

## ベラムに特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた アコヤガイ初期稚貝の同定法

佐藤 利幸<sup>1a</sup>・浜口 昌巳<sup>2</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)

天然採苗を行う真珠養殖現場のアコヤガイ初期稚貝の種判別手法として、本県で開発したベラムに特異的に反応するアコヤガイ浮遊幼生同定用のモノクローナル抗体を用いた技術を開発した。一般的にアサリ等の二枚貝はベラムを脱落、退化させ稚貝となるため、ベラムに特異的に反応するモノクローナル抗体は稚貝に使用できないとされてきた。しかしながら、アコヤガイのベラムに特異的に反応するモノクローナル抗体を使用することで、浮遊幼生のみならず初期稚貝の外套膜や足糸組織が明瞭に蛍光抗体反応を示し、当抗体が使用できることが明らかとなった。蛍光抗体反応を示す初期稚貝の観察から、アコヤガイは初期稚貝に変態する際に、ベラムの一部を外套膜や足糸等の他組織に分化して成長するものと示唆された。本手法を天然海域で使用する場合、杉葉採苗器等の野外サンプルを採取後、ブラッシング、洗浄、濃縮、選別等の行程を加えた後、モノクローナル抗体法を用いることでアコヤガイ初期稚貝の同定が容易に判別することが可能となった。本手法はこれまで不明であった採苗期間中のアコヤガイ初期稚貝の付着状況が把握できるだけでなく、種を特定する高度な技術が不要であり、抗体と蛍光顕微鏡があれば可能である。既に養殖現場で実用化されており、天然採苗に関する効率化が期待できる。

キーワード：ベラム，特異的，モノクローナル抗体，アコヤガイ，初期稚貝，同定

筑前海では2007年から外海域で天然採苗によるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の真珠母貝養殖が行われている。<sup>1)</sup> 天然採苗は杉葉等の採苗器を養殖場周辺海域に垂下して行われているが、採苗が不安定な年もあり、養殖に必要な種苗数を確保することが重要な課題となっている。

これまで採苗期間中の付着状況は、採苗器に浮泥や各種生物等が多く付着するため、把握が困難であり、採苗作業はこれまでの経験に委ねられていた。そのため養殖業者から、採苗期間中のアコヤガイ付着状況を簡易に把握する同定手法の開発が求められてた。

そこで本県が開発したベラムに特異的に反応するアコヤガイ浮遊幼生同定用のモノクローナル抗体（以下、モノクローナル抗体という）<sup>2)</sup> について、アコヤガイ初期稚貝の同定に利用できるか検討し、養殖現場で実用化できる簡易なアコヤガイ初期稚貝の同定法を開発した。

### 方 法

福岡県筑前海産の天然アコヤガイから人工生産した殻幅 1 mm 未満の初期稚貝200個を用いて、モノクローナ

ル抗体と反応させ、発光発色反応を示すか観察を行った。抗体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。

次に、養殖海域に垂下した天然採苗用の杉葉採苗器の一部を分析室に持ち帰り、杉葉から付着稚貝を採集した後、モノクローナル抗体と反応させた。発光発色反応を示した付着稚貝を単離後、一端凍結し、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にてリアルタイム PCR 法で種を同定した。

また、実証試験として、2013～2014年夏季に天然採苗のために養殖海域に垂下した杉葉採苗器について、毎週1回湿重量約200gの杉葉をサンプリングし、分析室に持ち帰り、杉葉から付着稚貝を採集した後、モノクローナル抗体と反応させ、採苗期間中のアコヤガイ初期稚貝の出現状況を観察し、実用化について検討を行った。同時に、杉葉等の野外サンプルは浮泥や付着生物等が多く付着するため、濁りや付着物等により、顕微鏡下での観察が困難な場合がある。そのため、サンプリング、洗浄、濾過、観察等の各行程について、養殖現場で実用化できる簡易な同定手法について検討した。

a 現所属：豊前海研究所

## 結 果

人工生産した殻長 1 mm 未満のアコヤガイ初期稚貝をモノクローナル抗体と反応させた結果、全て発光発色反応を示した。また、天然海域の杉葉採苗器から採集した稚貝のうち、モノクローナル抗体による発光発色反応を示した稚貝(図 1)を単離し、DNA を用いたリアルタイム PCR 検査を行った結果、当該稚貝がアコヤガイであると同定した。

