

## モノクローナル抗体法及びリアルタイム PCR 法による アコヤガイ浮遊幼生の同定

福澄 賢二<sup>1</sup>・浜口 昌巳<sup>2</sup>・小池 美紀<sup>1</sup>・吉岡 武志<sup>1a</sup>  
(<sup>1</sup>研究部・<sup>2</sup>独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所)

天然採苗による真珠養殖で必要となるアコヤガイ浮遊幼生の同定の新手法として、モノクローナル抗体法及びリアルタイム PCR 法の開発を行った。アコヤガイ浮遊幼生を抗原として抗体産生細胞を得、他の二枚貝抗原等でスクリーニングしてモノクローナル抗体を作製し、野外サンプル等を用いた精度検証により、種特異性が極めて高いことを確認した。近縁のウグイスガイ科浮遊幼生との交差反応性も認められたが、その出現割合は極めて低いため、養殖業者のモニタリング調査には実用可能と考えられた。リアルタイム PCR 法については、アコヤガイ近縁種の DNA 情報を利用してプライマー、プローブを設計し、二枚貝の DNA を用いて種特異性と検出感度を検証したところ、種特異性、検出感度ともに極めて高いことを確認した。なお、浮遊幼生の発育段階別の分析結果から、野外サンプルでの定量には適さないと判断された。この2手法を組み合わせることで、養殖現場でのモニタリング調査等の大幅な効率化が期待できる。モノクローナル抗体法を実際の養殖業者採取サンプルで試したところ、アコヤガイ浮遊幼生は他の二枚貝と明確に区別でき、実用性が高いことが実証された。

キーワード：アコヤガイ、浮遊幼生、同定、モノクローナル抗体、リアルタイム PCR

福岡県筑前海では、「天然」、「無病」、「純国産」の特性を生かした養殖方法で高品質な真珠の生産を目指しており、<sup>1)</sup> 真珠母貝であるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の種苗は、養殖場周辺海域における天然採苗により入手している。アコヤガイ等二枚貝の天然採苗では、採苗地における浮遊幼生の出現状況の把握が重要であり、採苗地周辺海域において定期的にプランクトンネットで採取したサンプル中からアコヤガイ浮遊幼生を同定して計数する必要がある。アコヤガイ浮遊幼生の同定は、従来から顕微鏡下での外部形態の細部観察により行っている。しかし、天然海域で採取したサンプルには外部形態が著しく類似する他の二枚貝の浮遊幼生が多く混在するため、同定作業には熟練が求められる上、多くの労力を要しており、養殖現場では簡易かつ精度の高い同定法の開発が求められている。そこで本研究では、アコヤガイと同じ二枚貝であるアサリ浮遊幼生<sup>2) 3)</sup> 等で先例があるモノクローナル抗体法と、同じく二枚貝のイガイ類<sup>4)</sup> 等で先例があるリアルタイム PCR 法によるアコヤガイ浮遊幼生の同定法の開発を目的とした。

### 方 法

#### 1. モノクローナル抗体法の開発

福岡県筑前海産の天然アコヤガイから人工ふ化させた浮遊幼生を用いて、定法によりマウス抗アコヤガイ浮遊幼生磨砕液モノクローナル抗体の抗体産生細胞を作製した。これらを人工ふ化で得たアサリ、マガキ、イワガキ、タイラギ、ハマグリ、ムラサキイガイ、ホトトギスガイ、サルボウガイの浮遊幼生抗原によりスクリーニングし、アコヤガイ浮遊幼生と特異性の高い株を選択した。次に、福岡県筑前海産アコヤガイから人工ふ化させた浮遊幼生との反応性が高い株を選択した。さらに、同定の精度を高めるため、2008～'10年に養殖場周辺で採取した野外サンプルから二枚貝の浮遊幼生を分類、同定し、種類別に各抗体候補と反応させ、抗体候補を1株に絞り込んだ。なお、浮遊幼生の分類、同定は、(有)生物生態研究社に依頼した。

また、選択した抗体候補と'09年7月採取の野外サンプルを反応させ、反応した浮遊幼生を単離してDNAを抽出し、アコヤガイ DNA の ITS 領域を利用した PCR

