

異なる時期に採集されたアサリの 無酸素耐性と炭水化物含量の関係

松田正彦, 北原 茂¹, 日向野純也², 品川 明³, 石松 惇⁴

Relationships between anoxic tolerance and carbohydrate content of Manila clam *Ruditapes philippinarum* collected in different months

MASAHIKO MATSUDA, SIGERU KITAHARA¹, JUNYA HIGANO², AKIRA SHINAGAWA³
AND ATSUSHI ISHIMATSU⁴

Manila clams in a culture area in Isahaya Bay were exposed to anoxia (DO < 0.1 mg/l) for 72h at 28 °C from July to October in 2003-2006 to examine a possible relationship between summer mass mortality and physiological state (anoxia tolerance and carbohydrate content). Although survival at 72 h varied largely between years, survival at 56, 48 and 32h was higher in July to August, and declined in September to October. Carbohydrate content showed a similar monthly variation. These data demonstrated that anoxia tolerance varied between months even when tested at a constant temperature, and that changes in carbohydrate content potentially contributed to the tolerance. We tentatively concluded that a carbohydrate content of 30 mg/g was a threshold for anoxia tolerance. The fact that anoxia tolerance was higher in August than in October indicates that the summer mass mortality is primarily due to environmental conditions, rather than physiological state of the clams alone.

アサリ *Ruditapes philippinarum* は日本各地の内海、内湾の潮間帯から浅海域に生息する産業上重要な二枚貝である。長崎県諫早湾北部に面する諫早市小長井町では客土覆砂による造成漁場でアサリ養殖業が営まれ、漁家の主要な収入源となっているが、夏季に大量への死が発生し、漁業経営を圧迫する要因となっている。¹⁾ への死要因として高水温、貧酸素、赤潮等の環境要因や衰弱などの生理状態の低下が疑われているが、明らかになっておらず、への死防止対策を行う上で大きな障害となっている。

潮間帯および浅海に生息するアサリなどの二枚貝は、低塩分や貧酸素など環境の変化に対し、閉殻に

よって順応²⁾ するが、閉殻時には外部環境中の酸素を取り入れて利用できないため、無気呼吸を維持し、代謝を低くして比較的長期間生存する事が知られている。³⁾ アサリの貧(無)酸素耐性については室内実験で調べられており、水温 25°C 以下ではほぼ無酸素の環境においても半数がへの死するのに 2 日以上を要している。^{4,5,6,7)} このように、25°C 以下の水温では高い耐性を持つアサリであるが、水温 25°C を上回る高水温の貧酸素耐性についてはヤマトシジミ *Corbicula japonica*⁸⁾ やシズクガイ *Theora fragilis*⁹⁾ では室内実験で知見があるものの、アサリについてどのような貧(無)酸素耐性を示すかなどの知見はほとんどない。また、柿野⁵⁾

1 長崎県県央水産業普及指導センター

2 水産総合研究センター 増養殖研究所

3 学習院女子大学 国際文化交流学部

4 長崎大学 環東シナ海環境資源研究センター

や鈴木ら¹⁰⁾は実験水温や生理条件(グリコーゲン含量や絶食等)によってアサリの貧酸素耐性は大きく異なることを推察しているが、水温、溶存酸素濃度等の条件を一定にし、その変化を詳細に調べた事例はない。

今回、耐性時間を指標に、夏季の大量へい死がアサリの季節的な生理状態によるものなのか、環境要因によるものかを推察するため、夏季の水温を想定した28°Cで2003~2006年の4ヶ年の7月~10月(2004年は8月~10月)の無酸素耐性を評価することとした。

また、黒田ら¹¹⁾はアサリが貧酸素や苦潮に対してどの程度耐性を示すかは、嫌氣的代謝に切り替わる溶存酸素濃度の閾値やその時点で蓄積しているグリコーゲンの量とその消費速度によって影響されると考えられるとしている。Uzaki et al.¹²⁾もグリコーゲン含量は貧酸素曝露時の生理状態の指標と思われるとしている。このように貧酸素耐性と関連があると考えられる炭水化物含量の時期別の推移と無酸素耐性ととの関係を調べ、知見を得たので報告する。

材料および方法

無酸素耐性実験

2003~2006年の7月~10月の期間(2004年のみ8月~10月)に長崎県諫早市小長井町地先のアサリ養殖漁場A~Cの3漁場(Fig. 1)で採取したアサリ成貝を実験材料とした。採取されたアサリは長崎県総合水産試験場の陸上水槽で1~2日間、実験水温の28°Cに無給餌で馴致し、実験に用いた。

2003年はA漁場で採取したアサリ(殻長 36.8 ± 2.3 mm), 2004年はB漁場のアサリ(34.6 ± 2.0 mm, 8~10月), 2005年はC漁場のアサリ(33.2 ± 1.7 mm), 2006年はB漁場のアサリ(34.1 ± 1.5 mm)をそれぞれ供試個体とした。

