分散分析 (ANOVA) により有意差の確認を行い、多重比較検定はダネットの方法 (Dunnnett test) により $P < 0.05$ で有意差の検定を行った。

結 果

アサリを低塩分海水に曝露した時の血リンパ浸透圧の推移を Fig. 5-5 に、外套腔液の有機酸含量の推移を Fig. 5-6 に示す。

塩分が 30 psu では実験開始 5 時間で血リンパは外界水とほぼ等浸透となったが、海水の塩分が低下するにつれて血リンパ浸透圧が外界水とほぼ等浸透となるまでの時間が第 3 章 2 節の実験 (Fig. 3-2) 同様に延長し、22.5~25 psu では 12 時間、20 psu で 36 時間、17.5 psu で 48 時間、12.5~15 psu では 72 時間を要した。なお、10 psu では 72 時間後までに血リンパ浸透圧は外界水と等浸透にはならなかった。

実験開始後、血リンパ浸透圧が曝露開始時の浸透圧と比較して有意に低い値になるまでの時間は、25~30 psu で 5 時間、22.5 psu で 12 時間、20 psu で 24 時間、17.5 psu で 36 時間、12.5~15 psu で 48 時間、10 psu で 36 時間であった。また、曝露開始 72 時間時点で観察されたへい死個体数は、10 psu では 6 個体、12.5 psu では 1 個体で、15 psu 以上ではへい死はみられなかった。

各塩分曝露時のアサリ外套腔液中有機酸含量は 22.5~30 psu では 30 psu の 36 時間後のコハク酸 (開始時 $0.13 \pm 0.06 \mu\text{mol/ml}$, 36 時間後 $1.12 \pm 0.60 \mu\text{mol/ml}$) を除けば、各有機酸とも有意な変化がなかった。

20 psu では開始時 $0.13 \pm 0.06 \mu\text{mol/ml}$ であったコハク酸含量が 24 時間後に $5.34 \pm 4.77 \mu\text{mol/ml}$ と有意に増加した。その後 36 時間後以降減少し、72 時間後には $0.22 \pm 0.12 \mu\text{mol/ml}$ とほぼ開始時の値となった。開始時 $0.09 \pm 0.02 \mu\text{mol/ml}$ であった酢酸含量も 48 時間後に $0.23 \pm 0.05 \mu\text{mol/ml}$ と有意に増加したが、72 時間後には $0.12 \mu\text{mol/ml}$ とほぼ開始時の値となった。

17.5 psu では開始時 $0.30 \pm 0.09 \mu\text{mol/ml}$ であったコハク酸含量が 36 時間後に $10.62 \pm 9.01 \mu\text{mol/ml}$ と有意に増加した、その後 48 時間以降減少し、48 時間後には $0.26 \pm 0.22 \mu\text{mol/ml}$ とほぼ開始時の値となった。酢酸に有意な変化なかった。

15 psu では開始時 $0.13 \pm 0.06 \mu\text{mol/ml}$ であったコハク酸含量が 48 時間後に $18.96 \pm 16.73 \mu\text{mol/ml}$ と有意に増加したが、72 時間後には $0.32 \pm 0.22 \mu\text{mol/ml}$ とほぼ開始時の値となった。開始時 $0.09 \pm 0.02 \mu\text{mol/ml}$ であった酢酸含量が 72 時間後に $0.24 \pm 0.11 \mu\text{mol/ml}$ と有意に増加した。

12.5 psu では開始時 $0.30 \pm 0.09 \mu\text{mol/ml}$ であったコハク酸含量が 24 時間以降有意に増加し、48 時間後に $18.59 \pm 2.55 \mu\text{mol/ml}$ となったが、72 時間後には $2.97 \pm 4.10 \mu\text{mol/ml}$ と減少した。酢酸含量に有意な変化なかった。

10 psu では開始時 $0.30 \pm 0.09 \mu\text{mol/ml}$ であったコハク酸含量が 12 時間以降有意に増加し、48 時

間後に $18.02 \pm 2.54 \mu\text{mol/ml}$ となった。その後 72 時間後に $33.85 \mu\text{mol/ml}$ と増加したが、供試個体へい死で 2 個体の分析にとどまったため、有意差の検定はできなかった。開始時 $0.14 \mu\text{mol/ml}$ であった酢酸含量が 48 時間後に $0.33 \pm 0.17 \mu\text{mol/ml}$ と有意に増加したが、72 時間後 $0.25 \mu\text{mol/ml}$ となった。

なお、各塩分ともプロピオン酸含量には有意な変化がみられなかった。

考 察

低塩分海水曝露後の血リンパ浸透圧の推移 (Fig. 5-5) およびアサリの生残状況は、試料を採取する間隔が違い、血リンパ浸透圧が有意に変化する時間や外界水と血リンパ浸透圧がほぼ等浸透となるまでの時間に若干のずれがあるものの、第 3 章 2 節の実験 (Fig. 3-2) と同様であった。また、供試個体のへい死状況についても同様で、各塩分曝露 72 時間後 10 psu で 6 個体、12.5 psu で 1 個体とへい死がみられたが、15 psu 以上の塩分ではへい死はみられなかった。

アサリの外套腔液中の有機酸含量について、品川ら (2002) は水温 30°C 、無酸素曝露でまずコハク酸含量が急増し、24 時間後酢酸とプロピオン酸が増加した直後からへい死が始まるとしている。外套腔液有機酸含量の推移 (Fig. 5-6) について、第 3 章 2 節で曝露時持続的閉殻引き起こす塩分の閾値 20 psu より高い $22.5 \sim 30 \text{ psu}$ では 30 psu で 36 時間後にコハク酸含量が増加した以外は有意な変化がなく、各塩分曝露後、アサリは速やかに十分な酸素を含んだ外界水を取り入れ、血リンパ浸透圧を外界水と等浸透としたため、閉殻による嫌気代謝を行うことがなく、各有機酸含量は有意に変化しなかったと考える。

20 psu 以下の各塩分の外套腔液のコハク酸含量の推移をみると、20, 17.5 および 15 psu では血リンパ浸透圧が有意に低下したそれぞれ 24 時間後 ($5.34 \mu\text{mol/ml}$)、36 時間後 ($10.62 \mu\text{mol/ml}$)、48 時間後 ($18.96 \mu\text{mol/ml}$) を頂点に低下し、それぞれ血リンパ浸透圧が外界水と等浸透となった 20

psu は 36 時間後に、17.5 psu は 48 時間後に、15 psu は 72 時間後にはほぼ開始時の値となった。これらはまず急激な外界の塩分低下に対して外界水の侵入を防ぎ閉殻したため、酸素を体内に取り込むことができず嫌気代謝に追い込まれた結果と考える。しかしその後、外界水を殻内に取り込み、血リンパ浸透圧が等浸透となる過程で、外界水の酸素が体内で利用できるようになったため、好気代謝を行い、TCA 回路を正常に回転させることによって、蓄積されたコハク酸が消費され含量が低下したものと考えられる (de Zwaan 1983)。12.5 psu については $15 \sim 20 \text{ psu}$ と同様に血リンパ浸透圧が有意に低下した 48 時間後コハク酸含量は $18.59 \mu\text{mol/ml}$ を頂点に血リンパ浸透圧がほぼ等浸透となった 72 時間後 $2.97 \mu\text{mol/ml}$ まで低下した。12.5 psu では曝露 72 時間後 8 個体中 1 個体がへい死した。第 3 章 1 節の実験の生残率曲線の解析 (Table 3-1) から塩分 12.5 psu は数日間の低塩分曝露でへい死する閾値であると思われる。このへい死した個体のコハク酸含量等は分析できなかったため、どのような経過でへい死に至ったのか不明であるが、他の生残個体は 72 時間後血リンパ浸透圧が外界水とほぼ等浸透になっていたことから、外界水の殻内への取り入れによってコハク酸等の含量は低下していたと推測され、殻内を 12.5 psu と等浸透とする過程で、一部衰弱個体はそのストレスに耐えきれずへい死したものと推察された。10 psu については低塩分曝露 36 時間後に血リンパ浸透圧は有意に低下したが、その後 72 時間まで外界水とほぼ等浸透になることなく、生残個体は外界水の侵入を防ぐため閉殻し続けたと考えられ、このためコハク酸含量は 12 時間後以降有意に増加し、48 時間後には、無酸素でアサリがへい死する外套腔液有機酸含量の目安 $18.0 \mu\text{mol/ml}$ (品川 未発表) とほぼ同じ $18.02 \mu\text{mol/ml}$ となった後、72 時間後には $33.85 \mu\text{mol/ml}$ ($n=2$ のため有意差確認不能) となった。10 psu では曝露 72 時間後 8 個体中 6 個体がへい死した。このへい死した個体もコハク酸含量等は分析できなかったため、どのような経過

でへい死至ったのか不明であるが、低塩分曝露 72 時間後のコハク酸含量が $33.85 \mu\text{mol/ml}$ とへい死の目安値を大きく上回る値まで増加していたことから、へい死原因はコハク酸の蓄積による可能性も考えられる。しかし、72 時間後に生残した 2 個体がこのように高いコハク酸含量となるほど嫌気代謝を継続し、外界水の侵入を阻むため閉殻し続けるほど、10 psu という低塩分は生存を脅かす塩分であり、コハク酸等の高濃度の有機酸の蓄積や長時間の閉殻にともなう疲労等によって閉殻し、10 psu の外界水が殻内に侵入した場合、短時間でへい死に至ると推察され、へい死原因としては軟体部組織の生存閾値を超えた低塩分海水の曝露の可能性が高いと考える。

酢酸含量については、10 psu (48 時間後, $0.33 \mu\text{mol/ml}$), 15 psu (72 時間後, $0.24 \mu\text{mol/ml}$) および 20 psu (48 時間後, $0.23 \mu\text{mol/ml}$) で開始時と比較してそれぞれ有意に増加したが、品川 (未発表) のへい死の目安値 $1.20 \mu\text{mol/ml}$ 以上を大きく下回っているため、酢酸の蓄積がアサリの生存に影響を与えるとは考えにくい。酢酸はコハク酸と違い、血リンパ浸透圧が有意に低下した後、嫌気代謝経路の違い (Fig. 5-2) から時間をおいて増加しているため、15 および 20 psu においては血リンパ浸透圧が外界水とほぼ等浸透となり、好気代謝に切り替わった直後もコハク酸のように速やかに好気代謝で消費されず、含量が低下しなかったと考える。15 psu では 72 時間後の酢酸含量が低下しなかったが、この時点で血リンパ浸透圧は等浸透となり、コハク酸含量もほぼ開始時の含量となっていることから、その後曝露を継続しても酢酸は蓄積し続けることはなく、その後速やかに含量は低下するものと推察される。

本実験では、水温 25°C で 20 psu 以下の低塩分曝露がアサリ継続的な閉殻を引き起こすことが、血リンパ浸透圧の変化 (第 3 章 2 節) だけでなく、嫌気代謝時に蓄積されるコハク酸含量の変化などから示唆された。また 10 psu 以下の低塩分の数日間の曝露はコハク酸含量の生存閾値を超える蓄積

等からアサリにとって致命的な環境であることが第 3 章の結果以外からも示唆され、アサリの生存を維持するための塩分の目安は数日間の曝露でへい死する個体がなかった 15 psu 以上と考える。

4 節 硫化水素曝露時の外套腔液有機酸含量の変化

材料および方法

2004 年 11 月および 2006 年 2 月に長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場 (Fig. 4-1) で採取したアサリ成貝を実験材料とした。供試個体は、実験に供するまで水産総合センター養殖研究所の陸上水槽で *Pavlova lutheli*, *Chaetoceros gracilis* を給餌して蓄養した。

実験は 2004 年 12 月 (実験 1) および 2006 年 3 月 (実験 2) に水温 25°C および 30°C で行った。アサリは自然水温 (実験 1 は $18.3\sim 18.9^\circ\text{C}$, 実験 2 は 12.2°C) から 2~3 日間かけて各実験水温に馴致した。

実験 1

実験は水温 25°C および 30°C で各 1 回行った。実験水温に設定した恒温槽中に濾過海水を満たした飼育槽に設置し、飼育槽内にアサリ (殻長 $35.5 \pm 2.8 \text{ mm}$, 肥満度 14.7 ± 2.2) を収容した後、溶存酸素計 928 酸素電極インターフェースおよび 1302 マイクロカソード酸素電極 (Strathklewin 社) で DO をモニターしながら飼育槽内の濾過海水を窒素で曝気し、無酸素 (DO 0.1 mg/l 未満) となった段階で密閉した無酸素区、ほぼ 10 mg-S/l となるよう硫化ナトリウム九水和物 (和光純薬工業社) を添加し、硫化水素はイオン態では生物に対する毒性が発揮されない (日向野 2005) ため硫化水素イオンとの平衡を考慮し、飼育槽内の pH をおよそ 7 (貧酸素の養殖現場で低下する可能性がある pH) に炭酸ガスを吹き込み調整し、無酸素区同様に無酸素として密閉した無酸素+ H_2S 区、対照として空気で曝気した状態 (DO 5 mg/l 以上) を維持した

有酸素区を設定した。アサリは無酸素区および有酸素区は3個体（飼育槽容量約700ml）、無酸素+H₂S区は5個体（飼育槽容量約1l）収容した。無酸素区および無酸素+H₂S区の飼育槽の側面にはマグネチックスターラーを装着して飼育槽内の海水を攪拌した（Fig. 5-7）。それぞれの環境にアサリを25℃では21時間、30℃では13時間曝露した。

実験2

実験は水温30℃で行った。実験水温に調整した恒温槽中に硫化水素が10 mg-S/lとなるよう硫化ナトリウム九水和物（和光純薬工業社）を添加した濾過海水（以下硫化水素溶液）を満たした飼育槽（容量約3l）を設置し、殻長32.5±1.7 mm、肥満度9.9±1.6のアサリを7個体収容し、ペリスタポンプ AC-2110（ATTO社）を用いて、硫化水素溶液を毎分6 mlを飼育水槽中に注水し、換水した。飼育槽は空気曝気し、有酸素（DO 5 mg/l以上）となるようにし、実験1と同じ溶存酸素計で水槽内のDOを15分毎に測定・記録した（Fig. 5-8）。上記の環境にアサリを13時間曝露した。

実験1, 2 共通

なお、実験終了後、実験1では無酸素+H₂S区は5個体、他の区は3個体、実験2では5個体のアサリを取り上げ、第5章1節と同様の方法でアサリ外套腔液を採取し、各種有機酸含量を測定した。また、生死の確認は実験終了時に第3章と同様の方法で行った。

硫化水素濃度の測定はFonselius et al. (1999)の方法に従って行った。

pHとORPの測定にはポータブルpH・ORP計IM-22P（東亜ディーケーケー社）を用いた。

アサリ外套腔液の有機酸の変化については、一元配置分散分析（ANOVA）により有意差の確認を行い、多重比較検定はシェフェの方法（Scheffé test）により $P < 0.05$ で有意差の検定を行った。

結果

実験1

実験終了時の無酸素+H₂S区の硫化水素濃度は25℃で13.4 mg-S/l、30℃で9.0 mg-S/lであった。

いずれの実験区も実験終了までへい死したアサリはみられず、ピンセットの先で外套膜を刺激した際の閉殻反応も速やかで外見上の異常は観察できなかった。

25℃および30℃の各実験区の実験終了時アサリ外套腔液中の各種有機酸含量をFig. 5-9に示す。

25℃では21時間後の実験終了時、コハク酸含量が無酸素+H₂S区（16.48 ± 2.78 μmol/ml）、無酸素区（21.83 ± 4.01 μmol/ml）の両区で有酸素区（0.20 ± 0.07 μmol/ml）に対して有意に増加した。また、酢酸含量は各区それぞれ0.46 ± 0.43、0.15 ± 0.08 および0.14 ± 0.03 μmol/mlと有意な差がなく、プロピオン酸含量は無酸素+H₂S区のみ0.66 ± 0.91 μmol/mlと検出されたが、検出されなかった有酸素区と比較して有意な差ではなかった。無酸素+H₂S区と無酸素区との比較ではいずれの有機酸含量も有意な差がなかった。

30℃では13時間後の実験終了時、コハク酸含量が無酸素+H₂S区（18.74 ± 3.94 μmol/ml）、無酸素区（11.47 ± 1.37 μmol/ml）の両区で有酸素区（0.50 ± 0.25 μmol/ml）に対して有意に増加した。酢酸含量は無酸素+H₂S区（0.75 ± 0.40 μmol/ml）、無酸素区（0.54 ± 0.03 μmol/ml）、有酸素区（0.12 ± 0.04 μmol/ml）と無酸素+H₂S区のみ有酸素区と有意な差があり、プロピオン酸含量も無酸素+H₂S区（1.56 ± 0.99 μmol/ml）、無酸素区（1.28 ± 0.06 μmol/ml）、有酸素区（0 μmol/ml）と無酸素+H₂S区のみ有酸素区と有意な差があった。なお、無酸素+H₂S区と無酸素区との比較ではコハク酸含量のみ有意な差があった。

実験2

実験終了時の飼育海水はORP -154 mV、pH 8.22であった。

実験中の水槽内のDOは5.03 ± 0.42 mg/lであっ

た。実験終了時、7個体中1個体がへい死した。

有酸素時、硫化水素がアサリ外套腔液有機酸含量に与える影響を比較するため、今回の実験区と第5章1節の対照区およびDO 2 mg/l区の有機酸含量の推移を Fig. 5-10 に示す。

実験開始時と終了時のアサリ外套腔液中の各有機酸含量は、コハク酸が $0.11 \pm 0.04 \mu\text{mol/ml}$ と $2.87 \pm 1.75 \mu\text{mol/ml}$ 、酢酸が $0.07 \pm 0.03 \mu\text{mol/ml}$ と $0.22 \pm 0.11 \mu\text{mol/ml}$ 、プロピオン酸が $0 \mu\text{mol/ml}$ と $0.44 \pm 0.40 \mu\text{mol/ml}$ とそれぞれ実験開始時と比べ終了時の含量は有意に増加していた。比較として Fig. 5-10 に示した対照区およびDO 2 mg/l区の各有機酸含量は実験期間中有意な変化を示さなかった。

考 察

硫化水素は、酸素分子による還元型チトクローム a_3 の再酸化をさまたげ、酸化的リン酸化を阻害する。この細胞でのエネルギー代謝の阻害は、低酸素症と同様の影響があるとされる (Boyd and Tucker 1988)。

柿野 (1982) は72時間、20 ppmの硫化水素 (S濃度) でへい死するが、実際の青潮が発生した際、検出される2 ppm程度ではおおむねへい死せず、もともと弱っていたアサリのへい死を早める程度だろうと推察している。一方、萩田 (1985) は硫化物量3.7 mg/l、3日間の曝露で80%へい死し、アサリは貧酸素のみで容易にへい死せず、硫化水素の接触によりへい死するのではないかとしている。また、中村ら (1997b) はDO 1 mg/l以下、硫化水素10 ppm、2日で半数へい死、4日で全滅するとしている。他の二枚貝においても無酸素時のへい死時間の短縮 (Theede et al. 1969 ; de Zwaan and Eertman 1996) や無酸素時、体内へのコハク酸の蓄積 (嫌気代謝) を促進する (Theede et al. 1995) 事例がある。本実験の硫化水素濃度 9.0~13.4 mg-S/lはアサリの生存に影響を与え、実験設定として十分な濃度であったと考える。

実験1 (Fig. 5-9) の水温25°C、曝露21時間後、無酸素+H₂S区と無酸素区のコハク酸のみがそれ

ぞれ有酸素区と比較して有意に増加したが、酢酸および無酸素+H₂S区のみ検出されたプロピオン酸は有酸素区と比較して有意な増加を示さなかったため、無酸素+H₂S区と無酸素区に明らかな差はなく、無酸素時の硫化水素の嫌気代謝の促進は確認できなかった。しかし、水温30°C、曝露13時間後の無酸素区ではコハク酸含量のみが有酸素区と比較して有意な差となったのに対し、無酸素+H₂S区はコハク酸、酢酸、プロピオン酸含量それぞれが有酸素区と比較して有意に増加した。また、水温30°Cの実験で無酸素+H₂S区と無酸素区の実験終了時のコハク酸含量には有意差があるなど硫化水素がアサリの無酸素時の嫌気代謝を促進することが潮間帯などに生息する底生性の二枚貝 *Scrobicularia plana* の Theede et al. (1995) の室内実験による報告と同様に明らかとなった。