<sup>a</sup> 現所属：農林水産部農林水産政策課

法により、当該浮遊幼生がアコヤガイか否か確認することで、抗体候補の精度を最終判定した。なお、抗体候補との反応の確認はすべて間接蛍光抗体法で行い、二次抗体には FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) を使用し、観察は蛍光顕微鏡の B 励起光下で行った。PCR 法に使用したプライマーの配列は、AkoyaITS-F:CTCAGCAAGAGTGAAAACCTTGC, AkoyaITS-2R:GTCATCCATCGACAGTCTTGG である。

## 2. リアルタイム PCR 法の開発

リアルタイム PCR 法の設計に当たっては、Dual-labeled probe 法を採用した。種判別のための遺伝子情報は、国際的 DNA データベース上に登録されている Pinctada 属の核 DNA 中の ITS 領域及びミトコンドリア DNA 中の CO I 領域の情報を利用し、プライマー設計ソフト Primer 3 を用いてプライマーとプローブを設計した。設計したプライマーとプローブの種特異性について、国内で採集したシロアオリガイ、ウグイスガイ、ヒオウギガイ等86種の二枚貝成貝の DNA を用いて検証した。また、人工ふ化及び野外サンプルから得たアコヤガイの D 型幼生単体から抽出した DNA を用いて、その反応性について検証した。なお、DNA の抽出には Qiagen 社の DNeasy Blood & Tissue Kit を使用した。

さらに、人工ふ化で得たアコヤガイの D 型幼生、アンボ期幼生、付着期稚貝から抽出した DNA を用いて、当手法によってサンプル中のアコヤガイ浮遊幼生の簡易的な定量も可能か検討した。

なお、リアルタイム PCR の機器は、Bio-Rad 社の Chromo4 または Life Technologies 社の Applied Biosystems7300リアルタイム PCR システムを使用した。

## 3. 養殖現場における実証試験

モノクローナル抗体法の実用性を確認するため、養殖業者が'11年7～9月に実施したアコヤガイ浮遊幼生のモニタリング調査のうち、2箇所採取した12回分のサンプル中のアコヤガイ浮遊幼生をモノクローナル抗体法で計数し、養殖業者が従来の方で計数した結果と比較した。なお、養殖業者のモニタリング調査では、北原式プランクトンネットによる鉛直曳きでサンプルを採取している。

## 結 果

### 1. モノクローナル抗体法の開発

抗体産生細胞は162株得られた。これらから得られた

モノクローナル抗体をアサリ、マガキ等の浮遊幼生抗原によるスクリーニングで8株まで絞り込み、さらにアコヤガイとの反応性の高さから、4株を抗体の一次候補とした。

各抗体候補と'08年採取の二枚貝浮遊幼生との反応結果を表1に示した。

抗体 B ではホトトギス、イガイ科と、抗体 C ではホトトギス、イガイ科、ウロコガイ超科との交差反応が確認されたため、これらは抗体の候補から除外した。交差反応がみられなかった抗体 A と抗体 D のうち、間接蛍光抗体法による反応性がより強かった抗体 A を最終候補とした。なお、'08年採取のサンプル中にはアコヤガイがほとんど確認されず、アコヤガイによる検証は1個体の供試にとどまった。

抗体 A と'09～'10採取の二枚貝浮遊幼生との反応結果を表2に示した。

'09年採取サンプルでは、アコヤガイの D 型幼生、初期幼生、アンボ期幼生の各発育段階30個体全てと反応した。また、アコヤガイと同属であるウグイスガイ科の幼生とも9個体全て反応したが、その他の二枚貝の幼生とは反応しなかった。

'10年採取サンプルでも、アコヤガイとは全個体と反応した一方、ウグイスガイ科とも全個体反応し、その他の二枚貝とは反応しなかった。

人工ふ化で得たアコヤガイ各発育段階の浮遊幼生に抗体候補及び二次抗体を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した像を図1に示した。

いずれの発育段階においても、遊泳及び摂餌のための器官であるベラムの部分が明瞭に蛍光発色していた。

PCR 法による検証では、抗体 A が反応した幼生156個体のうち150個体がアコヤガイであることが確認された。PCR で陰性であった6個体は、シーケンス解析によりアコヤガイに近縁なウグイスガイ科の幼生と推定された。

表1 '08年採取野外サンプルとモノクローナル抗体候補の反応結果

(反応個体/供試個体)