実験は水温28°Cで行い、2003年は上面を発泡スチロールで蓋をした2 l ガラスビーカー、2004~2006年は3 l 広口T型瓶(蓋付き)に濾過海水を満たし、

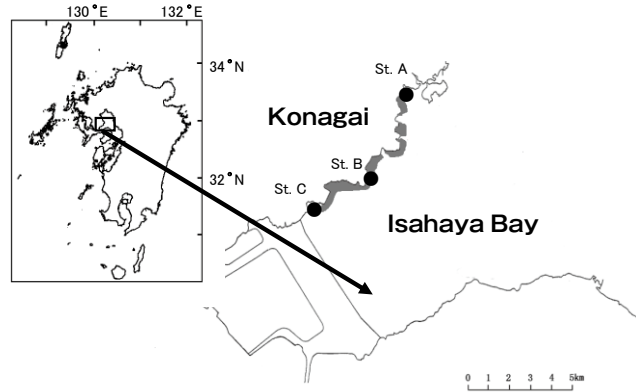


Fig. 1. Location of the monitoring stations A, B and C in Isahaya Bay, Kyushu, Japan. The shaded areas represent Manila clam culture area.

実験水温に設定したウォーターバス内に設置して、アサリ10個体(2003年7月30日の実験は8個体、同年9月24日の実験は9個体)を収容し、窒素で曝気し、飼育水中の溶存酸素濃度(以下、DO)0.1mg/l未満の無酸素とした環境に72時間曝露し、無酸素区とした。また、空気曝気により常時DO 5mg/l以上とした対照区を設け、無酸素区同様に10個体(2003年7月30日の実験は8個体、同年9月24日の実験は9個体)のアサリを収容し実験を行った。アサリの生残状況は実験開始後8, 24, 32, 48, 56, 72時間後に観察し、へい死貝はその都度取り上げた。へい死の判定は、開殻している個体の外套膜、閉殻筋にピンセットの先で刺激を加えた際の閉殻反応の有無によって行った。DOの測定は溶存酸素計Oxi340i(WTW社)を用い30分毎に行った。実験は無給餌で行い、換水は無酸素区、対照区とも8~12回転/日を目安に行った(Fig. 2)。

炭水化物含量の測定

無酸素耐性実験と同じ群のアサリそれぞれ10個体の炭水化物含量を調べた。

供試個体の軟体部を1個体分ずつ30%水酸化カリウム溶液20 ml(100°C, 1時間以上)に溶解し、試料溶液とした。得られた試料溶液を2003年のA漁場の試料については、定法に従いムタローゼ・GOD法(グルコースCII-テストワコー、和光純薬社)を用いて分析し、2004年のB漁場と2005年のC漁場および2006年のB漁場の試料に

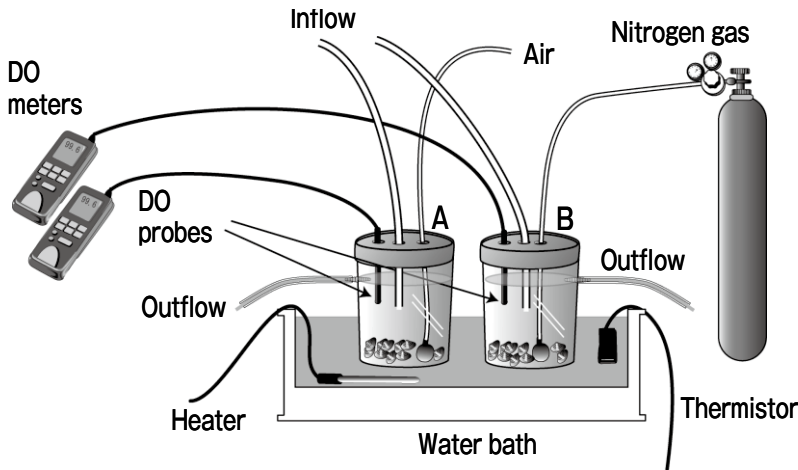


Fig. 2. Diagram of the experimental setup used for anoxic seawater exposure of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. (A) Control; (B) Anoxia.

