

クマサルボウ浮遊期幼生の成長に伴う消化器官の発達と 初期餌料の検討

大橋 智志

Observations on the digestive organ development and a feeding experiment
on the planktonic larvae of the Ark Shell *Scaphaca globosa ursus*

Satoshi Ohashi

A histological study on the digestive organ development, and a feeding experiment to evaluate the dietary value of the two planktonic algae, *Chaetoceros calcitrans* (small-type) and *Pavlova lutheri*, were conducted on the planktonic larvae of the Ark Shell *Scaphaca globosa ursus*. The alimentary canal and the stomach were formed in early D-larval stage, during which the evagination of digestive diverticulum cells commenced. Many body cells were found containing two types of granules thought to be egg yolks, and these were thought to be used as nutrients during this stage of development.

During the mid D-larval stage when larvae start feeding, the formation of pyloric caecum, and the storage of lipid granules in cells of the stomach wall were observed. However, yolk granules were still present in body cells. In the late D-larval stage, yolk granules disappeared while lipid granules increased.

In the umboral stage of larvae, the digestive diverticulum formed on the upper stomach. Based on this, growth increased until the settlement stage.

C. calcitrans (small-type) supported growth until the umboral stage, but growth became stagnant thereafter. In the case of *P. lutheri*, a wide deviation in growth was observed during the D-larval stage, but larval growth became normal thereafter. Results show that the planktonic larva of the Ark Shell changed its method of nutrient uptake three times during the D-larval stage and this can be attributed to the development of the digestive organ.

Neither *C. calcitrans* (small-type) nor *P. lutheri* fully supported growth of larvae, suggesting the need to investigate for a more suitable diet for a stable seedling production.

クマサルボウ *Scapharca globosa ursus* は、有明海と瀬戸内海に生息するフネガイ科の大型二枚貝で、諫早湾では過去に多獲され1992年には約42 tの漁獲記録があるが、近年では資源が減少し漁獲が記録されていない。このため本県では、クマサルボウ種苗生産の試みを進めているが、近縁種のアカガイ *Scapharca broughtonii* が *Pavlova lutheri* と *Chaetoceros calcitrans* あるいは *Pavlova lutheri* と

Chaetoceros gracilis の混合給餌で種苗生産が可能であるのに対して、クマサルボウは同様の餌料条件ではD型期幼生の初期に成長が停滞して斃死し、良好な結果を得ることができていない。また、飼育中の浮遊期幼生については、成長に伴う体組織の発達について十分な知見がないため、斃死要因等の検討が十分にできない状態にある。そこで、クマサルボウ浮遊期幼生の成長に伴う消化器官の発達について組

組織的に明らかにするとともに、初期餌料の検討を行い若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1) クマサルボウ浮遊期幼生の組織学的検討

組織学的検討に用いたクマサルボウ浮遊期幼生は、2002年5月15日、5月23日、6月11日に松田ら¹⁾の方法で得た受精卵から孵化したものをを用いた。得られた浮遊期幼生は25℃の恒温水槽内に収容した500 lポリカーボネイト水槽に飼育水1 mlあたり6~10個体の密度で収容し、*Chaetceros calcitrans*小型株(以下*C. calcitrans*小型株)、*Pavlova lutheri*(以下*P. lutheri*)を混合したものをを用いて給餌飼育を行った。これを採苗までの21~24日間毎日無作為に採集し氷冷下でパラホルムアルデヒド2%・グルタルアルデヒド2.5%溶液(カコジル酸緩衝, pH7.4)で固定した後、1%四酸化オスミウム液(カコジル酸緩衝, pH7.4)で後固定した。固定試料は常法に従ってSpurrのエポキシ樹脂に包埋し、顕微鏡用切片はトルイジン青で、電顕用の超薄切片は酢酸ウラニル-クエン酸鉛で染色を施し観察に供した。

