

アサリの無酸素曝露後の影響について

松田正彦

Effects of anoxia exposure to Manila clam *Ruditapes philippinarum*

MASAHIKO MATSUDA

Prolonged mortality of the Manila clam has been problematic in culture grounds in Konagai, Isahaya, Nagasaki, Japan during summer-autumn season. In order to determine whether hypoxia is the key factor causing the prolonged mortality, experiments were conducted to understand adverse effects of hypoxia on the production of the clam. Clams caught in the culture grounds were experimentally exposed to anoxic environments for different time durations in August during which the dissolved oxygen is frequently depleted in the culture grounds. Individuals survived the anoxic treatments were reared in baskets placed either in a tank with flow-through seawater system or in the culture ground to investigate the survival for 31 days and 90-106 days, respectively. Clams were almost annihilated by 48 h exposure to anoxia within a day after the exposure. However, anoxic exposure within 36 h did not significantly reduce the survival on and after 3 days from the exposure. Considering the duration of the hypoxia in the culture ground, the anoxic (hypoxic) environments alone may not be the key factor for the prolonged mortality.

アサリ *Ruditapes philippinarum* は日本各地の内海、内湾の潮間帯から水深 10 m までの浅海域に生息する産業上重要な二枚貝である。長崎県諫早湾北部に面する諫早市小長井町では泥質干潟に客土覆砂し、造成された漁場でアサリ養殖業が営まれており、生産されるアサリは手掘りで漁獲され、砂噛みが少なく、身入りが良く美味しいため「小長井あさり」としてブランド化されている¹⁾。

しかし、近年、小長井町のアサリ養殖漁場では夏～秋季に減耗や成長不良により、漁場に自然着底した稚貝が商品サイズのアサリまで成育せず、生産は県外産アサリの移植に依存する状況が続いている。移植アサリのための漁獲ではアサリ養殖漁家経営安定のため不十分であり、生産性向上のためには夏～秋季のアサリの生産不良対策を図る必要がある。

問題となっている夏～秋季のへい死は数ヶ月にわたる緩慢なへい死²⁻⁹⁾であり、数日で大量死する高水温と貧酸素によるもの¹⁰⁾ではなく、低塩分、高水温、貧酸素、赤潮、産卵や餌不足による衰弱²⁻⁹⁾な

どによる複合的要因（カゴ試験の結果のため食害等は除外）として推察されているが、明らかになっていない。

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¹¹⁾。潮間帯および浅海に生息するアサリは、低塩分や貧酸素など環境の変化に対し、閉殻によって順応するが、閉殻時には外部環境中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¹²⁾。

アサリの貧酸素耐性については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 3 日以上を要している¹³⁻¹⁶⁾。また、アサリの生理状態によって耐性が異なるが、水温 28℃で炭水化物含量が 30 mg/g（軟体部湿重量）未満では 48 時間の無酸素曝露で半数以上、72 時間では全滅することがあるとの室内実験結果がある¹⁷⁾。

このように、貧酸素曝露中のへい死については知見があるが、貧酸素曝露後の影響や生残については、水温25°Cで無酸素環境にアサリ8個体を3日間曝露し、44日後の生残(37%)や平均濾水速度(曝露前の75%減)を観察し、曝露されたアサリはグリコーゲン生産や濾水機能に修復不可能な障害「後遺障害」を受け、ついには死亡に至ることを示唆した知見¹⁸⁾などしか見当たらない。

貧酸素環境がその後のアサリに及ぼす生理的影響については未解明な部分も多く、生残に与える曝露後の長期的な影響についての知見は上記以外なく情報は極めて少ない。

今回、夏季にしばしばアサリ漁場で観測される貧酸素環境が夏～秋季の緩慢なへい死に与える影響を調べるため、無酸素環境で曝露時間を変え、知見の少ない曝露後の生残の推移について、流水水槽およびアサリ養殖漁場で長期間観察することを試み、知見を得たので報告する。

材料および方法

試験は2017と2018年の2ヶ年に漁場で貧酸素化が想定される8月中～下旬に行った。長崎県諫早市小長井町のアサリ養殖漁場(Fig. 1)で漁獲されたアサリ成貝を材料として用いた。