についてはフェノール硫酸改良法¹³⁾で分析し、軟体部湿重量1g当たりの炭水化物含量を求めた。

炭水化物含量と各曝露時間毎の生残率および半数致死時間(以下, LT₅₀)との関係は $P < 0.05$ で相関の有意性の検定を行った(EXCEL統計Ver.6.0, エスミ社)。

結果

無酸素耐性実験

実験の結果を Fig. 3 に示す。

2003年A漁場アサリ無酸素区の72時間後の生残率は7月14日が80%, 7月30日が25%, 8月11日が0%, 8月27日と9月10日が30%, 9月24日と10月23日が0%で, 対照区は7月14日~9月10日までが100%, 9月24日が89%, 10月23日が90%であった。

2004年B漁場アサリの無酸素区の72時間後の生残率は8月31日が60%, 9月14日が100%, 9月27日が50%, 10月12日が30%, 10月27日が0%で, 対照区は8月31日~10月27日まで100%であった。

2005年C崎漁場アサリの無酸素区の72時間後の生残率は7月6日が20%, 7月21日が100%, 8月6日が50%, 8月17日が100%, 9月2日~10月17日までが0%で, 対照区は7月6日~10月4日まで100%, 10月17日が90%であった。

2006年B漁場アサリの無酸素区の72時間後の生残率は7月11日が40%, 7月25日が70%, 8月7

日が90%, 8月22日と9月6日が100%, 9月22日が20%, 10月5日が80%, 10月21日が20%で, 対照区は7月11日~10月21日まで100%であった。

炭水化物含量の推移

2003~2006年の無酸素耐性実験に用いた養殖漁場の各年毎のアサリの炭水化物含量の推移を Fig. 4 に示す。

2003年A漁場の各調査日の炭水化物含量の平均値は11.7~31.1 mg/gの範囲であった。実験開始時の7月14日に 27.1 ± 11.1 mg/gであった炭水化物含量

は7月30日に 31.1 ± 10.0 mg/gと最大値を示した。8月11日~9月10日の期間は平均27.7~29.1 mg/gとほぼ横ばいの状況であったが, 9月24日に 23.3 ± 7.9 mg/gとやや減少し, 実験終了時の10月23日には最小値の 11.7 ± 3.8 mg/gと減少した。

2004年B漁場の各調査日の炭水化物含量の平均値は31.8~45.9 mg/gの範囲であった。実験開始時の8月31日に最小値 31.8 ± 4.8 mg/gであった炭水化物含量は9月14日に 45.9 ± 3.5 mg/gと最大値を示したが, 9月27日に 41.2 ± 3.2 mg/g, 10月12日に 33.0 ± 9.0 mg/gと減少し, 実験終了時の10月27日には 34.4 ± 6.2 mg/gとなった。

2005年C漁場の各調査日の炭水化物含量の平均値は17.1~41.8 mg/gの範囲であった。実験開始時の7月6日に 28.7 ± 3.2 mg/gであった炭水化物含量は8月17日に 41.8 ± 19.1 mg/gと最大値を示したが, 9月2日に 22.3 ± 3.1 mg/g, 9月16日に 17.1 ± 3.4 mg/g(最小値)と減少し, 実験終了時の10月17日には 18.1 ± 5.1 mg/gとなった。

2006年B漁場の各調査日の炭水化物含量の平均値は37.5~64.3 mg/gの範囲であった。実験開始時の7月11日に最大値の 64.3 ± 9.8 mg/gであった炭水化物含量はその後減少し, 9月6日に 40.8 ± 7.7 mg/gとなった。その後9月22日に 47.8 ± 5.5 mg/g, 10月5日に 49.3 ± 12.4 mg/gと増加したが, 実験終了時の10月21日には最小値 37.5 ± 8.8 mg/gに減少した。