2) 初期餌料の検討

初期餌料の検討には、2002年7月2日に松田ら¹⁾の方法で得た受精卵から孵化した殻長85~90 μm のD型期幼生を用いた。供試した幼生は200 lポリカーボネイト水槽3槽に各々飼育水1 mlあたり0.5~0.85個体の密度で収容し、*Chaetceros calcitrans*小型株給餌区(以下カリストランス区)、*Pavlova lutheri*給餌区(以下パプロバ区)、および無給餌区とした。*Chaetceros calcitrans*小型株は8000cells/ml・日、*Pavlova lutheri*は2000cells/ml・日ずつ給餌し、25℃の恒温水槽内に収容した。飼育水の交換は最初の1回を5日目に、以降は3日毎に全量を交換した。以上の条件で19~21日間飼育し、各成長段階の幼生

が出現する割合の推移と、各実験区毎の実験終了時の生残率を求めた。

結 果

1) クマサルボウ浮遊期幼生の組織学的検討

Fig. 1に採卵日毎の浮遊期幼生の平均殻長の推移を示す。いずれの飼育群も19~21日目には最大殻長が260 μm を超えたフルグロウン幼生が出現し、その後着底した。

ふ化後1日目の浮遊幼生(殻長80~90 μm)は、すでに消化管および胃の原型は形成されていた(Fig. 2 A)。ふ化後2日目(殻長90~95 μm)では消化管および胃が完成し、胃の上部には消化盲嚢細胞の膨出が開始された(Fig. 2 B)。この時期の幼生の体細胞内には電子密度の低い大型の顆粒と電子密度の高い2種の小型の顆粒が多数確認され、この顆粒を内包した状態で細胞分裂を行う細胞が確認された(Fig. 3)。

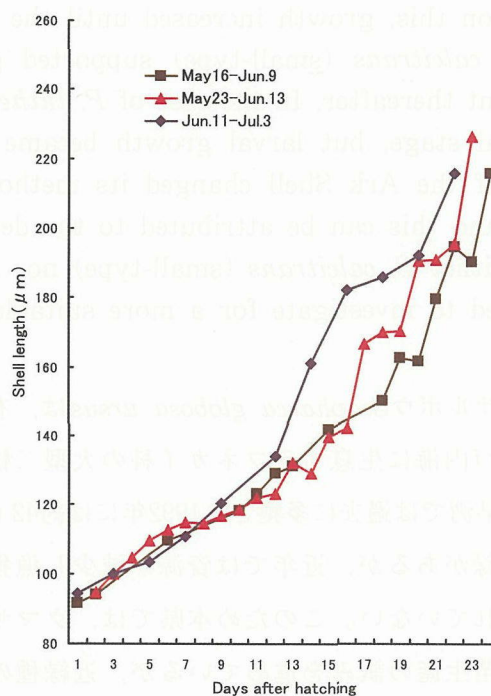


Fig. 1 Average shell length of larvae reared in 2002

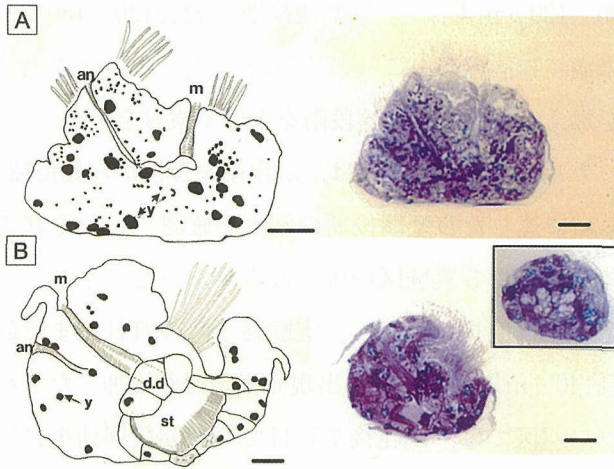


Fig. 2 Diagrams and light micrographs of early D-larvae.

