

# 二枚貝類幼生の生死判定法

浮遊生物課 藤原 しのぶ  
古澤 一思

1. 目的	43
2. 実験概要	43
2-1. 実験期間および実験場所	
2-2. 供試生物および飼育条件	
2-3. 実験項目	
3. 方法	43
3-1. 実験の種類と手順	
3-2. 生体染色剤(実験A)および酵素活性判定剤(実験B)	
3-3. 繊維染料(実験C)	
4. 結果および考察	45
4-1. 生体染色剤(実験A)および酵素活性判定剤(実験B)	
4-2. 繊維染料(実験C)	
5. まとめ	47
今後の課題	47
参考文献	48

## 1. 目的

生物が生きているか死んでいるかを判断するには、それが動物であるなら手足の動きや呼吸などの動作の有無を見てほとんどの場合、容易に判断することができる。しかし、植物では外傷のない場合、即座に判断できるのは死後何日が経過した後であろう。同様に微小な生物、顕微鏡などでしか姿を見ることのできない生物の場合、動物であっても判断するのに手間と時間が必要とされる。

一方、のり養殖や魚の増殖場などでは、有害とされる藻類やプランクトンの発生を抑制したり駆除する手段として除草剤や消毒剤などの薬剤を散布することがあるが、事前にその薬剤の安全性を確認するために毒性試験が行われる。この試験結果の評価は薬剤の影響で死亡した個体と影響を受けなかった個体を厳密に区別できるという前提の元にあり、この区別に生死判定の方法が密接に関わってくる。

毒性試験において、信頼性の高い試験結果を求めるならば、必然的に試験区が細かく設定されることとなり、生死判定を行わなくてはならない個体も多くなる。そうすると、実験開始から生死を確認するまでの時間に試験区ごとのずれが生じ、試験の評価が難しくなる。このような場合、生死判定の方法として試験終了時点で生死が判別できるよう個別にマーキングし、その後速やかに固定できる方法が望ましくなる。この方法に用いられるマーカーは、供試生物に対し無害であることと、視覚的に識別しやすいことが条件となり、さらに固定剤の添加により溶出したり変化したりしないことが要求される。本実験では、このようなプランクトンなどの多数の微小生物を対象とした生死判定を行う場合に有効なマーカーとなりうる物質を見いだすことを目的とした。

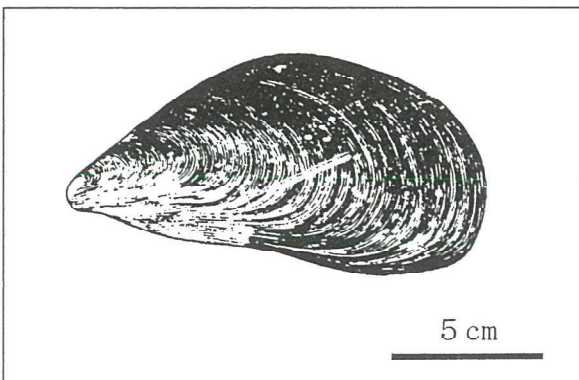


図2-2-1 ムラサキイガイ  
*Mytilus galloprovincialis* LAMARCK, 1819

## 2. 実験概要

### 2-1. 実験期間および実験場所

1996年3月12～28日の16日間にわたり、本社実験室で行った。

### 2-2. 供試生物および飼育条件

供試生物には、養殖場などのある内湾や沿岸域において普通にみられるムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* LAMARCK, 1819 (図2-2-1) のVeliger幼生を用いた。親貝には1996年3月12日に小田原市早川漁港岸壁で採集した個体を使用し、実験室内で低温刺激による産卵誘発を行い受精卵を得た。受精卵は目合い20 $\mu$ mの網地上で洗浄し、密度が100個体/mlとなるように30lの角型水槽へ収容した。受精後、約10時間で孵化したトロコフォア幼生を同様の30l角型水槽へサイフォンで分取し、飼育密度を1～2個体/mlに希釈した。飼育中は室温(11～20 $^{\circ}$ C)で育成し、受精から5日目のVeliger幼生(図2-2-2)を実験に供した。飼育中の餌料は、培養した黄色鞭毛藻 *Pavlova lutheri* (体長約5 $\mu$ m)を1日1回、 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個/mlとなるように添加した。飼育水は軽くエアレーションした止水とし、GF/Cフィルターで濾過した静岡県三保湾の天然海水を1日1回換水して用いた。

