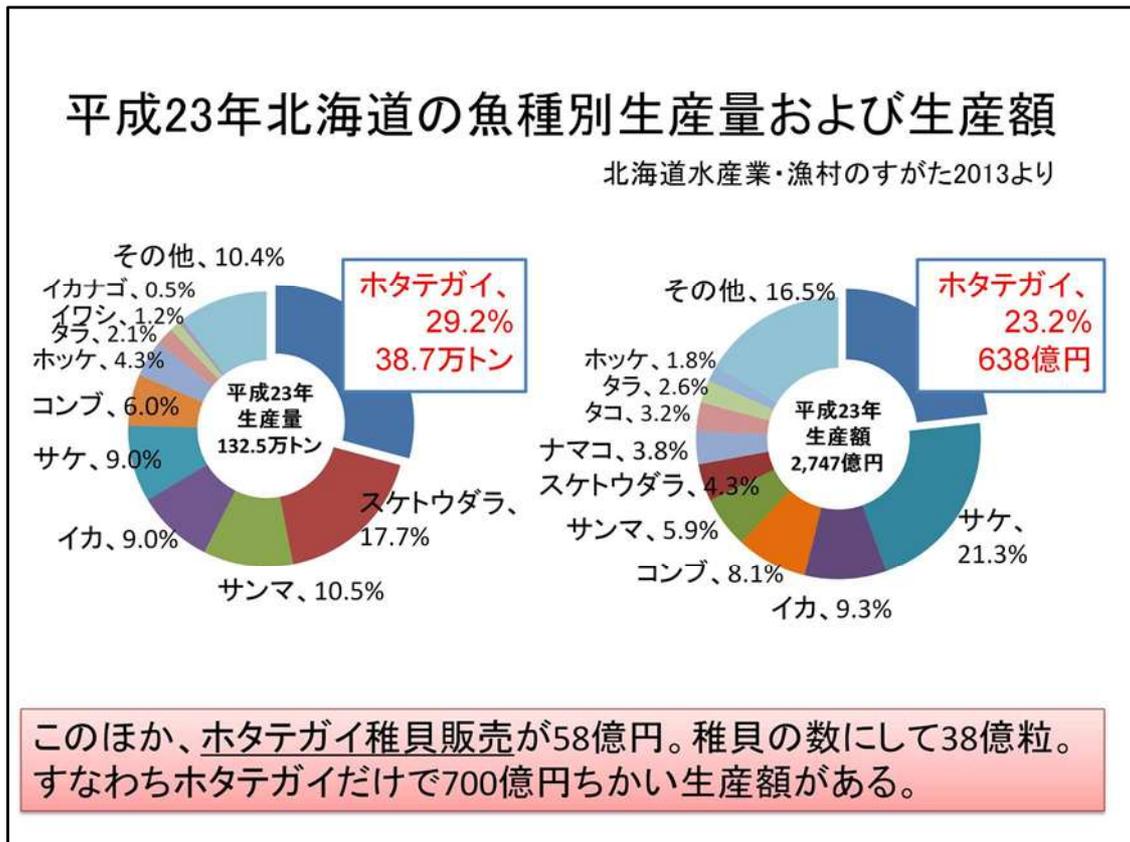




- 地方独立行政法人 北海道立総合研究機構 水産研究本部 栽培水産試験場 ホタテガイ幼生判別技術グループ 清水です。
- このたびは、全国場長会長賞という名誉ある賞を受賞することができ、大変うれしく思っております。
- では、免疫染色法を応用したホタテガイ幼生判別技術の開発について、その概要を説明します。



まず本研究で対象としたホタテガイの北海道における漁業の現状について説明させていただきます。

- ホタテガイは北海道の基幹産業であり、平成23年には年間約39万トンの生産量があり、北海道の漁業生産量の約30%を占めています。
- ほたてがい漁業は、北海道の漁業生産額の約23%を占める638億円に加え、ほたてがい漁業に必要な稚貝の販売を含めると約700億円の巨大な産業となっています。