一方、平均DO 5.0 mg/lと有酸素の環境下で硫化水素溶液を連続して添加した実験2 (Fig. 5-10) では、第5章1節の対照区 (平均DO 6.26 mg/l) およびDO 2 mg/l区 (平均DO 1.97 mg/l) で各DO曝露48時間後、各有機酸含量は有意に変化せず、嫌気代謝は行われていなかったのに対し、実験区ではDO 5.0 mg/lであったにもかかわらず、約10 ppm (10 mg-S/l) の硫化水素溶液の連続注水で嫌気代謝がおこなわれ、13時間という比較的短時間の間にコハク酸、酢酸、プロピオン酸含量がそれぞれ有意に増加した。

玉井 (1994) は硫化水素の毒性に対する生物側の対応策として、有気呼吸から無機呼吸への変換、体内からの硫化物のすばやい除去、酸化による硫化物の無毒化の3つをあげ、これらが単独またはいくつかを組み合わさり働くとしている。

de Zwaan et al. (1993) は有酸素環境下、高濃度の (約34 ppm : 1 mmol/l) の硫化水素の添加で底生性二枚貝 *Scapharca inaequivalvis* がコハク酸やアラニンなどの嫌気代謝産物を蓄積することを示している。

今回の実験の約10 ppmの硫化水素溶液連続注水という硫化水素が供給され続ける状況では、体

内からの硫化物の除去および有酸素であっても毒性が低いチオ硫酸等への酸化 (Grieshaber et al. 1995) が十分にできず、硫化水素が還元型クロム a₃ の再酸化を遮断し、酸化的リン酸化を阻害 (Boyd and Tucker 1988) したと考えられる。そのため好気代謝ができず、生存に必要なエネルギーを生産するため嫌気代謝し、その代謝産物であるコハク酸などの有機酸が蓄積したと考えられる。

玉井 (1994) はシズクガイ、中村ら (1997c) はヤマトシジミで高水温の方が硫化水素耐性時間は短くなるとしている。これらは、水温上昇に伴う代謝の増加に起因すると考えられる。

実験 1 (Fig. 5-9) の無酸素+H₂S 区では水温以外ほぼ同条件とした 25°C で曝露 21 時間後のコハク酸含量 16.48 μmol/ml, 酢酸含量 0.46 μmol/ml, プロピオン酸含量が 0.66 μmol/ml に対し、30°C では曝露時間が 13 時間、硫化水素濃度がやや低かったにもかかわらず、それぞれ 18.74 μmol/ml, 0.75 μmol/ml, 1.56 μmol/ml と 25°C の含量を上回っており、水温の上昇に伴い代謝が増加し、生存に必要なエネルギーを生産するため嫌気代謝が促進されたことが示唆された。今回曝露時間が短かったためへい死個体はなかったが、玉井 (1994) のシズクガイ、中村ら (1997c) のヤマトシジミの実験例と同様にアサリも水温上昇によって硫化水素耐性時間が短縮されると考えられる。

これらの結果から、夏季の高水温貧酸素時、硫化水素の存在は嫌気代謝を促進しアサリの生存に影響を与える。また、アサリにとって貧酸素ではない環境 (DO 1 mg/l 以上) でも、底質の悪化等でアサリの生息する底質内に硫化物が蓄積されている場合、好気代謝が阻害され、生存に影響がある可能性が示唆された。

現場でアサリ大量へい死時(可能であれば直前)のアサリの生息海域の底層水および底質中の硫化物量や水温、DO の挙動がどのようになっているか継続的に調べられた例はなく、断片的な記録等 (柿野 1982 ; 萩田 1985) がわずかにあるのみである。

今後、室内実験で硫化水素がアサリの生存に与える影響 (たとえば一定時間硫化水素曝露後、通常海水に浸漬した場合など) を詳細に調べる必要がある。しかし、それ以上に夏季に漁場で貧酸素が予想される時期、水温や DO 等の連続観測の他にアサリ漁場の底層水および底質中の硫化物量の連続的なサンプリング、酸化還元電位 (ORP) の測定などを行い、硫化水素がアサリにどのような影響を与えているか調べる必要がある。

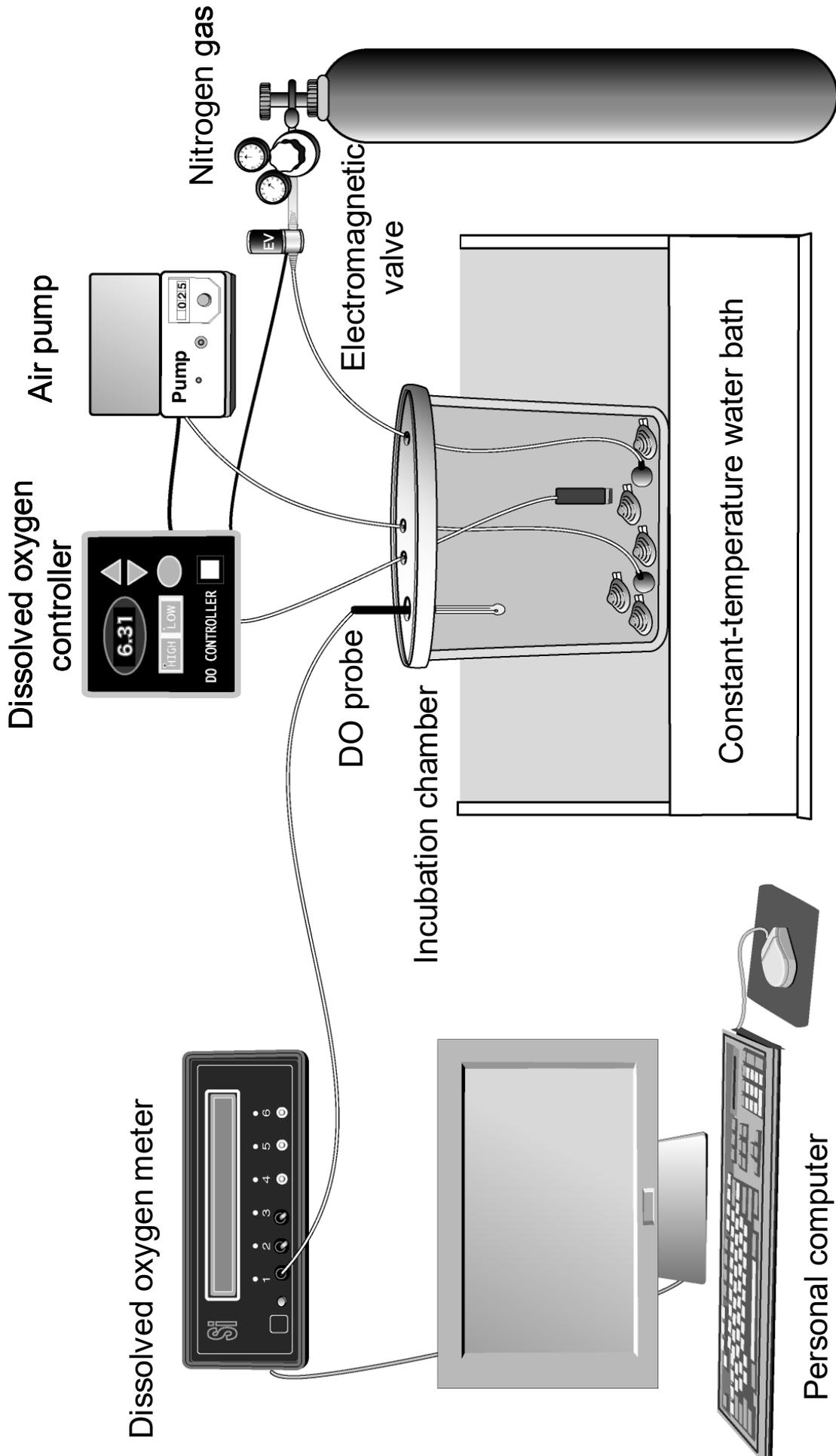


Fig. 5-1. Diagram of the experimental setup used for hypoxic seawater exposure of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*.

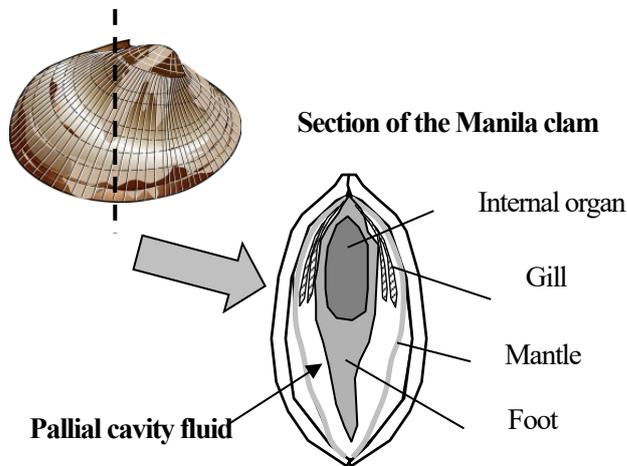
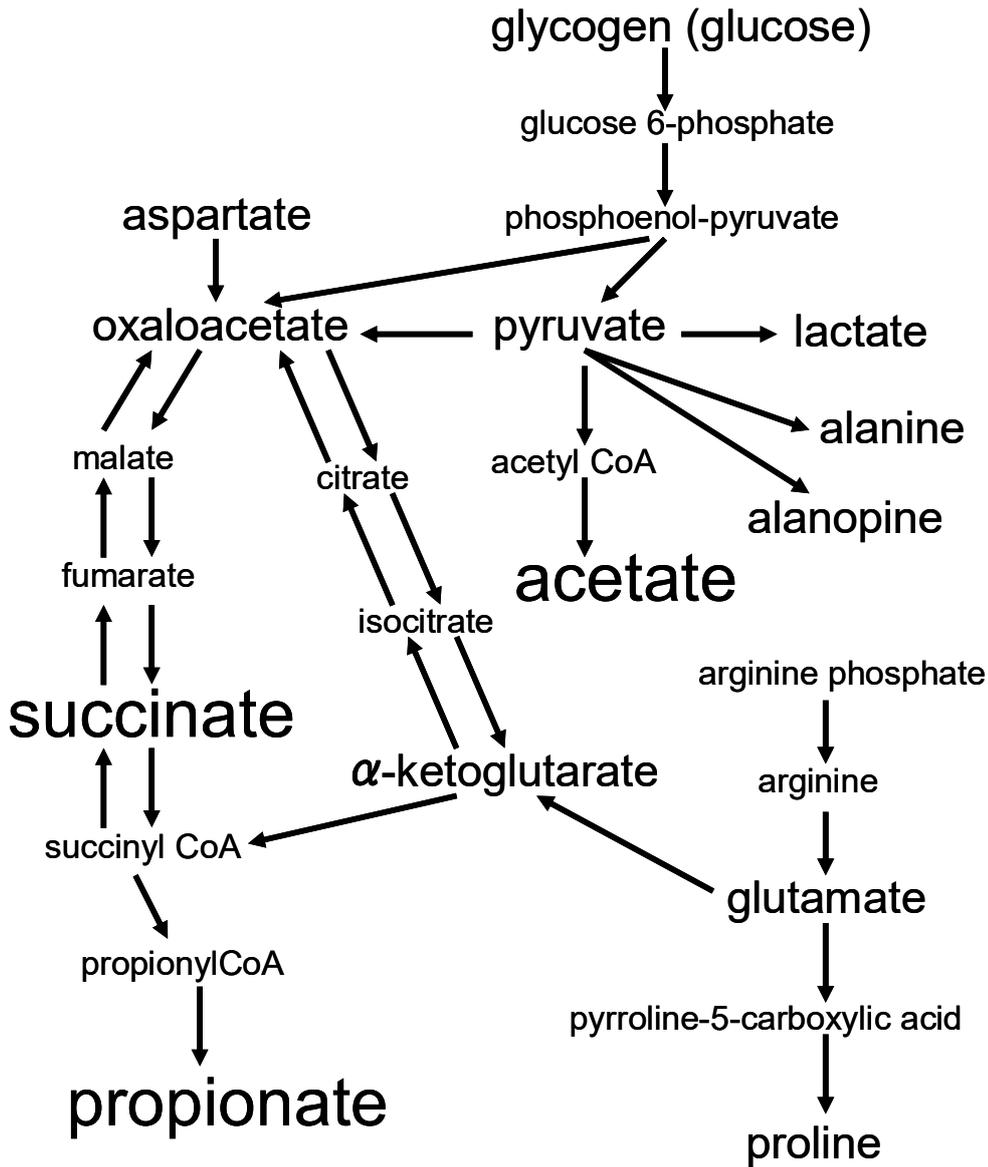


Fig. 5-2. Scheme for anaerobic metabolism and the pallial cavity fluid of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*.

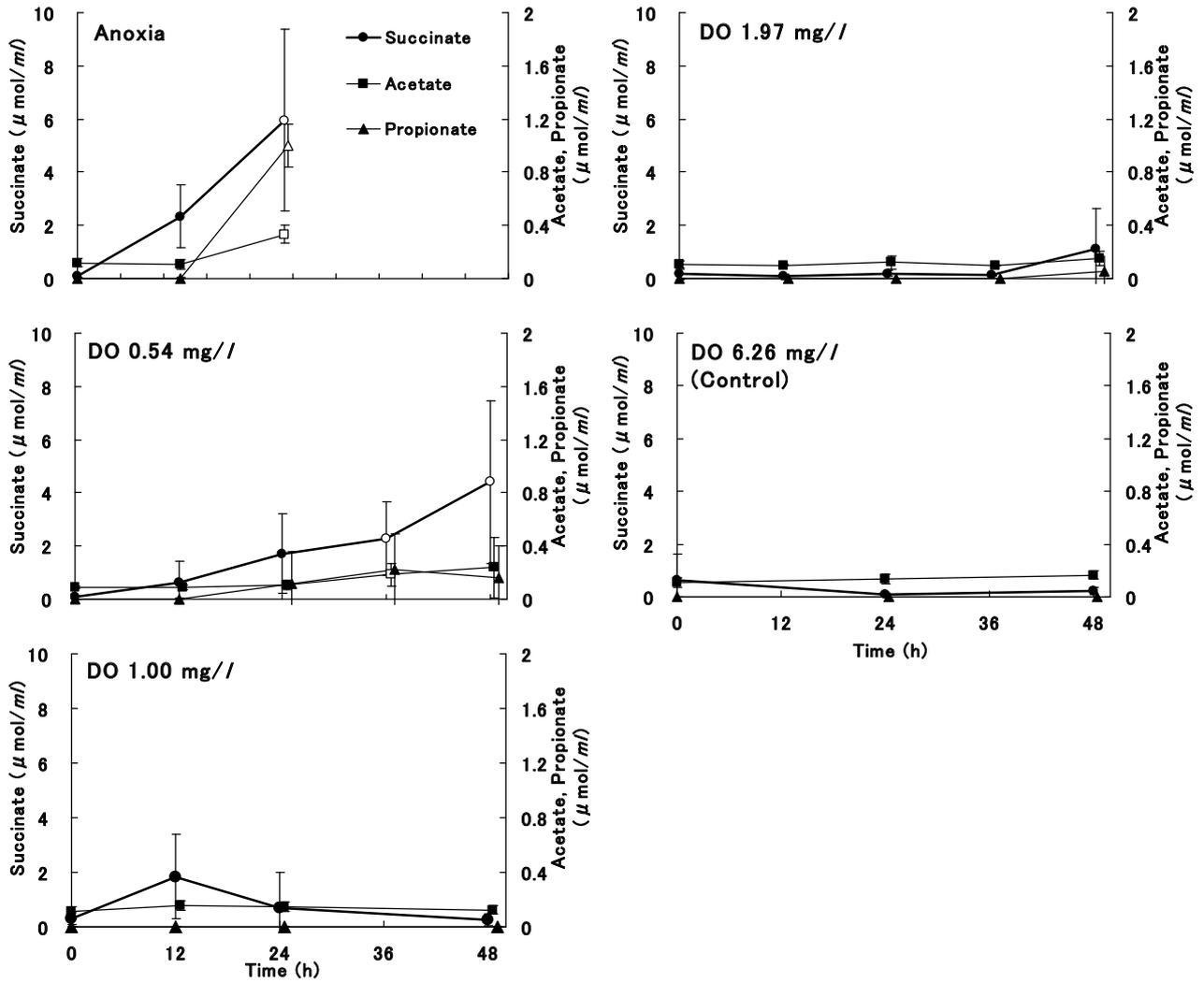


Fig. 5-3. Changes in organic acid concentrations of the pallial cavity fluid of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to hypoxia (anoxia). Data are given as the mean \pm SD ($n = 5$, except the 48 h data for the DO 0.5 mg/l group, where $n = 3$). Open symbols indicate significant difference from the corresponding 0 h value (*Dunnnett* test, $P < 0.05$, except the 48 h data for the DO 0.5 mg/l group, where *Scheffé* test, $P < 0.05$).

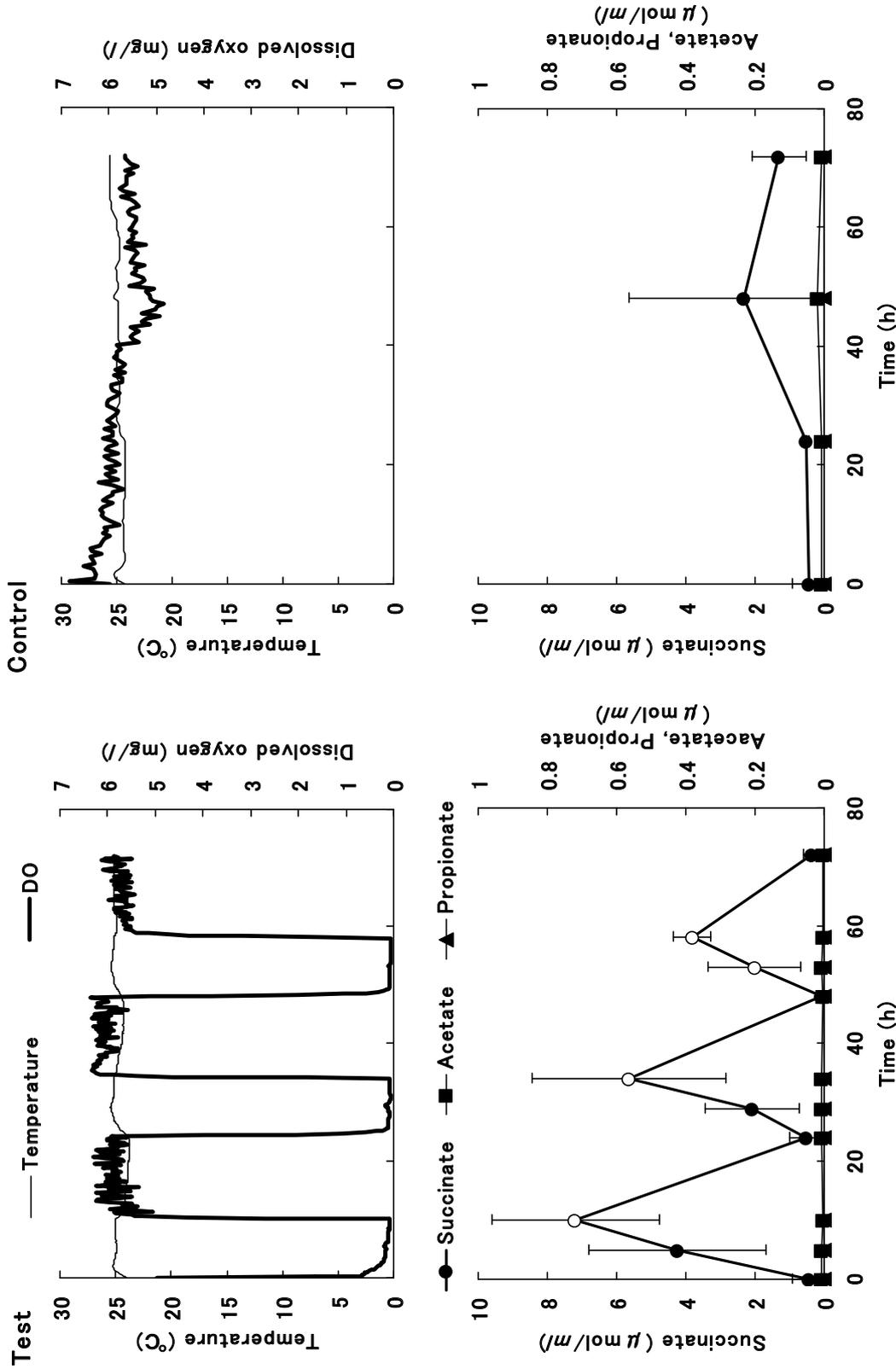


Fig. 5-4. Changes in seawater temperature, dissolved oxygen concentration and organic acid concentrations of the pallial cavity fluid of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to intermittent hypoxia (left : Test) and normoxia (right : Control). Dissolved oxygen concentrations during hypoxia and normoxia periods were below 0.5 mg/l and over 5 mg/l, respectively, at 25°C. Data are given as the mean \pm SD (n = 3, except the 0 h and 72 h data, where n = 5). Open symbols indicate significant difference from both preceding and following normoxic values (Scheffé test, $P < 0.05$).