## 3. 方法

### 3-1. 実験の種類と手順

本実験では、性質の異なる次の3つの方法から、生死判定への有効性を検討した。

すでに、細胞レベルでは生理活性度を測定することでいくつかの生死判定法が確立されており、この方法が生物そのものの生死判定法として有効となるかを検証した。供試薬には細胞レベルの生死判定法のひとつである色素排除試験において生

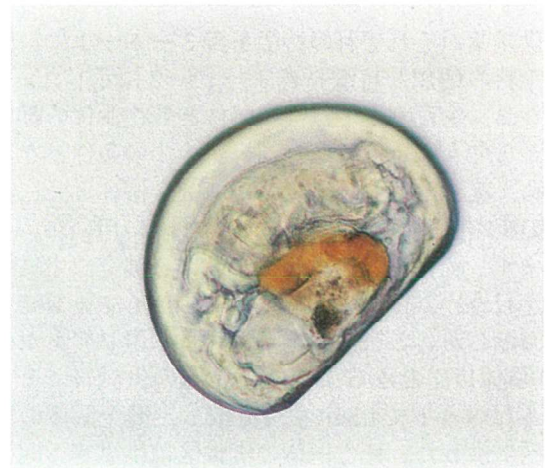


図2-2-2 ムラサキイガイVeliger(D型)幼生  
(消化管内の黄色色素は*Pavlova lutheri*)

表 3-1-1 実験A, Bの供試薬

試薬	Neutral red	Lithium carmin	NBT (nitro-blue-tetrazolium)
染色色調	赤 (赤茶)	赤	青紫
特性	生体染色色素 塩基性	生体染色色素 切片染色色素 酸性	トリazolium塩 脱水素酵素の検出 還元され有色になる
染色部位	細胞分泌顆粒 空胞	細胞内皮系 組織球 尿細管上皮	細胞組織
毒性	高い 細胞分裂阻害 成長阻害	高い	酵素反応阻害

表 3-1-2 実験Cの使用染料一覧

呼称	染料Ⅰ (蛍光ピンク)	染料Ⅰ (スカイブルー)	染料Ⅱ	染料Ⅲ
製造元	原光化学工業(株)		(株)ガロ企画	クローバー(株)
製品名	ペイントゴッコ モコモミニマーカー (蛍光ピンク)	ペイントゴッコ モコモミニマーカー (スカイブルー)	GARO color No.12 ブルー	ステンシル絵具 No.28 レッド
色調	ピンク	青	青	赤

体染色剤として普通に用いられる Neutral red, Lithium carmin の 2 種類と (以下実験Aと称す), さらに細胞の代謝活性の測定で普通に使用される酵素活性判定剤のひとつである NBT (nitro-blue-tetrazolium) を選定した (以下実験Bと称す)。

一方, 林ほか (1922) が仔魚の生死判定に有効であると報告している繊維染料から, 普通に市販されている数種を選び供試染料とした (以下実験Cと称す)。

供試薬のそれぞれの特徴を表 3-1-1 に, 供試染料の種類と特徴を表 3-1-2 に示した。

なお, 生死判定では健全個体と死亡個体のどちらからでも判定のできる条件となるため, それぞれの実験において健全個体と死亡個体の実験区を同数ずつ作成して比較に用いた。

まず, 飼育水槽中に浮遊している健全な生貝のみを目合い 20 $\mu$ m の網地を用いてサイフォンで分取濃縮した。これを攪拌しながら 1 供試管あたり 100 個体以上となるように 15ml 容の供試管にデジタルピペットで 4.5ml ずつ分取し, 健全個体の実験区に供した。死亡個体の実験区は供試管へ同様に分取し, これを 50 $^{\circ}$ C で 5 分間湯せんして作成した。また, 健全個体および死亡個体ともに供試管に分取作成後, 速やかに実験に供した。

### 3-2. 生体染色剤 (実験A) および酵素活性判定剤 (実験B)

実験Aと実験Bは基本的に同じ方法で行った。

健全個体と死亡個体をそれぞれ分取した供試管に前述の 3 種類の供試薬を添加し, 軽く攪拌したのち実験終了まで静置した。その後, 供試薬を洗い流すため目合い 20 $\mu$ m の網地で濾過した後に固定液に浸し, 検鏡を行った。