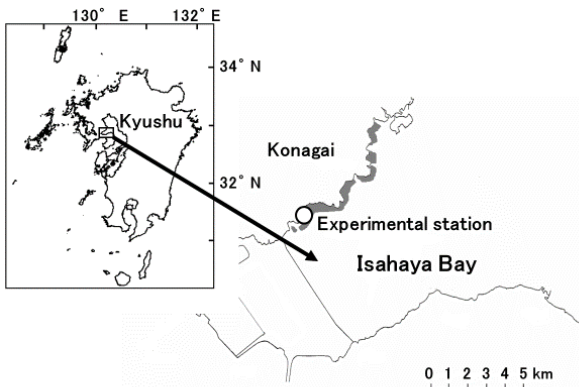


Fig. 1. Location of experimental station in Isahaya Bay, Japan. Shaded areas represent Manila clam culture grounds.

2017年8月15日に殻長 31.6 ± 1.3 mm (平均 ± 標準偏差), 重量 6.5 ± 0.9 g, 肥満度¹⁹⁾ 13.0 ± 1.6 のア

サリ各300個体をネット(目合い5 mm)に収容し、窒素曝気によりほぼ無酸素の溶存酸素濃度(以下DO) 0.02 ± 0.06 mg/lとした蓋つきの30 l水槽で24, 36, 48時間曝露する区(以下それぞれ24時間区, 36時間区, 48時間区)と曝露しない対照区を設け、曝露中および直後にへい死個体を取り除いた後、濾過海水流水下の空気曝気を施した角型100 l水槽(換水は90回転/日以上)に収容した。各試験区の水温は海水かけ流しによるウォーターバスで自然水温に調整した。36, 48時間区は24時間後にあらかじめ水温とDOを調整した水槽への移し変えで換水を行った。なお、供試個体のへい死などで、飼育海水の白濁等水質が悪化した場合は、随時上記の換水を行った。

曝露直後の同年8月17日に各区生残していたアサリ100個体をそれぞれ無作為に採取し、蓋付きカゴA(内面積 0.07 m²)に収容し、濾過海水流水下の空気曝気を施した角型8トン水槽(換水は90回転/日以上)において無給餌で31日間生残状況を観察した(以下水槽試験)。曝露4日後の同年8月21日に生残個体のうち、水槽試験に用いた個体以外から各区の100個体を諫早市小長井町の試験漁場(Fig. 1)の地盤高(CDL)1 m地点に設置した蓋付きカゴB(内面積 0.12 m²)に収容し、同年12月5日までの106日間一潮毎に生残状況を観察した(以下漁場試験)。

なお、48時間区は曝露直後生残個体が65個体となったためそのまま水槽試験のみに供試した。また、36時間区は曝露4日後までに水槽試験に供試した以外の生残個体が0個体となったため、漁場試験が行えなかった。飼育水の水温と調査漁場の地温(約5 cmの深さ)はおんどとり Jr. (TR-52i, TR-51i : T and D社製)で1時間毎に記録した(地温は2018年のみ、2017年は温度計故障のため地温測定できず)。飼育水のDOの調整と測定は溶存酸素計 Multi 3410 (WTW社製)で、塩分の測定は電導率計 Cond 340i (WTW社製)で行った。

後述の2018年の試験も、アサリの取り扱いやDOと水温等の管理と測定、水槽の換水、蓋付きカゴ等の管理も同様の方法で行った。

2018年は8月20日に殻長 32.0 ± 2.5 mm, 重量 7.0 ± 2.0 g, 肥満度 11.1 ± 1.1 のアサリ各300個体を2017年と同様の方法でほぼ無酸素(DO 0.05 ± 0.08 mg/l)にそれぞれ12, 24, 36時間曝露する区(以下12時間区, 24時間区, 36時間区)と曝露しない対照区を設けた。