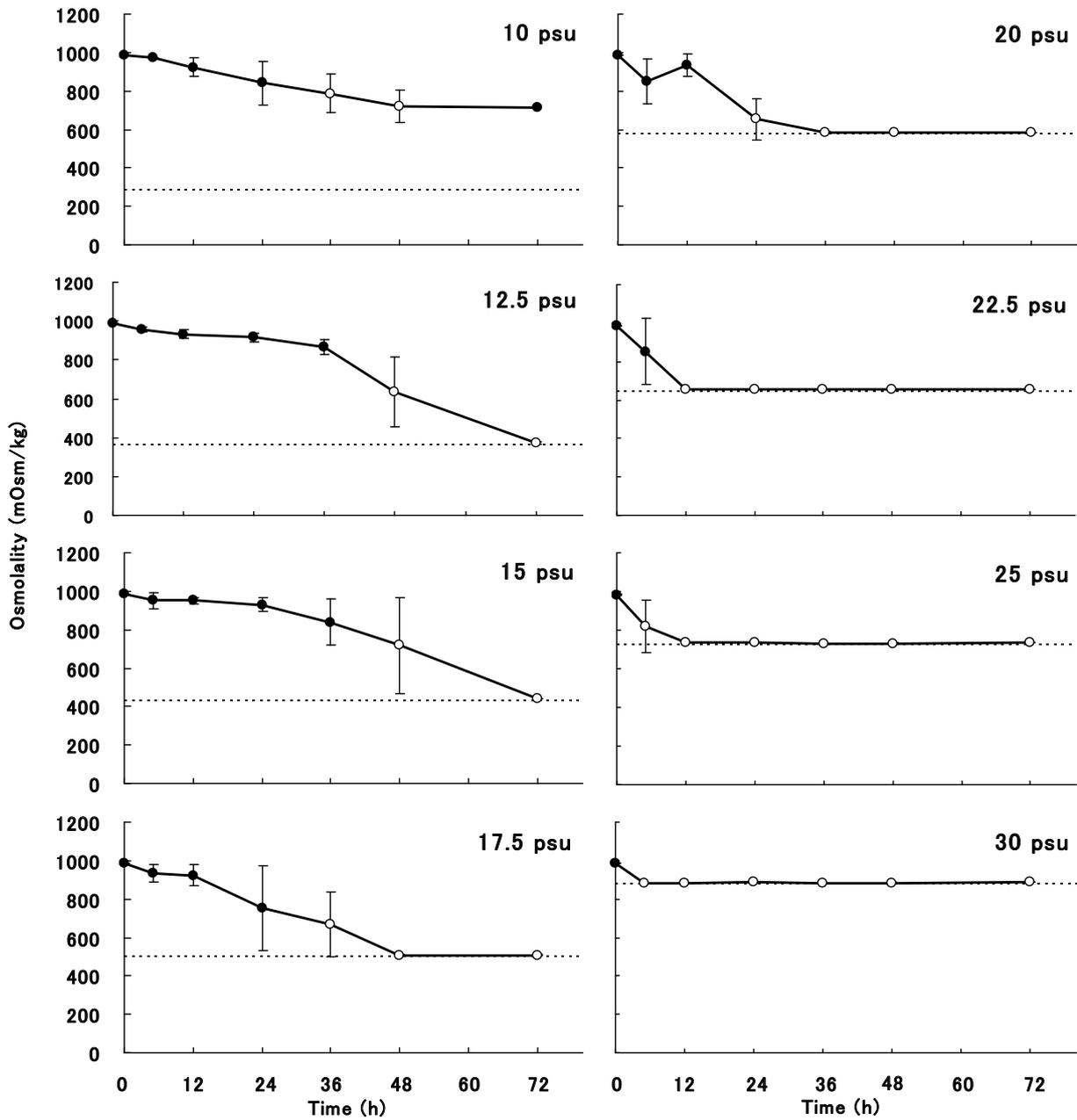


Fig. 5-5. Changes in hemolymph osmolality of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to low-salinity seawater. Data are given as the mean \pm SD ($n = 3$, except the 72 h data for the 10 psu group, where $n = 2$). Open symbols indicate significant difference from the corresponding 0 h value (*Dunnnett* test, $P < 0.05$). No statistical comparison was made for the 72h data of the 10 psu exposure due to the low number of clam. Horizontal broken lines indicate the ambient osmolality.

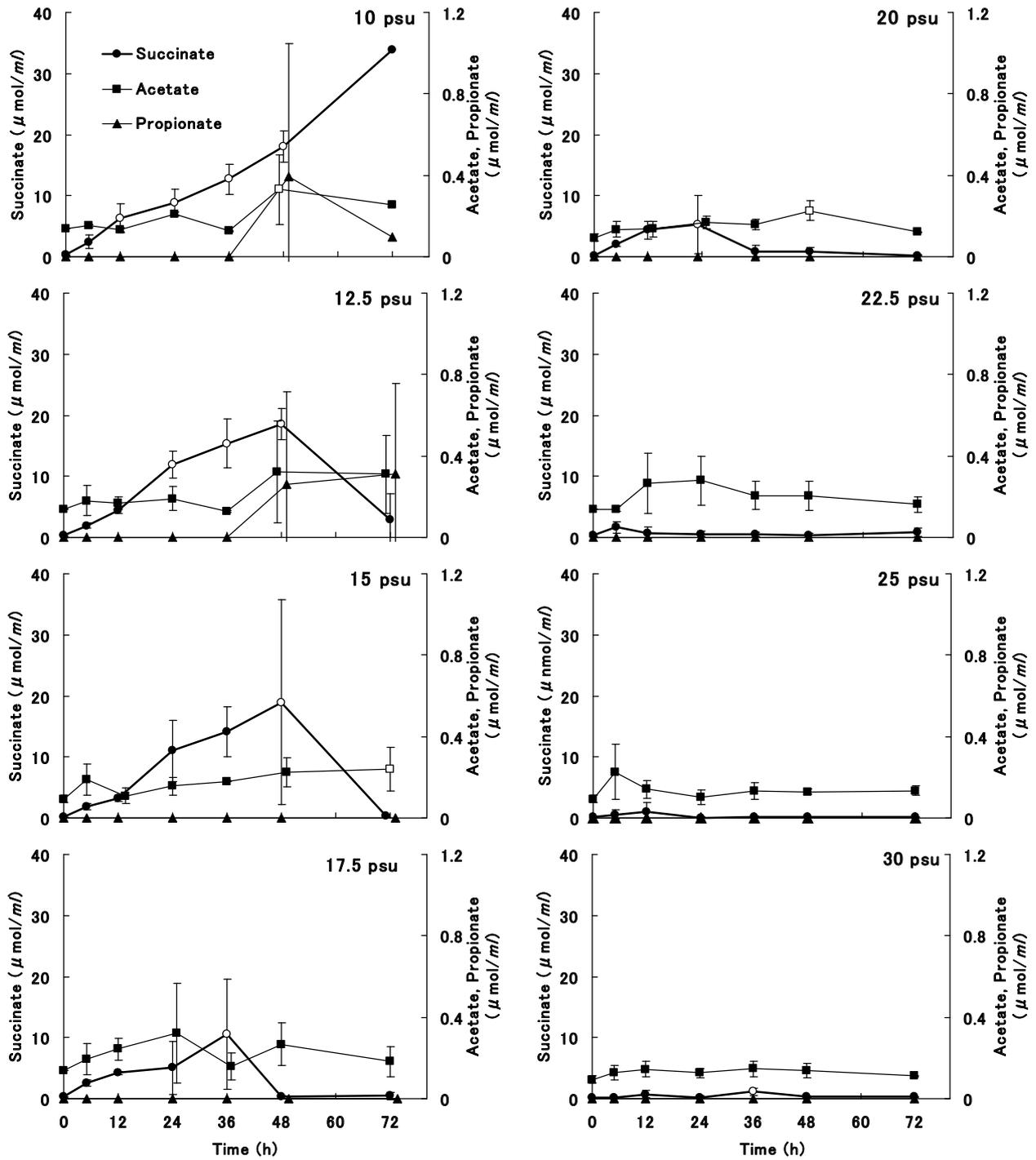


Fig. 5-6. Changes in organic acid concentrations of the pallial cavity fluid of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to low-salinity seawater. Data are given as the mean \pm SD ($n = 3$, except the 72 h data for the 10 psu group, where $n = 2$). Open symbols indicate significant difference from the corresponding 0 h value (Dunnett test, $P < 0.05$). No statistical comparison was made for the 72h data of the 10 psu exposure due to the low number of clam.

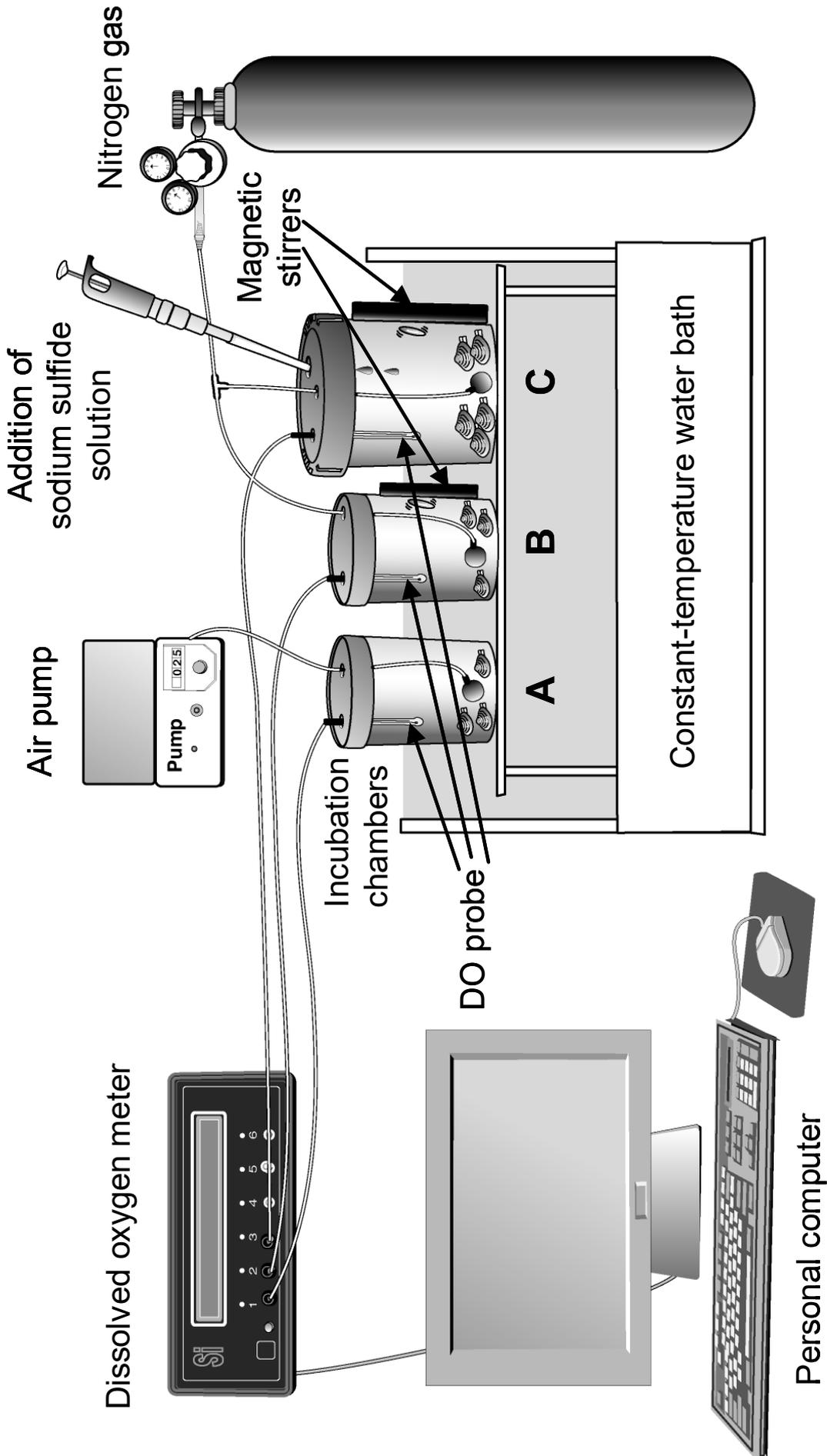


Fig. 5-7. Diagram of the experimental setup used for anoxic seawater added sodium sulfide solution exposure of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. (A) Normoxia; (B) Anoxia; (C) Anoxia + H₂S.

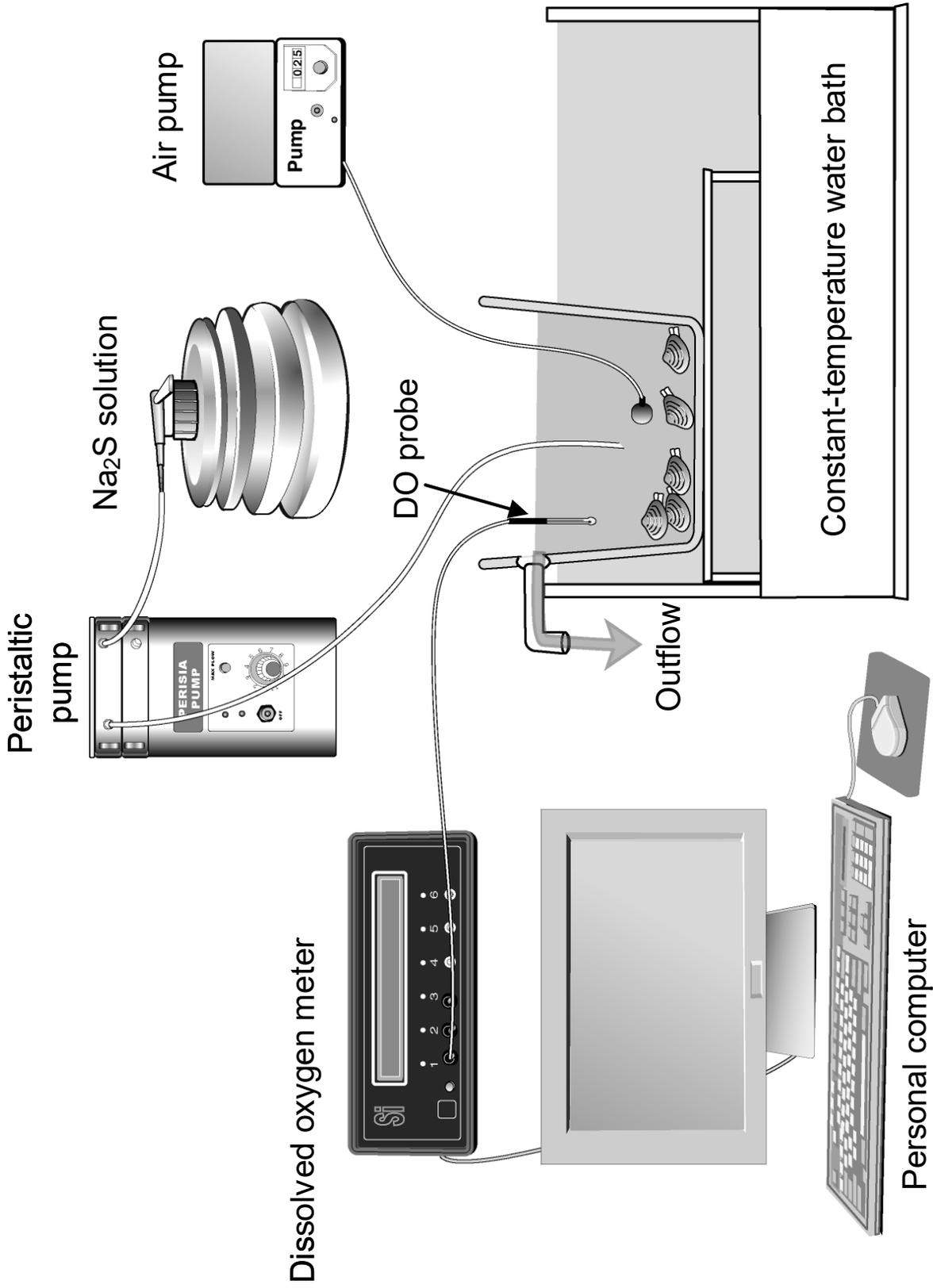


Fig. 5-8. Diagram of the experimental setup used for normoxic seawater added sodium sulfide exposure of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*.