試薬の実験濃度, 実験時間については表 3-2-1 に示した。

固定液には染色部位の褪色について比較を行うため, 3% 中性ホリマリン海水, 70% アルコール, 純アルコールをそれぞれの試薬に対して用い, 予備試験で有効性を示した NBT については, さらに 3% グルタルアルデヒドと硫酸銅を使用し, それぞれ経時的に観察を行った。

なお, NBT については固定剤を使用しない冷蔵保存も行い染色状態を観察した。

### 3-3. 繊維染料 (実験C)

実験Cは消化管内に取り込まれた染料の有無から健全個体と死亡個体を判別するため, 厳密にはその時点での対象生物の生死を判定するものではないが, 摂餌活動を行わなくなった個体は遅かれ

表 3-2-1 実験A, Bの実験区

試 薬	Neutral red	Lithium carmin	N B T
試薬濃度	50 , 100 , 1,000 mg/l		
実験時間	10 分	2 時 間	

早かれ死亡するであろう。実験Cでの判別基準とは、この観点から間接的に生死に結びつくことを前提とした。

方法は実験A, Bとほぼ同様としたが、はじめに染料の選定を行った上で適正使用濃度について検討を重ねた。まず染料Ⅰ～Ⅲ（表 3-1-2）について、適当濃度での経時的な取り込み量の変化を10, 30, 60, 90分後に検鏡観察し、健全個体のうち最も取り込み率の高かった染料および適正時間を決定した。

この結果より、取り込み率の高かった染料Ⅰについて、健全個体における適正使用濃度を知るために原液を濾過海水で $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ 倍に希釈したものについてさらに実験を行った。また、蛍光ピンクとスカイブルーの2色について視認の良さを比較した。なお、固定には3%中性ホルマリン海水を使用した。

#### 4. 結果および考察

##### 4-1. 生体染色剤（実験A）および酵素活性判定剤（実験B）

結果の概要を表 4-1-1 に示した。

Neutral redの場合、健全個体も死亡個体も同じ部位が染色され、1,000mg/lの実験区でも数分で軟体部全域が染色された。

Lithium carminの場合、健全個体と死亡個体では

細胞内での染色部位は異なるが、光学顕微鏡下ではいずれも軟体部全域が染まっているように観察された。

NBTについては、呼吸に関与するクエン酸回路の中でコハク酸脱水素酵素系を検出して有色のホルマザンとなるため細胞が青く染まるとされ、呼吸活動を行っている健全個体のみの細胞が染まるものと予測した。死亡個体も死亡直後では予測通りに染まらず、健全個体との判別が可能であった。しかし、死亡後数時間経過した個体にNBTを添加した場合、細胞内でバクテリア分解などによる還元作用が起こるため、光学顕微鏡下では健全個体と同様に軟体部全体が青く染まって観察された。

固定方法については、3供試薬とも3%中性ホルマリン海水、70%アルコール、純アルコールのいずれにおいても実験直後から2~3時間で染色部位の完全な褪色が認められ、硫酸銅では析出物が実験個体に付着して染色部位が観察不可能となった。3%グルタルアルデヒドで固定した場合、NBTの1,000mg/l濃度区で褪色しないことが判明したが、前述のようにNBTでは健全個体と死亡個体を判別することができないため実用には適さなかった。また、固定剤を使用せず冷蔵保存したNBTの実験区は有色のホルマザンが時間の経過とともに増加したため健全個体と死亡個体の判別が不可能となった。

表 4-1-1 実験A, Bの結果概要

試 薬	健全個体の染色部位	死亡個体の染色部位	染色率 (%)
Neutral red	細胞分泌顆粒	細胞分泌顆粒	健全個体：100
	空胞	空胞	死亡個体：100
Lithium carmin	細胞内皮系	細胞核	健全個体：100
	組織球		死亡個体：100
	尿細管上皮		
NBT	細胞組	細胞組織	健全個体：100
		※死亡直後では染まらない	(死亡個体：100)

表 4-2-1 各染料における取り込み量の経時変化

種類\経過時間	健全個体				死亡個体			
	10分	30分	60分	90分	10分	30分	60分	90分
染料Ⅰ	—	+	++	+	} すべて—			
染料Ⅱ	—	—	+	+				
染料Ⅲ	—	—	—	—				

