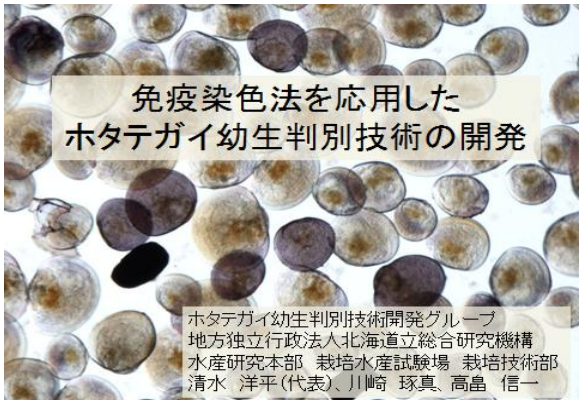
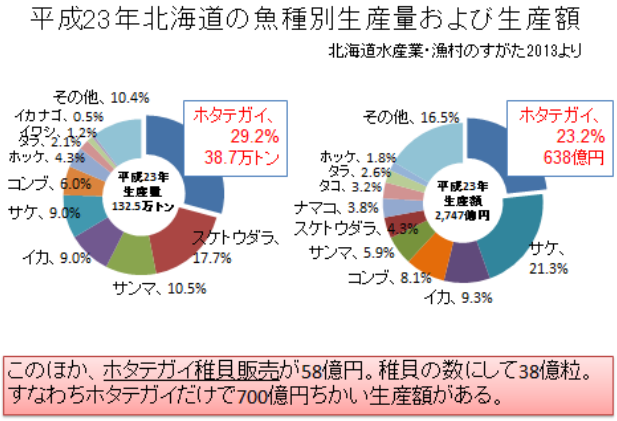
３）会長賞受賞記念講演

［北海道］「免疫染色法を応用したホタテガイ幼生判別技術の開発」
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　栽培技術部　清水研究主任



＜スライド 1＞

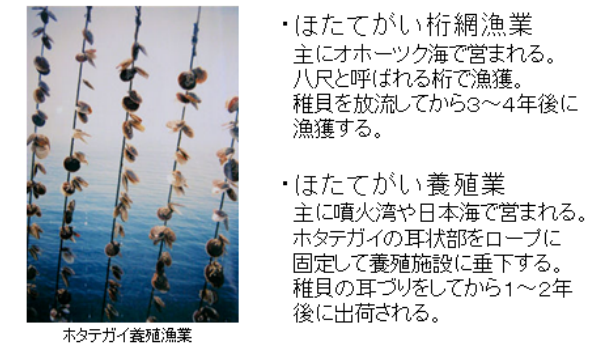
免疫染色法を応用したホタテガイ幼生判別技術の開発について、その概要を説明します。



＜スライド 2＞

ホタテガイは北海道の基幹産業で、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 23%、638 億円に加え、ほたてがい漁業に必須な稚貝の販売を加えると約 700 億円の巨大な産業となっています。

