ホタテガイの内面着色発現と外套膜修復過程の組織学的観察

小泉慎太朗・吉田達

目　的

ホタテガイ外套膜が損傷し殻内側に褐色を呈する内面着色[1)]は、貝の健康状態や種苗性の指標として有効であるが、外套膜が損傷を受けてから内面着色が発現するまでの過程や日数、外套膜の経時変化は明らかになっていない。そこで本研究では、外套膜を人為的に傷つけ、内面着色が発現するまでの時間経過と組織の修復過程を、水温、貝の成長段階毎に明らかにする。

材料と方法

試験は、2018年7月19日～8月28日（41日間）と2019年1月25日～6月14日（141日間）に行い、2018年は新貝（2017年産貝）92個体、2019年は稚貝（2018年産貝）126個体と成貝（2017年産貝）92個体を用いた。供試貝について、2018年は2018年7月19日、2019年は2019年1月23日に当研究所の久栗坂実験漁場のホタテガイ養殖施設から採取し、外見上異常がない個体を使用した。試験開始時に供試貝全個体の殻長を測定した後、新貝及び成貝は92個体のうち82個体について、稚貝は126個体のうち116個体について、開殻した際に右殻側の外套膜中央部に貝殻縁辺に対してほぼ垂直になるように解剖バサミで切り込みを入れ（図1）、外套膜に傷を付けた「切傷区」とした。なお、切り込みの長さについて、新貝及び成貝は約5mm、稚貝は約2mmとした。新貝及び成貝の切傷区のうち2個体は、傷を付けた直後の外套膜断面構造を電子顕微鏡で観察するため、解剖バサミを用いて切傷部周辺を1㎝四方で切り出し、ホルマリン1%、グルタルアルデヒド1%、海水98%の混合溶液で固定した。残りの10個体については、切傷区とへい死状況を比較するため、外套膜に傷を付けない「対照区」とした。両区の貝を2018年は20℃に調温したろ過海水をかけ流しにした研究所内の250ℓFRP水槽に収容し（図2）、無給餌で飼育した。2019年は5℃に調温したろ過海水をかけ流しにした研究所内の250ℓFRP水槽に収容し、無給餌で2月18日まで飼育後、同日、水槽から貝を引き揚げ、2kgのコンクリート製の錘を付けた目合3分の3段パールネットに、稚貝は10～11個体/段、成貝は4～5個体/段で収容し、6月14日まで研究所敷地内の桟橋に垂下した（図3、表1）。

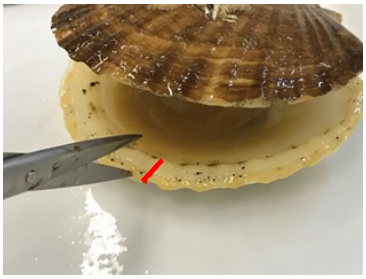


図1. 外套膜に傷を付けた部位（赤線）

図2. 研究所内の250ℓFRP水槽

図3. 研究所敷地内の桟橋（水深5m）

表1. 試験の概要

試験期間	供試貝	飼育環境
2018年（7～8月）	新貝（2017年産・1年貝）	屋内水槽（20℃）（41日間）
2019年（1～6月）	稚貝（2018年産・1年貝） 成貝（2017年産・2年貝）	屋内水槽（5℃）（25日間）→海中（116日間）

内面着色発現経過を明らかにするため、屋内水槽での試験期間中は3～5日毎に切傷区を10個体ずつ水槽から引き揚げ、軟体部を取り除いて右殻の内面着色の有無を確認した他、新貝及び成貝については引き揚げた10個体のうち2個体から切傷部周辺を上記のとおり切り出し、固定した。また、1～3日に1回、死貝の有無を確認した。海中での試験期間中は1ヶ