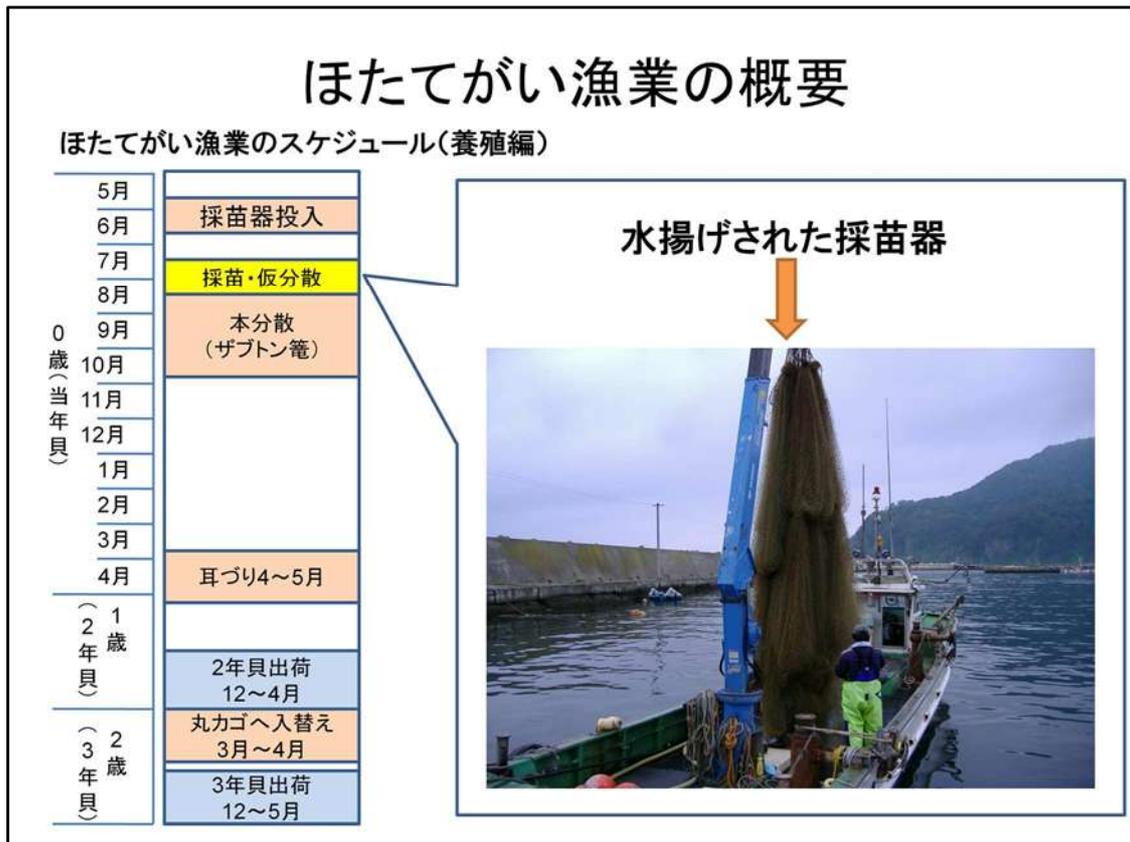
## ほたてがい漁業の概要



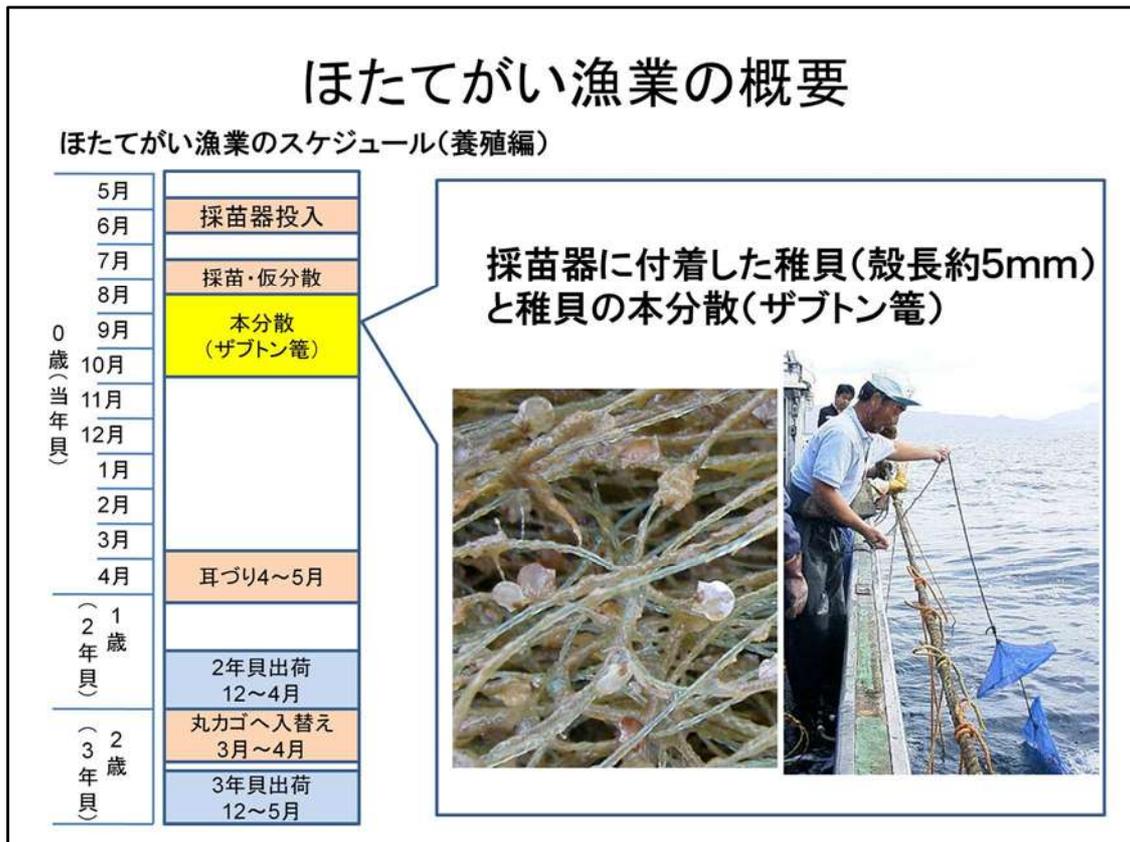
ホタテガイ養殖漁業

- ・**ほたてがい桁網漁業**  
主にオホーツク海で営まれる。  
八尺と呼ばれる桁で漁獲。  
稚貝を放流してから3～4年後に  
漁獲する。
- ・**ほたてがい養殖業**  
主に噴火湾や日本海で営まれる。  
ホタテガイの耳状部をロープに  
固定して養殖施設に垂下する。  
稚貝の耳づりをしてから1～2年  
後に出荷される。

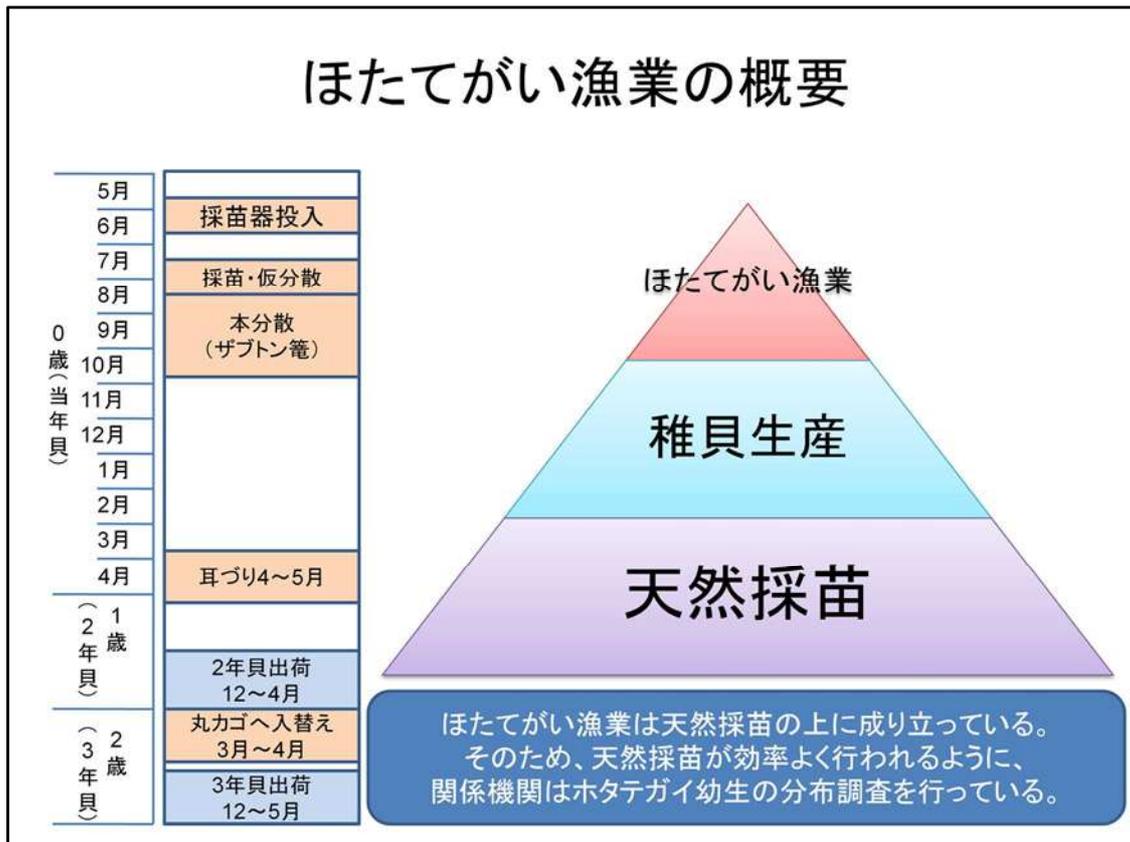
- この巨大なほたてがい産業は、主にほたてがい桁網漁業とほたてがい養殖業の2つの漁業により営まれています。
- ほたてがい桁網漁業はホタテガイの稚貝を漁場に放流し、3年から4年後に桁網を用いて漁獲する漁業で、主にオホーツク海で行われています。
- ほたてがい養殖業は写真のようにロープに稚貝を耳吊りして海中で育て、1年から2年後に漁獲する漁業で、日本海や噴火湾で行われています。