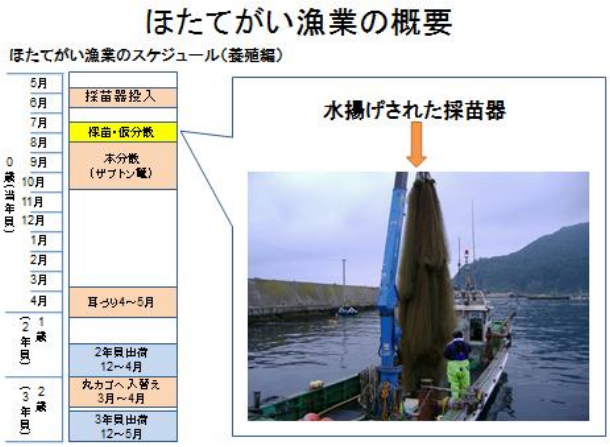


＜スライド 3＞

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営まれています。

ほたてがい養殖業はロープにホタテガイ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。



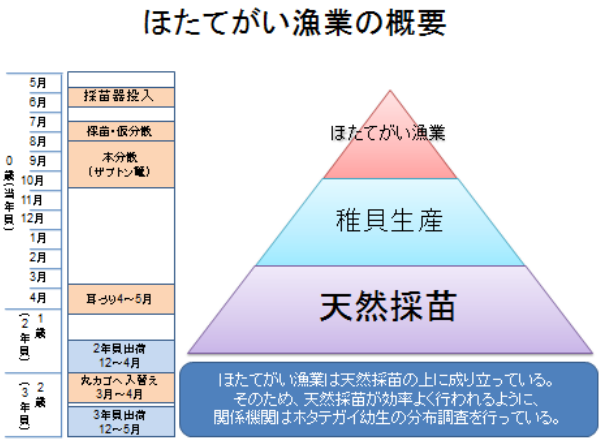
＜スライド 4＞

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。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 0.3mm 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、この天然採苗は、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、古い網を用いた天然採苗器を海に設置します。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。

＜スライド 5＞

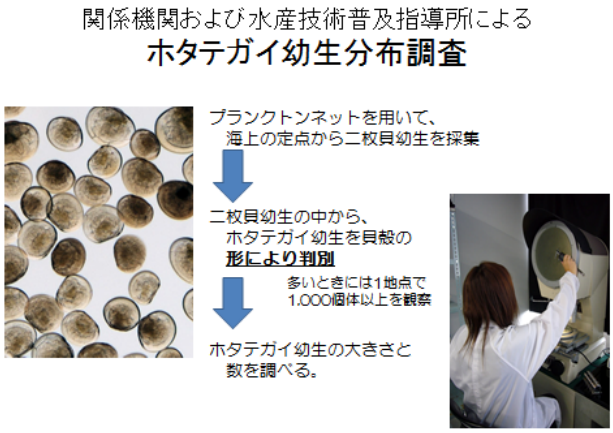
採苗器には、写真のように殻高 5mm 程度のホタテガイの稚貝が付着しています。このホタテガイの稚貝をたまねぎ袋や写真のような座布団かごに入れ、海中で約 1 年間、殻高約 8cm の大きさまで育てます。ほたてがい漁業では、この育てられた稚貝を、桁網漁業では海中へ放流し、養殖業では耳吊りを行い、漁獲・出荷まで育てます。



＜スライド 6＞

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、この天然採苗の良し悪しがほたてがい漁業に大きな影響を与えます。

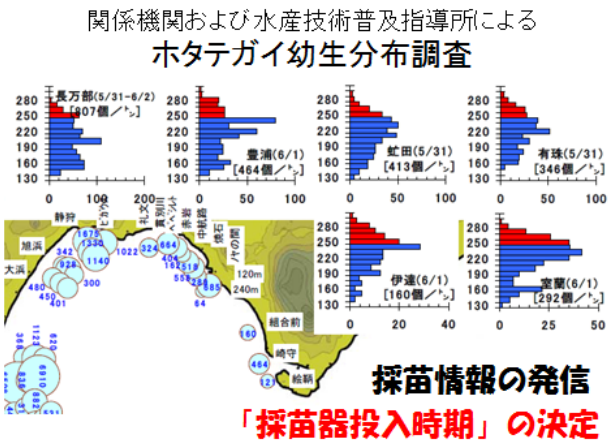
そこで、この天然採苗を効率よく行い、稚貝を安定的に得るため、ほたてがい漁業の関係機関では、ホタテガイ幼生の分布調査を行い、天然採苗器を海中へ投入する時期を決定しています。



＜スライド 7＞

ホタテガイ幼生の分布調査は、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。



＜スライド 8＞

ホタテガイ幼生の分布調査を定期的に行い、その都度、ホタテガイの採苗情報を漁業者に発信しています。たとえば、室蘭海域では 6 月 1 日に 1t の海水中に 292 個体のホタテガイ幼生が存在し、その殻長組成のピークは 230μm であり、また、採苗器投入の目安となる着底期幼生、赤色のバーで示されていますが、この幼生も出現していることも分かります。