月毎に死貝の有無を確認したうえで、切傷区を 2 個体ずつ海中から引き揚げ、内面着色の有無を確認した他、切傷部周辺を上記のとおり切り出し、固定した。

試験期間中、外套膜切傷部の状態、殻の変形や欠刻の有無を観察した他、屋内水槽及びパールネットに自記水温計（ONSET 社製 HOBO Water Temp Pro v2）を取り付け、毎時水温を記録した。

固定した外套膜は、凍結乾燥装置（日本電子、JFD-300）による凍結乾燥及びイオンスパッタ装置（日本電子、JFD-1100E）による真空蒸着を行い、走査型電子顕微鏡（日本電子、JCM-6000Plus）で断面構造を観察した。

結果と考察

1. 供試貝と飼育水温

試験開始時の供試貝殻長を表 2 に、試験期間中の飼育水温の推移を図 4 に示した。2018 年新貝の殻長は 97.0mm、2019 年稚貝の殻長は 68.1mm、成貝の殻長は 114.9mm だった。2018 年の水温は、20.1～20.8℃と 20℃台だった。2019 年の水温について、1 月 25 日～2 月 18 日の屋内水槽での飼育期間は 5.5～5.9℃と 5℃台であり、2 月 18 日～6 月 14 日の海中での飼育期間は 1.3～19.8℃だった。

表 2. 試験開始時の供試貝殻長

試験期間	供試貝	殻長(mm)	
		平均	標準偏差
2018年（7～8月）	新貝（2017年産・1年貝）	97.0	4.6
2019年（1～6月）	稚貝（2018年産・1年貝）	68.1	3.5
	成貝（2017年産・2年貝）	114.9	8.3

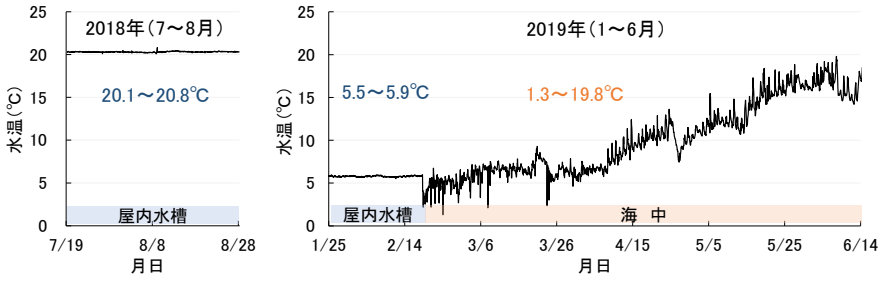


図 4. 試験期間中の飼育水温の推移（左が 2018 年、右が 2019 年）

2. 内面着色発現割合

試験開始日を 0 日目とし、経過日数における内面着色発現割合の推移を図 5 に示した。

2018 年の 20℃環境下における新貝の内面着色発現割合は、4 日目から内面着色を形成した個体が出現し、11 日目以降に内面着色発現割合が 100%となった。なお、11、14、19 日目で内面着色発現割合が 100%だったことから、それ以降、内面着色有無の確認は行わなかった。

2019 年の 5℃環境下における稚貝の内面着色発現割合は、稚貝成貝共に 10 日目から内面着色を形成した個体が出現し、稚貝は 14 日目以降、成貝は 18 日目以降に内面着色発現割合が 100%となった。なお、18、22 日目で内面着色発現割合が 100%だったことから、屋内水槽での飼育期間中、それ以降の内面着色有無の確認は行わなかった。

以上のことから、水温 20℃の環境下では外套膜が傷を負ってから 10 日前後、水温 5℃の環境下では 15 日前後で内面着色が形成されることがわかった。この結果は、外套膜切傷後 10 日目から切傷部に接する殻内側に着色を示す個体が現れたという過去の報告[1)]と概ね一致した。水温 5℃より 20℃の方が内面着色発現までの日数が短かった要因として、ホタテガイの鰓繊毛運動の好適水温は 5～20℃の範囲で、その間においては水温の上昇に伴って相対匍匐速度が増加することから[2)]、5℃より水温の高い 20℃の環境下でホタテガイの生理活性が高く、外套膜の機能が活発だったと考えられる。また、成貝より稚貝の方が内面着色発現までの日数が短かった要因として、産卵を控えた 2 年貝は生殖細胞の成熟にエネルギーを消費しており、外套膜の傷修復機能が低下していたと考えられる。