- これらのほたてがい漁業は、どちらもホタテガイの稚貝を採集するところから始まります。このことを天然採苗といいます。
- ホタテガイの産卵期は4月から5月であり、ふ化した幼生は殻長0.3ミリメートルとなるころまで海中を遊泳しながら成長します。
- 幼生は、その後、付着物に付着して遊泳するのをやめ、底生生活を送るようになりますが、天然採苗は、ホタテガイ幼生が付着するという生態を利用して行います。
- 天然採苗ではまず、古い漁網を用いた天然採苗器を自然の海に投入して設置します。
- 採苗器を投入して約2カ月後の7月ころ、採苗器に付着したホタテガイ稚貝が数mmの大きさに成長したころに、海中に設置していた採苗器を引き揚げます。

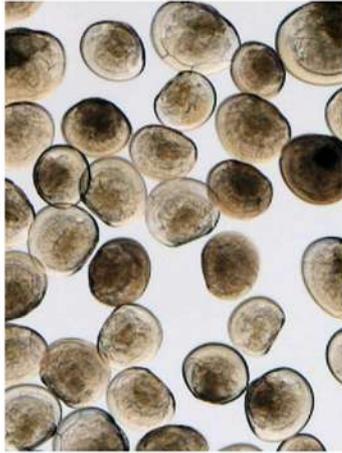


- 採苗器には、写真のように殻高5mm程度のホタテガイの稚貝が付着しています。
- このホタテガイの稚貝をたまねぎ袋や右の写真のような座布団かごに入れ、海中で約1年間、殻高約8cmの大きさまで育てます。
- ほたてがい漁業では、この育てられた稚貝を、桁網漁業では海中へ放流し、養殖業では耳吊りして漁獲・出荷まで育てます。



- このように、北海道の基幹産業であるほたてがい漁業は天然採苗により得られた稚貝を用いて行われているため、この天然採苗の善し悪しがほたてがい漁業に大きな影響を与えます。
- そこで、この天然採苗を効率よく行い、稚貝を安定的に得るため、ほたてがい漁業の関係機関では、ホタテガイ幼生の分布調査を行い、天然採苗器を海中へ投入する時期を決定しています。

## 関係機関および水産技術普及指導所による ホタテガイ幼生分布調査



プランクトンネットを用いて、  
海上の定点から二枚貝幼生を採集

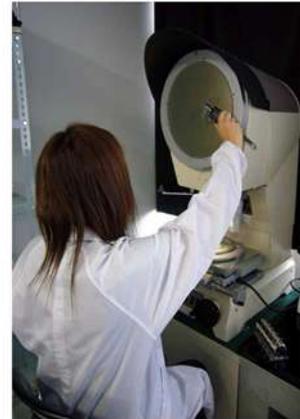


二枚貝幼生の中から、  
ホタテガイ幼生を貝殻の  
形により判別



多いときには1地点で  
1,000個体以上を観察

ホタテガイ幼生の大きさと  
数を調べる。



関係各機関が行っているホタテガイ幼生の分布調査について説明させていただきます。

- まず、海上の定点でプランクトンネットを用いて二枚貝幼生を採集します。
- この時期、さまざまな種類の二枚貝が産卵期を迎えているため、写真のように様々な二枚貝幼生が観察できます。
- この分布調査では、これら二枚貝幼生の中から、貝殻の形を基準にしてホタテガイ幼生を判別し、その大きさと数を測定することで、サイズ別に幼生の出現状況を調べています。
- 時には、1地点あたり1千から2千個体の幼生すべてに目を通し、ホタテガイ幼生の判別を行うこともあります。



## 幼生分布調査の問題点

採苗器垂下の時期は産卵後水中に後期の前期  
仔魚の出現時が理想であるが先づ蝶鉸直線仔魚が  
多数発見される時期なれば間違がない。佐呂瀨湖  
に於てはこの時期は五月下旬から六月二十日頃迄  
であり當時の中層水温は攝氏の七度から十度前後  
である。

「帆立貝の知識(北海道水産試験場(1936))」より

ほたてがい漁業が開始されて以来、幼生分布調査を行っている。

・ホタテガイ幼生の判別は形を基準にしている。

→経験豊富な人しか判別できない。技術が伝承しない。普及できない。

・幼生の出現密度の高い地域(噴火湾)では、1地点で1,000個体以上の幼生を一つ一つ判別する必要がある。

→多大な労力と時間を要する。

・幼生の出現密度の低い地域(日本海)では、1個体の誤判別が数値に影響する。

→高い判別精度が求められる。

誰でも簡単に精度良くホタテガイ幼生を判別できる技術が求められている。

- 左の切り抜きは、1936年に発行された「帆立貝の知識」という本の採苗器投入時期に関する文章です。
- このころからホタテガイ幼生の分布調査が行われており、ホタテガイ幼生を形で判断していることがうかがえます。
- このように70年以上に亘って行われているホタテガイ幼生分布調査ですが、様々な問題を抱えています。
- 先のスライドで示しましたように、本調査では様々な二枚貝幼生の中からホタテガイ幼生を形を基準に判別しています。
- しかしながら二枚貝幼生の形態は種間でもよく似ており、形を基にした判別では、経験豊富な人しかホタテガイ幼生を判別できません。また、判別の難しさからなかなか次世代へと技術が伝わっていきません。
- さらに、噴火湾のように二枚貝幼生の出現密度が高い地域では、1地点あたり数千もの二枚貝幼生すべてに目を通してホタテガイ幼生を判別したり、出現密度の低い地域では、1つの誤判別が、調査結果に大きな影響を与えることがあります。
- このようにホタテガイ幼生の分布調査は多大な経験・時間・労力を要する大変な調査でした。
- そのため、このホタテガイ幼生の分布調査をより効率よく行うため、「誰でも」「簡単に」「精度良く」ホタテガイ幼生を判別できる技術の開発が求められていました。