A ; 1 day after hatching,
 B ; 2 days after hatching. The square section shows digestive diverticulum.
 m : mouth, d.d : digestive diverticulum, st : stomach,
 y : yolk, an : anus
 Stained with toluidine blue, Scale bar=10 μ m

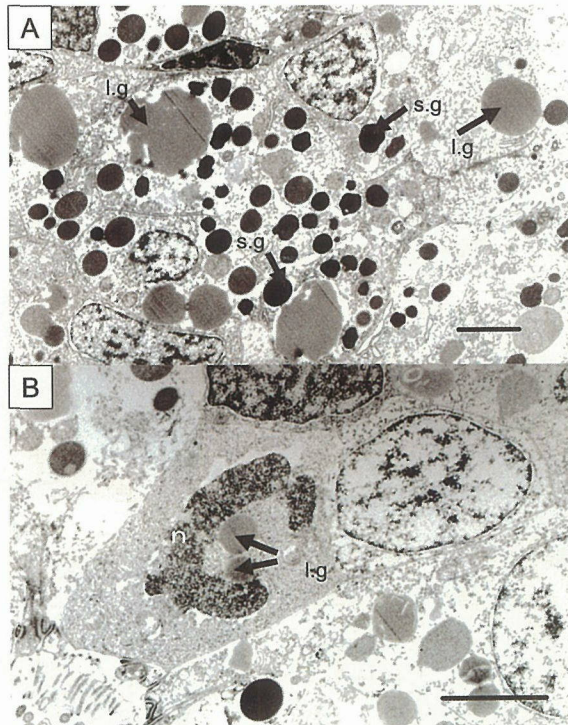


Fig. 3 Transmission electron micrographs of early D-larvae.

A ; Localization of yolk granules
 B ; The yolk granules during cell division
 l.g : large granules, s.g : small granules,
 n : nucleus in cell division
 Scale bar = 1 μ m

ふ化後4日目(殻長100~105 μ m)の幼生では体細胞内の2種の顆粒は急激に減少し、ふ化後6日目(殻長110~115 μ m)には消失した。胃からは晶体嚢が膨出して形成されたが、消化盲嚢細胞はほとんどが若い未分化の細胞であった(Fig. 4, 5)。胃壁細胞では、発達初期にはみられなかった細胞内への顆粒の蓄積が確認された(Fig. 6)。

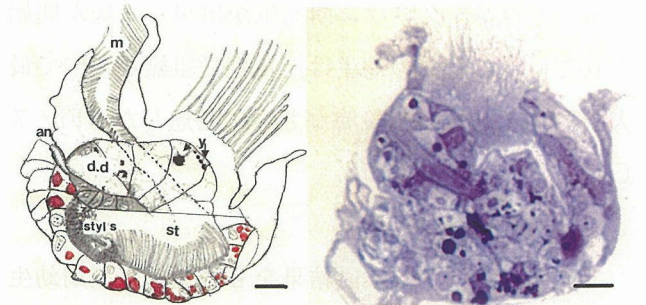


Fig. 4 A diagram and a light micrograph of mid D-larva, 4 days after hatching. Red pigments show lipid granules.

m : mouth, d.d : digestive diverticulum, st : stomach,
 styl.s : style sac, y : yolk, an : anus
 Stained with toluidine blue, Scale bar=10 μ m

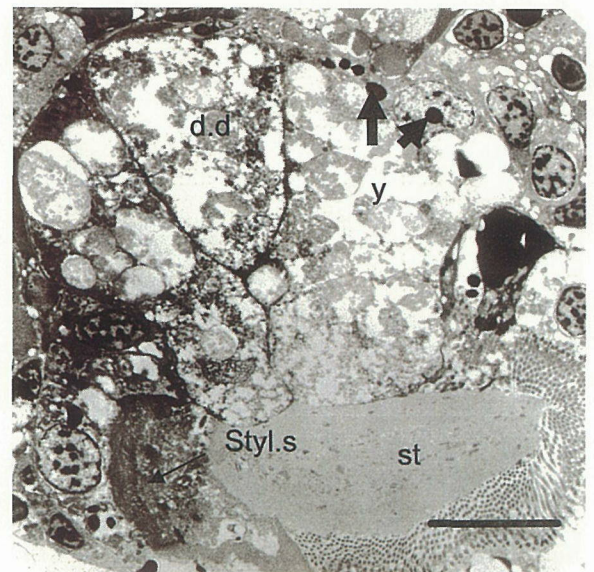


Fig. 5 A transmission electron micrograph of mid D-larva, 4 days after hatching.

d.d : digestive diverticulum, st : stomach,
 styl.s : style sac, y : yolk
 Scale bar = 10 μ m