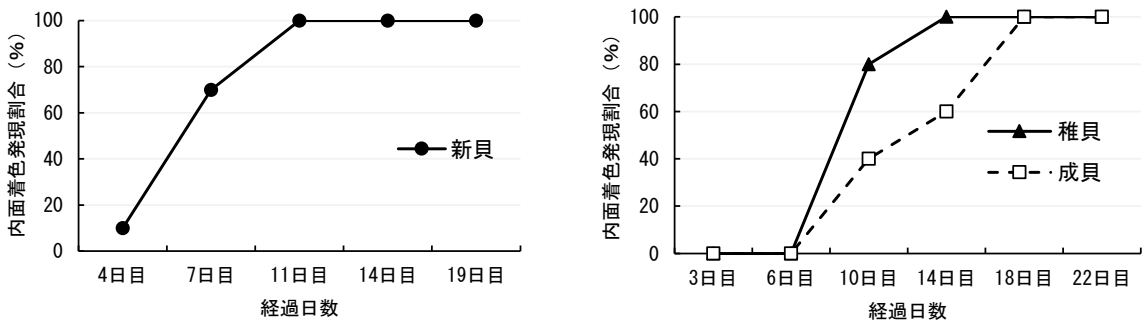


図 5. 内面着色発現割合の推移（左が 2018 年の 20℃環境下、右が 2019 年の 5℃環境下）

3. 経過日数毎の内面着色発現状況

内面着色が発現した個体の右殻内側殻縁辺部の様子を 2018 年新貝については付図 1～5 に、2019 年稚貝については付図 6～13 に、2019 年成貝については付図 14～21 に示した。内面着色は外套膜切傷部に接する殻内側の近くに限定して発現し、殻辺縁部全体に拡がることはなかった。また、経過日数が長くなるにつれ濃い褐色を呈した。稚貝については 53 日目以降、内面着色が見られない個体が現れた。これについて、殻の形成に伴い着色部が炭酸カルシウムの層で覆われ、外見上識別できなくなったためなのか、殻形成の過程で着色部が剥離あるいは融解等により消失したのかは不明である。色の濃淡や着色面積に個体差が見られたが、これは負わせた傷の大きさや各個体の生理活性の違いによるものと考えられる。形成されていた内面着色の中には、切傷部の断面を塞ぐような立体的なものが確認された（図 6）。軟体動物の外傷に対する生体の最初の反応は、筋の収縮による傷口のシールで、次いで体液細胞による血栓形成であり [3]、ホタテガイの内面着色の形成は生体防御の一種で、傷口からの出血を止める機能を有しているとも考えられる。

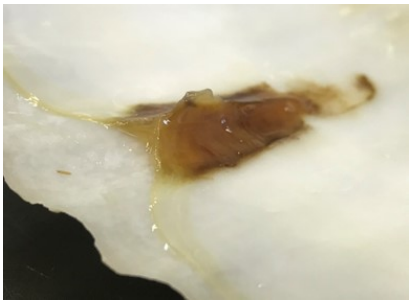
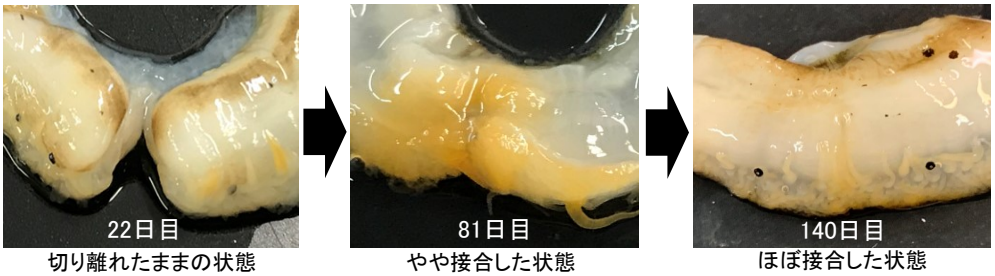