## 目 的

ホタテガイ幼生分布調査の効率化を図るため、  
「誰でも」「簡単に」「短時間で」「精度良く」  
ホタテガイ幼生を判別できる技術を開発する。

また、

現場への普及を図るため、現場で抽出された  
問題点に対する対策方法を明らかにし、

かつ、

普及しやすい技術へと改良する。

- そこで私どもはホタテガイ幼生の判別を「誰でも」「簡単に」「短時間で」「精度良く」行えるように、アサリやカキ類等で開発されている幼生の免疫染色技術を参考にして、ホタテガイ幼生を色で判別できる技術を開発すること、
- また、現場への普及を図るため、現場での実践から抽出された問題点の対策方法を開発し、普及しやすい技術へと改良を行こと、

を目的とし、研究を行いました。

## 抗体の作製

- 殻長160 $\mu$ mのホタテガイ幼生を抗原としてウサギおよびモルモットを免疫



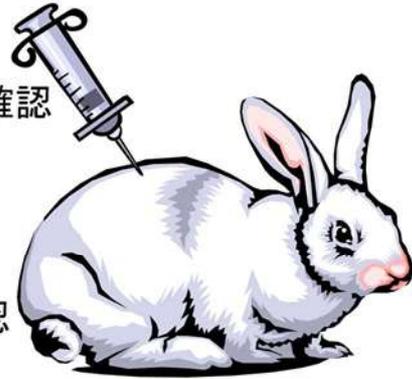
- 定期的な注射と採血および抗体価の確認



- 全採血により抗血清を採取

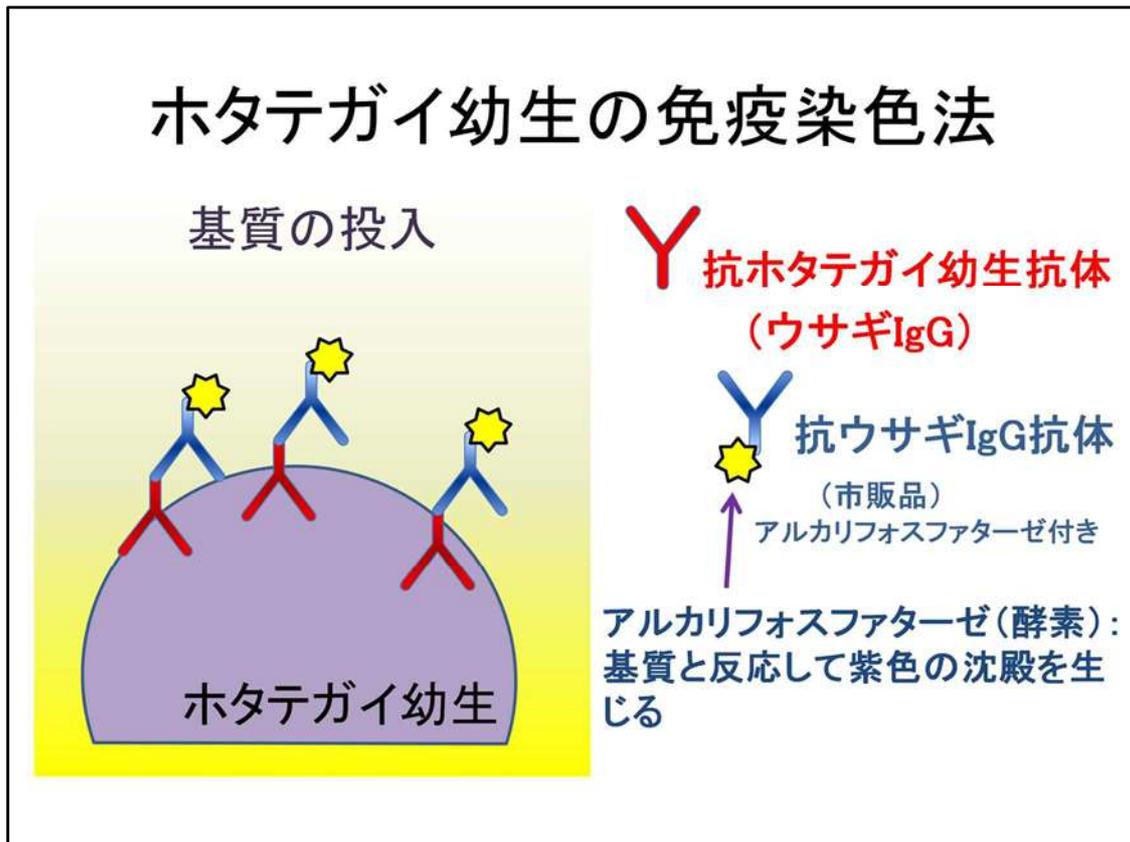


- 免疫染色を行い、抗体の特異性を確認



抗ホタテガイ幼生抗体の作製方法は「抗ホタテガイ幼生抗体作製マニュアル」としてとりまとめた。

- 私たちは、アサリやカキ類で用いられているモノクローナル抗体ではなく、ポリクローナル抗体を作ることになりました。理由は、モノクローナル抗体に比べ、作製に費用も労力も少なく済むと考えてのことでした。
- ホタテガイ幼生に対する抗体の作製に先立ち、殻長約160マイクロメートルのホタテガイ人工種苗を生産しました。これを集めて粉碎したものを抗原とし、ウサギおよびモルモットに注射しました。
- 抗原を注射した動物から定期的に採血を行い、抗体価のチェックを繰り返し、抗体価が高まったところで全採血により抗血清を採集し、これを抗体としました。抗体の作製方法については、「抗ホタテガイ幼生抗体作製マニュアル」に詳しく取りまとめました。



- 作製した抗体を用いたホタテガイ幼生の免疫染色方法の概要を説明します。
- 免疫染色には、赤で示しました今回作製した抗ホタテガイ幼生抗体と黄色で示したアルカリフォスファターゼが結合した青で示した二次抗体が必要となります。
- まず、ホタテガイ幼生と抗ホタテガイ幼生抗体を結合させます。
- 次にアルカリフォスファターゼが結合した二次抗体を抗ホタテガイ幼生抗体に結合させます。
- 最後に発色基質を投入すると、
- アルカリフォスファターゼにより抗ホタテガイ幼生抗体が結合したところだけに紫色の沈殿物が堆積します。
- これにより、抗ホタテガイ幼生が結合した幼生のみが紫色に染色されます。