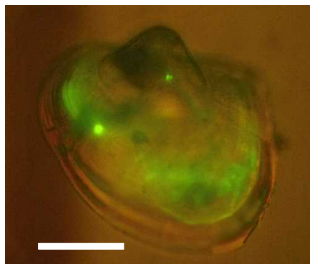
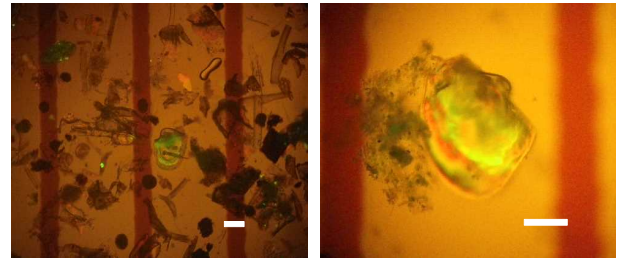
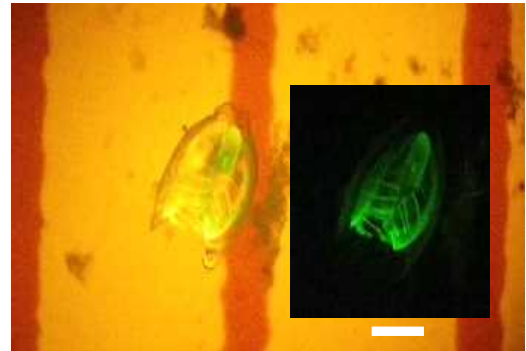


図 1 モノクローナル抗体に反応して蛍光色を発色した天然アコヤガイ初期稚貝 (スケールバー: 200 $\mu$ m)

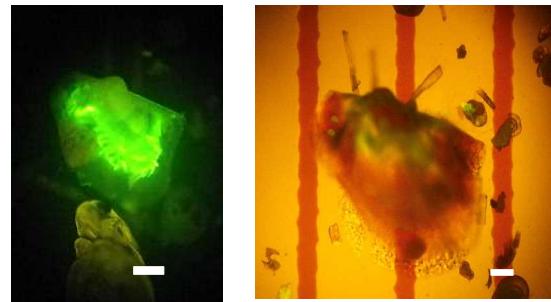
このことからアコヤガイ初期稚貝の同定にも浮遊幼生同定用のモノクローナル抗体が有効であると推察されたため、2013~2014年夏季に天然採苗したアコヤガイ初期稚貝の発光発色形態や出現状況等を観察した。採苗器から採集され、モノクローナル抗体に反応したアコヤガイ初期稚貝写真を図 2 に、アコヤガイ初期稚貝のサイズ別出現状況を図 3 に示した。初期稚貝の発光発色は外套膜や足糸が顕著であった。殻形状は殻長 0.4 mm を超えると周縁殻が発達し左右異形となり、殻長 1 mm を超えると殻に色素が現れ、より顕著となった。サイズ別にみると採苗開始から約 10 日後に殻長 1 mm 未満の初期稚貝、約 20 日後に殻長 1 ~ 4 mm の初期稚貝、約 30 日後に 4 mm 以上の初期稚貝の出現が確認できた。当抗体は浮遊幼生から 4 mm 以上の初期稚貝まで反応し、種の判定に有効な手法であることがわかった。



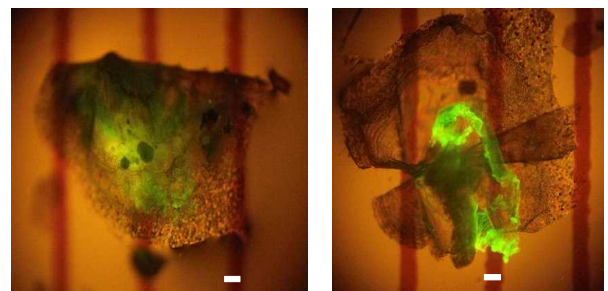
左上: 殻長 0.4 mm, 右上: 殻長 0.6 mm



上: 殻長 0.8 mm



左上: 殻長 1 mm, 右上: 殻長 2 mm



左上: 殻長 2.5 mm, 右上: 殻長 2.5 mm 殻開時

図 2 モノクローナル抗体に反応した天然アコヤガイ初期稚貝 (スケールバー: 200 $\mu$ m)