種 類	抗体A	抗体B	抗体C	抗体D
1 アコヤガイ D型幼生	1/1	—	—	—
2 ホトトギス	0/10	3/10	4/10	0/10
3 チヨノハナガイ	0/10	0/10	0/10	0/10
4 シズクガイ	0/10	0/10	0/10	0/10
5 ケシトリガイ	0/10	0/10	0/10	0/10
6 イガイ科	0/10	1/10	5/10	0/10
7 イタボガキ科	0/10	0/10	0/10	0/10
8 ザルガイ科	0/10	0/10	0/10	0/10
9 マルスダレガイ科	0/10	0/10	0/10	0/10
10 ウロコガイ超科	0/10	0/10	1/10	0/10
11 その他	0/10	0/10	0/10	0/10

表2 '08～'10採取野外サンプルとモノクローナル抗体候補Aの反応結果

(反応個体/供試個体)

種類	2008	2009	2010
1 アコヤガイ D型幼生		30/30	
初期幼生		30/30	30/30
アンボ期幼生	1/1	30/30	30/30
2 ウグイスガイ科		9/9	3/3
3 ホトギス	0/10	0/30	0/30
4 イガイ科	0/10	0/30	0/30
5 ザルガイ科	0/10	0/30	0/30
6 ウロコガイ超科	0/10	0/30	0/30
7 カキ類	0/10	0/30	0/30
8 チヨノハナガイ	0/10		
9 シズクガイ	0/10		
10 ケシトリガイ	0/10		
11 マルスダレガイ科	0/10		
12 その他	0/10	0/30	0/30

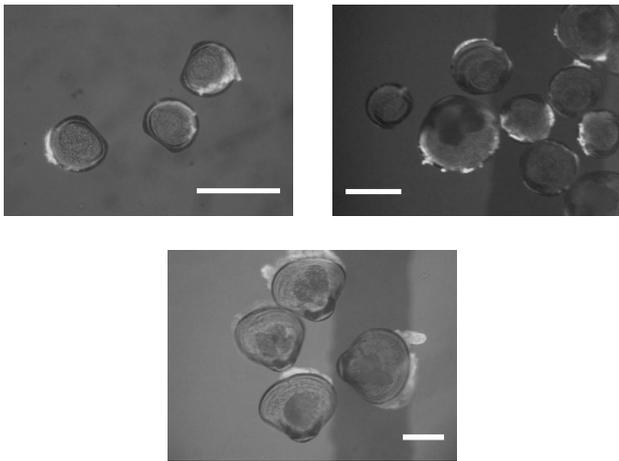


図1 モノクローナル抗体を反応させた人工ふ化アコヤガイ浮遊幼生

左上：D型幼生，右上：初期幼生，下：アンボ期幼生

スケールバー：100 μm

(白っぽく見える部分が蛍光発色している)

## 2. リアルタイムPCR法の開発

ミトコンドリア DNA の CO I 領域でプライマー及びプローブを設計した。プライマー等の配列を表3に示し、各機器での反応条件を表4に示した。

アコヤガイ，シロアオリガイ，ウグイスガイ，ヒオウギガイの成員から抽出した DNA を用いた分析結果を図2に示した。

アコヤガイのみ反応生成物の増加が認められた。これらの種以外の82種の二枚貝 DNA での分析結果でも、全て反応生成物の増加は認められず、この反応系のアコヤ

ガイに対する種特異性が極めて高いことが確認された。

人工ふ化及び野外サンプルで得たアコヤガイ D 型幼生 1 個体から抽出した DNA を用いた分析結果を図3、図4に示した。

供試した人工種苗の D 型幼生 8 個体分と、野外サンプル中の D 型幼生 11 個体分のサンプル全てで反応生成物の増加が認められた。

アコヤガイの D 型幼生，アンボ期幼生，付着期稚貝，各 2 個体ずつから抽出した DNA を用いた分析結果を図5に示した。

発育段階が進むほど早いサイクルで反応生成物の増加が認められ、発育段階により反応生成物の増幅曲線が大きく異なった。

## 3. 養殖現場における実証試験

モノクローナル抗体及び従来法によるアコヤガイ浮遊幼生の計数結果を図6に、アコヤガイ浮遊幼生を含んでいた野外サンプルにモノクローナル抗体及び二次抗体を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した像を図7に示した。