図 6. 立体的に形成された内面着色（29 日目、2018 年、新貝）

4. 外套膜切傷部の修復過程

外套膜切傷部の状態を経過日数毎に観察したところ、2018 年に行った 41 日間の試験では外套膜切傷部は完全に切り離れた状態だったが、2019 年に行った 141 日間の試験では稚貝成貝共に 81 日目以降、外套膜外褶から外套膜中褶にかけて接合している個体が見られた（図 7）。



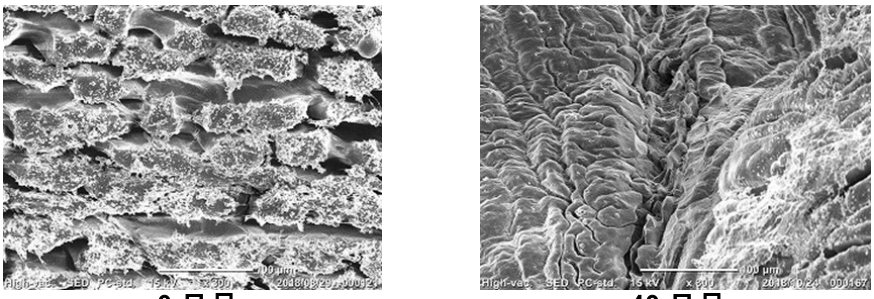
切り離れたままの状態　やや接合した状態　ほぼ接合した状態

図 7. 経過日数における外套膜切傷部（2019 年、稚貝）

電子顕微鏡で撮影した 2018 年新貝の 0、40 日目における外套膜切傷部断面組織を図 8 に示した。0 日目は組織全体に血球が見られ、さらに 40 日目でも血球が凝集している部分が見られた。なお、この途中経過は、検鏡に係るサンプル前処理作業のエラーにより、記録することができなかった。

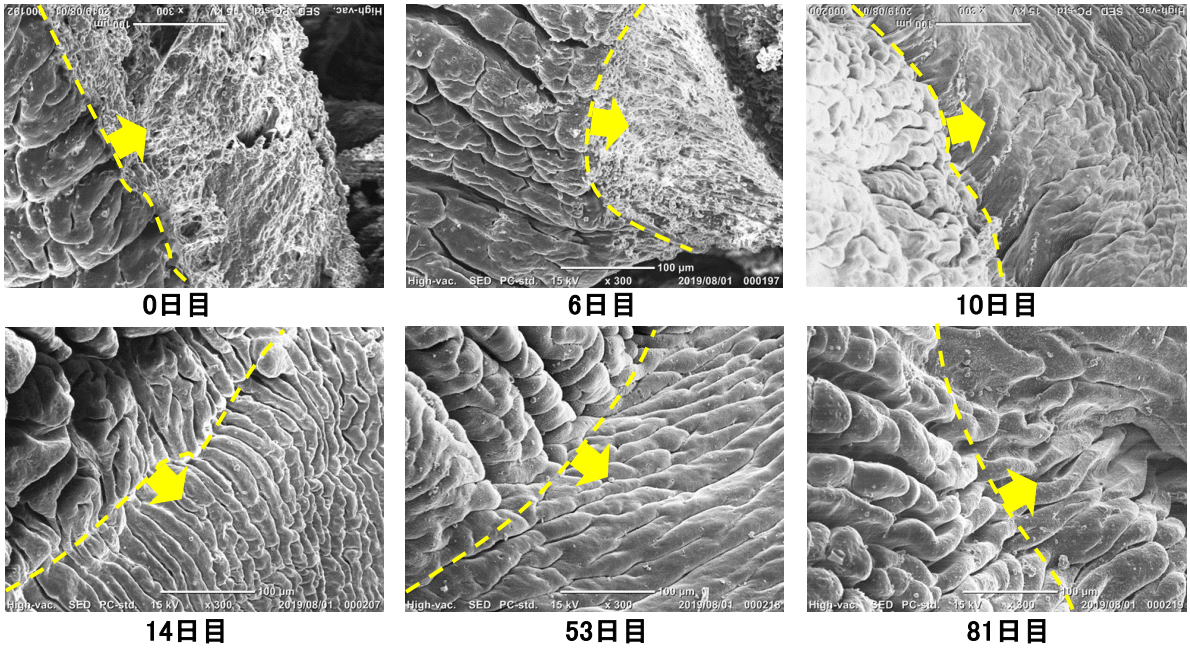
次に、2019 年成貝の 0、6、10、14、53、81 日目における外套膜切傷部断面組織を図 9 に示した。6 日目

