

瀬戸内市牛窓地先におけるイタボガキ繁殖試験

清水泰子・山野井英夫

Reproduction of Densely Lamellated Oyster *Ostrea denselamellosa* in Ushimado Setouchi City

Yasuko SHIMIZU and Hideo YAMANOI

キーワード：イタボガキ，再生産，PCR

イタボガキ *Ostrea denselamellosa* は、瀬戸内海に多く生息し食用とされていた^{1,2)}が、現在は減少してほとんど見られない。本種は大型食用種であることと、その希少性から、高付加価値の有用二枚貝になる可能性を持つと考えられる。

イタボガキの人工的な増殖については数機関^{1,3)}で試みられており、岡山県水産試験場でも、2006年から'08年まで種苗生産技術開発に取り組み、数万個程度の種苗生産が可能となっている⁴⁾。しかし現在は親となる天然貝が極めて少ない状態であり、海域でイタボガキの増殖を図るためには、人為的な親貝の供給が必要と考えられた。このため、現在までに生産した貝を親貝とし、海域での再生産を確認するべく、試験を行ったので報告する。

方 法

親貝の移植 '08年7月4日に、岡山県瀬戸内市牛窓町、岡山水試地先の保護水面内に親貝を移植した。試験場所と魚礁設置場所を図1に示した。移植親貝には、香川県水産試験場で人工生産された貝を親貝として'06年6月に岡山水試で生産した3年目のイタボガキを用いた。親貝を50個ずつ、大きさ820×570×428mm、目合い約11mmのプラスチックメッシュかご（サンテナー-B#150：三甲）に収容し、かご内部の底長辺に沿って、ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の殻（以下ホタテ盤）36枚を繋いだホタテ殻コレクターを、稚貝の付着基質として2本取り付け付けた。メッシュかごは8基使用したが、親貝の食害防止と、放出された浮遊幼生の滞留を図るため、うち2基には各側面に直径10mmの穴を合計162個開けたプラスチック板を、別の2基には同様の穴を108個開けた板を貼り付けた（以下、この条件はプラ多区、プラ少区と表記する）。双方とも、上下面には穴を開けなかつ

た。また、別の2基には目合い10mmのトリカルネット（トリカル N24：タキロン）を全面に1枚ずつ、残りの2基には、同ネットを全面に4枚重ねて取り付け付けた（以下、この条件はネット1区・ネット4区と表記する）。それぞれの試験区の移植かごの素材を図2に示した。

試験かごの埋没や流失を防ぐため、試験場所に設置さ

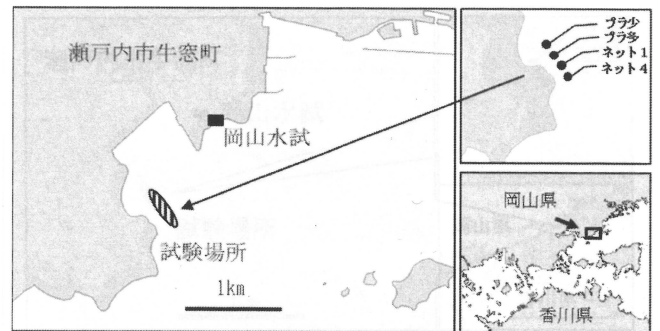
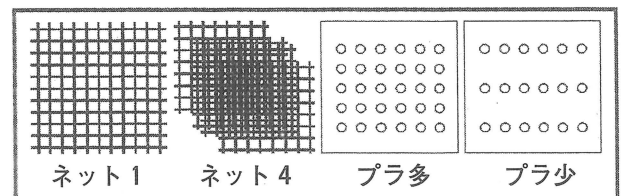


図1 試験場所と魚礁設置場所



*内側に貼り付け

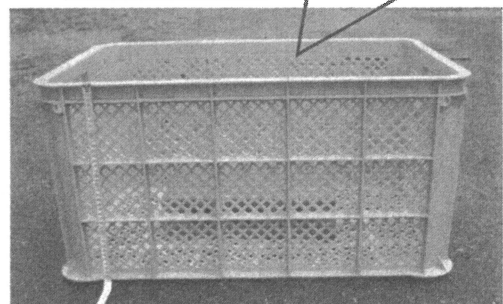


図2 移植かごの素材

れた魚礁を利用した。試験場所には、直径約3m、高さ約1mのコンクリート魚礁が岸に沿って設置されており、メッシュかごをロープでくくりつけて固定した。魚礁は、2列の線状に25基並んでおり、そのうち岸側の1列の隣り合う4基の魚礁に、同区のかごを2基ずつ取り付け付けた。設置場所の水深は約4m、底質は砂を含む軟泥質であった。