曝露直後のアサリは、曝露中および直後にへい死個体を取り除いた後、同年8月22日に濾過海水流水下の空気曝気を施した角型100 l水槽(換水は90回転/日以上)に收容して8月24日まで2日間生残状況を観察し、各区の生残個体各100個体を前年同様水槽試験と漁場試験に分けカゴに收容し、同日水槽試験、漁場試験とも開始した。水槽試験は31日間、漁場試験は同年11月22日までの90日間、前年と同様の手法、同じ地点で生残状況を観察した。

アサリの生死は刺激による閉殻反応の有無で判定した。各試験区の生残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により各試験区の生残曲線を $p < 0.05$ で比較した(PASW SPSS Statistics 17.0, SPSS社)。

結果

2017年に行った無酸素曝露時の塩分は33.5, 試験水温は 26.3 ± 0.3 , $25.8 \sim 26.9^\circ\text{C}$ (平均 \pm 標準偏差, 最大 \sim 最小)で、水槽試験の塩分は33.4 \sim 33.5, DOは6.7 \sim 7.0 mg/l, 水温は 25.3 ± 0.5 , $24.3 \sim 26.7^\circ\text{C}$, 漁場試験の地温は温度計故障のため測定できなかった。

曝露開始から曝露直後の生残は対照区が98.0%, 24時間区が95.7%, 36時間区が80.3%, 48時間区が21.7%と大量死があった。36, 48時間区とも対照区や24時間区と比べ生残が低く、有意な差となった(Fig. 2a, Table 1a)。

各試験区の曝露直後の生残個体100個体(48時間区のみ65個体)を用いた31日間の水槽試験の生残は、36時間区と48時間区が曝露後1日目で生残が12.3%と13.0%と急速に低下し、曝露後6日目に生残0%となったため、この両区の生残の評価は行わ

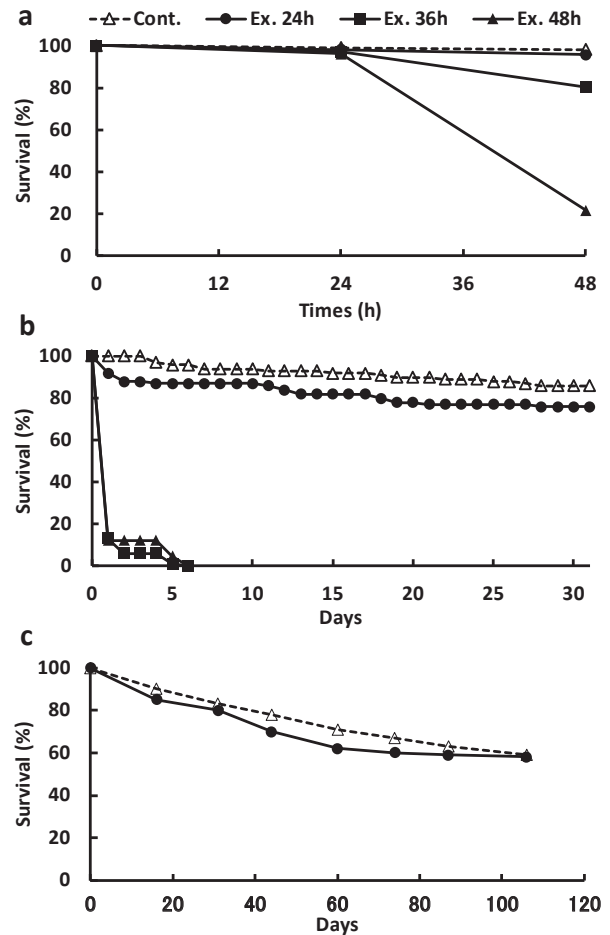


Fig. 2. Survival of Manila clam exposed to anoxic conditions for different time periods (a), post exposure survival in flow-through seawater system (b) and culture grounds (c). Results of statistical analyses are given in Table 1.