ふ化後12日目には殻長150 μ mの殻頂期幼生が出現した。殻頂期に達した幼生では胃壁細胞数がさらに増加して顆粒の蓄積が進み、消化盲嚢が組織として確認されるようになった (Fig. 7 A)。この時期から日間成長量は増加し、ふ化後15日目には殻長200 μ mに達する幼生が出現した。この時期の幼生では閉殻筋が確認され、消化盲嚢組織がさらに発達した (Fig. 7 B)。その後、ふ化後19日目以降に、殻長260 μ m以上のフルグロウン期幼生が出現し着底が開始された。この時期の幼生は消化盲嚢組織が体内で最大の器官となり、閉殻筋がさらに発達した (Fig. 7 C)。

2) 初期餌料の検討

上述の組織学的な検討結果をもとに、D型期幼生をD型期初期 (殻長90 μ m未満)、D型期中期 (殻長

90~120 μ m未満)、D型期後期 (殻長120~150 μ m未満)に区分し、これに殻頂期 (殻長150 μ m以上)を加えた4段階の発達段階を用いて検討を行った。

カリステランス区では、ふ化後8日目から殻長120 μ mに達したD型期後期の幼生が確認され、それまでの成長は3実験区の中で最も早かった。しかし、その後は成長が停滞し、実験終了時の21日目まで殻長140 μ m以上の幼生は出現せず斃死が増加した。パプロバ区では、ふ化後7日目でD型期後期幼生に達した幼生が見られたが、その後12日目までの成長はカリステランス区に劣った。しかしふ化後13日目から18日目までの成長はカリステランス区と変わらず19日目以降は成長が上回った。またふ化後15日目以降は殻長150 μ mを超える殻頂期幼生が出現し、最大で殻長180 μ mのものが確認された。無給餌区は殻長

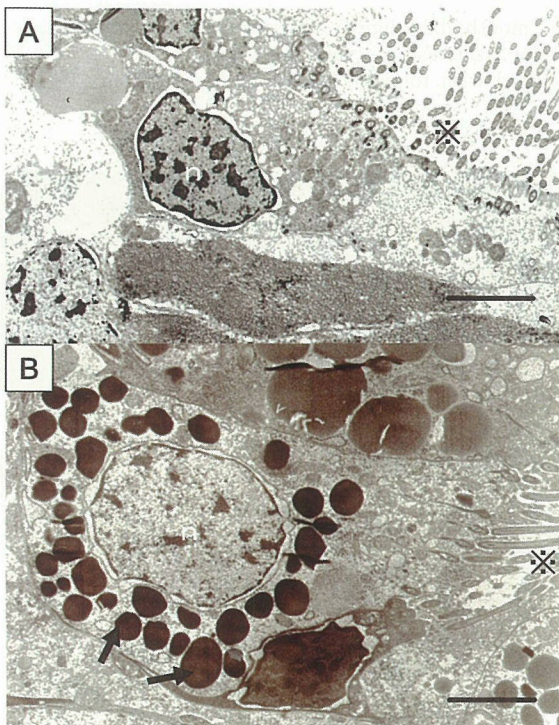


Fig. 6 Comparison of stomach wall cell between early and mid D-larvae, based on transmission electron micrographs.

A ; an Early D-larva

B ; a Mid D-larva (Arrows show lipid accumulation.)