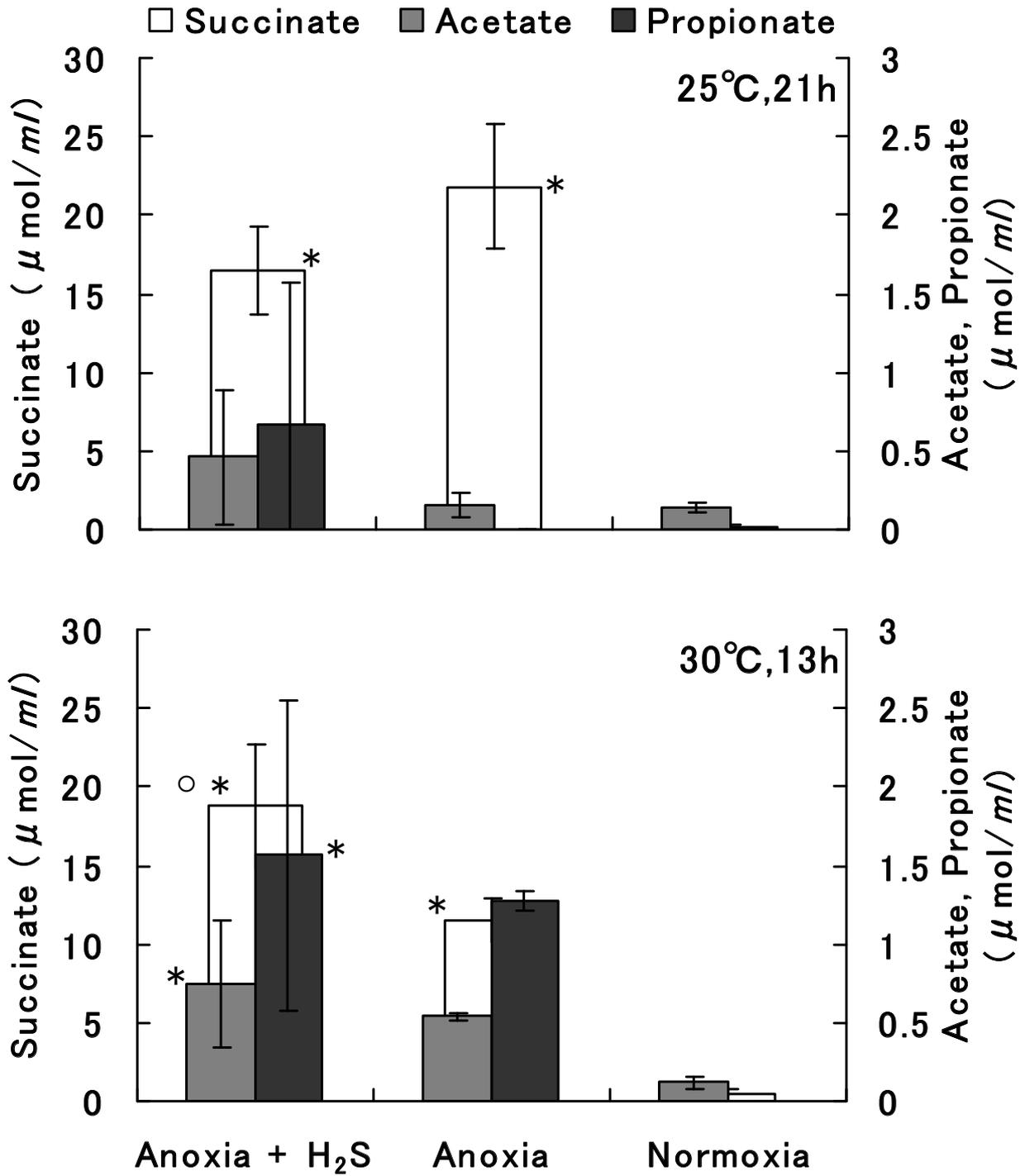


Fig. 5-9. Effect of hydrogen sulphide on organic acid concentrations of the pallial cavity fluid of the *Mania* clam *Ruditapes philippinarum* exposed to anoxia at 25°C (top) and 30°C (bottom). Dissolved oxygen concentrations of anoxia and normoxia were maintained below 0.1 mg/l and over 5 mg/l at both temperatures. Sodium sulfide were dissolved at concentrations of 13.4 and 9.0 mg-S/l in the anoxia + H₂S group at 25 and 30°C, respectively. Data are given as the mean ± SD (n = 3, except the anoxia + H₂S group at 25, 30°C, where n = 5). Asterisks and circle indicate significant difference from the corresponding normoxia and anoxia, respectively (Scheffé test, P < 0.05).

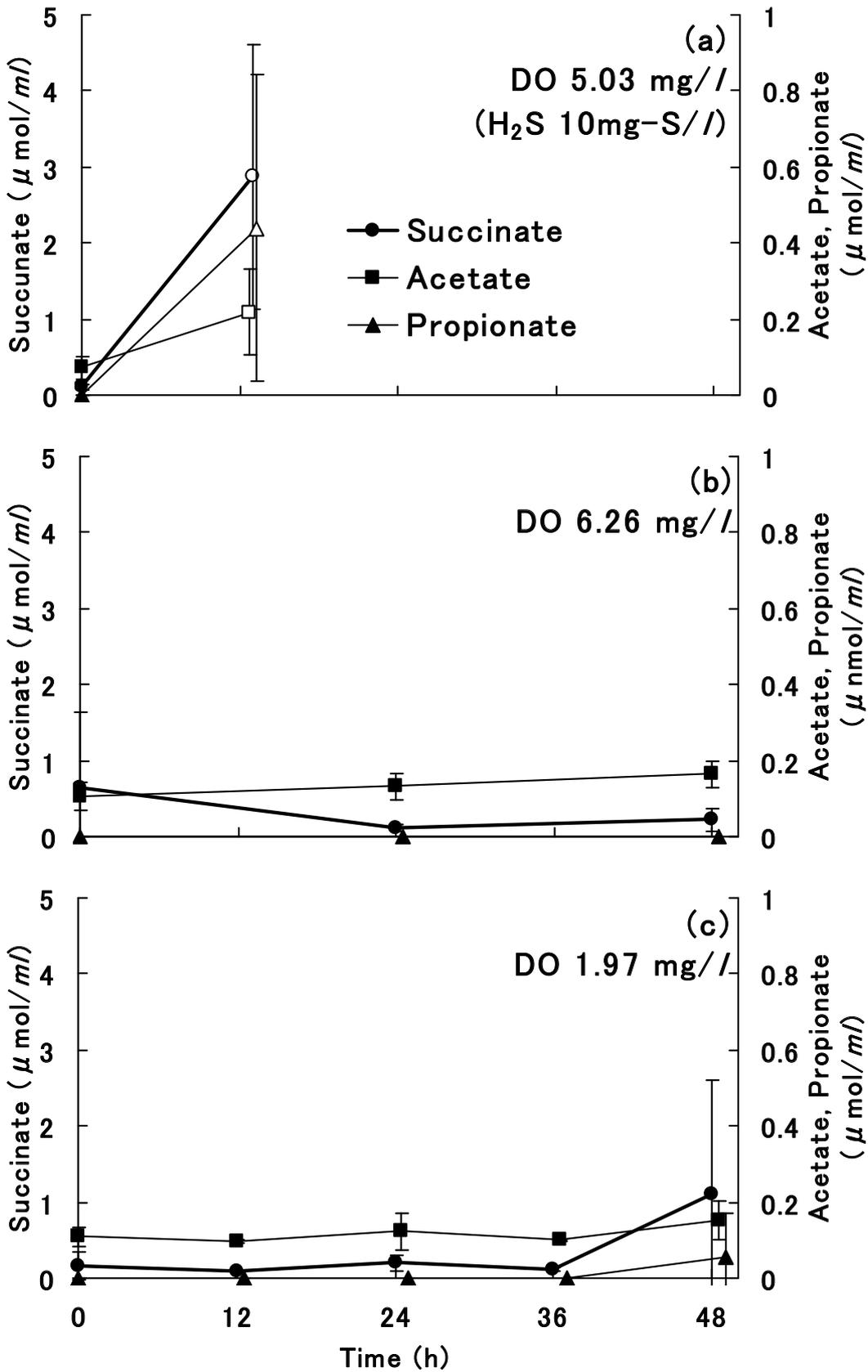


Fig. 5-10. Effect of hydrogen sulphide on organic acid concentrations of the pallial cavity fluid of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (a). (b) and (c) were shown in Fig. 5-3. Sodium sulfide was dissolved at concentration of 10 mg-S/l in the test group a. Data are given as the mean \pm SD (n = 5). Open symbols indicate significant difference from the corresponding 0 h value (Dunnett test, $P < 0.05$).

第6章 漁場環境とアサリの外套腔液有機酸含量および生残との関係

長崎県諫早市小長井町のアサリ養殖漁場では、夏季に大量へい死が発生し、漁業経営を圧迫する要因となっている（山本ら 2005）。へい死の原因として、高水温、貧酸素、赤潮、低塩分等が疑われているが、明らかになっていない。

本章では有明海で被害（山下ら 1989；中原・那須 2002）がある低塩分および東京湾や三河湾等で多くのへい死事例（柿野ら 1984；柿野 1986；鈴木ら 1998a；黒田ら 1998；青山ら 1999；武田・石田 2003；Uzaki et al. 2003）の報告がある夏季の漁場の貧（無）酸素がアサリに与える影響について検討することとした。

二枚貝は貧酸素など環境悪化時に無気呼吸を維持し、代謝を低くして比較的長期間生存する事が知られている（日向野 2005）。その際、嫌気代謝ではグリコーゲンとアミノ酸（アスパラギン酸等）を貯蔵物質として利用し、コハク酸、プロピオン酸など様々な有機酸などを代謝産物として得ながら生命維持に必要なエネルギーを得ている

（Hochachka 1984）。中村（1998）は無酸素下においてヤマトシジミが著しい耐性を示し、この時に最終代謝産物としてプロピオン酸が蓄積することを示した。また、品川ら（2002）はアサリが無酸素下でまず外套腔液中にコハク酸を蓄積し、その後、へい死直前にはプロピオン酸、酢酸が外套腔液中に高濃度で蓄積することを室内実験で示した。

しかし、二枚貝類において嫌気代謝による有機酸等の体内への蓄積の知見は無酸素（de Zwaan et al. 1995；中村 1998；品川ら 2002）、空中露出（de Zwaan 1983；Ali et al. 1999；高橋ら 2000）など室内実験によるもので、低塩分および貧酸素下の漁場において水温や塩分、DO 等の漁場環境を連続観測しながら、外套腔液中の有機酸含量の挙動を調べた事例はない。

夏季へい死原因解明を目的に、諫早市小長井町

のアサリ養殖場において 2003 年夏季に観測された断続的な低塩分および貧酸素時に水温、塩分、溶存酸素濃度を連続計測しながらアサリの外套腔液中の有機酸含量を数時間間隔で連続して調査した。また、2004 年夏季にも養殖漁場で約 2 日間にわたって貧酸素時に 2003 年同様の調査を行った。

1 節 2003 年アサリ養殖漁場低塩分時の外套腔液有機酸含量の変化

材料および方法

長崎県諫早市小長井町のアサリ養殖漁場の調査点 D（Fig. 6-1）の CDL+60 cm の地点の海底から約 5 cm 上に自動記録式多項目水質計 DS4a（Hydrolab 社）を設置し、水温、塩分、DO 等の漁場環境データを 2003 年 7 月 1 日から同年 9 月 25 日まで 1 時間毎に測定した。観測期間中、概ね 2 週間に 1 回の割合でセンサーを引き上げて清掃、キャリブレーションを行った。

調査は長崎県諫早湾海域で梅雨末期の降雨により断続的に低塩分が観測（Fig. 6-2）された 2003 年 7 月 25 日 18 時～翌 26 日 11 時 10 分に同漁場で行った。

調査時には 4.8～6.5 時間の間隔で 4 回、漁場のアサリ（殻長 39.1 ± 3.1 mm、肥満度 18.6 ± 3.0 ）各 3 個体を潜水によりサンプリングし、氷冷して室内に持ち帰り（処理まで 1 時間程度）、殻長・重量等を測定後、第 5 章 1 節と同様に外套腔液を 0.15～0.5 ml 採取し、コハク酸、酢酸、プロピオン酸等の有機酸含量を測定した。

外套腔液中の有機酸含量の変化については、一元配置分散分析（ANOVA）により有意差の確認を行った。

結果

調査時の漁場底層の水温、塩分、DO と有機酸含量の推移を Fig. 6-3 に示す。調査時の漁場底層の環境は平均水温が $27.6 \pm 0.6^\circ\text{C}$ （レンジ $25.4 \sim 28.1^\circ\text{C}$ ）、平均塩分 15.4 ± 3.4 psu（ $8.9 \sim 25.9$ psu）、

平均 DO 8.57 ± 1.35 mg/l (5.13~10.20 mg/l) であった。

調査開始時の2003年7月25日18時に16.5 psu であった塩分は、同日20時に一時的に25.9 psu と高くなったが、その後低下し、翌26日0時に14.7 psu となった後は概ね15 psu 以下の低塩分で調査終了時まで約11時間継続した。この期間の水温、塩分、DO はそれぞれ $27.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (レンジ27.6~27.9°C), 13.7 ± 1.7 psu (8.9~15.2 psu), 9.07 ± 0.64 mg/l (7.92~10.05 mg/l) であった。

調査開始時の7月25日18時の調査漁場のアサリの外套腔液のコハク酸含量は 0.61 ± 0.40 $\mu\text{mol/ml}$ であった。塩分が15 psu 未満となった調査開始から6時間30分後の2回目のサンプリング時には 1.29 ± 0.16 $\mu\text{mol/ml}$ とわずかに増加し、12時間20分後の3回目のサンプリング時には 3.56 ± 3.10 $\mu\text{mol/ml}$ と増加したが、17時間10分後の最終サンプリング時には、 1.04 ± 0.52 $\mu\text{mol/ml}$ と減少した。酢酸は開始時、 0.51 ± 0.04 $\mu\text{mol/ml}$ であったが、その後増加し、2回目、3回目および最終サンプリング時にはそれぞれ 0.64 ± 0.18 $\mu\text{mol/ml}$, 0.90 ± 0.15 $\mu\text{mol/ml}$, 1.10 ± 0.57 $\mu\text{mol/ml}$ となった。プロピオン酸含量は開始時 0.01 $\mu\text{mol/ml}$ から最終サンプリング時 0.02 ± 0.02 $\mu\text{mol/ml}$ とほとんど変化しなかった。各有機酸の変化は統計的に有意な差ではなかった。

なお、調査前後にアサリ養殖漁場では目立ったへい死などの異変は観察されなかった。

考 察

本調査時のアサリ養殖漁場の環境は平均水温 27.7°C 、平均 DO 9.07 mg/l と水温、DO はアサリにとって生存に影響を与えるような環境ではなかったと考えられるが、平均塩分13.7 psu の環境が約11時間継続した。アサリ外套腔液中の有機酸含量は調査開始時コハク酸含量は平均 0.61 $\mu\text{mol/ml}$ から12時間20分後の3回目のサンプリング時に 3.56 $\mu\text{mol/ml}$ と増加、酢酸も開始時 0.51 $\mu\text{mol/ml}$ から最終サンプリング時 1.10 $\mu\text{mol/ml}$ と増加した

が、それぞれ有意な変化ではなく、プロピオン酸については開始時からほとんど変化しなかった。

アサリの低塩分に対する生理的影響について、松田ら(2008)は20 psu 以下では継続的な閉殻を行い、15 psu 以下では閉殻が2~3日間継続し、閉殻期間中コハク酸含量等が増加し、12.5 psu 未満では2~3日間の曝露でへい死が始まるとしている。この野外調査での漁場環境では松田ら(2008)や第5章3節の実験の 25°C より若干高い水温で、平均塩分13.7 psu と長時間の閉殻を余儀なくされる塩分が約11時間継続したが、その程度の曝露では第5章3節の12.5~15 psu の条件下での有機酸含量の変化 (Fig. 5-6) と同様に、コハク酸含量等が開始時と比べて有意に増加せず、またアサリがへい死することはなかった。

漁場観測の結果(第2章1節)から小長井のアサリ養殖漁場では、少なくとも数日生存可能と考えられる15 psu を下回る塩分が数日間にわたって観測されることがないことから、松田ら(2008)も述べているように低塩分でアサリがへい死する可能性は低いと考える。

2 節 2003-2004 年アサリ養殖漁場貧酸素時の外套腔液有機酸含量の変化と生残

材料および方法

漁場観測

長期間の漁場観測は長崎県諫早市小長井町のアサリ養殖漁場の調査点 A (Fig. 6-1) の CDL+60 cm の地点(以下長期間観測地点)の海底から約5 cm 上に自動記録式多項目水質計 DS4a (Hydrolab 社)を設置し、水温、塩分、DO 等の漁場環境データを2003年は6月6日から同年11月27日まで、2004年は3月5日から同年12月31日まで30分毎に測定した。得られた観測データは太陽電池と携帯電話回線を利用した DOPA 送信ユニットで遠隔地でもインターネット回線により受信し、リアルタイムでモニターできるようにした。また、2004年は *Chattonella* 赤潮が発生し、アサリ養殖漁場で貧酸

素化が予測された小潮から中潮にかけて、後述するサンプリング期間前後の8月10日14時00分～8月13日8時30分に上記の長期観測地点から距離にして70m程度南西側のCDL+120cmの地点（以下短期観測地点）に上記の多項目水質計を同様に設置し、漁場観測を10分毎に行った。

さらに2004年は8月2日17時20分から同年8月26日17時10分まで10分毎に、小型メモリークロロフィル濁度計 COMPACT-CLW（アレック電子社）によってクロロフィル量を測定し、*Chattonella* spp.（以下 *Chattonella*）の細胞密度の推移を推定した。

なお、長期観測地点の多項目水質計は観測期間中、1～2週間に1回の割合でセンサーを引き上げて清掃、キャリブレーションを行うとともに、現場海水の採水および海洋観測により各データのクロスチェックを行い補正した。

サンプリング

2003年のサンプリングは調査海域で *Ceratium furca* - *Heterosigma akashiwo* 赤潮が発生し、調査漁場で貧酸素が断続的に観察されるようになった2003年8月22日16時30分～翌23日10時5分と同漁場の長期観測地点周辺で行った。

調査開始時も含め4.3～7.8時間の間隔で4回、うち3回は潜水により、また夜間のサンプリング時（23日0時20分）のみ長柄ジョレンにより、漁場のアサリ（殻長 34.0 ± 5.6 mm、重量 8.2 ± 4.2 g）を各サンプリング時に5個体（調査開始時の8月22日16時30分のサンプルのみ3個体）採取し、前節同様に殻長・重量等を測定後に外套腔液を0.15～0.5 ml採取し、コハク酸、酢酸、プロピオン酸等の有機酸含量を測定した。

2004年は調査漁場において潜水で採取したアサリ（殻長 32.1 ± 1.2 mm、重量 6.4 ± 1.1 g）39個体を目合い約5mmのナイロン製ネットに収容して短期観測地点底層に設置し、2004年8月10日16時50分～8月12日14時30分に8.3～13.8時間の間隔で調査開始時も含め5回のサンプリングを

行った。サンプルは各サンプリング時5個体ずつを2003年と同様の方法で処理し、有機酸含量を測定した。

へい死率

2004年は各サンプリング時にネット内のアサリの生残状況を観察し、へい死個体はその都度取り除いた。生死の判定は第3章と同様に行った。へい死率は、その時点でのへい死個体の総数を開始時個体数からそれ以前にサンプリングで取り上げた個体数を減じた値で除し、100倍して求めた。

へい死率 (%) = その時点でのへい死個体総数 ÷ (開始時個体数 - それ以前にサンプリングで取り上げた個体数) × 100。

組織学的観察

2004年は *Chattonella* がアサリ各種組織におよぼす影響を明らかにするため、調査海域で *Chattonella* 赤潮が発生し、海面の着色が顕著であった2004年8月8日8時およびその後アサリ養殖漁場が貧酸素化した2004年8月11日16時に同漁場で採集したアサリそれぞれ6および8個体について、メスで閉殻筋を切断、開殻し、軟体部を10%海水ホルマリンで固定した。固定したアサリはその後、鰓、外套膜、消化盲囊、斧足および生殖腺について常法に従いパラフィン包埋し、4 μmパラフィン切片を作成の上、ヘマトキシリン-エオシンの2重染色を施し、組織学的観察に供した。

貧酸素の定義

底生性二枚貝の *Scapharca inaequivalvis* (de Zwaan et al. 1991) やヤマトシジミ (中村 1998) を用いた室内実験でDOを変化させた際、嫌気代謝 (Hochachka 1984) となり、体内にコハク酸等蓄積したDOの値と、第5章1節で外套腔液中に継続してコハク酸を蓄積したDOの値からアサリにとって「貧酸素」とはDO 1.0 mg/l未満の環境とした。

統計処理

統計処理は、一元配置分散分析 (ANOVA) により有意差の確認を行い、多重比較検定はダネット方法 (Dunnnett test) により $P < 0.05$ で有意差の検定を行った。

結果

2003年

2003年調査期間前後の長期観測地点底層の水温、塩分、DOと調査地点近辺の気象庁大浦検潮所で観測された実測潮位から求めた潮位 (CDL) の推移を Fig. 6-4 に、調査時の水温、塩分、DOと有機酸含量の推移を Fig. 6-5 に示す。調査時の漁場底層の環境は平均水温が $25.4 \pm 1.2^\circ\text{C}$ (レンジ $24.4 \sim 28.1^\circ\text{C}$)、平均塩分 $30.2 \pm 1.4 \text{ psu}$ ($26.8 \sim 31.3 \text{ psu}$)、平均 DO $1.55 \pm 1.94 \text{ mg/l}$ ($0.38 \sim 7.82 \text{ mg/l}$) であった。