以前の断面は組織構造が壊れている状態だったが、10 日目以降、断面に内褶表面に似た凹凸が形成され始め、81 日目には内褶表面と断面の境界がほぼ見分けられなくなるまで形状が変化した。このように、外套膜切傷部の組織が修復されていく過程が確認できた。



0 日目　　40 日目

図 8. 外套膜切傷部の断面組織（2018 年の新貝、左が 0 日目、右が 40 日目、撮影倍率 300 倍、白い顆粒が血球）



0日目　　6日目　　10日目

14日目　　53日目　　81日目

図 9. 外套膜切傷部の断面組織（2019 年の成貝、撮影倍率 300 倍、点線は内褶表面と断面の境界線を示す、矢印は断面側を示す）

5. 欠刻の出現過程

2019 年稚貝の 53、81、110、140 日目における切傷区の右殻内側と外側の様子を図 10 に示した。53 日目時点で欠刻は出現していなかったが、殻の成長に伴い 81 日目、110 日目には欠刻が出現した。その後、140 日目にはＶ字に欠損していた部分が識別できなくなるまで殻が形成された。二枚貝の貝殻は外套膜の分泌物をもとにして形成されるが [1)]、外套膜が損傷を受けたことで一時的に殻形成機能が停止もしくは低下した影響で、損傷を受けていない周辺の外套膜に比べて著しく殻の成長が遅れ、欠刻として出現したものと考えられる。その後、前述のとおり損傷を受けた外套膜が修復されることで、殻形成機能が回復し、次第に欠刻部にも殻が形成され始めたものと考えられる。

このように、外套膜切傷部の殻縁辺部に欠刻が発現し始めたことから、ホタテガイの異常貝は内面着色の発現が先行し、その後に欠刻が出現することを確認できた。

なお、2018 年新貝、2019 年成貝については、試験期間中に欠刻は出現しなかった。この要因として、2018

年は試験期間が 41 日間と期間が短かったこと、産卵を控えた 2 年貝は生殖細胞の成熟にエネルギーを消費しており、外套膜の殻形成機能が低下していたことで殻形成速度に差が生じたと考えられる。