漁業者はこの情報を基に採苗器を投入するタイミングを決定しています。このように、ホタテガイ幼生の分布調査は、ホタテガイ漁業者にとって重要な情報であるため、この調査は全道の関係各機関により行われています。

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稚期仔蟲の出現時が理想であるが先づ蝶鉸直線仔蟲が多數發見される時期なれば間違がない。佐呂間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。

＜スライド 9＞

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。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 年間にわた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。

調査では様々な二枚貝幼生の中からホタテガイ幼生の形を基準に判別しています。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 1 千から 2 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。

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。

＜スライド 10＞

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うことを目的とし、研究を行いました。

抗体の作製

- 殻長160μm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

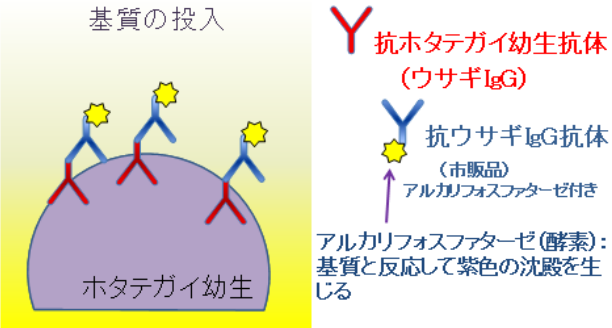
抗ホタテガイ幼生抗体の作製方法は
「抗ホタテガイ幼生抗体作製マニュアル」としてとりまとめた。

＜スライド 11＞

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しました。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 160μm のホタテガイ人工種苗を生産しました。これを集めて粉砕したものを抗原とし、ウサギおよびモルモットに注射して、抗体価が高まったところで全採血により抗血清を採集、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」として取りまとめました。

ホタテガイ幼生の免疫染色法



＜スライド 12＞

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。

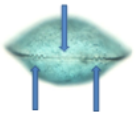
まず、ホタテガイ幼生と抗ホタテガイ幼生抗体を結合させます。次にアルカリフォスファターゼが結合した二次抗体を抗ホタテガイ幼生抗体に結合させます。最後に発色基質を投入すると、アルカリフォスファターゼにより抗ホタテガイ幼生抗体が結合したところだけに紫色の沈殿物が堆積します。

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 ➡ 幼生の鉸装を観察し、ホタテガイ幼生の判別

直線状の幼鉸板



角形の幼鉸歯

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
	×	248	1	247
ウサギ抗体2	○	131	124	7
	×	76	0	76
モルモット抗体1	○	198	196	2
	×	86	0	86
モルモット抗体2	○	193	193	0
	×	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。

＜スライド 13＞

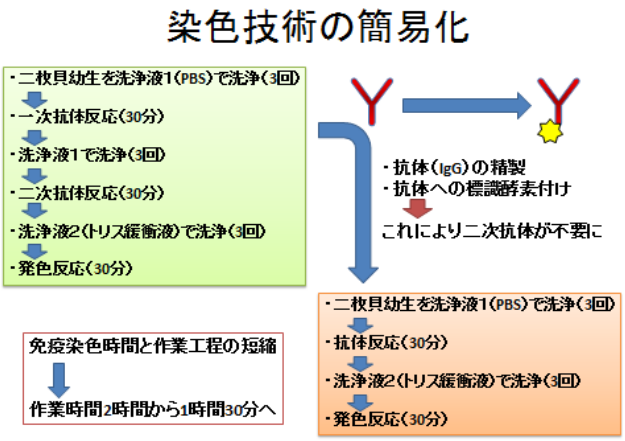
次に、この抗体がホタテガイ幼生を特異的に認識しているかを検証するため、噴火湾で得られた二枚貝幼生を免疫染色し、染色された幼生とされなかった幼生を分離して鉸装を観察、ホタテガイ幼生を判別しました。