なかった。24時間区の生残は曝露後2日目までに88.0%と減少(対照区100%)したが、その後は対照区と同様に緩慢なへい死となり、試験終了時の生残は対照区86.0%, 24時間区76.0%となった。開始から終了時の生残では対照区と24時間区には差があったが、曝露の影響による急激な生残の低下がみられなくなった曝露後3日目以降から終了時までの生残曲線の比較では対照区と24時間区に有意な差はなかった(Fig. 2b, Table 1b)。

曝露後4日目の生残個体を用いた143日間の漁場試験の結果をFig. 2cとTable 1cに示す。開始から終了時の生残は、試験を実施できた対照区が59.0%, 24時間区が58.0%と有意差がなかった。

Table 1. Statistical comparison of the survival curves of the Manila clam shown in Fig. 2 with *log-rank* test

a

	Control	Ex. 24h	Ex. 36h	Ex. 48h
Control				
Ex. 24h	NS			
Ex. 36h	***	***		
Ex. 48h	***	***	***	

b

	Control	Ex. 24h
Control		
Ex. 24h	NS	

c

	Control	Ex. 24h
Control		
Ex. 24h	NS	

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

In (b), comparison was made only between the control and 24h exposure group for 3 to 31 days

2018年に行った無酸素曝露時の塩分は33.2, 試験水温は 27.3 ± 0.2 , $27.0 \sim 27.8^\circ\text{C}$ で, 水槽試験の塩分は33.4~33.9, DOは6.5~6.8 mg/l, 水温は 27.6 ± 0.5 , $26.6 \sim 28.6^\circ\text{C}$, 漁場試験の地温は 22.6 ± 4.3 , $13.0 \sim 31.7^\circ\text{C}$ であった。

曝露開始から曝露直後の各試験区の生残は対照区98.7%, 12時間区100%, 24時間区94.0%, 36時間区が88.0%となった。曝露開始から曝露後2日目までの各試験区の生残は対照区96.7%, 12時間区98.0%, 24時間区87.0%, 36時間区が70.3%で, 対照区と12時間区に対し24時間区と36時間区は有意な差があった (Fig. 3a, Table 2a)。

曝露後2日目の生残個体で開始した31日間の水槽試験 (90日間の漁場試験) の生残は対照区63.0% (63.0%), 12時間区61.0% (60.0%), 24時間区57.0% (58.0%), 36時間区54.0% (56.0%) となったが, 両試験とも試験区間の生残に有意な差がなかった。 (Fig. 3bc, Table 2bc)。

考 察

アサリの生理状態によって耐性が異なるが, 水温 28°C で炭水化物含量が30 mg/g (軟体部湿重量) 未

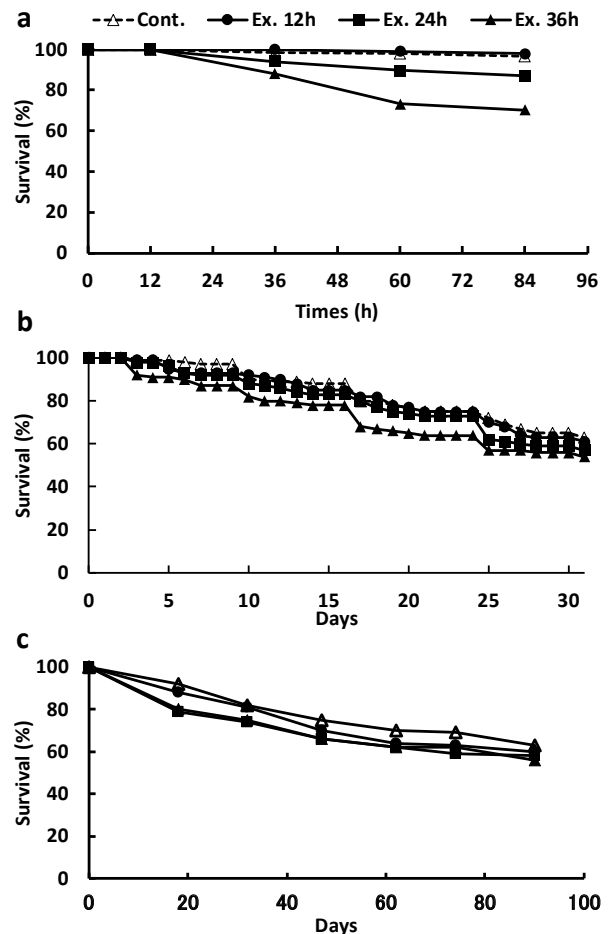


Fig. 3. Survival of Manila clam exposed to anoxic conditions for different time periods and after 48h (a), post exposure survival in flow-through seawater system (b) and culture grounds (c). Results of statistical analyses are given in Table 2.