## 抗体の特異性検証

噴火湾で得られた二枚貝幼生の免疫染色

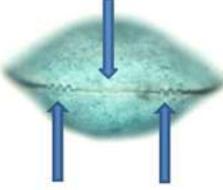
➔

免疫染色により染色された幼生とされなかった幼生を分離

➔

幼生の殻装を観察し、ホタテガイ幼生の判別

直線状の幼殻板



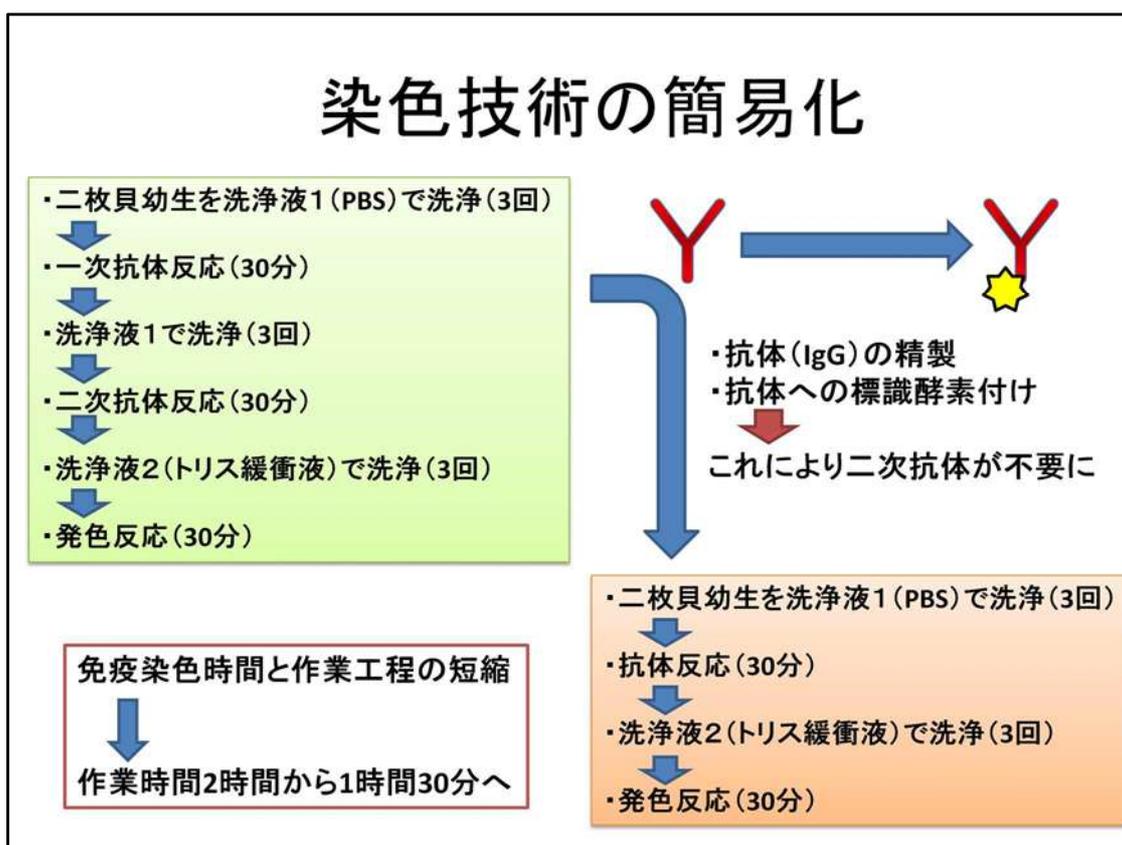
角形の幼殻歯

ホタテガイ幼生の特徴

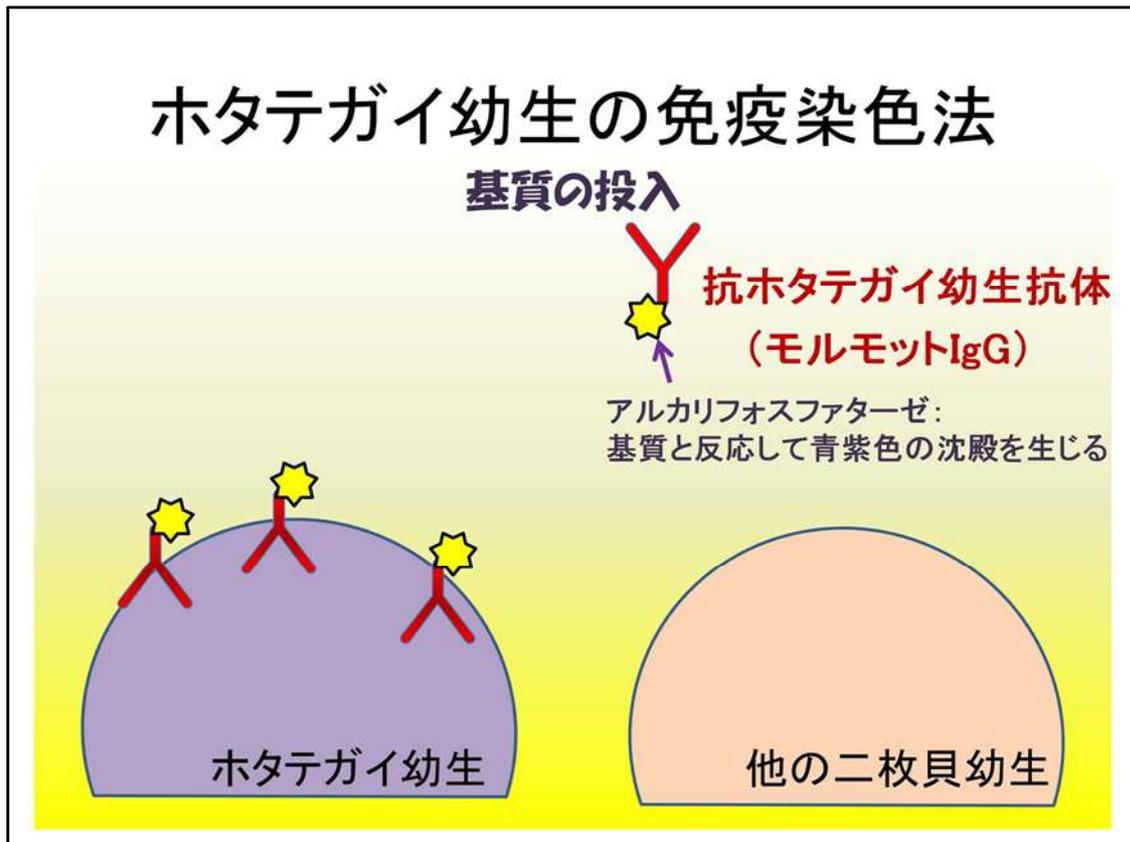
	染色の有無	観察数	ホタテガイ	ホタテガイ以外
ウサギ抗体1	○	256	255	1
ウサギ抗体2	×	248	1	247
ウサギ抗体1	○	131	124	7
ウサギ抗体2	×	76	0	76
モルモット抗体1	○	198	196	2
モルモット抗体2	×	86	0	86
モルモット抗体1	○	193	193	0
モルモット抗体2	×	104	0	104