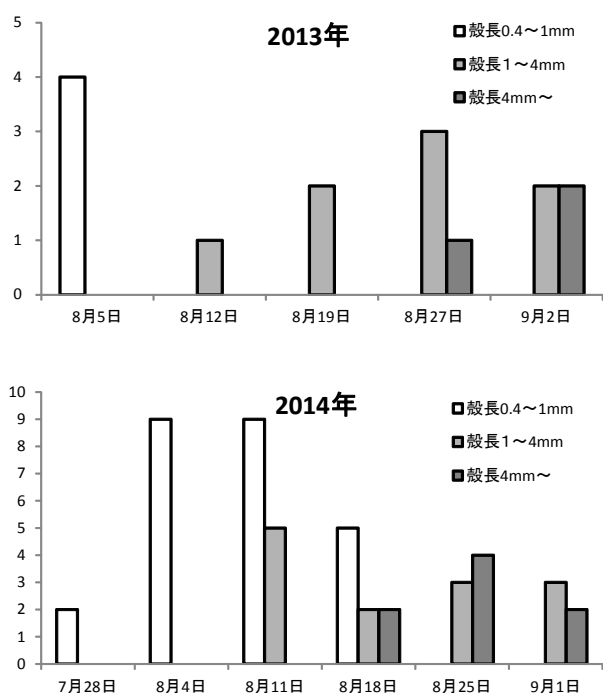


図3 杉葉採苗器に付着したアコヤガイ初期稚貝のサイズ別出現状況

今回使用した杉葉採苗器の野外サンプルは浮泥や付着物等が多く、直接顕微鏡下で観察が困難であった。そのため簡易に観察するためには、ブラッシング、洗浄、濃縮、選別等の各行程が必要なケースがあったことから、野外サンプルから付着稚貝を採集、観察するまでの手法例を図4に示した。サンプルを処理する作業行程は、サンプルを氷冷し分析室に持ち帰り、ブラッシングしてPBS（リン酸緩衝生理食塩水）等の緩衝液を使用して付着物全量をバット上に移す。次に目合い2mm程の荒目メッシュと0.2mm程の細目メッシュ2種類を使用して洗浄、濃縮、選別を行う。荒目メッシュに残留したアコヤガイ初期稚貝は周縁殻が発達し既にアコヤガイ特有の稚貝形状を呈しており、目視や検鏡等による形態観察が可能であるため直接観察する。細目メッシュに残留した付着物は適量マイクロチューブ等に移し、モノクローナル抗体と反応させた後、蛍光顕微鏡で発光発色反応の有無を確認する。

## 考 察

モノクローナル抗体法は、1975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た。<sup>5)</sup> 近年、水産分野においても水産生物の同定や魚

野外サンプル(杉葉等)を氷冷し、分析室に持ち帰る



サンプルをブラシ等でブラッシングし、緩衝液で付着物をバットに移す



目合い0.2mmメッシュ及び2mmメッシュで洗浄、濃縮、サイズ別に選別する



2mmメッシュに残る付着物は、目視等で直接形態観察し、同定する



0.2mmメッシュに残る付着物は、適量のマイクロチューブ等に移す



間接蛍光抗体法でモノクローナル抗体と付着物を反応させる



蛍光顕微鏡下で発色発光反応の有無や形態を観察し、同定する

図4 野外サンプルから付着稚貝を採集、観察する前処理工程

病診断等に同手法が利用されており、アサリ浮遊幼生、<sup>3,4)</sup> アコヤガイ浮遊幼生、<sup>2)</sup> ヤマトシジミ浮遊幼生、<sup>6)</sup> マダイ卵、<sup>7)</sup> アコヤガイ赤変病<sup>8)</sup>等の事例がある。