種判別用プライマー カキ類の稚貝は、外見から種を判別することが困難なため、PCRによる種判別法を検討した。日本近海で比較的普通に見られるカキ類などから、イタボガキを判別できるプライマーセットを設計した。日本 DNA データバンク (DDBJ) ホームページから、イタボガキ (Accession Number: AF137043), マガキ *Crassostrea gigas* (Z29546), イワガキ *Crassostrea nippona* (AB110095), シカメガキ *Crassostrea ariakensis* (AF137052), ヨーロッパヒラガキ *Ostrea edulis* (AF137047) の28SrRNA 遺伝子の部分塩基配列データを取得した。配列の比較は、フリーソフト CLC Free Workbench (CLC bio A/S) を使用し、イタボガキに特異的な部分を選択してプライマーを設計した。また、イタボガキの閉殻筋から DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) で DNA を抽出し、PCR を行って上記プライマーセットの有効な温度条件を明らかにした。

本プライマーの特異性を確認するため、マガキ5個体、イワガキ2個体、コケゴロモガキ *Ostrea circumpictai* 2個体、ケガキ *Saccostrea kegaki* 2個体、およびイタボガキ4個体の閉殻筋の一部を切り出して前述の方法で DNA 抽出と PCR を行った。

採水と幼生の採取 かごの内部から海水を採取するために、かごにビニールチューブをあらかじめ取り付け付けた。かごを固定した4基の魚礁に、ロープでブイを設置し、メッシュかごの上面中央部から、直径6mmのビニールチューブをかごの中央部に届くように刺し込み、逆端をブイに固定した。採取装置の模式図を図3に示した。7月23日と8月1, 17日、及び9月1日に、チューブに10mlのプラスチックシリンジを接続して、かご内部からそれぞれ2lの海水を採取した。なお、最初の20mlは廃棄してチューブ内の海水を除いた。また、かごを設置した魚礁に隣接する地点で、海底から50cmの水深で採水を行った。各かごから採取した海水1lを目合い45 μ mのナイロンメッシュで吸引濾過し、実体顕微鏡下でメッシュ上に残った二枚貝の浮遊幼生を選別してエタノール固定し、種判別作業まで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。また、残りの1lと、かご外で採水した海水のクロロフィルa量を測定した。

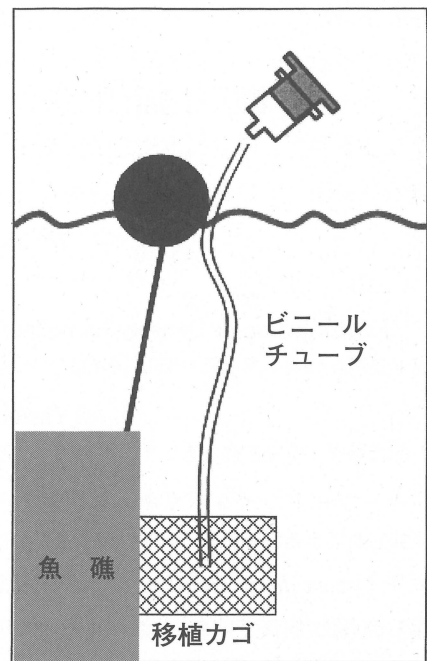


図3 採取装置の模式図

二枚貝幼生の PCR は、既報⁹⁾を参考に行った。エタノール固定した各かごの二枚貝幼生を、1から6個体ずつ、出来る限りエタノールを含まないように200 μ l PCR チューブに取り分け、開封したまま80 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートして乾燥させた。乾燥後の幼生をそのまま鋳型として、前述の PCR を行ってイタボガキ稚貝の有無を調べた。