モノクローナル抗体による計数結果は、従来法と出現時期及びピーク時期はほぼ一致しており、概ね同じ傾向の推移を示した。

野外サンプル中のアコヤガイ浮遊幼生にモノクローナル抗体を反応させた観察像でも、ベラムの部分に明瞭に蛍光発色しており、他の二枚貝との区別に全く支障はなかった。

表3 アコヤガイ浮遊幼生リアルタイム PCR 用プライマー及びプローブ

プライマー、プローブ	塩基配列 (5'-3')	増幅産物サイズ (bp)
Sense primer	TTGGGAACCTGGTTGTTG	
Anti-sense primer	CCCTCTCCGTAACAAT	129
Probe	FAM-AACCTAAAATTATTCAGCGCGGAA-BHQ1 (又はTAMRA)	

表4 リアルタイム PCR システム反応条件

使用機器	Applied Biosystems7300	Chromo4
蛍光色素、クエンチャー	FAM, TAMRA	FAM, BHQ
反応プログラム	50℃ 2分 95℃ 10分 95℃ 15秒 58℃ 60秒 } 40回	95℃ 3分 95℃ 10秒 60℃ 20秒 } 40回
プライマー、プローブの最終濃度	100-300nM	50-100nM

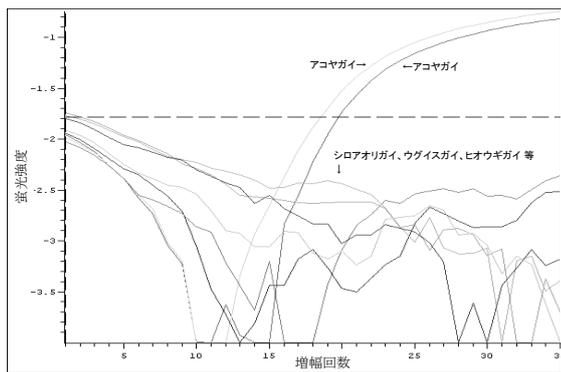


図2 二枚貝成員 DNA リアルタイム PCR の分析結果

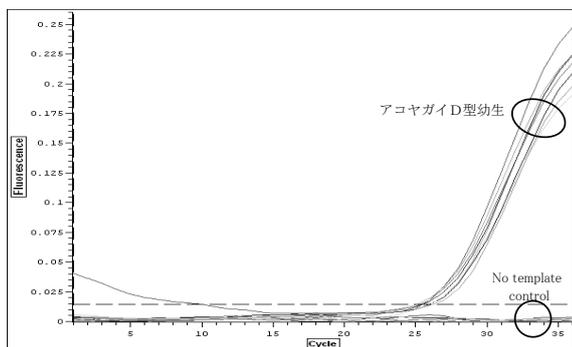


図3 人工種苗アコヤガイD型幼生1個体  
リアルタイム PCR の分析結果

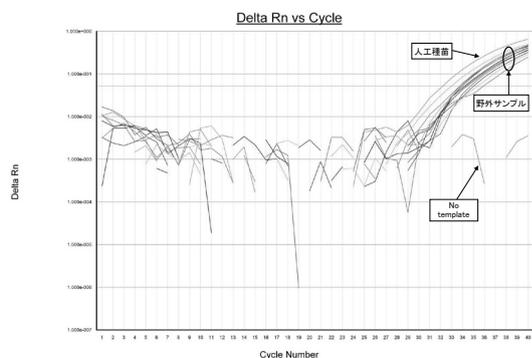


図4 野外サンプル中のアコヤガイD型幼生1個体  
リアルタイム PCR 分析結果

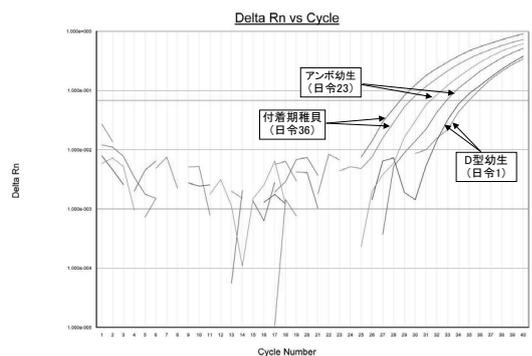


図5 アコヤガイ人工種苗 発育段階別リアルタイム分析結果

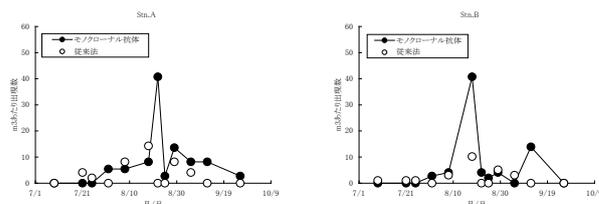


図6 モノクローナル抗体法と従来法による  
アコヤガイ浮遊幼生計数結果

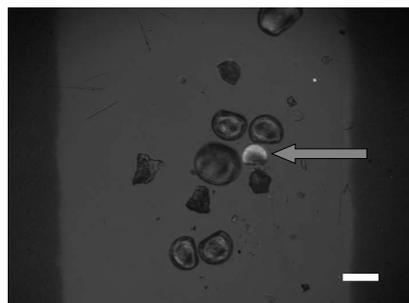


図7 モノクローナル抗体を反応させた野外サンプル  
矢印:アコヤガイ浮遊幼生, スケールバー:100μm  
(白っぽく見える部分が蛍光発色している)