注：表中の++は良く取り込まれていた，+は取り込まれていた，—は取り込まれていなかったことを示す

表 4-2-2 各染料の粒径 (μm) と組成率 (%)

種類\粒径	<0.2	約0.2	1~5	5~10	10<
染料Ⅰ <sup>注1</sup>	—	99.0	0.7	0.2	0.1
染料Ⅱ <sup>注2</sup>	—	100	(—)	—	—
染料Ⅲ	100	—	—	—	—

注1：値はスカイブルーを示し，蛍光ピンクとは若干異なる。また，スカイブルーで凝集しやすい性質を持つ  
注2：海水に対して難溶で5μm程度の凝集塊をつくる

表 4-2-3 染料Ⅰにおける健全個体の濃度別取り込み率 (n：検鏡個体数)

希釈倍率	蛍光ピンク	スカイブルー
10 <sup>2</sup>	3.0% (n=456)	3.5% (n=200)
10 <sup>3</sup>	91.6% (n=1047)	77.4% (n=310)
10 <sup>4</sup>	98.2% (n=691)	97.6% (n=335)

#### 4-2. 繊維染料 (実験C)

染料選定のため予備的に行った各染料についての取り込み量の結果から，死亡個体では全く染料の取り込みが行われないことが確認された (表 4-2-1)。

健全個体については，染料Ⅰでは30分後に消化管内への染料の取り込みが認められたが，90分後には消化管内が空となった個体が観察された。なお，取り込まれた粒子の直径は1~5μmのものが大部分を占めた。染料Ⅱでは60分後以降に消化管内に取り込みが認められたが，取り込んでいた量は染料Ⅰより少なかった。染料Ⅱでは全く消化管内への取り込みが観察されなかった。

ここで各染料の粒子サイズを表 4-2-2 に示した。

染料Ⅰにおける供試個体の消化管内で確認された粒子サイズが1~5μmであったことは，ムラサキイガイのVeliger幼生が体長約5μmの *Pavlova lutheri* を餌料としていることに関与していたものと推測される。一方，0.2μm以下の微小粒子のみを持つ染料Ⅲについて全く取り込みが認められなかったのは，

Veliger幼生にとって染料粒子が小さすぎ，取り込まれていても消化管内に残らずそのまま海水とともに排出されたか，取り込み量が少ないため消化管内で視認することが難しかったのではないかとと思われる。以上の結果より，染料Ⅰ~Ⅲの中では染料Ⅰが浸漬時間30分の時，健全個体と死亡個体を明確に区別できるものと判断した。

さらに染料Ⅰについて，健全個体の染料の取り込みにおける適正使用濃度の検討と，色調における視認の良さについて比較を行った (表 4-2-3)。

この結果，蛍光ピンクの方がスカイブルーよりもやや取り込み率が高く，1万倍の希釈濃度で最も高い値を示した。ここで2色素の取り込み率の差異は，蛍光ピンクとスカイブルーの粒径組成の多少の相違と性質の違いに起因するものと推測されるが，希釈元である染料の原液濃度にわずかな違いがあった可能性も否定できない。

視認の良さの程度は，図 4-2-1 のようにムラサキイガイのVeliger幼生の殻がやや紫色を帯びるため，蛍光ピンクよりもスカイブルーの方がより良いものと判断された。