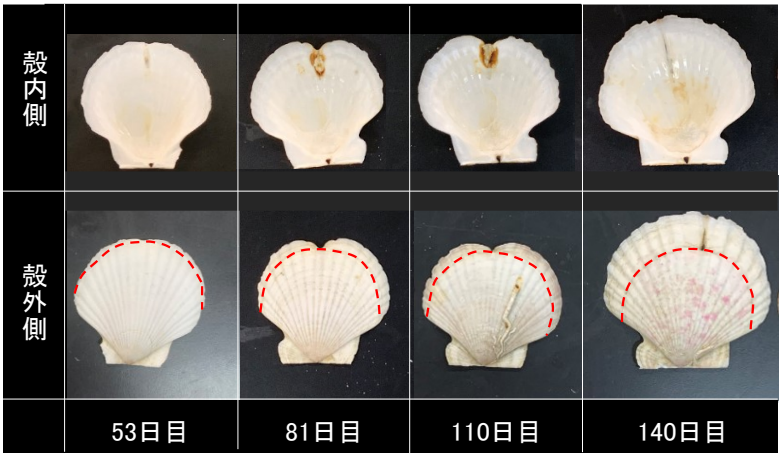


図 10. 経過日数毎の殻内側と殻外側（2019 年の稚貝、点線は試験開始時の殻辺縁部を示す）

6. へい死状況

試験期間中の死貝出現状況を図 11 に示した。2018 年新貝は切傷区で 6 個体、2019 年稚貝は切傷区で 1 個体、対照区で 3 個体、2019 年成貝は切傷区で 13 個体、対照区で 8 個体へい死が確認された。切傷区と対照区で供試貝数が異なること、切傷区は内面着色の有無を調べるため定期的に個体数が減少していることから、単純にへい死率として比較できないものの、対照区であってもへい死が見られた。両区の死貝の殻内側を確認すると、図 12 のように蝶番付近や、傷を負わせていない左殻の外套膜外縁部の内側に広範囲にわたる内面着色が形成されており、試験区設定時に負わせた傷の影響でへい死したものではないと推察された。試験開始時、外套膜の内側までは確認できず、試験開始以前に養殖篭内で貝同士のぶつかり合いや噛み合わせ等によって外傷を負い、体力を消耗した瀕死状態の貝が供試貝として混入してしまったと考えられる。

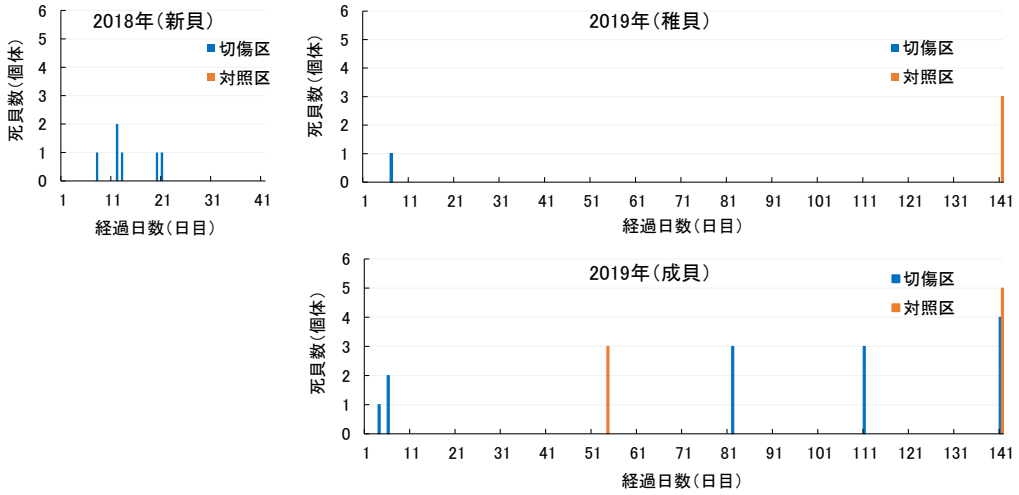


図 11. 試験期間中の死貝出現状況

図 12. 死貝の例（左は蝶番付近に着色、右は外套膜内側の広範囲に着色）

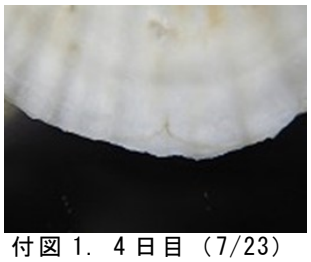
7. まとめ

以上の結果から、水温 20℃の環境下では外套膜が傷を負ってから 10 日前後、水温 5℃の環境下では 15 日前後で内面着色が形成されること、2 年貝より 1 年貝の方が内面着色発現までの日数が短いことがわかった。また、ホタテガイの異常貝は内面着色の発現が先行し、その後、欠刻が出現する過程や、損傷を受けた外套膜組織は時間の経過とともに修復され、停止もしくは低下していた殻形成機能が回復することで再び殻を形成する過程が明らかになった。