付着稚貝の種判別 '09年2月4日に設置したかごを引き上げ、ホタテ殻コレクター、親貝を回収した。コレクターに付着したカキ類の付着稚貝の個体数を計数し、かご、コレクター、親貝に付着した一部の稚貝を採取した。採取した186個の稚貝をただちに開殻し、閉殻筋の一部を切り出してエタノール固定して、-20 $^{\circ}$ Cで種判別作業まで保存した。エタノール固定した閉殻筋のうち151個から前述と同様に DNA 抽出を行い、設計したプライマーで種判別を行ってイタボガキ稚貝の有無を調べた。また、親貝の殻長と全重量を測定するとともに、生死を確認して生残率を算出した。

結 果

種判別用プライマー 温度条件を決定した後に、イタボガキ、マガキ、イワガキ、コケゴロモガキ、ケガキの DNA を鋳型として PCR を行った結果、イタボガキのみが陽性となったことから、瀬戸内海に比較的普通に見られるカキ類から、本法によりイタボガキを判別することが可能と分かった。プライマー配列を表1に、PCR 条件

を表2に示した。

採水と幼生の回収 浮遊幼生のPCR結果を表3に示した。全てのかごから4回採水を行い、合計131個体の二枚貝浮遊幼生を得た。これらをかごとくに数個ずつまとめて解析した結果、各日において数検体が陽性であった。

各区(2かごの平均)のクロロフィルa量を表4に、外を100とした各区の相対値の推移を図4に示した。クロロフィルa量は、すべての区で外よりも低かった。各区を比較すると、ネット1区が最も高く、ネット4区とプラ多区は同程度、プラ少区が最も低かった。

回収と種判別 各かご内に取り付けたホタテ殻コレクターに付着していたカキ類の平均個体数を図5に、ホタテ盤の様子を図6に示した。PCRの結果は、3個体が陽性であった。確認されたイタボガキ稚貝を図7に示す。各区の親貝の生残率を図8に、殻高と全重量の変化を図9に示した。殻高、全重量ともネット4区が最も小さく90.1mm、138.6g、殻高はプラ多区が最大で94.2mm、全

重量はネット1区が最大で148.3gであった。生残率は46.7~50.0%で大差なかった。

考 察

各区のクロロフィルa量は、岡山県のマガキ養殖の基準*からみると、少なめか普通であった。イタボガキの適正餌料量は不明だが、マガキと同様の方法で垂下飼育できる¹⁾ことから、この餌料量で十分生存可能だったと考えられた。クロロフィルa量は概ね遮蔽率が低いほど多くなっており、海水交換率を反映していると考えられた。また、各かごのコレクターへのカキ類付着稚貝数も海水交換率を反映していたと考えられた。3年貝だったためもあり、親貝は全かごであまり成長せず、生残率にも差異は見られなかった。このことから、かごの側面加工は、餌量や流入してくる他の二枚貝幼生の数には影響を与えるが、親貝そのものに与える影響は大差なかったものと推測された。

表1 プライマー配列

Primer F	CGCAGGCTCGTTGTCGG-3'
Primer R	GCGCCTCCCGTCCGCTA-3' (179bp)

表3 浮遊幼生のPCR結果

区	カゴNo	日付				合計
		7/23	8/1	8/14	9/1	
ネット1	1	1	1	13	3	18
	2	3	8	0	1	12
ネット4	3	9	0	4	6	19
	4	6	0	4	7	17
プラ多	5	5	6	4	7	22
	6	0	11	7	1	19
プラ少	7	4	1	-	0	5
	8	3	3	5	8	19
合計		31	30	37	33	131

数字：幼生数 ■：PCR陽性の検体が含まれる区

表4 各区の平均クロロフィルa量の推移

区	日付			
	7/23	8/1	8/14	9/1
ネット1	2.80	1.60	2.94	5.61
ネット4	4.01	0.80	2.14	4.67
プラ多	1.34	1.20	2.67	4.01
プラ少	1.60	0.53	0.93	3.20
カゴ外	7.48	1.87	4.54	6.41

($\mu\text{g/l}$)