ホタテガイ幼生の鉸装の特徴は左右に角型の幼鉸歯があり、その間に直線状の幼鉸板があるのが特徴です。

その結果、ウサギ 1 抗体では、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、染色されなかった二枚貝幼生 248 個体のうち、247 個体がホタテガイ幼生ではありませんでした。

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

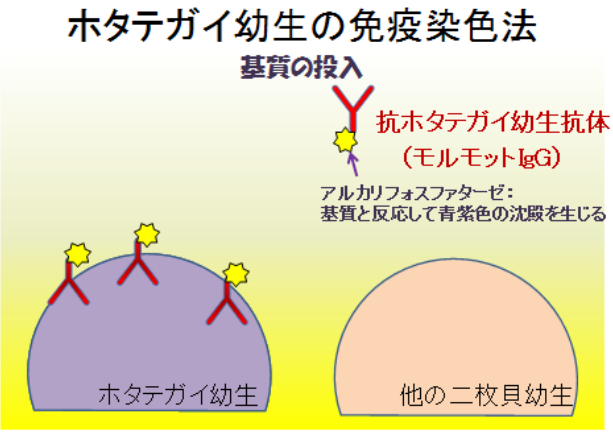
が分かり、免疫染色法を応用したホタテガイ幼生判別技術が開発され、「ホタテガイ幼生の免疫染色マニュアル」としてとりまとめました。



＜スライド 14＞

次は普及に向け、技術の簡易化をする必要がありました。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 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。

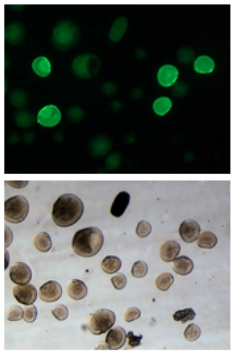
これにより、2 次抗体の反応が不要になり、2 行程減らすことで作業にかかる時間が約 2 時間から 1 時間 30 分へと短縮されました。



＜スライド 15＞

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に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。

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リボゾーム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リボゾーム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

＜スライド 16＞

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 解析を行うことから標識に緑色の蛍光色素を用いて免疫染色を行いました。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。染色された幼生と染色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 リボゾーム RNA 遺伝子の部分配列を PCR により増幅し、シークエンサーを用いて塩基配列を決定して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あり、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。

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、特異性が損なわれていないことが明らかになりました。

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
撹拌のみ

1時間から1時間30分で染色が完了する。

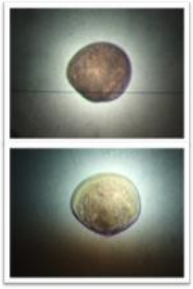
＜スライド 17＞

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。

キットは、洗浄液 1、抗体溶液、洗浄液 2、発色液の 4 つの試薬だけで、それぞれドロッパーボトルや点眼容器を用い、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うことができます。

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



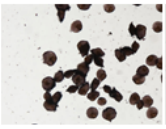
万能投影機での観察
上:ホタテガイ幼生(染色)
下:その他二枚貝(非染色)

問題点の抽出と対策

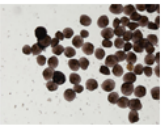
－水産技術普及指導所と共に－

免疫染色の注意点

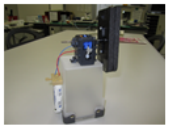
- 1%グルタールアルデヒド溶液を用いて3時間以上固定、もしくは、3%以上で30分間固定する。
- 1サンプルあたり、二枚貝幼生の数は2,000個体以下
- 免疫染色の反応温度は20℃以上
- 染まりすぎる場合は、抗体反応時間を20分、発色反応を20分に短縮する。