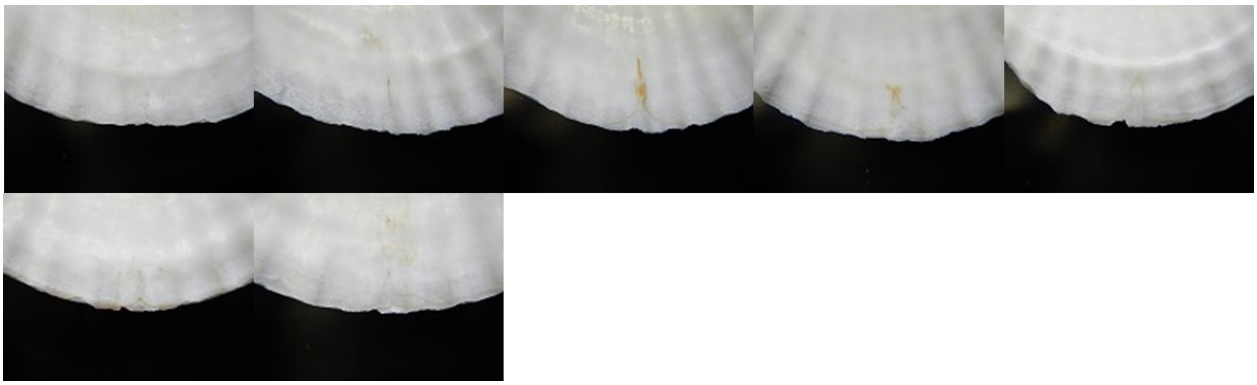
本研究では、試験によって負わせた傷の影響でへい死に至った可能性は低いと考えられたが、これは、①供試貝の健康状態が良好で生理活性が高かったこと、②外套膜の損傷範囲が狭く、へい死に直接結びつくような重症な傷ではなかったこと、③安静な環境で飼育したことにより、へい死に至るまでホタテガイが衰弱することがなかったためと考えられる。異常貝がへい死に関連することは、これまでの研究から明らかであり、外套膜の広範囲にわたる損傷や継続的な損傷、冬季低水温、夏季高水温、波浪、速い潮流の影響等といったホタテガイにとって環境の悪い条件が複合的に関与することで、へい死に至ると考えられる。

文　献

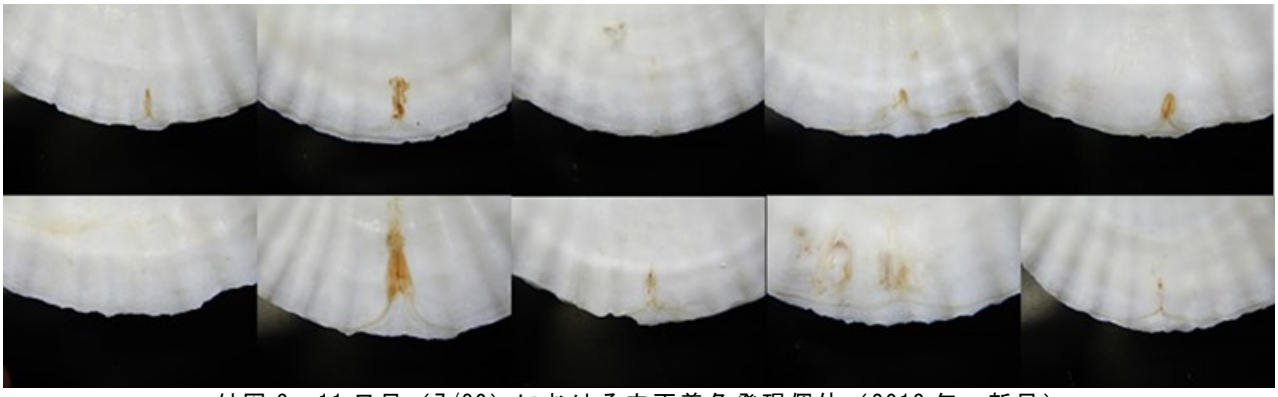
1) 東北大学理学部付属臨界実験所（代表 長内健治）(1979) 異常ホタテガイ発生機構の基礎的研究. 青水増事業概要, 8, 100-123.
2) 山本護太郎, (1964), 水産増養殖叢書 6　陸奥湾におけるホタテガイ増殖, 6-19.
3) 小坂善信・相坂幸二・宝多森夫（1996）耳吊りホタテガイの春季へい死原因について. 平成 6 年度青森水産増殖センター事業報告, 140-149.