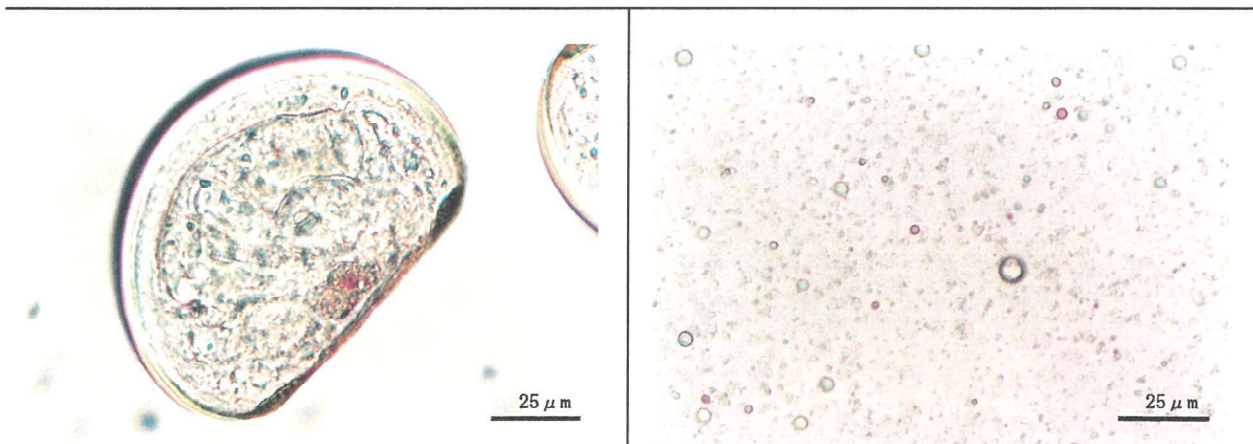


図4-2-1 (1) 染料I (蛍光ピンク) の染料取り込み状況 (左) と染料粒子 (右)

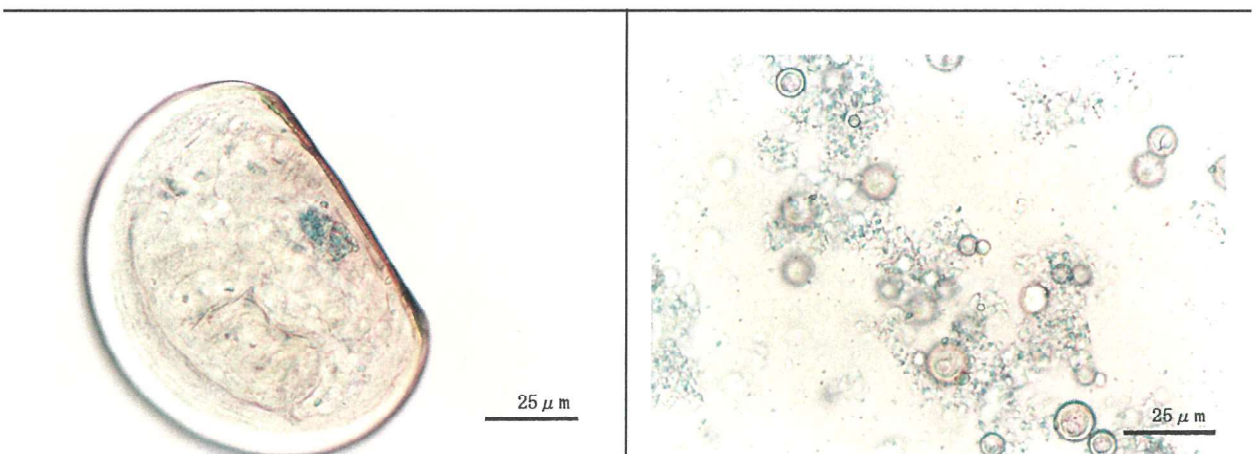


図4-2-1 (2) 染料I (スカイブルー) の染料取り込み状況 (左) と染料粒子 (右)

## 5. まとめ

実験Aでは健全個体も死亡個体も同一に染まり、生死を識別することができなかった。

実験Bでは死亡個体の経過時間とともに健全個体も死亡個体も同一に染まり、生死を判別することができなかった。

実験Cでは健全個体での染料Iの1万倍希釈の取り込み率が95%以上を示し、死亡個体との判別が可能であった。

以上の実験結果から、今回選択した方法の中では繊維染料を用いて摂餌活動の有無を判別する方法が最も生死判定に有効であると判断された。

## 今後の課題

本実験より染料Iを用いることで、生死判定を

容易に行うことが可能となった。しかし、前記したように消化管内への取り込みから判定する方法では、「摂餌活動=生きている個体」という前提条件が必要となることに注意しなければならない。そして、以下に挙げるような問題点も残されており、更なる検討が必要と考えられる。

[取り込まれた粒子サイズと使用濃度]

2色の染料Iについて、取り込み率の差異は染料の粒径組成と性質に起因した可能性は高い。これらを検証するため取り込まれた粒子サイズを再確認すると共に、 $0.2\mu\text{m}$ 以下のものについても詳細に調べる必要があると考える。また、使用濃度の再現性を考慮し、1万倍という希釈濃度ではなく単位当たりの粒子数で正確に濃度を表示することが重要である。