種の同定にモノクローナル抗体法を用いるメリットは、PCR 等他の手法に比べ、技術の熟練や高額な分析機器等が不要である。また、サンプルを破壊することなく、顕微鏡下で迅速に発光発色の有無を容易に識別できることである。<sup>9)</sup> このことから、真珠養殖業者にとっても導入が容易な手法であると考えられる。

本県で開発したアコヤガイ浮遊幼生同定用のモノクローナル抗体<sup>2)</sup>は、図5のとおりアコヤガイ浮遊幼生のベラムに特異的に反応し、明瞭に発光発色することで蛍光顕微鏡等を用いて同定が可能である。一般的にアサリ等の二枚貝はベラムを脱落、退化させ稚貝となるため、ベラムに特異的に反応する様に開発した浮遊幼生同定用のモノクローナル抗体は、これまで初期稚貝には利用できないと考えられてきた。

しかし、本研究の結果、アコヤガイは浮遊幼生同定用のモノクローナル抗体を使用することによって、初期稚貝でも外套膜や足糸が明瞭に抗体反応で発光発色し、同定が可能であることが明らかとなった。これは浮遊幼生から初期稚貝まで同一のモノクローナル抗体で同定が可能であることに加え、初期稚貝に変態する過程でベラムの一部を外套膜等の他器官に分化して稚貝に成長した可能性を示唆している。アコヤガイと同様に二枚貝には、ベラム組織を外套膜等の他器官に残して成長する種類が存在するものと考えられる。モノクローナル抗体は生存個体でも標識が可能であり、発光発色で形態観察がより

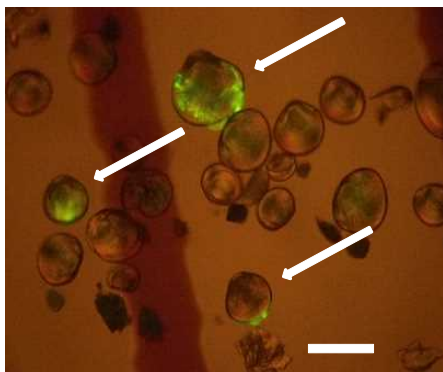


図5 モノクローナル抗体と反応して蛍光色を発色したアコヤガイ浮遊幼生 (矢印: アコヤガイ浮遊幼生, スケールバー: 100 $\mu$ m)

容易となることから、変態過程の観察等、学術的な研究分野においても、充分利用が可能と考えられる。

またアコヤガイ初期稚貝のサイズ別出現状況から、モノクローナル抗体法を使用することで、稚貝の付着状況に加え、成長状況の把握も可能であり、より計画的な養殖管理が実践できるものと推察された。

一方、モノクローナル抗体法の欠点としてアコヤガイについてもウグイスガイ科との交差反応性があげられるが、本県養殖海域のウグイスガイ科の出現は、浮遊幼生数はアコヤガイの約3%と著しく低いこと<sup>2, 10)</sup> また1 mm以上の初期稚貝では形態観察で分類も可能と考えられること等から養殖現場で使用する手法として特に問題とはなっていない。

野外サンプル採取から初期稚貝同定までの方法としては、野外サンプル採取後、氷冷、ブラッシング、洗浄、濃縮、選別等の行程後に、モノクローナル抗体法と形態観察を併用することでアコヤガイ初期稚貝の付着状況の把握が可能である。この技術は1~2回程度の実習で容易に習得でき、これまで不明であった初期稚貝の出現動向がサンプリングから約半日程で把握できるため、真珠

養殖業者に好評で、既に養殖現場で実用化されている。採苗時期の判断や採苗場所の検討等、天然採苗に関する効率化が期待できる。

## 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) 福澄賢二, 浜口昌巳, 小池美紀, 吉岡武志. 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. 福岡県水産海洋技術センター研究報告 2013 ; 23 : 27-32.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 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) 勢村均, 増田一志, 石田健次, 開内洋, 浜口昌巳. 宍道湖におけるヤマトシジミの初期生活史. 島根県水産技術センター研究報告 2014 ; 6 : 31-43.
- 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) 伊東尚史, 山下浩史. アコヤガイ赤変病の検出用モノクローナル抗体, その調整方法及び利用方法. 特許4700973. 2011.
- 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.