ホタテガイ幼生の免疫染色方法は「ホタテガイ幼生の免疫染色マニュアル」としてとりまとめた。

- 次に、この抗体がホタテガイ幼生を特異的に認識しているかどうかを検証する必要がありました。
- そこで、噴火湾で得られた二枚貝幼生の免疫染色を行い、染色された幼生とされなかった幼生を分離し、それぞれの幼生の殻装を観察し、ホタテガイ幼生を判別しました。
- ホタテガイ幼生の殻装の特徴は写真のように、左右に角型の幼殻歯があり、その間に直線状の幼殻板が見られます。
- 免疫染色を行った後に、このように殻装の観察を行いました。
- その結果、ウサギ抗体1では、染色された二枚貝幼生256個体を観察した結果、255個体がホタテガイ幼生でした。
- 一方、染色されなかった二枚貝幼生248個体を観察した結果、247個体がホタテガイ幼生ではありませんでした。
- 他の抗体も同様の結果になりました。
- このように、作製した抗ホタテガイ幼生抗体はすべて、ホタテガイ幼生に対して高い特異性を持っていることが分かりました。
- これらの結果から、免疫染色法を応用したホタテガイ幼生判別技術が開発され、「ホタテガイ幼生の免疫染色マニュアル」を作成しました。

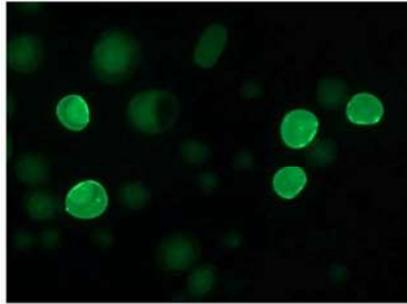


- さて、いったんでき上がったホタテガイ幼生免疫染色技術ですが、次は普及に向け、技術の簡易化をする必要がありました。
- これまでに説明した方法では、1次抗体の後に、アルカリフォスファターゼが結合した2次抗体を反応させるという工程がありました。
- しかし、工程をより簡単にするため、より成績の良かったモルモットの抗血清からイムノグロブリンG (IgG) を精製し、直接アルカリフォスファターゼを結合させました。
- これにより、2次抗体が不要になり、2行程減らすことで作業にかかる時間が約2時間から1時間30分へと短縮されました。



- 新しく簡易化した免疫染色法について説明します。
- まず、二枚貝幼生標本のうち、ホタテガイ幼生のみ抗ホタテガイ幼生抗体が結合します。
- この抗ホタテガイ幼生抗体にはすでにアルカリフォスファターゼが結合しているため、2次抗体反応が不要であり、
- 基質を加えると、
- 抗体が結合したホタテガイ幼生のみが紫色に染色されます。
- このように免疫染色工程が2工程、約30分省力化されました。

## 精製抗体の特異性検証



- ・ 免疫染色(蛍光色素を使用)
- ・ 染色された幼生とされなかった幼生を顕微鏡下で分離
- ・ 1個体ずつDNAを抽出
- ・ 16SリボソームRNA遺伝子の部分配列をPCRで増幅
- ・ シークエンサーにより塩基配列を決定
- ・ 既知の16SリボソームRNA遺伝子と比較し、種を決定

	染色あり	染色無し
ホタテガイ	114	0
エゾマテガイ	1	67
ムラサキイガイ類	0	2
キヌマトイガイ類	0	6
オオノガイ類	0	5
ザルガイ類	0	1

抗ホタテガイ幼生抗体の特異性の高さが再確認された

- 次に、染色方法を簡易化するため精製した抗体の、ホタテガイ幼生の判別精度をDNAレベルで検証しました。
- 今回は、後にDNA解析を行う必要があり、アルカリ処理するとDNAが壊れてしまうことからアルカリフォスファターゼによる発色は用いられないので、標識に緑色の蛍光色素を用いて免疫染色を行いました。
- 免疫染色の結果、左上の写真のように抗体が結合した二枚貝のみが緑色に染色されます。
- この染色された幼生とされなかった幼生を分離し、それぞれの幼生1個体ずつからDNAを抽出しました。
- このDNAの16SリボソームRNA遺伝子の部分配列をPCRにより増幅した後、シーケンサーを用いて塩基配列を決定し、幼生の種を特定しました。
- その結果、染色された二枚貝幼生115個体のうち、114個体がホタテガイ幼生でした。残りの1個体はエゾマテガイでした。
- また、染色されなかった二枚貝幼生81個体はすべてホタテガイではありませんでした。中でも67個体はエゾマテガイでした。
- この結果から、精製した抗ホタテガイ幼生抗体もホタテガイ幼生を特異的に染色でき、特異性が高いことが示されました。

## 染色技術の簡易化



免疫染色に用いる試薬類をキット化  
試薬類は4種類のみ。

- ・洗浄液1 (PBS)
- ・抗体溶液
- ・洗浄液2 (トリス緩衝液)
- ・発色基質

点眼用容器を用いて、作業も簡易化



操作は  
溶液の出し入れと

ローテータを用いた  
攪拌のみ



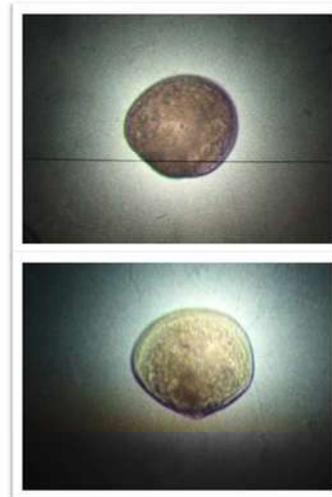
1時間から1時間30分で染色が完了する。

- このように、ホタテガイ幼生の判別精度が確認された抗体を用いて、現場で使えるレベルまで免疫染色法を簡易化するため、道総研栽培水産試験場で試薬類をキット化しました。
- 免疫染色の反応は、右の写真のようなチューブを用いて行います。
- キットは、洗浄液1、抗体溶液、洗浄液2、発色基質の4つの試薬だけで、それぞれドロップボトルや点眼容器を使い、試薬をチューブに入れやすくしました。
- また、チューブの試薬の除去はパスツールピペットやアスピレーターを使うことで容易に行えます。
- 基本的に、免疫染色は試薬類の出し入れと、抗体反応と発色反応のための攪拌だけの簡単な操作で行うことができ、
- 免疫染色工程は1時間から1時間30分で終了するようになりました。