満では48時間の無酸素曝露で半数以上へい死との知見¹⁷⁾がある。2017年の曝露試験では供試アサリの肥満度が13.0と「やや身が落ちていますが, 減耗が起きることは少ない。」とされる肥満度12.1~15.0²⁰⁾の範囲であり, 生理状態がそれほど悪い状態ではなかった。また, 曝露水温の 26.3°C と上記の知見より低かった。それにも関わらず, 48時間区では曝露直後の生残が21.7%の大量死となり, その生残個体も翌日には8割弱がへい死するなど無酸素48時間は急速にへい死数が増加する極めて致命的な環境であることが改めて確認できた (Fig. 2ab, Table 1a)。

36時間曝露については2017, 2018年の曝露直後および2日目の生残がそれぞれ対照区と比較して有意に低かったが (Table 1a, 2a), 2017年は曝露直後生残していた個体が1日目には12.3%

Table 2. Statistical comparison of the survival curves of the Manila clam shown in Fig. 3 with *log-rank* test

a				
	Control	Ex. 12h	Ex. 24h	Ex. 36h
Control				
Ex. 12h	NS			
Ex. 24h	***	***		
Ex. 36h	***	***	***	

b				
	Control	Ex. 12h	Ex. 24h	Ex. 36h
Control				
Ex. 12h	NS			
Ex. 24h	NS	NS		
Ex. 36h	NS	NS	NS	

c				
	Control	Ex. 12h	Ex. 24h	Ex. 36h
Control				
Ex. 12h	NS			
Ex. 24h	NS	NS		
Ex. 36h	NS	NS	NS	

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

まで急速に低下したのに対し、2018年は曝露開始～曝露後2日目70.3%と生残状況に大きな差があった (Fig. 2a, 3a)。2018年の曝露試験では供試アサリの肥満度が11.1と「身入が悪く、活力が低い。減耗が起きる可能性がある。」とされる肥満度8.1～12.0²⁰⁾の範囲であり、生理状態が2017年より不良であった上に、曝露水温も27.3℃と前年より高く、試験環境としては厳しい状況であった。しかし、生残状況としては2018年の方が曝露後2日目の生残が7割程度とあったことから、水温やアサリの生理状態以外の何かが生残に影響を与えたと思われるが、その要因は不明である。いずれにしても36時間の無酸素曝露は曝露後2日目までに3割程度またそれ以上のへい死を引き起こしたことから、26.3～27.3℃程度の水温では48時間曝露と同様に致死的な環境であると考えられた。

一方、2018年の36時間曝露後2日目の生残個体を用いた水槽と漁場試験では、それぞれ31と90日後、対照区と生残状況に有意な差がなく、36時間以内の無酸素では曝露直後生残に与える影響が残るものの、曝露後2日目の生残個体では影響が観

察されなかったことから、36時間無酸素曝露の障害によるその後の長期的影響はほとんどなかったと考えられた (Fig. 3bc, Table 2bc)。

24時間曝露については2017、2018年の曝露直後の生残が対照区と比較してそれぞれ有意差がなかったが (Table 1a, 2a)、2017年は水槽試験で開始2日目の生残が対照区100%に対して88%に低下した。2018年は開始3日後の生残が対照区99%に対し98%と差がなかった (Fig. 2a, 3a)。水温28℃での24時間無酸素曝露では曝露期間中ほとんどへい死する個体がないとされているが、36時間曝露中にへい死率が増加する例が観察¹⁷⁾されていることから、状況によっては24時間曝露でも一部の個体が生残を脅かす障害を受けると考えられ、その後有酸素となっても2日間程度は生理状態¹⁷⁾やその他の環境によってへい死する可能性があると考えられた。しかし、2017年は曝露障害によるへい死が収まった3日目以降の生残状況では水槽、漁場試験とも対照区と生残に有意差がなく、2018年も同様に有意差がなかったことから、曝露による障害の長期的影響はほとんどないと考えられた (Table 1bc, 2bc)。