調査開始時の2003年8月22日16時30分に6.09 mg/l あった DO は、同日17時30分頃から低下し始め、夕方から夜間、朝方にかけての8月22日の18時30分頃と19時30分頃に貧酸素、水温 $25.4 \sim 25.5^\circ\text{C}$ で DO 0.65 および 0.55 mg/l がそれぞれ30分以内、8月22日22時30分頃～8月23日の9時30分頃までの約11時間 DO 0.83 mg/l 以下の貧酸素、平均水温 $24.7 \pm 0.4^\circ\text{C}$ 、平均 DO $0.57 \pm 0.12 \text{ mg/l}$ ($0.38 \sim 0.83 \text{ mg/l}$) が観測された。

調査開始時の8月22日16時30分の調査漁場のアサリの外套腔液のコハク酸含量 $1.11 \pm 0.61 \mu\text{mol/ml}$ であったが、DO 0.5 mg/l 未満の貧酸素となった7時間50分後の2回目のサンプリング時には $2.57 \pm 0.99 \mu\text{mol/ml}$ とわずかに増加し、開始から13時間15分後の3回目および17時間35分後の最終4回目のサンプリング時にはそれぞれ $7.45 \pm 2.71 \mu\text{mol/ml}$ 、 $8.98 \pm 2.34 \mu\text{mol/ml}$ となり、開始時と比較して有意に増加した。酢酸、プロピオン酸含量も開始時のそれぞれ $0.26 \pm 0.03 \mu\text{mol/ml}$ 、 $0.02 \pm 0.01 \mu\text{mol/ml}$ から最終4回目のサンプリング時にはそれぞれ $0.66 \pm 0.23 \mu\text{mol/ml}$ 、 $0.19 \pm 0.32 \mu\text{mol/ml}$ とわずかに増加したが、統計的に有意な差ではなかった。

なお、調査時には *Ceratium furca*、*Heterosigma akashiwo* の赤潮 (細胞密度の推移不明) が漁場で発生していたが、調査前後にアサリ養殖漁場では目立ったへい死などの異変は観察されなかった。

2004年

2003年と同様に調査期間前後の長期観測地点底層の水温、塩分、DOと潮位 (CDL) および *Chattonella* 細胞密度の推移を Fig. 6-6 に、調査時の短期観測地点底層の水温、塩分、DOとアサリのへい死率および外套腔液有機酸含量の推移を Fig. 6-7 に示す。

Chattonella 細胞密度が $1.00 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ を超え、赤潮状態となったと考えられる8月5日16時30分から調査直前8月10日16時40分までの *Chattonella* の平均細胞密度は $1.22 \times 10^3 \pm 1.65 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ ($0.05 \sim 10.47 \times 10^3 \text{ cells/ml}$) であったが、調査期間中 (8月10日16時50分～8月12日14時30分) の平均細胞密度は $0.53 \times 10^3 \pm 0.39 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ ($0.14 \sim 2.74 \times 10^3 \text{ cells/ml}$) と減少していた。

2004年8月10日16時50分から8月12日14時30分までの調査時の底層の環境は平均水温が $31.2 \pm 0.9^\circ\text{C}$ ($30.0 \sim 34.1^\circ\text{C}$)、平均塩分 $29.4 \pm 0.1 \text{ psu}$ ($29.1 \sim 29.6 \text{ psu}$)、平均 DO $2.09 \pm 2.23 \text{ mg/l}$ ($0.03 \sim 8.79 \text{ mg/l}$) であった。

調査開始時の2004年8月10日16時50分から翌8月12日0時30分までの31時間40分間は2時間程度継続した貧酸素が2回、40分程度継続した貧酸素が1回など、断続的に貧酸素が観測されたが概ね有酸素の環境であった。

しかし、8月12日0時40分からの同日最終サンプリング時14時30分までの期間は同日13時50分から20分間程度、DO $1.72 \sim 2.98 \text{ mg/l}$ の有酸素が観測されたものの、平均水温 $31.3 \pm 1.4^\circ\text{C}$ ($30.0 \sim 34.1^\circ\text{C}$)、平均塩分 $29.4 \pm 0.1 \text{ psu}$ ($29.3 \sim 29.6 \text{ psu}$)、平均 DO $0.08 \pm 0.13 \text{ mg/l}$ ($0.03 \sim 0.70 \text{ mg/l}$) と貧酸素が13時間50分継続した (平均 DO とレンジは上記8月12日13時50分～14時10分の20分間の DO $1.72 \sim 2.98 \text{ mg/l}$ のデータを除いた値)。

調査開始時の8月10日16時50分の調査漁場の

アサリの外套腔液のコハク酸含量は $1.76 \pm 0.85 \mu\text{mol/ml}$ であったが、有酸素の環境であった 2 回目と 3 回目のサンプリング (8 月 11 日 6 時 40 分と同 17 時 20 分) のコハク酸含量は $0.62 \pm 0.36 \mu\text{mol/ml}$, $1.21 \pm 0.43 \mu\text{mol/ml}$ と開始時から統計的に有意な変化はなかった。しかし、貧酸素化して 5 時間 30 分後の 4 回目のサンプリング時 (8 月 12 日 6 時 10 分) と 13 時間 50 分後の最終サンプリング時 (8 月 12 日 14 時 30 分) には $15.72 \pm 1.73 \mu\text{mol/ml}$, $10.21 \pm 5.41 \mu\text{mol/ml}$ となり開始時と比べ有意に増加した。

酢酸の含量は開始時 $0.14 \pm 0.02 \mu\text{mol/ml}$ で、その後各サンプリング時 $0.17 \pm 0.08 \mu\text{mol/ml}$, $0.19 \pm 0.09 \mu\text{mol/ml}$, $1.08 \pm 0.62 \mu\text{mol/ml}$ となったが有意な変化ではなく、最終サンプリング時に $1.55 \pm 1.27 \mu\text{mol/ml}$ と開始時と比較して有意に増加した。

プロピオン酸の含量は開始時の試料から検出されなかった。その後も有酸素の環境であった 3 回目のサンプリング時までほぼ $0 \mu\text{mol/ml}$ であったが、無酸素化した 4 回目サンプリング時に $2.09 \pm 1.15 \mu\text{mol/ml}$ と急増し、最終サンプリング時に $2.34 \pm 0.91 \mu\text{mol/ml}$ と開始時と比較して有意に増加した。

組織学的観察の結果、観察したすべての標本の鰓、外套膜および生殖腺の結合組織にはパーキンサス属の原虫が観察されたが、寄生強度はいずれも低かった。

また、8 月 8 日および 8 月 11 日のそれぞれ 1 個体の生殖腺に 1 種のセルカリアの寄生が、8 月 8 日の 1 個体の斧足に条虫幼虫の寄生がみられた。両日の数個体の鰓において粘液の分泌および上皮細胞の部分的壊死が、消化盲嚢においては上皮細胞の部分的壊死が観察されたが、いずれも比較的軽微であった。

へい死率は、貧酸素化しはじめた 8 月 11 日 6 時 40 分まで 0% とへい死はみられなかったが、同 17 時 20 分に 2.9% とわずかにへい死し、その後 8 月 12 日 6 時 10 分に 13.8% と増加し、最終サンプリング時には 70.8% と全滅に近い状況となった。

また、調査地点 A 付近の漁場では 8 月 12 日から 13 日にかけてアサリが全滅した (長崎県調査 未発表)。

考 察

2003 年の調査の結果から **Figs. 6-4, 6-5** で示したように 2003 年 8 月下旬の漁場底層の断続的な貧酸素が、鈴木ら (1998b) の三河湾での調査事例と同様に低水温・高塩分の比重の大きい貧酸素水塊の潮汐などによる移動と滞留により引き起こされていることが示唆された。このように貧酸素に曝露されたアサリ外套腔液中のコハク酸含量は **Fig. 6-5** に示したように調査開始時平均 $1.11 \mu\text{mol/ml}$ から 13 時間 15 分後の 3 回目および 17 時間 35 分後の最終 4 回目のサンプリング時にそれぞれ $7.45 \mu\text{mol/ml}$, $8.98 \mu\text{mol/ml}$ と有意に増加しており、水温 25°C , $\text{DO} 0.6 \text{ mg/l}$ 前後の貧酸素下では、アサリは通常の好気代謝では生命活動を維持するエネルギーを生産することができず、グリコーゲンやアミノ酸を利用した嫌気代謝によってエネルギーを得ていることが、コハク酸含量の増加によって証拠づけられ、このような貧酸素はアサリの生存に影響を与える環境条件であると示唆された。倉茂 (1942b) は平均水温 22.5°C ($17.2 \sim 24.3^\circ\text{C}$) と 23.0°C ($21.4 \sim 25.7^\circ\text{C}$) で 2 回の実験を行い、 $\text{DO} 0.5 \text{ ml/l}$ (0.7 mg/l) 以下となるとアサリは 3 日間は生存できるが、4 日後からへい死個体が現れ、9 日後経過するとほぼ全滅 (へい死率 96% と 98%) するとしており、今回の調査結果とよく一致する。

de Zwaan (1983) は固着性二枚貝 *Mytilus edulis* が干出した際、当初は嫌気代謝によってコハク酸を生産するが、干出が継続すると最終代謝産物のプロピオン酸を生産することを示し、干出状態から海中に戻ると、速やかに体内に蓄積したコハク酸含量等が減少するとしている。

また、第 5 章 2 節 (**Fig. 5-4**) では 10 時間の貧酸素曝露時にはコハク酸含量は有意に増加するが、14 時間の有酸素でコハク酸は貧酸素曝露前の含量まで速やかに減少することを示した。

2003年調査でのアサリ外套腔液中のコハク酸含量は調査開始時 $1.11 \mu\text{mol/ml}$ が、最終サンプリング時 $8.98 \mu\text{mol/ml}$ と開始時と比較して有意に増加したが、アサリが嫌気代謝時にへい死する外套腔液コハク酸含量の目安 $18.00 \mu\text{mol/ml}$ 以上(品川未発表)の値になることはなかった。また、酢酸やプロピオン酸含量は有意な変化を示しておらず、その後も嫌気代謝を継続し、生存できる状況にあったのではないかと考えられる。最終サンプリング直後にはDOは回復したことから、第5章2節(Fig. 5-4)同様、蓄積されたコハク酸も貧酸素曝露前の含量まで減少したと推測される。

一方、2004年の調査の結果はFig. 6-7で示したように大量へい死直前の8月11日から観測されていた貧酸素が、調査期間中約14時間継続した。2004年の貧酸素は2003年の水温 25°C 前後の貧酸素水塊(Figs. 6-4, 6-5)と違い、平均水温が 31.3°C と高かった。このような高水温、貧酸素の環境に曝露されたアサリ外套腔液中のコハク酸含量はFig. 6-7に示したとおり調査開始時平均 $1.76 \mu\text{mol/ml}$ であったが、4回目のサンプリング時(貧酸素後5時間30分)以降急増($15.72 \mu\text{mol/ml}$)し、最終サンプリング時(貧酸素後13時間50分)に $10.21 \mu\text{mol/ml}$ となり開始時と比べ有意に増加した。

酢酸含量も同様に開始時 $0.14 \mu\text{mol/ml}$ が、4回目のサンプリング以降急増し、最終サンプリング時に $1.55 \mu\text{mol/ml}$ と開始時と比較して有意に増加した。

プロピオン酸含量は開始時 $0 \mu\text{mol/ml}$ がコハク酸、酢酸同様、4回目のサンプリング時以降急増($2.09 \mu\text{mol/ml}$)し、最終サンプリング時 $2.34 \mu\text{mol/ml}$ となり開始時と比べ有意に増加した。

2004年は4回目のサンプリング時以降に3種の有機酸がすべて急増し、へい死が発生しなかった2003年の最終サンプリング時と比較して3種の有機酸すべてで高い値となった。

これらの有機酸含量は前述の品川(未発表)のへい死の目安値と比較すると4回目のサンプリング時のコハク酸含量 $15.72 \mu\text{mol/ml}$ は目安値(18.00

$\mu\text{mol/ml}$)以下、最終サンプリング時の酢酸含量 $1.55 \mu\text{mol/ml}$ は目安値($1.20 \mu\text{mol/ml}$)以上、4回目および最終サンプリング時のプロピオン酸含量 $2.09 \mu\text{mol/ml}$ と $2.34 \mu\text{mol/ml}$ は目安値($2.00 \mu\text{mol/ml}$)以上となった。

この状況は前述のde Zwaan(1983)が示した干出が長期間継続した事例と同様に嫌気代謝が長期間継続し、プロピオン酸等を生産・蓄積せざるを得ない状況であったと考えられる。

嫌気代謝の継続でアサリがどのような過程を経てへい死にいたるかは現在未解明であるが、嫌気代謝の最終代謝産物のプロピオン酸が4回目のサンプリング時(へい死率13.8%)にへい死の目安値の $2.00 \mu\text{mol/ml}$ を上回っており、この時点でアサリは嫌気代謝による生存の限界点を超えていたのではないかと考えられる。

Chattonella 赤潮とアサリの死亡の関連に関しては、*Chattonella marina* を用いた室内曝露実験によるアサリのへい死事例が報告(Kim et al. 2004)されているが、実験の設定細胞密度が $25.0 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ と、調査海域で海面着色が顕著であった調査期間前の平均細胞密度 $1.22 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ や調査期間中の平均細胞密度 $0.53 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ (Fig. 6-6)と比較して高密度であった。調査期間前の8月8日および調査期間中の8月11日に漁場で採取したアサリの各臓器の結合組織および生殖腺における寄生虫感染ならびに鰓および消化盲囊の上皮細胞に組織学的な損傷がみられたが、いずれも軽微で致死的な障害である可能性は低いと考えられたこと、調査期間中に貧酸素となる前の3回目のサンプリングまではアサリ外套腔液中の各有機酸は嫌気代謝による有意な変化がなく、*Chattonella* の曝露で閉殻による忌避行動などがとられなかったことから、*Chattonella* 赤潮がへい死要因である可能性は低いと考える。

2003, 2004年の2ヵ年の調査結果から、アサリ夏季の大量へい死原因を推測すると、貧酸素時、2003年は水温 25°C 前後と夏季にしては低めであったのに対し、2004年は水温 31°C 以上と高かった。

中村ら (1997b) はアサリは水温 30°C の飼育で 30 日間死亡する個体が全くなかったが、32°C では 6 日目にへい死する個体が現れ、LT₅₀ は 8 日目、LT₁₀₀ は 18 日目、34°C では LT₁₀₀ は 3 日目であるとしている。

2004 年の調査時の底層の環境は水温 30.0～34.1°C とアサリが生存に影響を受けるとされる水温であった。水温 34°C であっても 1 日程度は生存する (中村ら 1997b) ため、半日程度の高水温のみで大量へい死しないが、生存に影響を与える水温であり、2004 年の大量へい死は平均 31°C を超える高水温が一つの要因と考えられる。

次に、2003 年の貧酸素の継続時間は約 11 時間 (平均 DO 0.57 mg/l) であったのに対し、大量へい死が発生した 2004 年の調査中の貧酸素継続時間は約 14 時間 (平均 DO 0.08 mg/l) とやや長かった。しかし、水温 28°C で行った第 4 章 2 節の実験 (Fig. 4-6) では無酸素でへい死個体が現れるのに 24 時間、半数以上へい死するのに 36 時間以上を要しており、この程度の貧酸素継続時間だけで大量へい死するとは考えられない。

ただ、2004 年の調査結果から嫌気代謝の長期間の継続で生成される外套腔液中のプロピオン酸含量 (de Zwaan 1983) や無酸素曝露時にへい死直前に増加するとされる酢酸含量 (品川ら 2002) は有意に増加しており、アサリが嫌気代謝を生存の限界までを継続せざるを得ないような状況に追い込まれていたのではないかと考える。

品川 (未発表) の実験によると無酸素下でアサリの水温 25°C の半数致死時間 (LT₅₀) は 90 時間、水温 30°C では 43 時間と、水温 30°C では 25°C の半分以下の時間で半数がへい死しており、第 4 章 1 節 (Fig. 4-4) と同様、高水温がアサリの代謝を増大させ、生存に大きな影響を与える。

つまり、2004 年のアサリ大量へい死要因は、水温 31°C 以上の高水温と約 14 時間継続した貧酸素の複合要因であると、現場で連続的に観測された環境要因の推移と外套腔液中のプロピオン酸等の有機酸含量の高濃度の蓄積から考えられた。

今回の調査で、漁場では水温 25°C 前後、DO 0.57 mg/l の環境はアサリを嫌気代謝に追い込み、長期間継続すると生存に影響を与えるような環境であるが、半日程度の継続ではへい死が発生しないこと、水温 31°C 以上、DO 0.08 mg/l の約 14 時間の貧酸素は嫌気代謝の限界を超え、へい死したことが野外調査で示唆された。

しかし、品川ら (2002) の室内実験では水温 30°C、無酸素の環境でアサリは 24 時間曝露時には外套腔液中のコハク酸が増加し、酢酸やプロピオン酸も 12 時間曝露後と比べて顕著に増加するものの、その時点ではへい死せず、曝露 36 時間後からへい死個体が出現し、曝露 60 時間後に全滅したとしている。

アサリの貧 (無) 酸素耐性は生理状態によって変化 (第 4 章 3 節, Figs. 4-9, 4-10) する。

2004 年のへい死時は平均水温が 31.3°C と品川ら (2002) の水温 30°C よりわずかに高かったものの、貧酸素継続時間が約 14 時間と短時間のうちに 70% を越える大量へい死となった。品川 (未発表) は無酸素、水温 30°C での LT₅₀ が 43 時間としており、それと比較して、1/3 程度の時間で半数以上がへい死したことになるが、これほどの大きな無酸素耐性時間の差は生理状態の違いだけでは説明がつかない。養殖現場では第 4 章 3 節でも言及したように高水温、貧酸素以外の環境要因が関与している可能性がある。日向野 (未発表) は本調査後の 2004 年 8 月 13 日にへい死が発生した養殖漁場底層水から硫化水素 (0.9～4.0 mg-S/l) を検出している。硫化水素は貧酸素時の二枚貝のへい死時間の短縮 (Theede et al. 1969; de Zwaan and Eertman 1996) や体内への有機酸の蓄積を促進する (Theede et al. 1995; 第 5 章 4 節, Fig. 5-9) ことから硫化水素が大量へい死に関与した可能性も考えられ、硫化水素などの環境要因がどの程度アサリの大量へい死に影響を与えているのかなどについては今後の検討課題と考える。

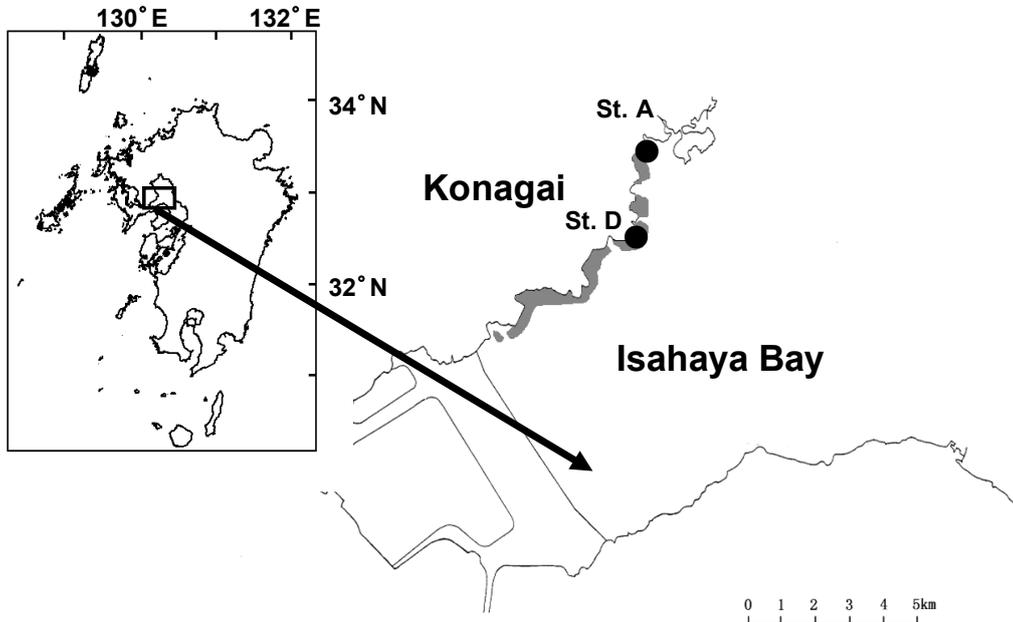


Fig. 6-1. Location of the monitoring stations A and D in Isahaya Bay, Kyushu, Japan. The shaded areas represent the Marina clam culture area.