表2 PCR条件

反応液組成		温度条件	
Ex Taq Buffer	2.500 μl	94 $^{\circ}\text{C}$	2min
d NTPmixture	2.000 μl	94 $^{\circ}\text{C}$	30sec
Primer F	0.250 μl	63 $^{\circ}\text{C}$	30sec
Primer R	0.250 μl	72 $^{\circ}\text{C}$	30sec
TaKaRa Ex Taq Hot Start Version	0.125 μl	72 $^{\circ}\text{C}$	5min
template DNA	1.000 μl	4 $^{\circ}\text{C}$	∞
DW	19.375 μl		
total	25.000 μl		

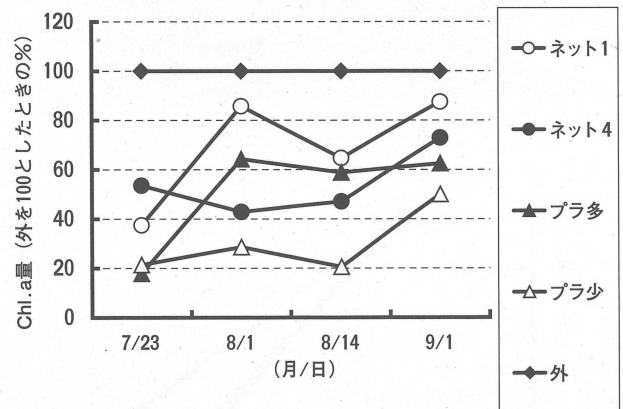


図4 外を100としたときの各区の相対値の推移

*岡山県水産試験場 HP クロロフィルa情報

かご内で採取した浮遊幼生にイタボガキが含まれていたことから、移植した親貝はかご内で幼生を放出していたと考えられた。試験場所は、岡山水試地先海面のイタボガキ飼育筏から約750mしか離れておらず、幼生が浮遊してきた可能性も考えられたが、外部からの海水流入が多いと考えられるネット1区と、他の区でイタボガキと思われる幼生が含まれる検体数に差が無く、外部から流入してきたのであれば、海水交換の良い区に多くなると考えられることから、PCRの陽性反応は、内部の親貝か

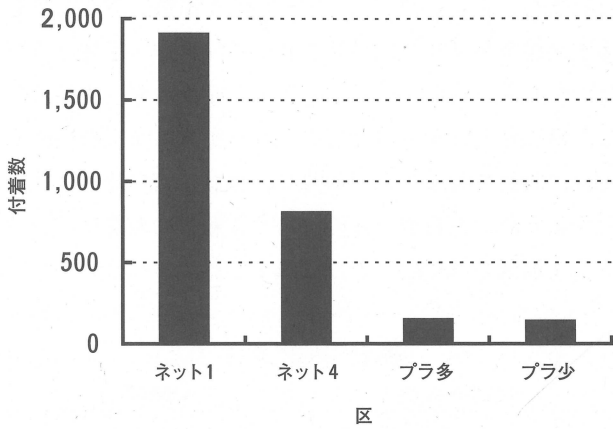


図5 区ごとの平均個体数

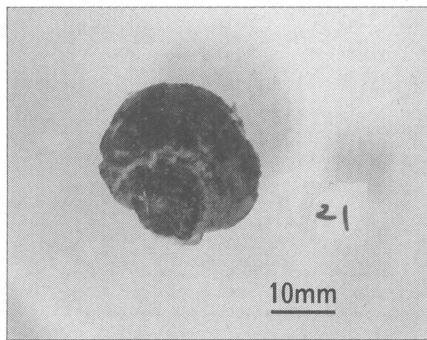


図7 イタボガキ稚貝

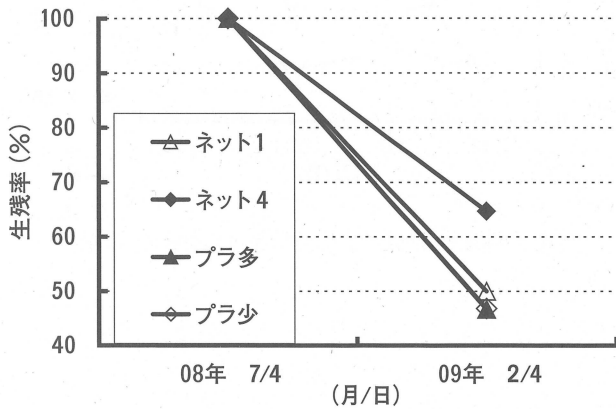


図8 各区の親貝の生存率

ら放出されたイタボガキの幼生を捕らえた可能性が高いと推察された。しかし、遮蔽率の高いかごにイタボガキの幼生が多い訳ではなかったことから、本試験での各区の条件は、浮遊幼生の滞留に影響を与えたものの、その程度はどれも同程度だったと考えられた。