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。

＜スライド 18＞

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。

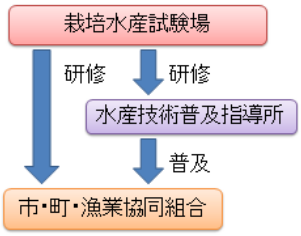
これまで使ってきた万能投影機を使っても、右の写真のように、ホタテガイ幼生を色で判別できます。

＜スライド 19＞

免疫染色技術を普及するに当たり、現場で使ってもら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対し、固定液は１％のグルタールアルデヒドを用いて、3時間以上固定すること、また、寒いところでは抗体反応や発色反応を行わないこと、また、染まり過ぎる時には、抗体反応時間と発色反応時間を短くできる、また、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、3%といった濃い固定液濃度にすることにより、幼生がばらばらになり、観察しやすくなるなど、対処法が見出され、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

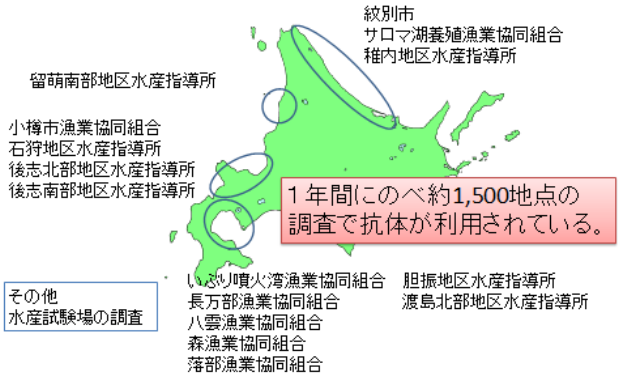


研修実績
・全水産技術普及指導所（普及員研修）
・漁業協同組合（落部・森・八雲・長万部・小樽市・サロマ湖養殖・いぶり噴火湾・網走管内各漁協ホタテガイ担当者）
・紋別市、豊浦町

＜スライド 20＞

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市・町・漁業協同組合のホタテガイ幼生分布調査を行っている多くの担当者へと研修を行い、また、水産技術指導所から各機関へ普及されていきました。

活用の現状



＜スライド 21＞

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分布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。**

＜スライド 22＞

以上、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、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。

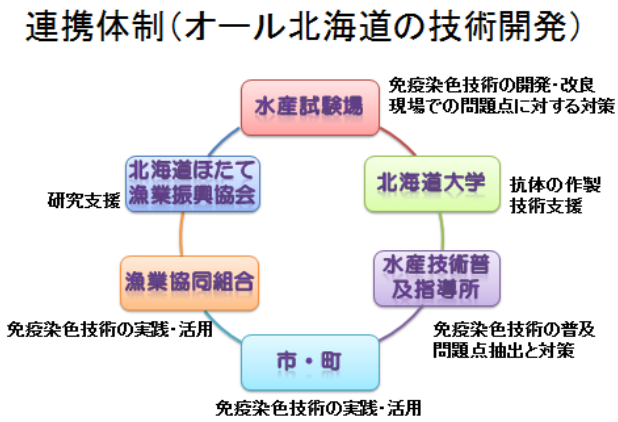
染色されたホタテガイ幼生は、溶液を水道水に置換することにより発色が止まり、水道水中で半永久的に保存することができます。また、作業の簡易化・効率化を図ることにより、免疫染色方法も容易になり、現場に即した技術となりました。

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しまっ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おります。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ていきます。



＜スライド 23＞

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のもと、北海道大学とともに免疫染色技術の開発を行ってきました。

この技術を、これまで長年にわた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、現在に至っております。

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。

〔関係質疑〕

岡山県（藤井室長）

ホタテガイ採苗器の写真があったと思いますが、採苗器の長さは海面から海底まで到達するような長いものなのでしょうか。

北海道（清水研究主任）

採苗器についてですが、採苗器の長さは5～10mくらいで、水面から5m以深に設置しています。その下は海底まであと10mくらいはあります。海の深さは15～20mくらいあるので水中にぶら下がっているような状態です。