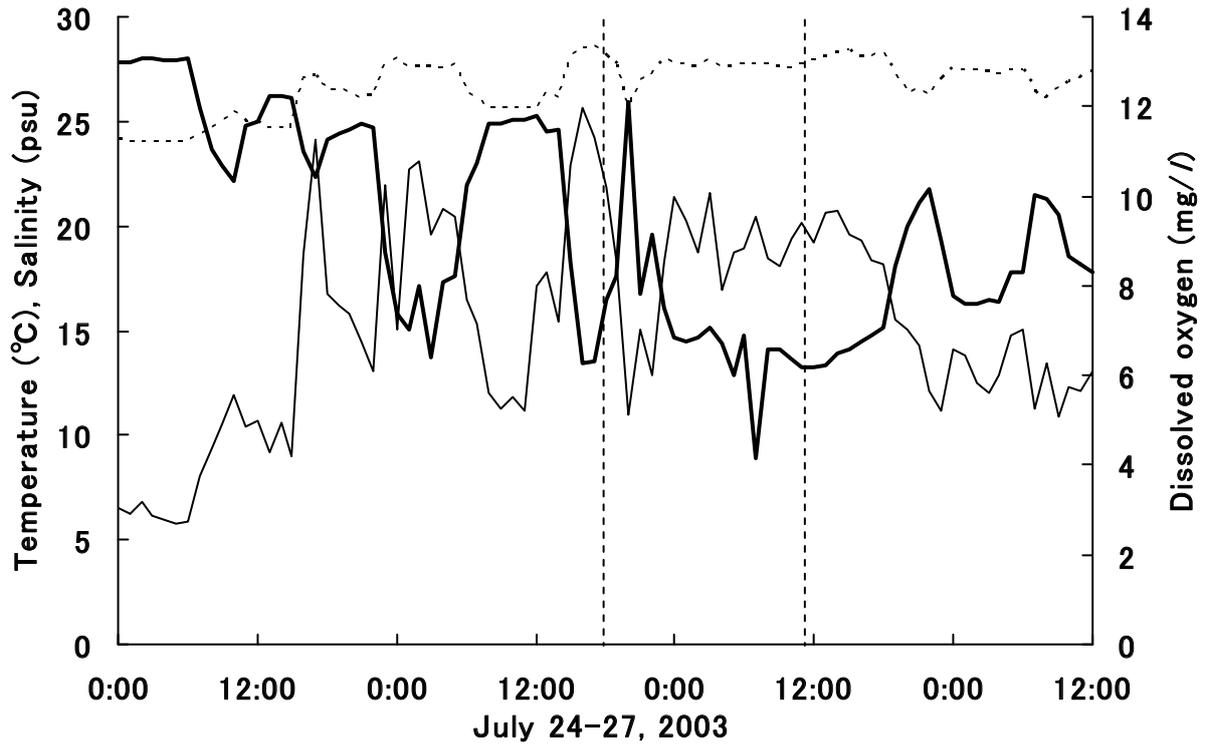


Fig. 6-2. Continuous records of environmental variables of the bottom water in the monitoring station D (60 cm above the chart datum line) shown in Fig. 6-1 from July 24 to July 27, 2003. The broken, thick and solid lines indicate water temperature, salinity and dissolved oxygen concentration, respectively. The vertical broken lines mark the sampling period for organic acid analysis (July 25-26) shown in Fig. 6-3.

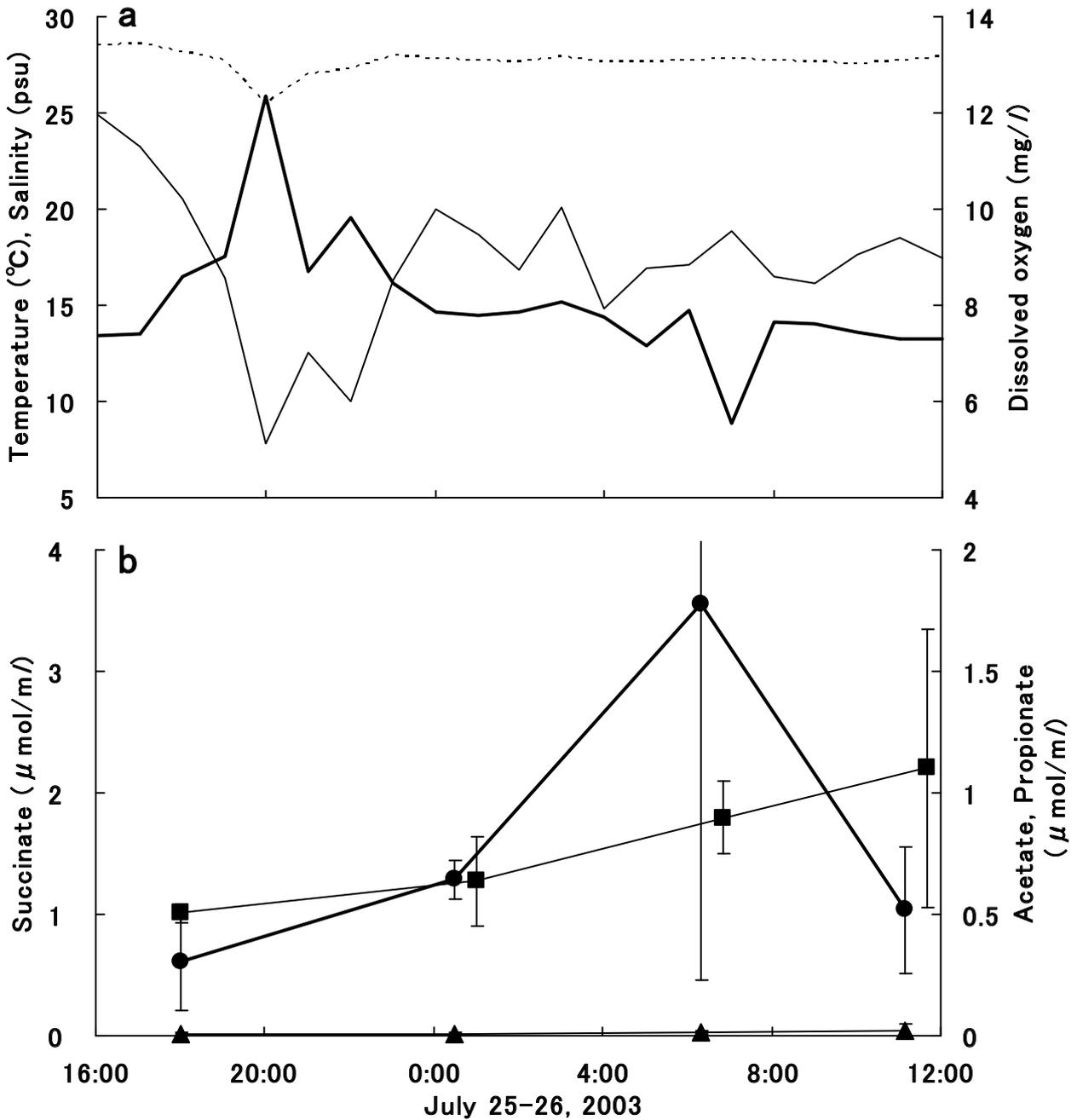


Fig. 6-3. Changes in environmental variables (a) and organic acid concentrations of the pallial cavity fluid of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (b) from July 25 to 26, 2003. The broken, thick and solid lines in a indicate water temperature, salinity and dissolved oxygen concentration, respectively. The circle, square and triangle symbols in b indicate succinate, acetate and propionate concentrations of the pallial cavity fluid, respectively. Data are given as the mean \pm SD (n = 3).

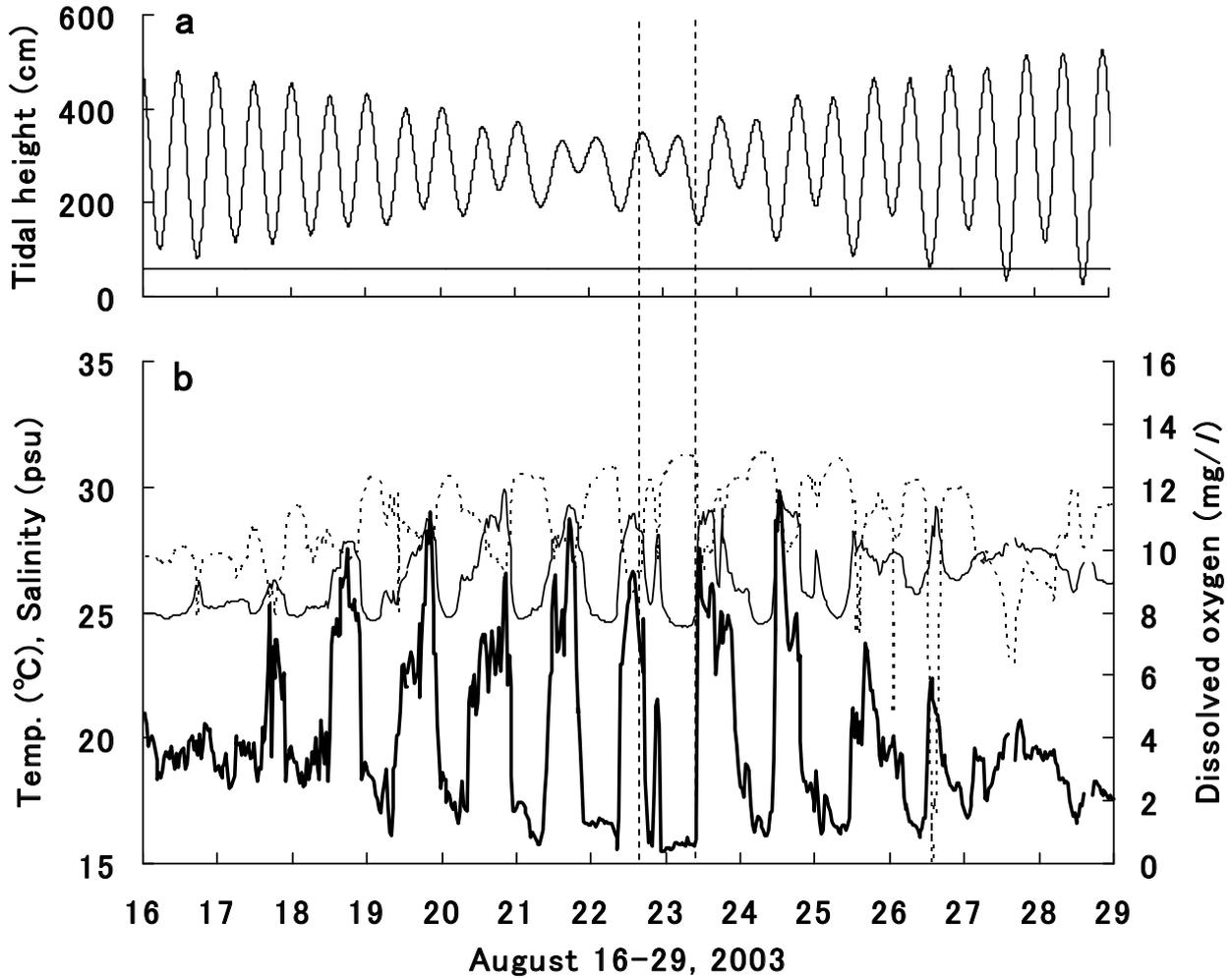


Fig. 6-4. Continuous records of the tidal height (a) and environmental variables of the bottom water (b) of the long term monitoring point in the monitoring station A (60 cm above the chart datum line, horizontal line in a) shown in Fig. 6-1 from August 16 to August 28, 2003. The solid, broken and thick lines in b indicate water temperature, salinity and dissolved oxygen concentration, respectively. The vertical broken lines mark the sampling period for organic acid analysis (August 22-23) shown in Fig. 6-5.

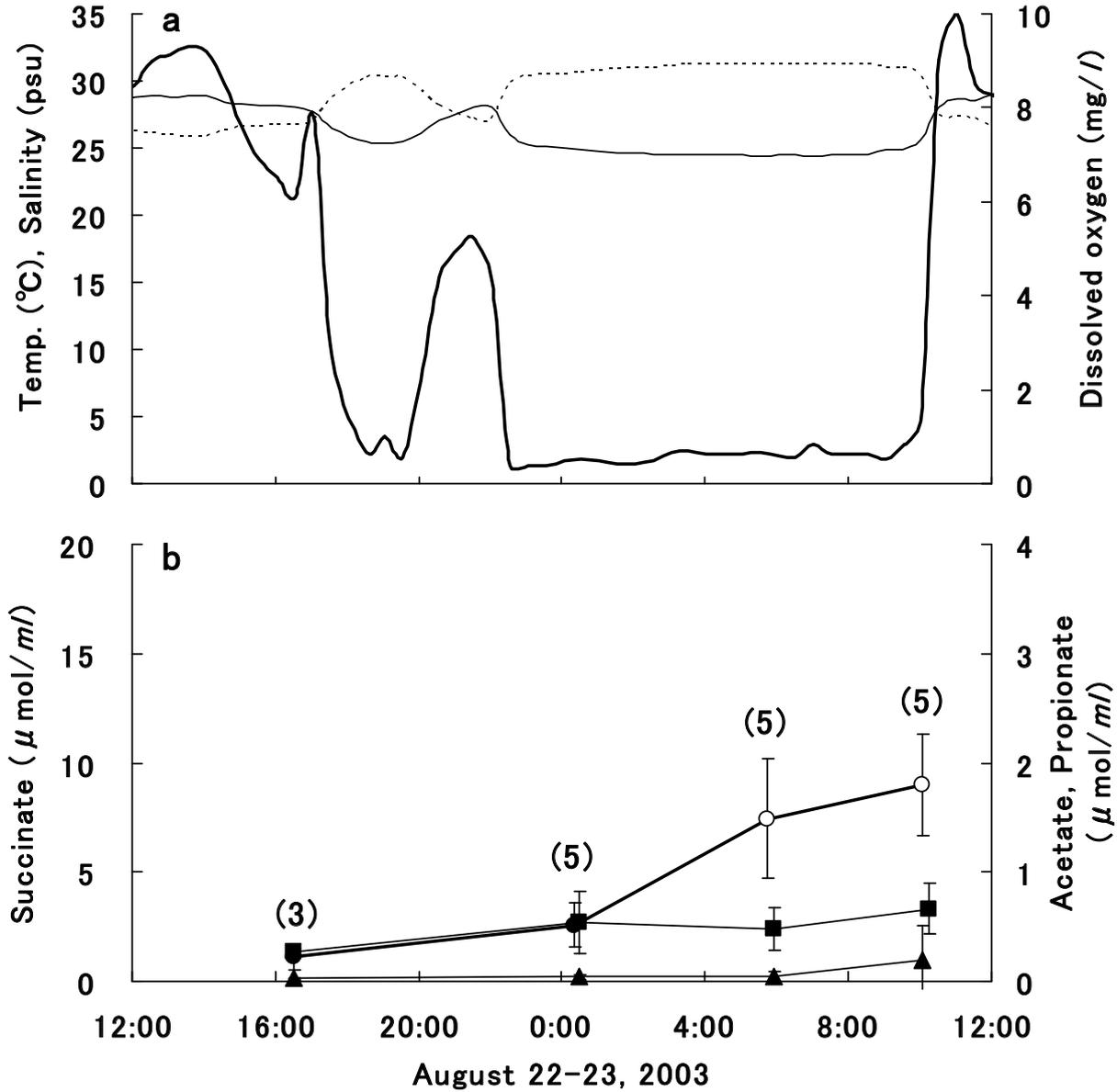


Fig. 6-5. Changes in environmental variables (a) and organic acid concentrations of the pallial cavity fluid of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (b) from August 22 to 23, 2003. The solid, broken and thick lines in a indicate water temperature, salinity and dissolved oxygen concentration, respectively. The circle, square and triangle symbols in b indicate succinate, acetate and propionate concentrations of the pallial cavity fluid, respectively. Data are given as the mean \pm SD. The numbers in parenthesis represent numbers of samples. Open symbols indicate a significant difference from the corresponding initial value (Dunnett test, $P < 0.05$).

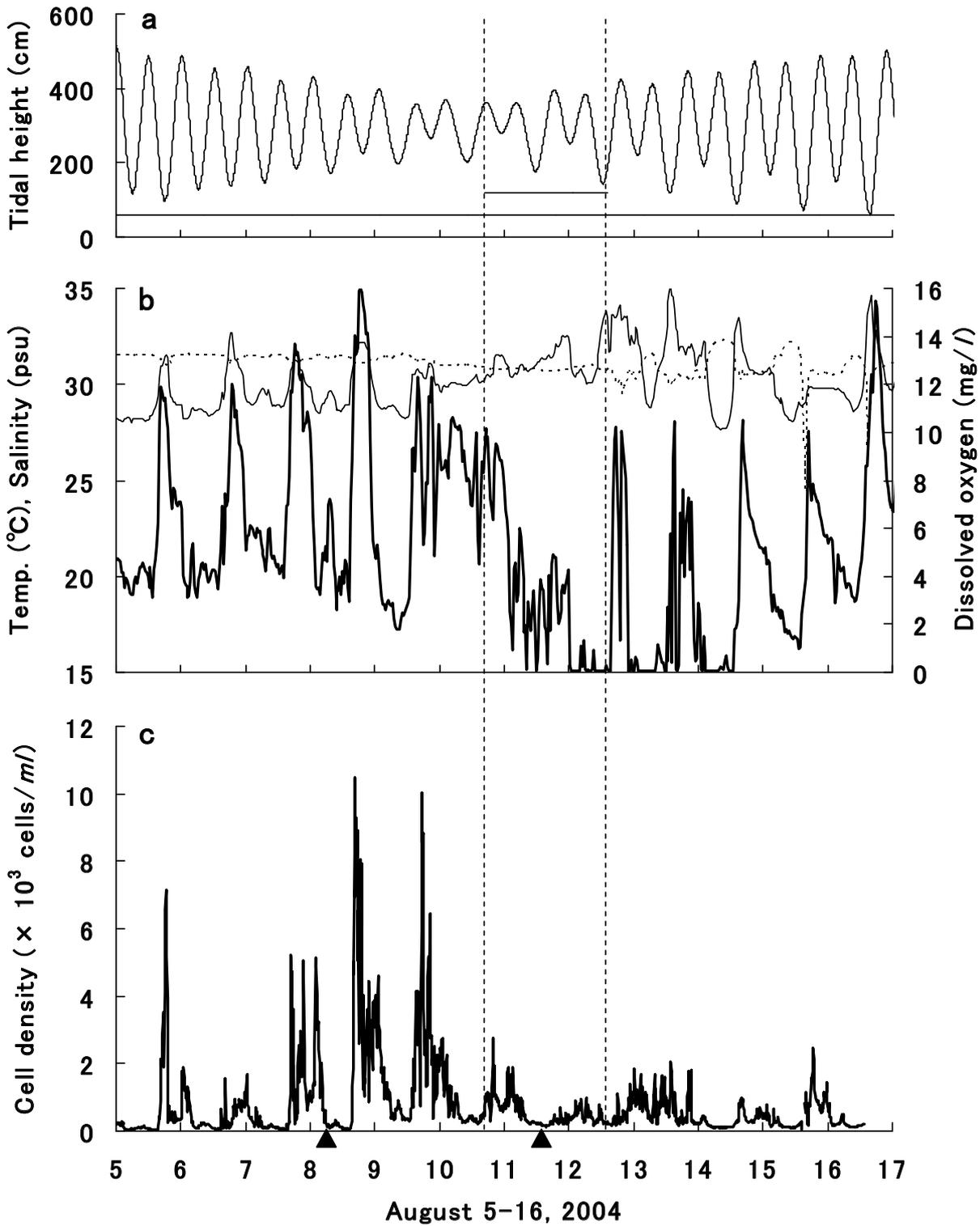


Fig. 6-6. Continuous records of the tidal height (a), environmental variables of the bottom water (b), and cell density of *Chattonella* spp. (c) of the long term monitoring point in the monitoring station A (60 cm above the chart datum line, the lower horizontal line in a) shown in Fig. 6-1 from August 5 to August 16, 2004. The solid, broken and thick lines in b indicate water temperature, salinity and dissolved oxygen concentration, respectively. The solid triangles below the horizontal axis of c indicate clam sampling for histological observations. The vertical broken lines mark the sampling period for organic acid analysis (August 10-12) shown in Fig. 6-7. The shorter horizontal line (August 10-12) indicates the height of the short term monitoring point (120 cm above the chart datum line).