イタボガキと考えられる稚貝は、ネット1区で2個体、プラ多区で1個体が、それぞれ親貝に付着していた。漁業者からの聞き取りによると、イタボガキは、互いに固着して塊状で漁獲されることが多かったというが、イタボガキの殻に付着基質としての優先性があるのかどうかは不明である。イタボガキの浮遊幼生は、付着までに約4週を要する⁹⁾。この間、天然の状態では一点に留まることは少ないであろうが、本試験では僅かでも留まらせることが出来た。

本試験では、移植したイタボガキ親貝が正常に幼生を放出すること、その幼生が付着稚貝まで成長することな

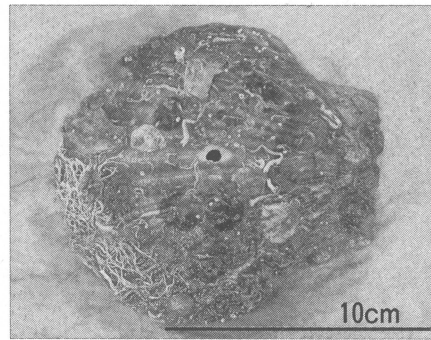


図6 ホタテ盤の様子

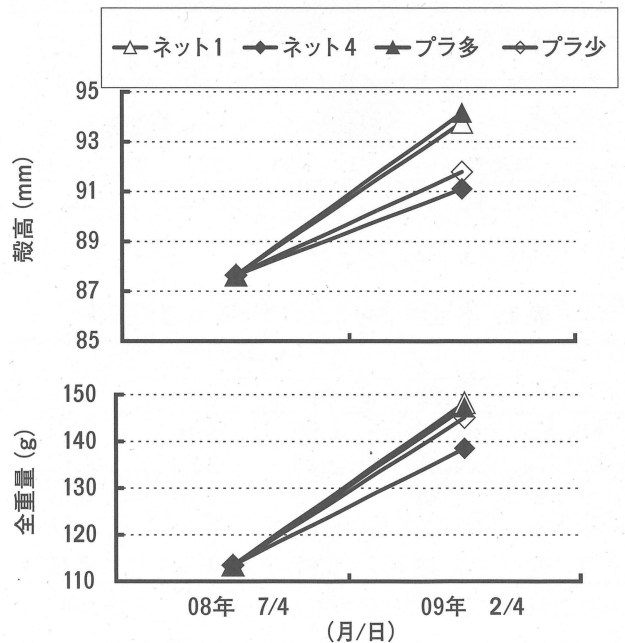


図9 各区の親貝の殻高と全重量の変化

どが確認できた。これらのことから、親貝の移植によるその場での繁殖が一応確認できたと言えるが、効率は低く、方法については、さらに検討する必要がある。

文 献

- 1) 山賀賢一, 2006: イタボガキ種苗生産・養殖試験, 香川水試事報, 6, 64-68.
- 2) 兵庫県水産試験場, 1958: 兵庫県における浅海増殖の歩み, 兵庫県, 3-9.
- 3) 平川千修・中川彩子・日高 愛, 2006: 浅海増殖に関する研究
- 4) 清水泰子, 杉野博之, 植木範行, 2009: イタボガキの種苗生産, 岡山水試報, 24, 44-48.
- 5) M. HOSOI, S. HOSOI-TANABE, H. SAWADA, M. UENO, H. TOYOHARA, and I. HAYASHI, 2004: Sequence and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the large subunit rRNA gene of bivalve: Simple and widely applicable technique for multiple species identification of bivalve larva, *Fish Sci*, 70, 629-637.
- 6) 妹尾秀實, 1929: 板甫牡蠣ノ発生, 水産講習所試験報告, 24, 161-169.