n : nucleus, * : Indicates inner side of stomach, Scale bar = 2 μ m

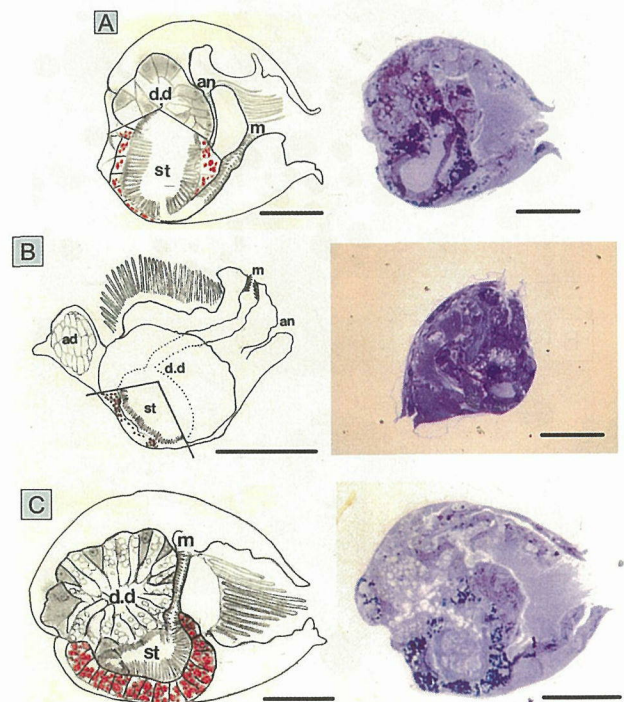


Fig. 7 Diagrams and light micrographs of early (A) and late (B) unboral larvae, a full-grown larva (C). Red pigments show lipid granules.

m : mouth, d.d : digestive diverticulum, st : stomach, ad : adductor, an : anus

Stained with toluidine blue, Scale bar = 40 μ m

105 μ m以上に成長せず、19日目にほとんどが斃死したため実験を中止した。

次に各実験区毎のD型期中期、D型期後期、殻頂期の各成長段階の幼生が出現する割合の推移をTable 1に示す。カリステランス区では11日目に100%の幼生がD型期後期幼生に達したが、実験終了まで殻頂期に達した幼生は出現しなかった。パブロバ区では15日目に83.9%の幼生がD型期後期幼生に達し、殻頂期幼生も徐々に増加した。しかし実験終了までD型期中期の幼生が最低でも12.9%を占め成長にばらつきが見られた。無給餌区ではD型期中期幼生以降に成長することはなかった。各実験区の終了時の生残率は、カリステランス区が7.7%、パブロバ区が59.3%、無給餌区が0.07%であった。

考 察

実験開始時の幼生の体細胞中に確認された2種の顆粒はその消長から卵黄と考えられ、幼生はこの卵黄を栄養としてふ化後1日で消化管を形成し、2日目からは摂餌を開始すると考えられる。しかし、卵黄はふ化後6日目頃まで存在することから、この間は卵黄と餌料の双方の栄養を利用して成長するものと考えられた。このことは、初期餌料試験の無給餌区の幼生が実験開始から6日目までの間はゆるやかな成長を示したことから裏付けられた。

餌料からの栄養吸収は、胃壁細胞と消化盲嚢細胞が行うと考えられた。胃壁細胞ではふ化後2日目以

降、餌料由来の栄養物質と考えられる顆粒の細胞内蓄積が見られ、着底まで続いた。この顆粒は四酸化オスミウムに好染されることから脂質と考えられた。一方、消化盲嚢細胞は、ふ化後2日目から確認されたが、盲嚢組織が形成されたのは殻頂期幼生以降であり、それまでは十分に消化吸収に関与できないものと考えられた。これらの結果から、幼生の餌料からの栄養吸収は殻頂期までは胃壁細胞を主体とし、殻頂期以降は胃壁細胞と消化盲嚢の双方で行われると考えられた。

以上の結果を殻長サイズ毎に整理すると、ふ化後殻長90 μ mまでのD型期初期に卵黄栄養のみで消化管等を形成した浮遊期幼生は、殻長120 μ m未満のD型期中期まで卵黄と摂餌した餌料の双方を利用して成長し、殻長120 μ m以上のD型期後期幼生以降に摂餌のみで成長するようになると考えられた。また栄養摂取の形態は、ふ化から殻長120~150 μ m未満のD型期後期までは胃壁細胞による栄養摂取を主体とし、殻頂期以降は消化盲嚢による栄養摂取が加わると考えられ、殻頂期以降の成長量の増加は、栄養摂取形態の変化によるものと考えられた。

また斃死幼生の殻長組成では、殻長120~130 μ mと殻長160~170 μ mのサイズでピークが見られ²⁾、このことは、卵黄と摂餌した餌料の双方を利用する時期から、摂餌のみに切り替わる時期と、消化盲嚢の形成により栄養摂取の形態が変化する時期にあたり、栄養摂取法の変化が幼生の生残に関与する可能性を示唆すると考えられた。

Table 1. Changes in frequency (%) of three larval stages on each feeding conditions