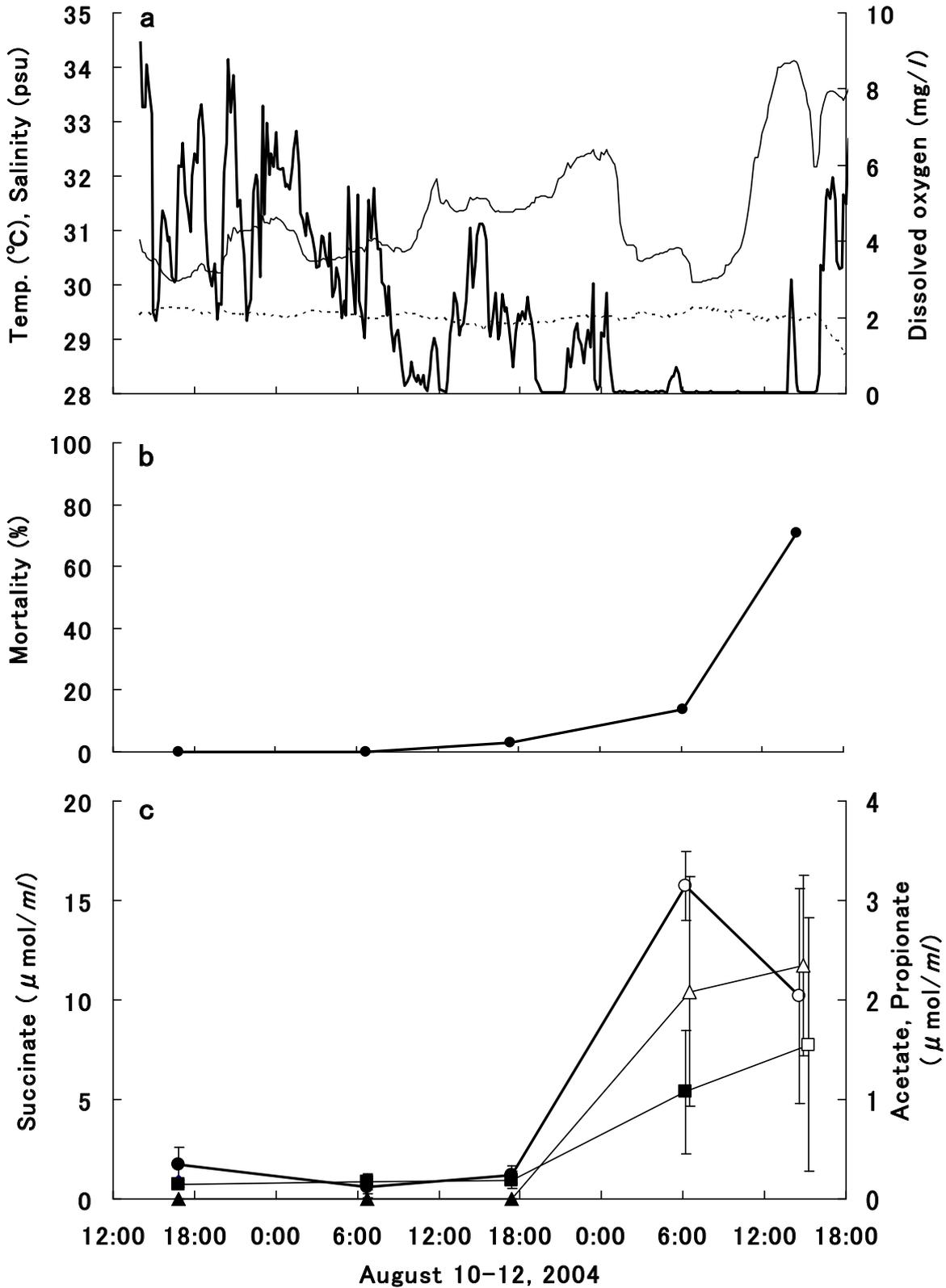


Fig. 6-7. Changes in environmental variables of the bottom water (a, recorded at 120 cm above the chart datum), Manila clam mortality (b) and organic acid concentrations of the pallial cavity fluid (c) of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from August 10 to 12, 2004. The solid, broken and thick lines in a indicate water temperature, salinity and dissolved oxygen concentration, respectively. The circle, square and triangle symbols in c indicate succinate, acetate and propionate concentrations, respectively. Data are given as the mean \pm SD ($n = 5$). Open symbols indicate a significant difference from the corresponding initial value (Dunnett test, $P < 0.05$).

第7章 総合考察

へい死要因について

第2章～第6章で、アサリの漁場環境の現状や環境要因がアサリへい死に与える影響について、特に諫早市小長井町のアサリ養殖漁場の事例をもとに考察してきた。

これらから **Fig. 7-1** に各環境要因とアサリのへい死との関係を示す。

低塩分

第2章1節、第3章、第5章3節および第6章1節でへい死との関係について述べた。室内実験の結果から 10 psu 以下の環境が2～3日間継続すれば、大量へい死する可能性があるが、4年間の漁場環境調査結果 (**Fig. 2-3**) から 10 psu 以下は最長 6.5 時間 (2006 年) しか継続せず、また、低塩分時に行った野外調査 (**Fig. 6-3**) で平均 13.7 psu が約 11 時間継続でアサリは一時的に閉殻し、嫌気代謝を行いコハク酸等の有機酸含量が増加したが、アサリがへい死することはなかった。これらの実験や調査結果から低塩分は小長井町アサリ養殖漁場のへい死原因ではない可能性が高い。

赤潮

第2章1節の **Figs. 2-2～2-4** に示した 2003 年 9 月上旬 (へい死率 7.7%)、2004 年 8 月中旬 (へい死率 100%) のへい死発生時、*Chattonella* spp. による赤潮が漁場で発生していた。

Chattonella の赤潮がアサリに与える影響については *Chattonella antiqua* を主体とした海水に曝露した実験 (Kim et al., 2004)、2000 年の小長井町アサリ漁場でのへい死 (藤井・山本 2003) の報告があり、へい死原因の一つであると考えられる。しかし、2004 年 8 月中旬の大量へい死ではアサリは藤井・山本 (2003) が報告したような *Chattonella* による鰓上皮の剥離などの顕著な障害がみられず、貧酸素となる前には外套腔液の有機酸含量の増加もなかったことから *Chattonella* による窒息でへい

死したとは考えられない。平野ら (2008) が指摘しているようにこの海域では夏季に風が弱く、赤潮が発生した小潮時に貧 (無) 酸素が発生することから、*Chattonella* 等の大規模な赤潮の発生はその分解や酸素消費などによって漁場を貧酸素化すると考える。このような貧酸素がアサリの生存に与える影響が大きいと考える。

高水温

第2章1節、第4章1節および第6章2節でへい死との関連を述べた。中村ら (1997b) はアサリは水温 30°C の飼育で 30 日間死亡する個体が全くなかったが、32°C では 6 日目にへい死する個体が現れるとしている。アサリの生存に影響を与える 32°C 以上の高水温はへい死が発生した 2003 年は 1 時間 (9 月 8 日)、2004 年は 10 時間 (8 月 12 日～13 日) 継続し、30°C 以上の水温が 2003 年は 7 時間 (9 月 8 日)、2004 年は 65.5 時間 (8 月 10 日～13 日) 継続した (**Fig. 2-2**)。2003 年、2004 年ともこれらの高水温が観測された期間にへい死が発生しているが、これらの水温および継続時間ではアサリがへい死するとは考えられない。

Fig. 4-4 で示したように高水温 (30°C) では酸素消費速度が速くなり、代謝が大きくなるため、2003、2004 年のアサリ養殖漁場貧酸素時の調査 (**Figs. 6-5, 6-7**) で示したように貧酸素が半日程度 (11～14 時間) 継続した際、水温の差 (25～31°C) によって生残状況が大きく変わる。中村ら (1997b) がヤマトシジミの例で言及しているように、高水温単独では致死的环境要因とはならなくとも、他の環境要因との組み合わせによる影響を考える必要がある。高水温は貧酸素等との組み合わせでアサリに致死的な影響を与える主要なへい死原因の一つであると考えられる。

貧 (無) 酸素

第2章1節、第4章、第5章1～2節および第6章2節でへい死との関連を述べた。

高水温・無酸素時アサリの炭水化物含量の減耗

は有酸素時と比べ有意に大きく (Fig. 4-11), 無酸素がアサリの生理状態 (炭水化物含量) を顕著に低下させることが明らかとなった。

室内実験 (Fig. 5-3) で水温 30°C, DO 1 mg/l 未満はアサリの生存に影響を与える環境であるとした。養殖漁場の4ヵ年のDOの推移 (Fig. 2-4) では, DO 1 mg/l 以下の貧酸素はへい死が発生した2003年は15時間 (9月5日~6日), 2004年は10.5時間 (8月12日~13日) 継続し, 2003年, 2004年ともこれらの貧酸素が観測された期間または直後にへい死が発生している。また, 2004年8月の野外調査 (Fig. 6-7) で31°Cを越える高水温と14時間程度継続した貧酸素時に大量へい死し, へい死直前に嫌気代謝最終代謝産物のプロピオン酸等の有意な増加があり, アサリが「酸欠」であったことが裏付けられた。

これらの結果から, 貧 (無) 酸素は, 東京湾や三河湾等でのへい死報告 (柿野ら 1984 ; 柿野 1986 ; 鈴木ら 1998a ; 黒田ら 1998 ; 青山ら 1999 ; 武田・石田 2003 ; Uzaki et al. 2003) 同様, 小長井町アサリ養殖漁場夏季大量へい死の主要なへい死原因と考える。

日向野 (2005) は, 貧酸素に連動して底質の還元が進むと硫化水素が生成されるとしている。硫化水素等のアサリの生存に与える影響は後述するが, これら環境悪化を促進する点や, 貧酸素などでアサリや他の底生生物等がへい死するとその腐敗・分解によって大量に酸素が消費され, より一層貧酸素の規模が拡大し, 大量へい死するという「負のスパイラル」を招くことからその影響はきわめて大きい。

硫化水素

第5章4節および第6章2節でへい死との関連を述べた。

萩田 (1985) や中村ら (1997b) は貧酸素時に硫化水素がアサリの生存に影響を与え, へい死を促進することが示されている。Theede et al. (1995) は硫化水素が貧酸素時に底生性二枚貝の体内への

有機酸の蓄積を促進するとしており, 第5章4節 (Fig. 5-9) でアサリにおいても同様の結果となった。また, 有酸素下 (DO 5 mg/l 以上) においても, 硫化水素はアサリの好気代謝を阻害し, 生存に影響を与えることが示唆された (Fig. 5-10)。

また, 2004年8月の野外調査 (Fig. 6-7) で高水温・貧酸素でアサリが短時間 (約14時間) でへい死したこと, へい死後の調査で漁場底層水から硫化水素 0.9~4.0 mg-S/l (日向野ら未発表) が観測されたことなどから, 高水温・貧酸素環境下に硫化水素のアサリへい死を促進する効果が働いたのではないかと推察される。

前述したが, 硫化水素の生成は貧酸素と関連し, アサリ等のベントスがへい死し, 腐敗・分解するとすると貧酸素とともに硫化水素による影響が拡大し, 大量へい死する「負のスパイラル」を招くことから, 硫化水素はへい死を促進する一因と考える。

アサリの生理状態

第2章2節および第4章2節および3節でアサリの生理状態の変化とへい死との関連を述べた。

Fig. 2-5 で小長井町養殖漁場のアサリの夏季~秋季の炭水化物含量は冬季~春季と比較すると低めに推移するとした。Table 4-3 に示したとおり, 小長井町アサリ養殖漁場での大量へい死は7~9月, 特に8月に多く発生している。Figs. 4-7, 4-8 から7~8月頃のアサリは, へい死が発生しない10月頃のアサリよりも無酸素耐性および炭水化物含量が高く, 衰弱し「活力」が顕著に低い状況ではないことから, 「秋季~冬季」の衰弱によるへい死 (柿野ら 1995 ; 辻ら 1995) と違い, 大量へい死の主因ではないと考えられる。

アサリの炭水化物含量と無酸素耐性には正の相関 (Figs. 4-9, 4-10) があり, 貧酸素耐性維持の目安を炭水化物含量 30 mg/g 以上 (Fig. 2-6 の回帰直線から水分含量 79.9%以下) とした。高水温・貧酸素等の漁場環境悪化時, 炭水化物含量が低い場合, 貧酸素耐性が低下し, へい死しやすくなると

推察されることから、生理状態は大量へい死の発生を促進する間接的な因子と考えられる。

へい死要因

これらから、2003～2006年の調査期間中に発生した2003年9月および2004年8月の小長井町アサリ養殖漁場の夏季大量へい死要因は、夏季の高水温と赤潮が発生した小潮時に観測される貧(無)酸素による複合要因と考える。またそれらに連動して生成される硫化水素などの環境要因やアサリの生理状態の低下も大量へい死を促進する一因と考えられた。

夏季大量へい死防除に対する提言

大量へい死させないためにどうすればよいか

諫早市小長井町アサリ養殖漁場の夏季大量へい死要因の検討結果を受けて、へい死防除について考えを Fig. 7-2 に示す。

アサリの夏季大量へい死要因は高水温と貧(無)酸素の複合要因と考えられる。養殖漁場の海水温をコントロールすることは現実的に難しいため、改善を図るのは海水中の溶存酸素濃度(DO)である(直接のへい死要因の可能性が低い赤潮と低塩分も改善を図るのは困難であると考え)。

この海域の貧酸素は、赤潮(特に *Chattonella*)が発生した無風の潮時に発生し、その継続時間は長くて3日間程度であるとされている(平野ら 2008)。つまり、へい死を防ぐためには夏季赤潮が発生した小潮時の3日間程度の期間、養殖漁場をアサリが嫌気代謝とならず生存可能な DO 1 mg/l 以上の環境に維持する必要がある。

ブルーシートによる仕切りとポンプを用いた海水曝気によって、アサリ養殖漁場の貧酸素化を防止する手法(平野ら 2008)が開発中である。このような工夫によって貧酸素発生時に養殖漁場内をアサリの生存が可能な DO 1 mg/l 以上と水質を改善することでへい死を防止することができると考えられる。

なお、上記の赤潮の観測や貧酸素発生(時期)の予察には監視体制の整備が不可欠であることは言うまでもない。

夏季大量へい死要因は高水温と貧(無)酸素の複合要因で、そのへい死を促進する環境要因として硫化水素の影響が考えられた。

アサリの漁獲・耕耘(底質の攪拌)による底質の改善は、アサリ生息帯(底質の深さ)に蓄積した有害な硫化水素(硫化物)を酸化・無毒化することで貧酸素耐性時間の延長を図ることができる。

また、アサリの生息密度を低くし、有機物負荷を下げることで底質の改善を図ることができるため、過密養殖の抑制(殻長 10 mm 以上のアサリ 1,500 個体/m² 以下が目安)は有効であり、適正密度のアサリは餌料や生息環境の改善のため身入率(生理状態)が高くなる(松田未発表)とされる。

適正密度の養殖はアサリの生理状態の改善(炭水化物含量 30 mg/g 以上または水分含量 79.9%以下)による貧酸素耐性等の向上と貧酸素時のわずかな酸素の有効利用(酸素を消費するアサリが少ないため)を同時に図る上で有効である。

また、大量へい死発生時期は7月～9月(特に8月)であり、この時期までに適正密度の養殖により身入率が高く(身が充実した)、価値の高い大型貝(小長井町漁業協同組合では商品となる殻長 35 mm 以上)を漁獲・出荷し、それより小型のアサリは垂下養殖等(長崎水試未発表)で避難を図ることにより、へい死リスクの分散と養殖密度を低下させることができる。養殖密度を低下させることにより、前述した底質改善の効果も相乗的に現れる。

上記の改善策は漁業者や漁協(一部公的な支援が必要かもしれないが)で実施可能であり、へい死防除対策として取り組むべき課題であると考えられる。

また、覆砂や開発中の曳航式微細気泡装置による底質改善(藤田ら 2007)などについても、上記の改善策と併せてこれらを実施することにより、さらに大量へい死の防除を図ることができると考

える。

へい死防除策の考えのまとめ (現状で実行できる対策)

1. 監視体制の充実 赤潮発生の監視, 貧酸素発生 (時期) の予察
2. 貧酸素時のアサリ漁場内の曝気による DO の維持 (1 mg/l 以上)
3. 底質の改善 耕耘や漁獲による底質の攪拌 (覆砂を含む)
4. 適正 (低) 密度 (1,500 個体/m² 以下) の養殖によるアサリの生理状態の改善 (炭水化物含量 30 mg/g 以上または水分含量 79.9%以下)
5. へい死時期前 (~6 (7) 月まで) の漁獲と避難

これらを実行し, 適正密度の養殖で貧酸素耐性が高いアサリ (炭水化物含量が高く生理状態が良いアサリ) を飼育する。嫌気代謝を促進する硫化水素の発生を底質改善等で抑制し, 養殖漁場の DO をアサリにとって貧酸素 (DO 1 mg/l 未満) とならないようにする。へい死時期前の漁獲や避難で養殖密度を低下させ, アサリ漁場で必要とする酸素量を少なくし, へい死リスクの分散を図ることが, 現状で行えるへい死防除対策と考える。

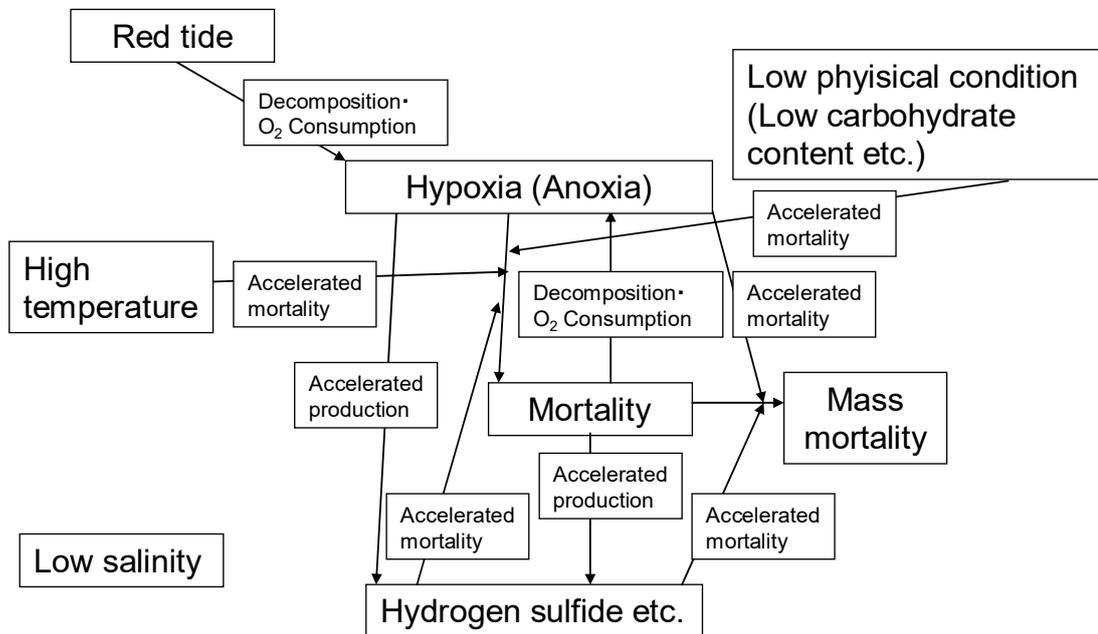


Fig. 7-1. Relationships of environmental factors and mass mortality of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in a culture area. The solid arrows indicate cause-effect relationships.