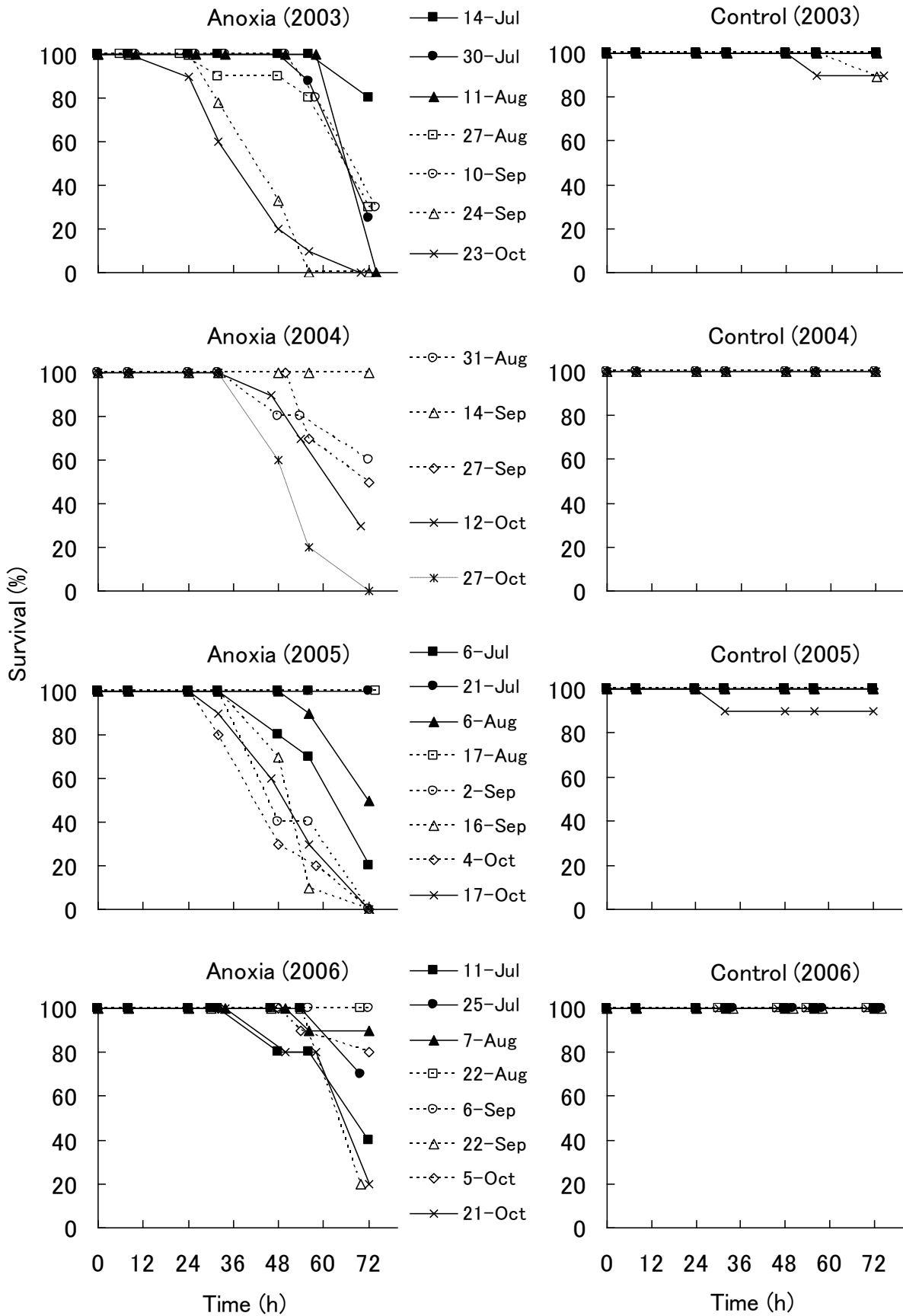


Fig. 3. Changes in survival of Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to anoxia from 2003 to 2006 (n = 10, except 30-July (n = 8) and 24-Sep. (n = 9), 2003). Dissolved oxygen concentrations of anoxia and control were maintained below 0.1 mg/l and over 5 mg/l, respectively, at 28°C.