## 免疫染色の結果



実体顕微鏡での観察  
ホタテガイ幼生は紫色に  
染色されている



万能投影機での観察  
上:ホタテガイ幼生(染色)  
下:その他二枚貝(非染色)

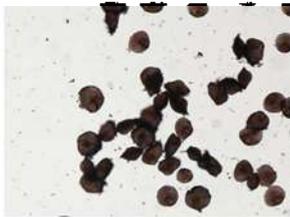
- この方法で免疫染色を行うと、写真のようにホタテガイ幼生が紫色に染色されます。
- これにより、今まで形基準でしか判別できなかったホタテガイ幼生が、色を基準に容易に判別できるようになり、だれでも判別できるようになりました。
- これまで使ってきた万能投影機での観察でも、右の写真のように、ホタテガイ幼生を色で判別可能です。

## 問題点の抽出と対策

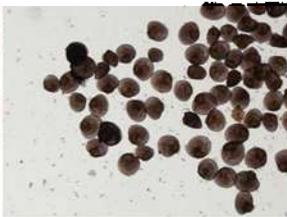
－水産技術普及指導所と共に－

### 免疫染色の注意点

- ・1%グルタルアルデヒド溶液を用いて3時間以上固定、もしくは、3%以上で30分間固定する。
- ・1サンプルあたり、二枚貝幼生の数は2,000個体以下
- ・免疫染色の反応温度は20℃以上
- ・染まりすぎる場合は、抗体反応時間を20分、発色反応を20分に短縮する。



1%濃度で30分間固定



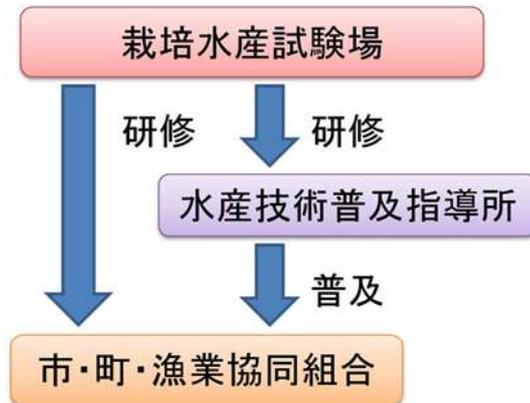
3%濃度で30分間固定



ローテーターは自作できる。

- 免疫染色技術を普及するに当たり、現場で使ってもらおうと、様々な問題点が抽出され、これらの対策法について、検討を行ってきました。
- 例えば、免疫染色の染め分けがうまくいかないことについて、
- 固定液は1%以上のグルタルアルデヒドを用いて、1時間以上固定することや、
- 抗体反応や発色反応を寒いところで行わない、
- また、発色が濃く感じるときには、抗体反応時間と発色反応時間を短くできる、
- さらに、写真のように、1%の固定液で30分間しか固定しないと、幼生同士がくっついて観察しづらくなりますが、固定液濃度をあげることにより、
- 幼生がばらばらになり、観察しやすくなるなど、
- 対策法が見出され、今では、各現場とも、見やすくホタテガイ幼生を染色できるようになりました。

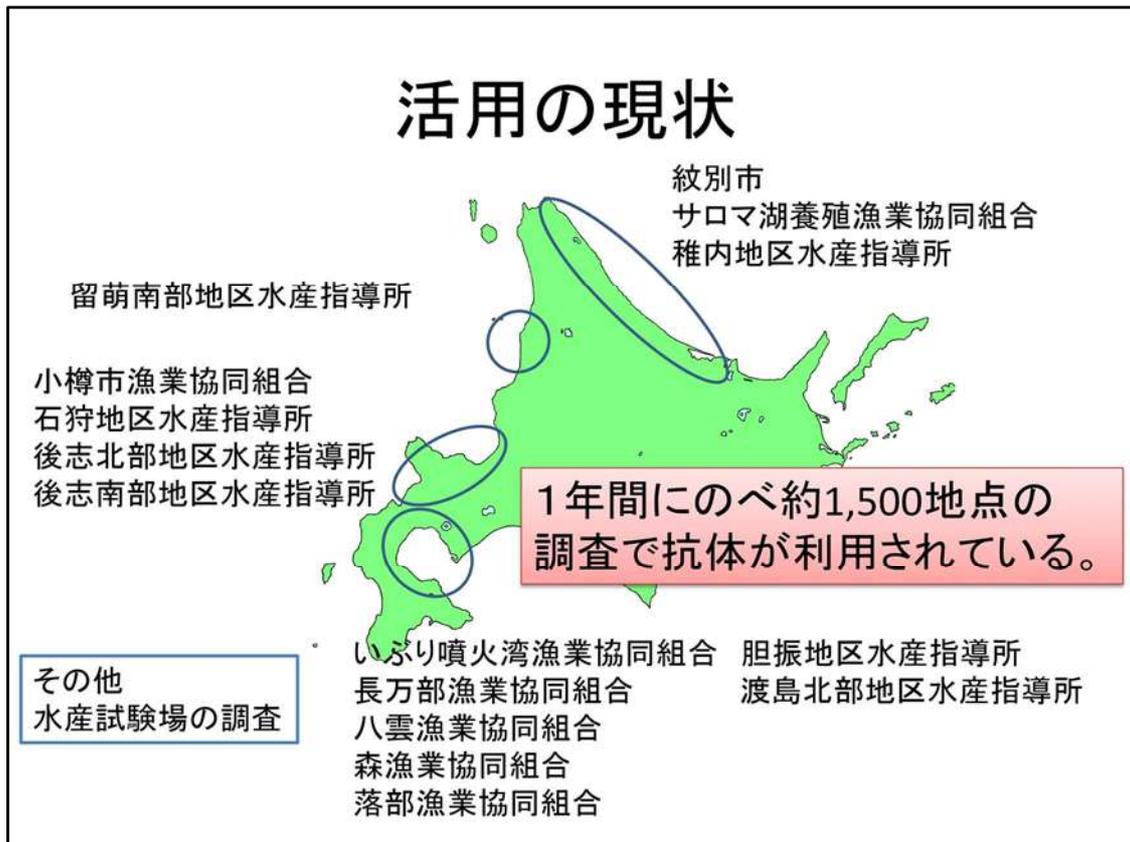
## 技術の研修・普及



### 研修実績

- ・全水産技術普及指導所(普及員研修)
- ・漁業協同組合(落部・森・八雲・長万部・小樽市・サロマ湖養殖・いぶり噴火湾・網走管内各漁協ホタテガイ担当者)
- ・紋別市、豊浦町