12時間曝露については曝露後2日目、水槽と漁場試験の生残が対照区と比較していずれも有意差がなく (Table 2abc)、致死的な障害や長期的影響をいずれも受ける曝露ではなかった。

無(貧)酸素環境下、嫌氣的代謝の継続でアサリがどのような過程を経てへい死に至るかは未解明であるが、体内の酸性化²¹⁾やグルコース等貯蔵物質の有酸素下より大きな消耗²²⁾などの影響を受け、このような環境が長時間継続すれば、アサリの生残に影響を与えられられる。

今回の無酸素曝露後、有酸素の水槽や漁場でその後の生残を観察する試験では、無酸素曝露直後までの生残で環境耐性を評価した知見¹⁷⁾より、耐性が24時間以上短くなるようであった。この結果は例えば体内の酸性化²¹⁾などにより一部の体組織に致命的な障害を受けても、生死の判定に用いたアサリの閉殻反射は即座に停止しないこ

とから生存と判定され、これら致命的障害を受けた個体は Fig. 2b, 3a の 48, 36 時間区のように曝露後 1～2 日でへい死することにより生残が急減すると考えられた。

しかし、無酸素曝露後、2 日後の生残個体を用いた 2018 年の水槽、漁場試験では 12～36 時間区と対照区で生残に有意差がなかったこと (Table 2bc), 2017 年の曝露後 3 日以降の水槽試験と漁場試験の生残で 24 時間区と対照区で有意差がなかった (Table 1bc) ことから、致死的な影響は、低塩分曝露の 1 週間程度²³⁾と異なり、2 日程度の短期間に留まると評価された。

また、水温 25℃で 3 日間の無酸素曝露を施し、グリーンコーゲン生産や濾水機能などが修復不能な障害を受け死に至る知見¹⁸⁾と異なり、今回の 36 時間以内の無酸素曝露後 3 日目以降の生残個体では、31 日間の水槽試験や 90～106 日間の干潟のアサリ養殖漁場で、未曝露の対照区と生残状況に有意な差がなく、修復不能な後遺障害を受けていなかったと考えられた。

さらに、試験水温 28℃、低い生理状態では 48 時間無酸素曝露直後までに半数以上へい死との知見¹⁷⁾があり、今回の水温 26.3℃で行われた 48 時間曝露終了時生残 21.7%、翌日には 2.7%とほぼ全滅であったことから、高温となる夏季の干潟養殖漁場では無酸素 48 時間では「後遺障害¹⁸⁾」を受ける間もなく、即座にへい死する可能性が高いと推察された。

これらのことから、夏～秋季の数ヶ月にわたる漁場でのアサリの緩慢なへい死については、低塩分曝露²¹⁾とは異なり、無(貧)酸素が単独で関与し、引き起こされる可能性は低いと示唆された。

よって、養殖漁場でのアサリの数ヶ月にわたる夏～秋季の緩慢なへい死対策のための要因解明については、今回の無(貧)酸素、低塩分²³⁾以外の高温、赤潮、産卵や餌不足による衰弱などの影響を室内試験などで調べるとともに、その複合的要因の関与について養殖漁場現場の環境観測とアサリのへい死状況の継続的なモニタリングによって明らかにする必要があり、今後の課題である。

最後に、アサリなどの二枚貝の環境耐性試験を行う際は、低塩分曝露²³⁾でも言及したが、曝露環境のみならず、曝露時間とその後の影響についてよく検討し、無(貧)酸素では曝露後 3 日以上、できれば 1 週間程度は生残状況を観察する必要があると考える。