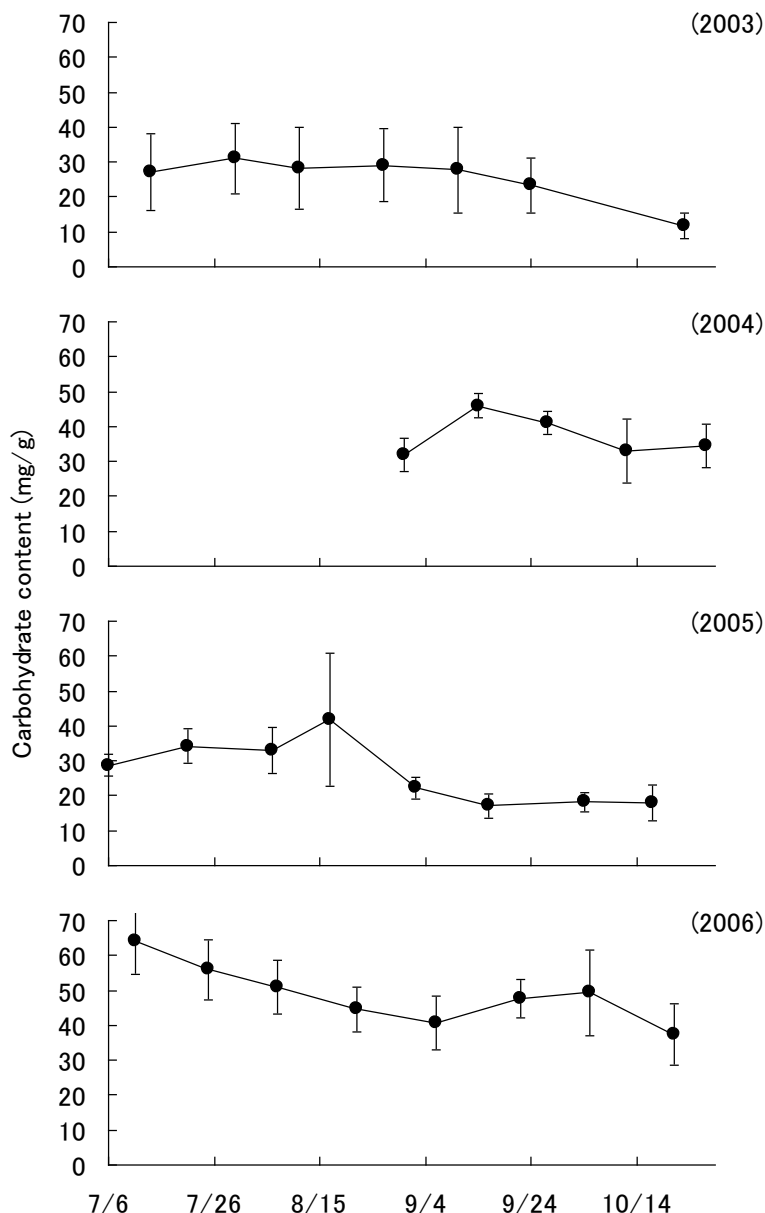


Fig. 4. Changes in carbohydrate content of Manila clam *Ruditapes philippinarum* used for the anoxic tolerance experiments shown in Fig. 3. Data are given as the mean \pm SD (n = 10).

考 察

無酸素耐性実験の各年実験日毎の32, 48, 56, 72時間後の生残率の推移をFig. 5に示す。

72時間の生残率は各年変動が大きく、傾向がつかみにくい。56時間生残率は生残率がいずれの時期も80%以上の2006年を除き、7~8月は高く、9~10月に低下する傾向であった。48時間生残率も56時間生残率と同様の傾向であった。32時間生残率は全ての実験日で100%であった2004年、2006年を除くと、2003年は9~10月にかけて、2005年は10月の生残率が低下する傾向であった。

(2003) 一方、炭水化物含量 (Fig. 4) は各年、含量の増減には違いがあるが、7~8月のデータがほとんどない2004年を除けば、7~8月に含量が高く、9月から10月にかけて低い傾向であった。

(2004) 2003~2006年のアサリの調査日別の平均炭水化物含量と無酸素耐性実験日別の32, 48, 56, 72時間後の生残率との関係をFig. 6に、実験終了時までの生残率が50%以下の実験時、観察時間毎の生残率の推移からLT₅₀を求め、LT₅₀と炭水化物含量との関係をFig. 7に示した。

(2005) 72時間後生残率では不明瞭であるが、炭水化物含量30 mg/g前後で各曝露時間の生残率に差があると考えられたため、含量30 mg/g以上と以下でそれぞれ生残率との相関を求めた (Fig. 6)。含量30 mg/g以下では56時間後生残率で $r^2=0.67$, 48時間後で $r^2=0.60$, 32時間後で $r^2=0.43$ とそれぞれ正の有意な相関 (n = 11) であったが、72時間後生残率では有意な相関が認められなかった。また、含量30 mg/g以上でもそれぞれ有意な相関が認められなかった (n = 17)。

(2006) 炭水化物含量30 mg/g以上では、72時間曝露後の生残率で変動が大きく傾向がつかみにくいが、曝露56時間以内の生残率では含量とは横ばいかもしくはわずかに右肩上がりの関係で、無酸素耐性に大きな変化はないと考えられた。相関が認められた32~56時間後生残率の含量30 mg/g以下では炭水化物含量の低下に従い、曝露時間別の生残率も低下する傾向であったが、72時間後生残率ではその関係が不明瞭であった。なぜ、72時間曝露と56時間以下の曝露でこのような差となったのかは不明であるが、水温28°C、72時間の無酸素曝露はそれより短い曝露時間と比べ、アサリの生存に強い影響を与