- これらの技術は、私ども栽培水産試験場から水産技術普及指導所やホタテガイ幼生分布調査を行っている市・町・漁業協同組合の多くの担当者へと研修を行い、また、水産技術指導所からも各機関へと普及されていきました。



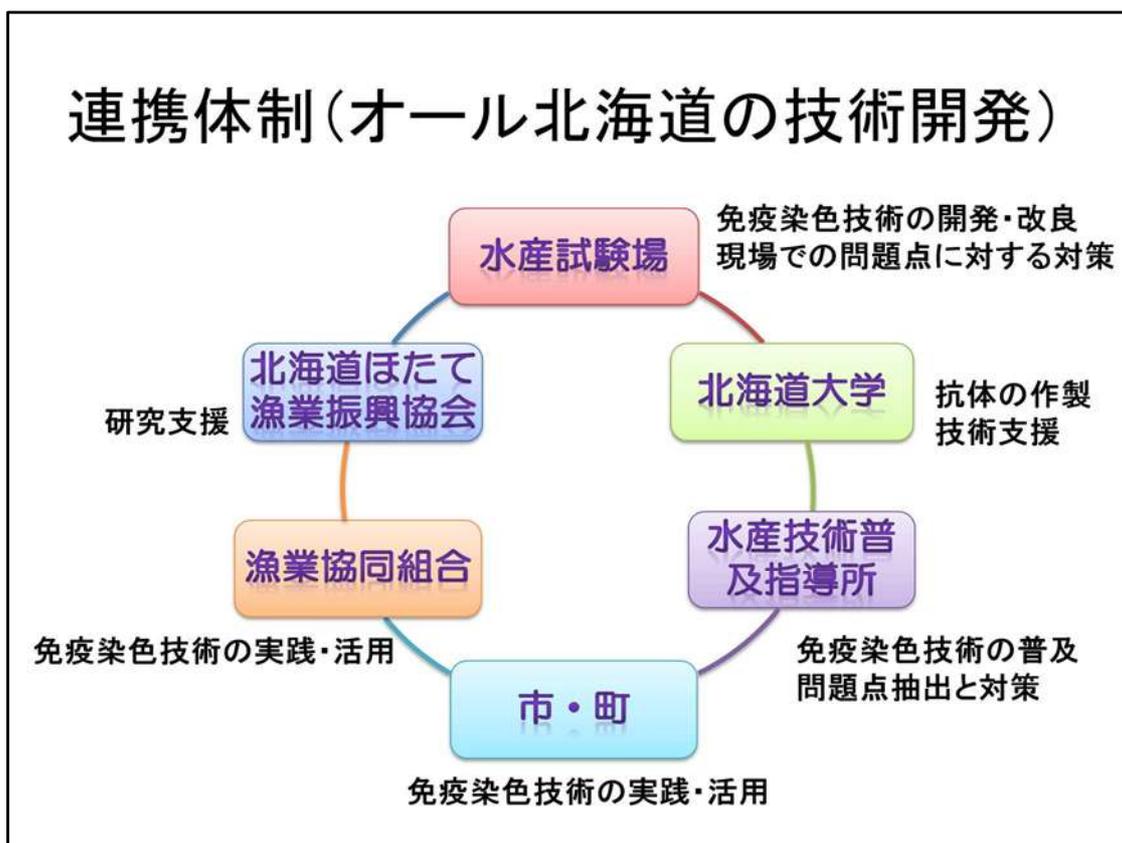
- これらの研修と、水産技術普及指導所による積極的な普及により、現在では、噴火湾におけるホタテガイ幼生調査のすべてに免疫染色が用いられているなど、全道の多くの機関で免疫染色を活用していただいています。
- 特に、各漁協では、若い職員がこの調査を担当できるようになりました。

## まとめ

- ホタテガイ幼生分布調査におけるホタテガイ幼生の判別を簡易化・効率化することを目的として、抗ホタテガイ幼生抗体を作製し、**免疫染色法を用いたホタテガイ幼生判別技術を開発した。**
- 本技術を用いることで、ホタテガイ幼生に色をつけることができ、誰でも簡単に高い精度でホタテガイ幼生を判別できるようになった。**判別基準が形から色へ！**
- 染色法の簡易化(キット化)および現場での技術改良により、作業時間が短縮され(例:噴火湾35地点3~4日→1~2日)、本技術が現場に即した技術となった。**速さと正確さの両立！**
- 水産技術普及指導所と共に普及を行い、**全道で活用されている。**

以上の取り組みをまとめますと、

- ホタテガイ幼生分布調査におけるホタテガイ幼生の判別を簡易化・効率化することを目的として、抗ホタテガイ幼生抗体を作製し、免疫染色法を用いたホタテガイ幼生判別技術を開発しました。
- これまで難しかったホタテガイ幼生の判別ですが、本技術を用いることで、ホタテガイ幼生を染色することができ、また、色を基準とすることで、誰でも簡単に判別できるようになりました。
- 染色されたホタテガイ幼生は、溶液を水道水に置換することで発色が止まり、水道水中で半永久的に保存することができます。
- また、作業の簡易化・効率化を図ることにより、染色方法も容易になり、現場に即した技術となりました。
- この技術開発により、分布調査の精度が上がったため、発生した幼生数に応じて漁業者が採苗器の投入数を調整できるようになるなど、天然採苗の効率が向上しました。その他、小型個体の判別精度も上がったため、大型個体が突然消失しても小型個体がいることが分かれば安心できるなど、天然採苗を長期的な視野で見られるようになりました。
- 本技術は、水産技術普及指導所と一緒に普及を行い、現在では、全道で活用されています。
- なお、本研究は2007年から取り組み、2011年には試薬類がキット化され、ここ数年は、現場からの問題点に対する試験を実施してきました。
- 血清は現状で10年分ほど保存しており、もし無くなれば、また抗原を作るところから抗体作製を行うことで対応します。



- 最後に、本研究の連携体制について説明させていただきます。
- 北海道の水産試験場では、北海道ほたて漁業振興協会の研究支援により、北海道大学とともに免疫染色技術の開発を行いました。
- この技術を、これまで長年に亘って培ってきたほたてがい漁業に関する連携体制の下、水産技術普及指導所とともに市・町・漁業協同組合に普及し、活用していただくことにより、問題点を抽出し、試験場と指導所と共に技術改良等を行い、現在に至っています。
- このように、北海道におけるほたてがい漁業にかかわる多くの機関が協力し合い、本技術が開発されました。
- この技術は、まさにオール北海道の技術といえます。
- このような技術の開発に対し、すばらしい賞をいただけたことは大変公栄と感じております。
- 以上で発表を終わります。
- 本日はありがとうございました。