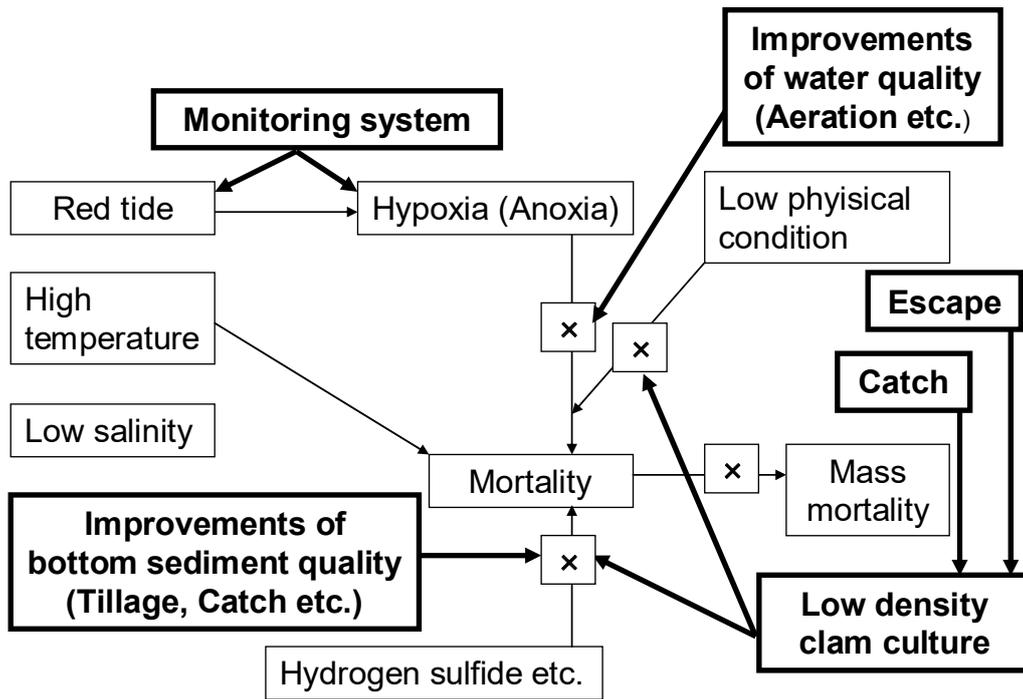


Fig. 7-2. Proposed measures to prevent mass mortality of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in a culture area. The solid and thick arrows indicate cause-effect relationships and mitigation methods, respectively.

謝 辞

本研究の遂行および本論文のとりまとめにあたり、懇切なる御指導と御校閲の労を賜った長崎大学環東シナ海海洋環境資源研究センター教授 石松惇博士に心から感謝し、厚く御礼申し上げます。本論文をとりまとめるにあたり、御助言、御校閲の労を賜った長崎大学生産科学研究科教授 中田英昭博士、萩原篤志博士、玉置昭夫博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始激励の言葉を頂き、懇切なる御指導、貴重なる御助言、多大なる御協力を賜った学習院女子大学国際文化交流学部教授 品川明博士、独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所生産システム部二枚貝増養殖チーム長 日向野純也博士に心から感謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究に際して御助言と御協力を頂いた長崎県総合水産試験場種苗量産技術開発センター所長藤井明彦博士、漁場環境科 平野慶二科長に深く感謝する。

調査および試料の採取や分析について御協力頂いた長崎県対馬水産業普及指導センター 山本憲一所長、長崎県総合水産試験場漁場環境科の北原茂主任研究員、水田浩二主任研究員に感謝する。

貴重な御助言や調査および試料の分析、資料のとりまとめに御協力頂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の漁場環境研究科木元克則科長、資源培養研究室長 前野幸男博士、同養殖研究所生産システム部の徳田雅治博士、栗原真野臨時職員、同水産工学研究所環境分析研究室長 桑原久実博士に感謝する。

学位を取得するにあたって、御理解と御支援を頂いた小坂安廣元場長、濱口博彦元場長、池田修二場長をはじめ長崎県総合水産試験場、科学技術振興局、水産部に所属しておられた方々に感謝する。

本研究に際し、御協力頂いた長崎県総合水産試験場環境養殖技術開発センターに所属しておられ

た職員、委託・臨時職員の方々、独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所の皆様にご挨拶。

実験材料および試料の採取、現場調査で多大な御協力頂いた小長井町漁業協同組合 新宮隆喜代表理事組合長はじめ職員、漁業者の皆様にご挨拶。

最後に様々な御支援、御協力を頂いたすべての方々に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 相島 昇 (1993) アサリ稚貝の潜砂行動に及ぼす水温と塩分の影響. 福岡水技研報, **1**, 145-150.
- Ali, F., K. Nakamura and S. Yamasaki (1999) Physiological characteristics of aerial survival in Japanese clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve). *Suisanzoshoku*, **47**, 381-389.
- 青山裕晃・甲斐正信・鈴木輝明・中尾徹・今尾和正 (1999) 三河湾における貧酸素化によるアサリの死亡率の定式化II. 海洋理工学会誌, **5(1 & 2)**, 31-36.
- アサリ資源全国協議会提言検討委員会・水産庁・独立行政法人水産総合研究センター (2006) 提言 国産アサリの復活に向けて. p. 29.
- Boyd, C. E. and C. S. Tucker (1998) Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers, Boston, p. 700.
- de Zwaan, A. (1983) Carbohydrate catabolism in bivalves. In "The Mollusca", Vol. 1, (ed. by P. W. Hochachka), Academic Press, New York, pp. 137-175.
- de Zwaan, A., P. Cortesi, G. V. Thillart, J. Roos, K. B. Storey (1991) Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia tolerant marine molluscs: a biochemical analysis. *Mar. Biol.*, **111**, 343-351.
- de Zwaan, A., O. Cattani and V. N. Putzer (1993) Sulfide and cyanides induced mortality and anaerobic metabolism in the arcid blood clam *Scapharca inaequivalvis*. *Comp. Biochem.*

- Physiol.*, **105C**, 49-54.
- de Zwaan, A., G. Isani, O. Cattani and P. Cortesi (1995) Long-term anaerobic metabolism of erythrocytes of the arcid clam *Scapharca inaequivalvis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **187**, 27-37.
- de Zwaan, A. and R. H. M. Eertman (1996) Anoxic or aerial survival of bivalves and other euryoxic invertebrates as a useful response to environmental stress – A comprehensive review. *Comp. Biochem. Physiol.*, **113C**, 299-312.
- de Zwaan, A. and J. M. F. Babarro (2001) Studies on the causes of mortality of the estuarine bivalve *Macoma balthica* under conditions of (near) anoxia. *Mar. Biol.*, **138**, 1021-1028.
- 海老原天生・村田靖彦 (1967) アサリ (*Venerupis semidecussata*) の酸素消費量 (第1報). 千葉内湾水試調査報告書, **9**, 89-96.
- 藤井明彦・山本憲一 (2003) 諫早湾におけるタイラギ・アサリの現状と問題点. 月刊海洋, **35**, 235-240.
- 藤井武人 (1979) 二枚貝の周期的活動性に関する研究 - I 自然環境下でのアサリ *Tapes japonica* DESHYES に見られる周期性. 東北水研研報, **40**, 37-46.
- Fonselius, S., D. Dyrssen and B. Yhlen (1999) Determination of hydrogen sulfide. In “*Methods of seawater analysis*” (ed. by K. Grasshoff, K. Kremling and M. Ehrhardt), Wiley-vch, Weinheim, pp. 91-100.
- 藤森三郎 (1929) 有明海干潟利用研究報告, 福岡県水産試験場, 福岡県, p. 715.
- 藤田孝康・木村和也・森光典・田中勝久・木元克則・岡村和磨・森勇一郎 (2007) 有明海湾奥部サルボウガイ漁場における曳航式微細気泡装置による底質改善試験. 水産工学, **44**, 101-111.
- Funakoshi, S., T. Suzuki and K. Wada (1988) Salinity tolerances of marine bivalves. In “*Environmental Quality and Aquaculture System*” (ed. by C. J. Shindermann), NOAA Tech. Rep. Natl. Mar. Fish. Serv., Seattle, WA, USA, pp. 15-18.
- Gabbott, P. A. and R. R. Stephenson (1974) A note on the relationship between the dry weight condition index and the glycogen content of adult oysters (*Ostrea edulis*) kept in the laboratory. *J. Cons., Cons. Int. Explor. Mer.*, **35(3)**, 359-361.
- Grieshaber, M. K., K. Hauschild, A. Sommer and S. Völkel (1995) Anaerobiosis and sulphobiosis in the lugworm, *Arenicola marine* L. In “*Biology and Ecology of Shallow Coastal Waters*” (ed. by A. Eleftheriou, A. D. Ansell and C. J. Smith), Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 131-137.
- 萩田健二・石川貴朗 (1982) アサリ肉重量の季節的変動. 昭和55年度三重伊勢湾水試年報, 17-19.
- 萩田健二 (1985) 貧酸素水と硫化水素水のアサリのへい死に与える影響. 水産増殖, **33**, 67-71.
- 日向野純也 (2005) 貧酸素・硫化水素・浮泥等の環境要因がアサリに及ぼす影響. 水研センター研報, 別冊3号, 27-33.
- 平木治 (1917) 重要貝類生殖腺発達状況調査. 大正5年度長崎水試事報, 97.
- 平野慶二・松田正彦・北原茂・日向野純也 (2005) 諫早湾内の小長井町釜地区干潟の貧酸素化について. 平成17年度日本水産工学会学術講演会講演論文集, 91-94.
- 平野慶二・松田正彦・北原茂・品川明・日向野純也 (2008) 諫早湾内の諫早湾小長井町地先干潟の貧酸素化の実態とその対策. 平成20年度日本水産工学会学術講演会講演論文集, 273-275.
- Hochachka, P. W. (1984) 低酸素適応の生化学—酸素なき世界で生きぬく生物の戦略— (橋本周久・安部宏喜・渡部終五訳), 恒星社厚生閣, 東京, p. 194.
- Hosoi, M., S. Kubota, M. Toyohara, H. Toyohara and I. Hayashi (2003) Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. *Fish. Sci.*, **69**,

- 395-400.
- 磯野良介・喜田潤・岸田智穂 (1998) アサリの成長と酸素消費量におよぼす高温の影響. 日水誌, **64**, 373-376.
- 柿野純 (1982) 青潮によるアサリへの死原因について 貧酸素水および硫化物の影響. 千葉水試研報, **40**, 1-6.
- 柿野純・竹脇博・鈴木和良 (1984) 最近の東京湾におけるアサリへの死現象とへの死調査に関する考察. 千葉水試研報, **42**, 23-28.
- 柿野純 (1986) 東京湾奥部における貝類のへの死事例 特に貧酸素の影響について. 水産土木, **23**, 41-47
- 柿野純・鳥羽光晴・兼子昭夫・深山義文 (1992) 東京湾木更津地先における冬季アサリへの死の特徴. 千葉水試研報, **50**, 21-30.
- 柿野純・古畑和哉・長谷川健一 (1995) 東京湾盤洲干潟における冬季のアサリのへの死要因について. 水産工学, **32**, 23-32.
- 柿野純 (1996) 丸形指数を指標とした籠試験によるアサリの成長と生残の特性. 日水誌, **62**, 376-383.
- 川本信之 (1954) アコヤガイの生理的研究-II 低塩分海水中に於ける介体液の氷点降下度に就いて. 日水誌, **20**, 273-276.
- Kim, D., O. Kumamoto, K. Lee, A. Kuroda, A. Fujii, A. Ishimatsu and T. Oda (2004) Deleterious effect of *Chattonella marina* on short-necked clam (*Ruditapes philippinarum*); possible involvement of reactive oxygen species. *Journal of Plankton Research*, **26**, 967-971.
- Kim, W. S., H. T. Huh, J. H. Lee, H. Rumohr and C. H. Koh (1999) Endogenous circatidal rhythm in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Mar. Biol.*, **134**, 107-112.
- 小池啓一 (1999) 運動. 軟体動物学概説 下巻 (波部忠重・奥谷喬司・西脇三郎共編), サイエンス社, 東京, pp. 127-135.
- 鴻巣章二・藤本健四郎・高橋良子・松下輝子・橋本芳郎 (1965) アサリのエキス成分ならびに蛋白のアミノ酸組成. 日水誌, **31**, 680-686.
- 鴻巣章二・柴生田正樹・橋本芳郎 (1967) 貝類の有機酸, とくにコハク酸含量について. 栄養と食糧, **20**, 18-21.
- 高良夫 (1957) アサリ生殖巣についての二・三の組織学的観察. 日水誌, **23**, 394-399.
- 倉茂英次郎 (1942a) 海水塩分の変化に対するアサリの抵抗性. 日本海洋学会誌, **1**, 29-43.
- 倉茂英次郎 (1942b) 常温における朝鮮産アサリの致死酸素量. 日本海洋学会誌, **1**, 123-132.
- 倉茂英次郎 (1957) アサリの生態研究, 特に環境要因について (松本文夫編). 水産学集成, 東京大学出版会, 東京, pp. 611-655.
- 黒田伸郎・甲斐正信・原保 (1998) 漁場環境変動に伴うアサリのグリコーゲン含量の変動. 愛知水試研報, **5**, 35-39.
- Kushwaha, S. C. and M. Kates (1981) Modification of phenol-sulfuric acid method for the estimation of sugars in lipids. *Lipids*, **16**, 372-373.
- Lockwood, A. P. M. (1973) 無脊椎動物の体液調節, 動物の体液 (大出浩訳), 河出書房, 東京, pp. 21-62.
- Lucas, A. and P. G. Beninger (1985) The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, **44**, 187-200.
- 牧 義男 (1915) 東京内湾に於ける「あさり」「ばかがひ」の養殖. 水産研究誌, **10**, 6-34.
- 松田正彦・品川明・日向野純也・藤井明彦・平野慶二・石松 惇 (2008) 低塩分がアサリの生残, 血リンパ浸透圧および軟体部水分含量に与える影響. 水産増殖, **56**, 127-136.
- 村地四郎・古川哲三 (1958) サルボウ (モガイ) の希釈海水に対する抵抗性について. 水産増殖, **6**, 35-40.
- 中原康智・那須博史 (2002) 主要アサリ産地からの報告—有明海熊本県沿岸. 日本ベントス学会誌, **57**, 139-144.
- 中村幹雄・安木 茂・高橋文子・品川 明・中尾

- 繁 (1996) ヤマトシジミの塩分耐性. 水産増殖, **44**, 31-35.
- 中村幹雄・品川明・戸田顕史・中尾繁 (1997a) ヤマトシジミの貧酸素耐性. 水産増殖, **45**, 9-15.
- 中村幹雄・品川明・戸田顕史・中尾繁 (1997b) 宍道湖および中海産二枚貝4種の環境耐性. 水産増殖, **45**, 179-185.
- 中村幹雄・品川明・戸田顕史・中尾繁 (1997c) ヤマトシジミの硫化水素耐性. 水産増殖, **45**, 17-24.
- 中村幹雄 (1998) 宍道湖におけるヤマトシジミと環境との相互関係に関する生理生態的研究. 島根水試研報, **9**, 1-192.
- 西沢正・柿野純・中田喜三郎・田口浩一 (1992) 東京湾盤洲干潟におけるアサリの成長と減耗. 水産工学, **29**, 61-68.
- 沼口勝之 (1999) アカガイの生残および生理状態におよぼす塩分の影響. 水産増殖, **47**, 391-396.
- Robertson, J. D. (1964) Osmotic and ionic regulation. In "Physiology of Mollusca" (ed. by K. M. Wilbur and C. M. Yonge), Vol.1, Academic Press, New York, pp. 283-308.
- 佐伯清子・熊谷洋 (1980) アサリの一般成分および無機成分の季節的変動. 日水誌, **46**, 341-344.
- 品川明・高橋文子・中屋望・戸田顕史 (2002) アサリの代謝産物による活性度判定と生息環境評価指標としての活用. 第36回日本水環境学会年会講演集, 561.
- 白石淳・長修司・三島かおり (1995) 北部九州産アサリ (*Ruditapes philippinarum*) の筋肉部分と内臓部分の一般成分の周年変化. 日本家政学会誌, **46**, 313-319.
- 鈴木輝明・青山裕晃・甲斐正信 (1998a) 三河湾における貧酸素化によるアサリの死亡率の定式化. 海洋理工学会誌, **4(1)**, 35-40.
- 鈴木輝明・青山裕晃・甲斐正信・今尾和正 (1998b) 底層の貧酸素化が内湾浅海底生生物群集の変化に及ぼす影響. 海の研究, **7**, 223-236.
- 鈴木 徹・尾形 博・船越将二・新井 茂・和田 浩爾 (1987) 海産および淡水産二枚貝の血中遊離アミノ酸組成. 養殖研報, **11**, 27-34.
- 高橋文子・小野彰子・半田郁子・品川 明 (2000) シナハマグリ可食部および血リンパエキス成分に及ぼす干出の影響. 学習院女子大紀要, **2**, 131-138.
- 武田和也・石田基雄 (2003) 土砂採取に伴う浚渫窪地における顕著な貧酸素化減少について. 愛知水試研報, **10**, 7-14.
- 玉井恭一 (1993) シズクガイの貧酸素耐性. 日水誌, **59**, 615-620.
- 玉井恭一 (1994) シズクガイの硫化水素耐性. 日本ベントス学会誌, **46**, 41-48.
- 田中弥太郎 (1954) 有明海産重要二枚貝の産卵期-III. アサリについて. 日水誌, **19**, 1165-1167.
- Theede, H., A. Ponat, K. Hiroki and C. Schlieper (1969) Studies on the resistance of marine bottom invertebrates to oxygen-deficiency and hydrogen sulfide. *Mar. Biol.*, **2**, 325-337.
- Theede, H., R. Oeschger and A. Jahn (1995) Adaptive responses of marine benthic invertebrates to hydrogen sulphide. In "Biology and Ecology of Shallow Coastal Waters" (ed. by A. Eleftheriou, A. D. Ansell and C. J. Smith), Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 149-152.
- 鳥羽光晴・深山義文 (1991) 飼育アサリの性成熟過程と産卵誘発. 日水誌, **57**, 1269-1275.
- 辻秀二・宗清正廣・井谷匡志・道家章生 (1995) 舞鶴湾におけるアサリのへい死現象. 京都海洋センター研報, **18**, 5-9.
- Uzaki, N., H. Kai, H. Aoyama and T. Suzuki (2003) Changes in mortality rate and glycogen content of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during the development of oxygen-deficient waters. *Fish. Sci.*, **69**, 936-943.
- 山本憲一・藤井明彦・松田正彦 (2005) 二枚貝等の生産阻害要因の解明. 有明海の海洋環境の変化が生物生産に及ぼす影響の解明, 農林水産省農林水産技術会議事務局, 東京, pp.

96-103.

山下輝昌・小原博義・浜崎稔洋（1989）梅雨期の
大出水に伴う貝類の異常へい死について．昭
和62年度福岡有明水試研報，55-58.