謝 辞

本試験を行うにあたり調査の実施や試料の採取などにご協力をいただいた長崎県諫早湾漁業協同組合の職員と漁業者の方々に心からお礼申し上げます。また、論文の作成にご指導をいただいた水産研究・教育機構 水産技術研究所 環境応用部門 沿岸生態システム部長 渡部諭史博士と資料の解析に協力をいただいた総合水産試験場の水田浩二博士に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 松田正彦, 鶴田政文. 区画管理された客土覆砂漁場でのアサリ養殖漁業 小長井町漁業協同組合の取り組み. アクアネット 2015 ; 202 : 47-50.
- 2) 松田正彦, 平野慶二, 北原茂, 石田直也. 諫早湾貝類の漁場有効利用技術開発 (アサリ). 平成 24 年度長崎水試事報 2013 ; 89-91.
- 3) 松田正彦, 平野慶二. 諫早湾貝類の漁場有効利用技術開発 (アサリ). 平成 25 年度長崎水試事報 2014 ; 90-92.
- 4) 松田正彦, 高見生雄, 木村和也. 諫早湾貝類の漁場有効利用技術開発 (アサリ). 平成 26 年度長崎水試事報 2015 ; 83-85.
- 5) 松田正彦, 高見生雄, 木村和也. 諫早湾貝類の漁場有効利用技術開発 (アサリ). 平成 27 年度長崎水試事報 2016 ; 74-75.
- 6) 松田正彦, 木村和也. 諫早湾貝類の漁場有効利用技術開発 (アサリ). 平成 28 年度長崎水試事報 2017 ; 77-78.
- 7) 松田正彦, 木村和也. 諫早湾貝類新增養殖技術開発 (アサリ). 平成 29 年度長崎水試事報

- 2018 ; 77-78.
- 8) 松田正彦, 木村和也. 諫早湾貝類新增養殖技術開発 (アサリ). 平成 30 年度長崎水試事報 2019 ; 60-61.
- 9) 松田正彦, 木村和也. 諫早湾貝類新增養殖技術開発 (アサリ). 令和元年度長崎水試事報 2020 ; 54-55.
- 10) 松田正彦. アサリ養殖漁場における夏季大量へい死要因の検討. 長崎水試研報 2021 ; 46 : 39-140.
- 11) 村地四郎, 古川哲三. 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 1958 ; 6 : 35-40.
- 12) 日向野純也. 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 2005 ; 別冊 3 号 : 27-33.
- 13) 倉茂英次郎. 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 1942 ; 1 : 123-132.
- 14) 柿野純. 青潮によるアサリへい死原因について 貧酸素水および硫化物の影響. 千葉水試研報 1982 ; 40 : 1-6.
- 15) 萩田健二. 貧酸素水と硫化水素水のアサリへのい死に与える影響. 水産増殖 1985 ; 33 : 67-71.
- 16) 中村幹雄, 品川明, 戸田顕史, 中尾繁. 宍道湖および中海産二枚貝 4 種の環境耐性. 水産増殖 1997 ; 45 : 179-185.
- 17) 松田正彦, 北原茂, 日向野純也, 品川明, 石松惇. 異なる時期に採集されたアサリ *Ruditapes philippinarum* の無酸素耐性と炭水化物含量の関係. 長崎水試研報 2013 ; 39 : 17-24.
- 18) 上月康則, 山中亮一, 松重摩耶, 齋藤梓, 岩雲貴俊, 石田達憲, 大谷壮介. 貧酸素によるアサリのろ水機能への後遺障害の関する研究. 土木学会論文集 B2 (海岸工学) 2011 ; 67 (2) : I_1006-I_1010.
- 19) 鳥羽光晴・深山義文. 飼育アサリの性成熟過程と産卵誘発. 日水誌 1991 ; 57 : 1269-1275.
- 20) 水産庁. 干潟生産力改善のためのガイドライン. 水産庁, 東京, 2008.
- 21) Hochachka, P. W. 二枚貝におけるグルコースとアミノ酸分解代謝の共役. 低酸素適応の生化学 (橋本周久・阿部宏喜・渡部終五訳). 恒星社厚生閣, 東京. 1984; 40-54.
- 22) de Zwaan, A. (1983) Carbohydrate catabolism in bivalves. In "The Mollusca, vol. I", (ed. by P. W. Hochachka), Academic Press, New York. 1983; 137-175.
- 23) 松田正彦, 平野慶二. アサリの低塩分曝露後の影響について. 長崎水試研報 2019 ; 44 : 7-13.