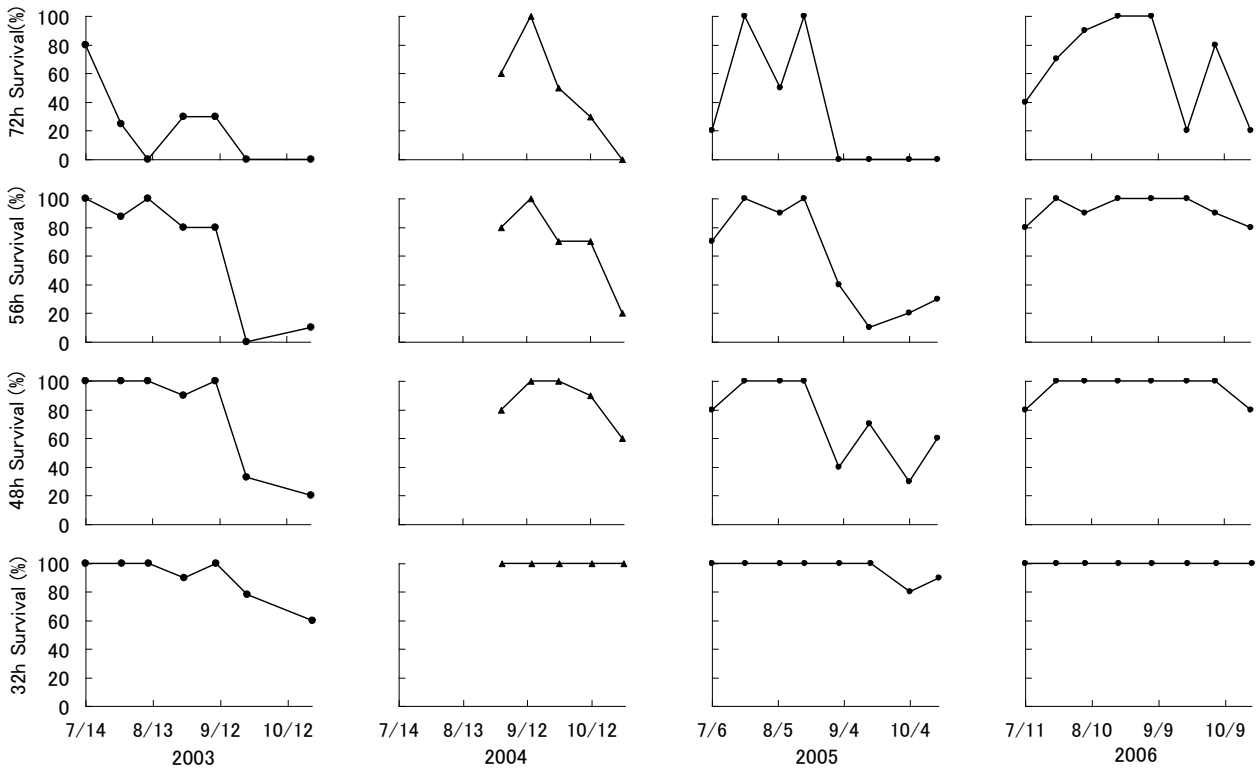


Fig. 5. Changes in 32, 48, 56 and 72h survival of Manila clam *Ruditapes philippinarum* during exposure to anoxia shown in Fig. 3.

える環境と考えられた。

56 時間以下の曝露では含量 30 mg/g 前後で生残率に差があり，含量 30mg/g 以上で概ね 60%以上の生残率であったこと，含量 30mg/g 以下の回帰直線 (Fig.6) から求めた 32～56 時間曝露後の含量 30mg/g での生残率は 86.6～100%といずれも高い値を示した。

曝露時間別生残率と同じく，炭水化物含量 30mg/g以上と以下でLT₅₀に差があると考えられたため，それぞれ相関を求めたところ，含量 30mg/g以下では含量が低くなるほどLT₅₀も低くなる正の有意な相関 ($r^2=0.72$, $n=10$) がみられたが，含量30mg/g以上では有意な相関 ($n=9$) が認められなかった (Fig.7)。

これらの結果から，アサリの無酸素耐性維持の目安は炭水化物含量30mg/g以上と考える。

黒田ら¹¹⁾ は三河湾においてアサリを収容したカゴを漁場に設置，同時に水温，DO等を連続観測し，定期的に生残とグリコーゲン含量を調べた結果，漁場で貧酸素化が進み，無酸素が頻繁に観測されるようになるとグリコーゲン含量が33 mg/gから18 mg/gに急減し，アサリがほぼ全滅したとしてい

る。Uzaki et al.¹²⁾ も三河湾において同様の調査を行い，貧酸素化し，グリコーゲン含量が27.8 mg/gから21.4mg/gに減少したのち全滅した例と，それぞれ別の漁場でのグリコーゲン含量が34.0 mg/gでへい死率13.3%，15.7 mg/gで57.3%と差が出たことを報告している。野外調査の結果であるため単純な比較はできないが，佐伯・熊谷¹⁴⁾ が述べているようにグリコーゲンが炭水化物の大部分で9割を占めること¹⁵⁾ を前提とすると，Fig.6で炭水化物含量が30 mg/g前後を境に各耐性時間別の生残率に大きな差があったことと三河湾での野外調査の知見は良く一致する。

Table 1に示したとおり，小長井町アサリ養殖漁場での大量へい死は7～9月，特に8月に多く発生している。今回の試験結果から7～8月頃のアサリは，へい死が発生しない10月頃のアサリよりも無酸素耐性および炭水化物含量が高く，生理状態が顕著に低い状況ではないと考えられることから，夏季大量へい死がアサリの生理条件のみによって引き起こされているのではなく，何らかの環境要因に大きく支配され，引き起こされていることが明らかとなった。