## 考 察

特定の抗原決定基のみに結合する抗体の集合体であるモノクローナル抗体を作製して利用する「モノクローナル抗体法」は、'75年にモノクローナル抗体の調整方法が報告されて以降、医療分野を中心に発達してきた。<sup>5)</sup>当手法は水産生物の同定にも利用されており、アサリ浮遊幼生、<sup>2) 3)</sup>クモヒトデ幼生、<sup>6)</sup>マダイ卵、<sup>7)</sup>有毒アオコ<sup>8)</sup>等の例がある。

モノクローナル抗体法によって同定を行う大きな利点は、微細な形態を顕微鏡下で調べることなく、特定の種のみを容易に識別でき、サンプルを破壊することなく観察できる点にある。<sup>9)</sup>したがって、アコヤガイ浮遊幼生の出現数とともに、浮遊幼生の発育段階の把握も重要である真珠養殖業者によるモニタリング調査時の同定法として、たいへん有用な手法となる。

今回アコヤガイ浮遊幼生の同定を目的として作製したモノクローナル抗体は、野外サンプルを用いた検証により、アコヤガイ浮遊幼生との特異性が高く、浮遊幼生のいずれの生育段階においても明瞭に蛍光発色することが確認できた一方で、ウグイスガイ科浮遊幼生との交差反応性も認められた。交差反応性はモノクローナル抗体法の欠点のひとつであり、<sup>10)</sup>当モノクローナル抗体の実用化に当たっては、ウグイスガイ科浮遊幼生との交差反

応性が、真珠養殖業者によるモニタリング調査にどの程度影響するか考慮する必要がある。

'08年6月から'11年3月の間に養殖場内で毎月採取した野外サンプルにおけるアコヤガイ及びウグイスガイ科幼生の出現状況を表5に示した。

ウグイスガイ科幼生の出現時期は、アコヤガイ浮遊幼生の出現時期とほぼ重複するものの、その出現割合は、調査全期間で0.04%、アコヤガイ浮遊幼生が出現した7～11月では0.03%と極めて低く、アコヤガイの1.05%、1.17%と比べても26分の1以下であった。したがって、当モノクローナル抗体でのウグイスガイ科幼生との交差反応による影響はごく小さく、養殖業者によるモニタリング調査用には十分に実用可能と考えられた。なお、学術的な研究等、厳密な同定が求められる場合には、今回開発したリアルタイム PCR 法の併用により補完できるものと考えられた。

リアルタイム PCR 法による水産生物の同定や定量には、イガイ類、<sup>4)</sup> フジツボ類、<sup>11) 12)</sup> 貝毒原因プラנקトン<sup>13)</sup> 等の例がある。

今回設計したリアルタイム PCR システムは、アコヤガイの種特異性が極めて高く、また、浮遊幼生で最も小さいD型幼生1個体の検出が可能であったことから、検出感度も極めて高い。