#### [取り込み率]

染料Ⅰの取り込み率が高かった要因は、餌料と同じ粒子サイズに関係しているものと推測した。これを確認するために、さらに様々な粒径を持つ染料に対して追試し、その結果より取り込み率を上げることが可能となるだろう。

#### [成長段階による有効性と使用濃度]

今回はVeliger幼生に対して染料Ⅰの有効性が認められたが、成長した個体では殻が厚くなるため染料取り込みの視認が困難となることが予想される。また、成長と共に取り込む粒子のサイズなどが変化することも考えられ、これらについて検証する必要がある。

#### [水温変化と取り込み率]

一般に水温の低下と共に生物の活性もしだいに低下することが知られる。本実験では水温との関係について検証を行わなかったが、水温に対する取り込み率の変化を検証する必要があるだろう。

#### [他種に対する有効性と使用濃度]

ムラサキイガイに対しては染料Ⅰの有効性が認められた。しかし、他種における染料Ⅰの有効性および適正使用濃度などについては使用する前に確認する必要がある。

#### 謝辞

本実験を行うにあたり、実験の機会を与えてくださった尾長幸夫部長、有益な助言、ご指導をしてくださった清沢弘志課長、渡辺淳課長、実験を手伝ってくださった前島依子氏、その他にも貴重な時間と場所を提供してくださった本社の方々に感謝の意を申し上げる。

#### 参考文献

- 1) 深見公雄, 1988: 海洋生態系における付着細菌と浮遊細菌. 月刊海洋科学, 20(2), 85-90.
- 2) 林 邦茂・池田知司・西 潔・垣井清澄・篠田正俊, 1992: 染色剤を用いた仔魚の生死判別法について. 京都府立海洋センター研究報告, (15), 31-41.
- 3) 細見彬文, 1989: ムラサキイガイの生態学. 山海堂, 85-94.
- 4) 本陣良平, 1965: 組織学入門. 南山堂, 91-97.
- 5) 今堀和友・山川民夫, 1984: 生化学辞典. 東京化学同人.
- 6) 泉 美治・中川八郎・三輪谷俊夫, 1986: 生物化学実験のてびき. ④動物・組織実験法. 化学同人, 87-94.
- 7) 上妻智行, 1994: アサリ種苗生産における採卵および幼生飼育技術. 福岡水技研報, (2), 67-77.
- 8) 種山展志, 1967: 低温刺激によるムラサキイガイの産卵誘発. 水産増殖, 15(1), 9-13.
- 9) 木暮一啓, 1988: 海洋細菌の量と生産速度. 月刊海洋科学, 20(2), 32-37.
- 10) 三好英夫, 1988: 海洋における有機物の微生物分解一方法論を中心に. 月刊海洋科学, 20(2), 95-100.
- 11) 中村彌太郎, 1982: 二枚貝類幼生の同定⑩. 海洋と生物, 18, 24-26.
- 12) 奥谷喬司, 1996: 日本のムラサキイガイ. ちりぼたん, 27(1), 10-11.
- 13) 坂口 勇, 1991: 海洋生物の付着機構. 恒星社厚生閣, 76-84.
- 14) 佐野 豊, 1976: 組織学研究法. 南山堂, 208-209, 222-223, 241-246, 505-523.
- 15) ストライヤー, 1977: 生化学上巻. 東京化学同人, 293-309.
- 16) 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. 日水試, 57(7), 1269-1275.
- 17) 鳥羽光晴・深山義文, 1992: アサリ産卵誘発方法の比較. 水産増殖, 40(3), 303-311.
- 18) 鳥羽光晴・深山義文, 1994: 飼育アサリのサイズと成熟, 産卵の関係. 日水試, 60(2), 173-178.
- 19) 鳥羽光晴・深山義文, 1995: アサリ人工産卵における産卵量および卵径と, 卵・幼生の生き残りの関係. 水産増殖, 43(3), 315-321.
- 20) 畝本 力, 1988: 海洋細菌の生理的特性—細胞膜機能を中心に. 月刊海洋科学, 20(2), 45-50.
- 21) 吉田 裕, 1964: 貝類種苗学. 北隆館, 111-114.