Feeding conditions	larval stage	Days										
		1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
<i>Chaetceros. caloitrans</i> (small type)	Mid D-larval	100	100	100	93.8	16.7	0	6.7	6.7	16.7	3.3	3.4
	Late D-larval	0	0	0	6.2	83.3	100	93.3	93.3	83.3	96.7	96.6
	Umboral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pavlova. lutheri</i>	Mid D-larval	100	100	100	96.6	60	70	36.7	12.9	38.7	14.5	17.3
	Late D-larval	0	0	0	3.4	40	30	63.7	83.9	54.8	65.5	65.5
	Umboral	0	0	0	0	0	0	0	3.2	6.5	20	17.2
non-feeding	Mid D-larval	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Late D-larval	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Umboral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

次に、餌料別の成長を見ると、カリステランス区は殻長150 μ m未満までのD型期後期までは成長差も少なく良好な成長を示したが、殻頂期幼生は出現しなかった。一方パプロバ区は、殻頂期の幼生が出現したが成長差が大きく、D型期の成長ではカリステランス区に劣った。このことから*C. calcitrans*小型株は胃壁からの栄養吸収を主体とするD型期までの餌料として良好であると考えられた。また*P. lutheri*はD型期以降の消化盲嚢の発達によって餌料としての利用が価値が増すものと考えられた。胃壁細胞からの栄養吸収は、晶桿体が未発達である浮遊期では、消化酵素による餌料の分解吸収ではなく、細胞飲作用による胃壁細胞への直接の取り込みが行われていると考えられ、摂餌する餌料の大きさは栄養吸収に大きく関与すると推察される。このため、長径3 μ m程度の*C. calcitrans*小型株はD型期の餌料として有効であったと考えられたのに対して、*P. lutheri*はD型期の餌料としてはやや大型で、胃壁細胞よりも高い消化能力を持つと考えられる消化盲嚢の形成後に餌料としての有効性が高くなったと考えられた。

2枚貝浮遊幼生の餌料としては、他に*Chaetceros calcitrans* (長径5~6 μ m)、*Chaetceros gracilis* (長径6~8 μ m) *Isochrysis galbana* (長径5~8 μ m) 等があるが³⁾、当水試では今回供試した2種の餌料藻類を混合して給餌する飼育方法で一定の種苗生産結果を得ている。これは2種の餌料藻類が双方の欠点を補完し合った結果と考えられるが、現在の生産状況はまだ不安定であり、今後は明らかにした消化器官の発達を考慮する必要があると考えられた。特に消化器官の中で最大の器官である消化盲嚢が遅れて発達することは、その間の栄養のほとんどを胃壁から摂取することを意味し、胃壁細胞で吸収

される餌料の質が初期浮遊幼生の成長と生残に大きな影響を与えることを示唆している。他県の事例^{4,5)}では*P. lutheri*の単独給餌で良好な結果を得ているものがあるが、これらの事例は*P. lutheri*だけが餌料として有効であったとは考えにくく、環境水中に存在するバクテリア等の成長への関与も疑われるため、今後は微細藻類のみに餌料を限定せず新たな餌料の検討を進めることが重要であると考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたって、有益な助言とご指導をいただいた長崎大学水産学部吉越一馬教授、Cyril Glenn Satuito助手、ならびに瀬戸内海区水産研究所浜口昌巳主任研究官に深謝の意を表する。

文 献

- 1) 松田正彦, 藤井明彦. タイラギ, アカガイに対する産卵誘発方法としての止水と紫外線照射海水の効果. 長崎県水試研報 2000; 26: 9-15.
- 2) 大橋智志. 未発表.
- 3) 押野明夫, 關哲夫, 谷口和也. 二枚貝の餌料となる微小藻類の培養ハンドブック. 水産庁東北区水産研究所 1995.
- 4) 異儀田和弘, 北島博郷, 伊東義信. クマサルボウ *Scapharca globosa* (REEVE) の幼生および稚貝の飼育と形態について. 佐賀水試業務報告書 1977; 19-26.
- 5) 高見東洋, 中村達夫. クマサルボウガイの人工種苗生産に関する研究-I. 山口県内海水産試験場報告 1981; 27-32.