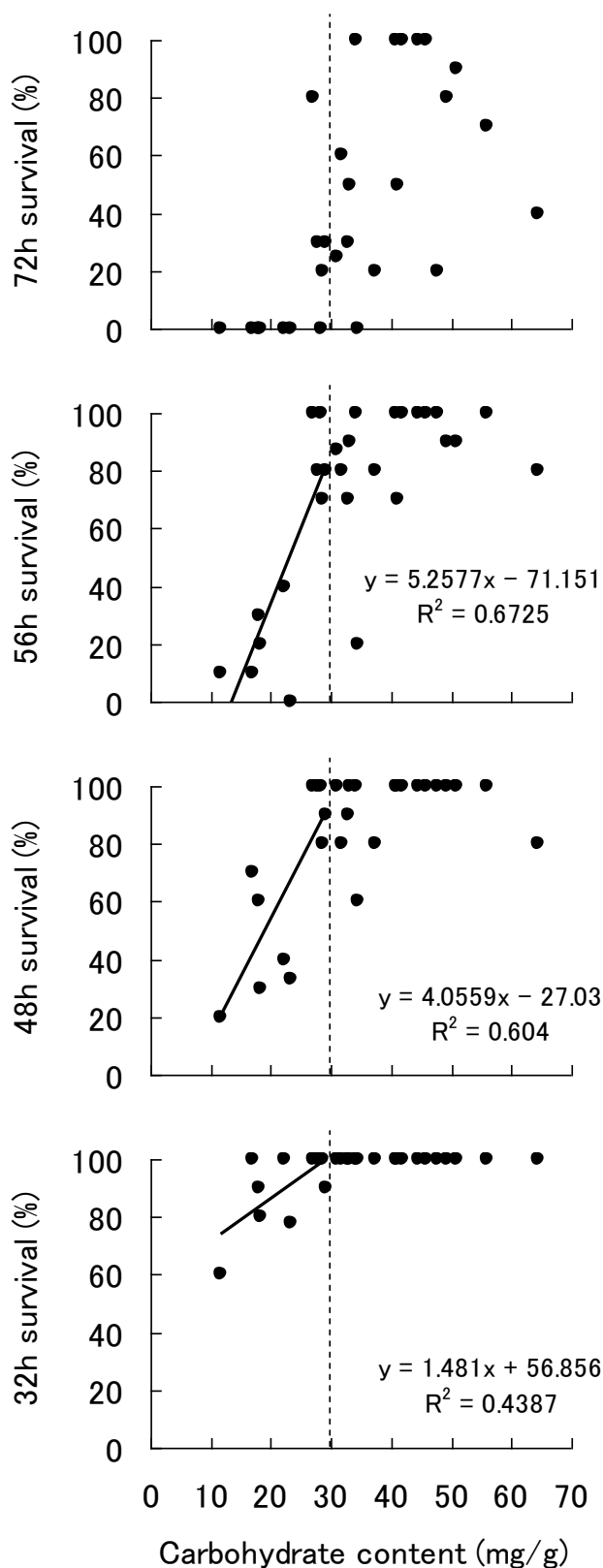


Fig. 6. Relationships between carbohydrate content and each time survival (32, 48, 56 and 72h) of Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to anoxia from 2003 to 2006. Dissolved oxygen concentration was maintained below 0.1 mg/l at 28°C. Vertical broken lines indicate carbohydrate content of 30mg/g. Regression lines were calculated only for carbohydrate content below 30mg/g ($P < 0.05$).

夏季高水温下の貧酸素時のアサリのへい死機構は、無酸素曝露時の炭水化物含量の顕著な減少²⁾や嫌氣的代謝時の代謝産物蓄積¹⁶⁾の影響などが考えられるが明らかになっていない。また、黒田ら¹¹⁾も嫌氣的代謝による生存の限界とグリコーゲン含量がどのように関連するのか、生死を分けるグリコーゲン含量の閾値が存在するのかは不明であるが、アサリ漁場の管理にとって重要であり、今後明らかにする必要があるとしている。これらの機構や生死を分ける閾値などはアサリの無・貧酸素環境によるへい死対策を検討する上で重要であり、その解明は今後の検討課題である。

柿野⁵⁾はアサリの貧酸素耐性が実験水温と季節による生理条件によって大きく異なることを推察したが、今回の実験のように水温28°C、無酸素と一定の条件で耐性試験を実施しても耐性がアサリの採取時期により変化することが明らかとなり、生理状態(炭水化物含量)の違いが耐性に関係していると示唆された。

アサリの生理状態の低下は夏季大量へい死を促進する一因²⁾と考えられるため、へい死対策のひとつとして、本実験の結果から夏季の養殖漁場のアサリの生理状態を飼育条件の改善(生息密度、底質改善)などにより、炭水化物含量30 mg/g以上を目安に維持することが有効であると考えられる。

謝 辞

本実験を行うにあたり調査の実施や試料の採取などにご協力をいただいた長崎県総合水産試験場の方々および長崎県小長井町漁業協同組合の職員と漁業者の方々に心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) 山本憲一, 藤井明彦, 松田正彦. 二枚貝等の生産阻害要因の解明. 有明海の海洋環境の変化が生物生産に及ぼす影響の解明, 農林水産省農林水産技術会議事務局, 東京. 2005 ; 96-103.
- 2) 松田正彦. アサリ養殖漁場における夏季大量へい要因の検討. 博士論文, 長崎大学, 長崎. 2008.