当手法による定量は、既知量のDNAをスタンダードサンプルとしてPCRを行って作成した標準曲線(検量線)と、目的サンプルのPCRの結果からサンプル中のDNA量を求める原理によっている。<sup>14)</sup> アコヤガイ浮遊幼生の場合、発育段階が異なるとPCR結果が大きく異なっており、また、野外サンプルには発育段階が異なる浮遊幼生が混在することが多いことから、結果を誤るおそれがあり、定量法としては適さないものと考えられた。ただし、定性的な手法としては、種特異性と検出感度に加え、迅速性にも優れているため、アコヤガイ浮遊幼生の有無が不明なサンプルの大量処理には有効である。その特長を活かし、まずサンプルの一部をリアルタイムPCR法で分析し、アコヤガイが検出されたサンプルについてのみモノクローナル抗体法で同定し、計数や発育段階を観察する手順が考えられる。この手順により、浮遊幼生のモニタリング調査の大幅な効率化が期待できる。また、例えば新規養殖場開拓時の基礎調査となる広範囲なアコヤガイ浮遊幼生の定量的な調査手法としても有効と考えられた。

養殖現場における実証試験結果から、モノクローナル抗体法の実用性が高いことが実証された。当手法を導入することにより、天然採苗に関する作業の効率化や高度

化が十分に期待できる。

表5 野外サンプル中のアコヤガイ、ウグイスガイ科浮遊幼生の出現状況

種類	全期間('08.6月-'11.3月)			アコヤガイ出現期(7-11月)	
	平均密度(個体/m <sup>3</sup> )	出現割合(%)	出現時期	平均密度(個体/m <sup>3</sup> )	出現割合(%)
アコヤガイ	3.7	1.05	7-11月	8.4	1.17
ウグイスガイ科	0.1	0.04	8,12月	0.2	0.03
その他の二枚貝	348.1	98.91	1-12月	707.4	98.80
計	351.9	100.00		716.0	100.00

## 文 献

- 1) 濱田弘之, 吉岡武志, 大嶋雄治, 秋本恒基, 池内仁, 良質ピース貝生産技術開発試験. 平成18年度福岡県水産海洋技術センター事業報告, 2007, 33-35.
- 2) 浜口昌巳. アサリ浮遊幼生特異的モノクローナル抗体. 特許2913026, 1999.
- 3) 浜口昌巳. アサリ等海産ベントスの初期生態研究推進のための技術開発. 日本水産学会誌 2009; **75**: 771-774.
- 4) 野方靖行, 遠藤紀之. 遺伝情報を用いた付着生物の動態観測. 電力中央研究所報告 2012; V11031.
- 5) 井上國世. モノクローナル抗体の利用の現状. 化学と生物 1996; **34**: 240-253.
- 6) Ikegami S, Mitsuno T, Kataoka M, Yajima S, Komatsu M. Immunological Survey of Planktonic Embryos and Larvae of the Starfish *Asterina pectinifera*, Obtained from the Sea, Using a Monoclonal Antibody Directed against Egg Polypeptides. *Biological Bulletin* 1991; **181**: 95-103.
- 7) 大西庸介, 池田知司, 広石伸互, 沖山宗雄. モノクローナル抗体を用いた浮遊性魚卵の同定. 日本水産学会誌 2003; **69**: 170-177.
- 8) 幸 保孝, 吉田天士, 広石伸互. 有毒アオコの分子識別と予察への応用. 「有毒・有害藻類ブルームの予防と駆除」(広石伸互, 今井一郎, 石丸 隆編) 恒星社厚生閣, 東京. 2002; 43-53.
- 9) 浜口昌巳, 手塚尚明. アサリ浮遊幼生の分散と着底. *Sessile Organisms* 2007; **24**: 69-79.
- 10) Garland ED, Zimmer CA. Techniques for the identification of bivalve larvae. *Marine Ecology Progress Series* 2002; **225**: 299-310.

- 11) 松村清隆, 野方靖行, 坂口 勇. リアルタイム PCR による汚損性フジツボ幼生の定量的検出. 電力中央研究所報告 2007 ; V06020.
- 12) 遠藤紀之, 野方靖行. 10種の汚損性フジツボ類幼生のリアルタイム PCR による定量的検出. 電力中央研究所報告 2009 ; V08012.
- 13) 田辺祥子, 神川龍馬, 左子芳彦. 貝毒原因有毒ブラシクトンの分子モニタリング. 「貝毒研究の最先端－現状と展望」(今井一郎, 福代康夫, 広石伸互編) 恒星社厚生閣, 東京. 2007 ; 55-64.
- 14) 小島夫美子, 岩谷良則, 藤本秀士. リアルタイム PCR －その原理と特徴－. 九州大学医学部保健学科紀要2003 ; 2 : 95-102.