- 3) 日向野純也. 貧酸素・硫化水素・浮泥等の環境要因がアサリに及ぼす影響. 水研センター研報 2005 ; 別冊3号 : 27-33.
- 4) 倉茂英次郎. 常温における朝鮮産アサリの致死酸素量. 日本海洋学会誌1942 ; 1 : 123-132.
- 5) 柿野純. 青潮によるアサリへの死原因について 貧酸素水および硫化物の影響. 千葉水試研報 1982 ; 40 : 1-6.
- 6) 萩田健二. 貧酸素水と硫化水素水のアサリのへの死に与える影響. 水産増殖 1985 ; 33 : 67-71.
- 7) 中村幹雄, 品川明, 戸田顕史, 中尾繁. 宍道湖および中海産二枚貝4種の環境耐性. 水産増殖 1997 ; 45 : 179-185.
- 8) 中村幹雄, 品川明, 戸田顕史, 中尾繁. ヤマトシジミの貧酸素耐性. 水産増殖 1997;45:9-15.
- 9) 玉井恭一. シズクガイの貧酸素耐性. 日水誌 1993 ; 59 : 615-620.
- 10) 鈴木健吾, 清本節夫, 興石祐一. 断続的な貧酸素曝露がアサリの栄養状態および貧酸素耐性に与える影響. 水産技術 2012 ; 5 (1) : 39-47.
- 11) 黒田伸郎, 甲斐正信, 原保. 漁場環境変動に伴うアサリのグリコーゲン含量の変動. 愛知水試研報 1998 ; 5 : 35-39.
- 12) Uzaki N, Kai H, Aoyama H, Suzuki T. Changes in mortality rate and glycogen content of Manila clam *Ruditapes philippinarum* during the development of

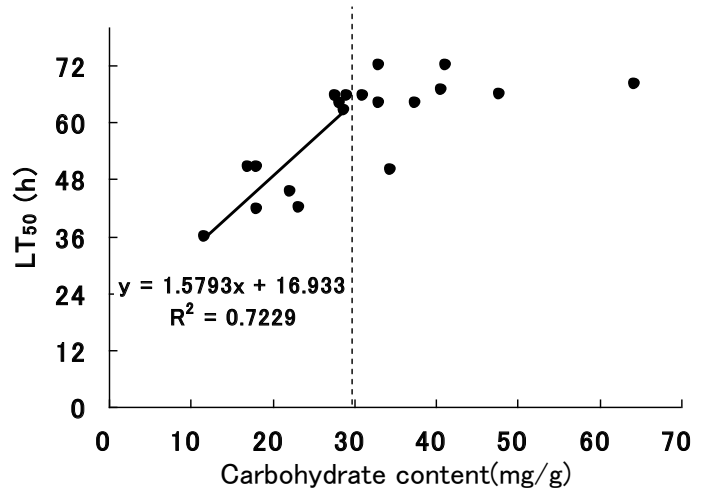


Fig. 7. Relationships between carbohydrate content and LT_{50} of Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to anoxia from 2003 to 2006. Dissolved oxygen concentration was maintained below 0.1 mg/l at 28°C. Vertical broken line indicates carbohydrate content of 30mg/g. Regression line was calculated only for carbohydrate content below 30mg/g.

- oxygen-deficient waters. *Fish. Sci.*2003 ; 69 : 936-943.
- 13) Kushwaha SC, Kates M. Modification of phenol-sulfuric acid method for the estimation of sugars in lipids. *Lipids*1981 ; 16 : 372-373.
- 14) 佐伯清子, 熊谷洋. アサリの一般成分および無機成分の季節的変動. 日水誌 1980 ; 46 : 341-344.
- 15) 鴻巣章二, 藤本健四郎, 高橋良子, 松下輝子, 橋本芳郎. アサリのエキス成分ならびに蛋白のアミノ酸組成. 日水誌 1965 ; 31 : 680-686.
- 16) ホチャチカ P.W. 「低酸素適応の生化学」恒星社厚生閣, 東京. 1984 .

Table 1 The mortality of the Manila clam culture area in Konagai, Isahaya Bay, Kyushu, Japan

Year	Period of mortality	Mortality area	Estimated mortality (%)
1998	Late July	Whole area	40
1999	Late August	A part of area (The head of the bay)	10
	Late September	Whole area	27
2000	Early August	Whole area	24 - 100
2001	Late July	A part of area (The middle of the bay)	24 - 85
2002	Early August	A small part of area (The mouth of the bay)	10 - 40
2003	Early August	A small part of area (The head of the bay)	38 - 66
	Early September	A part of area (The head of the bay)	15 - 100
2004	Mid-August	Whole area	10 - 100
2007	Late August - Early September	Whole area	52 - 100