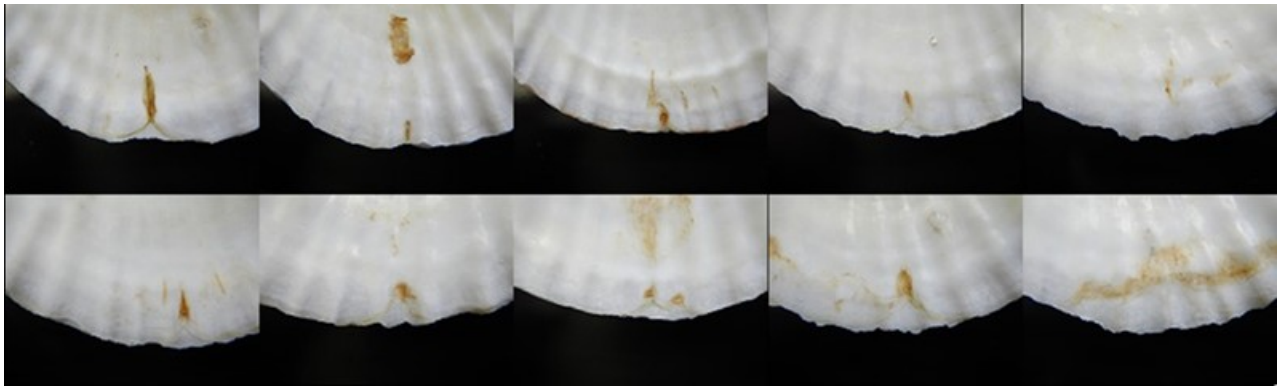
付図 1. 4 日目（7/23）における内面着色発現個体（2018 年、新貝）



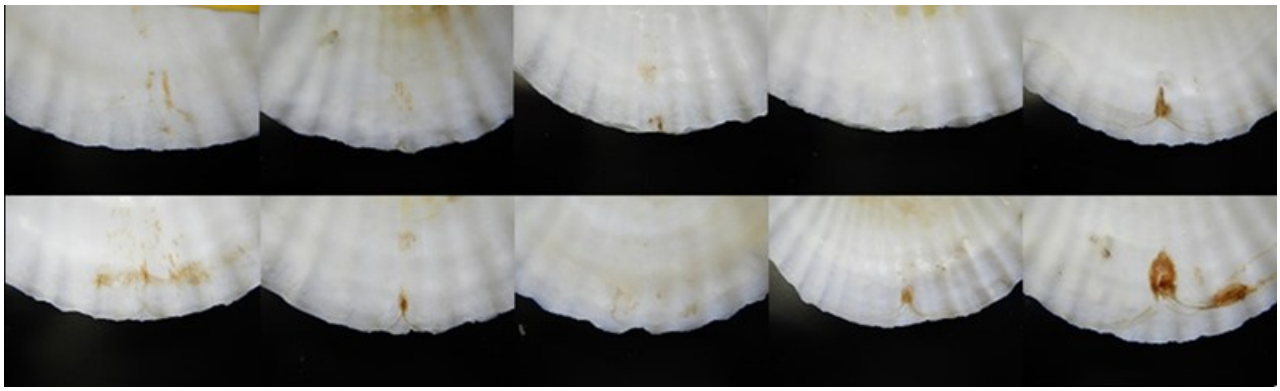
付図 2. 7 日目（7/26）における内面着色発現個体（2018 年、新貝）



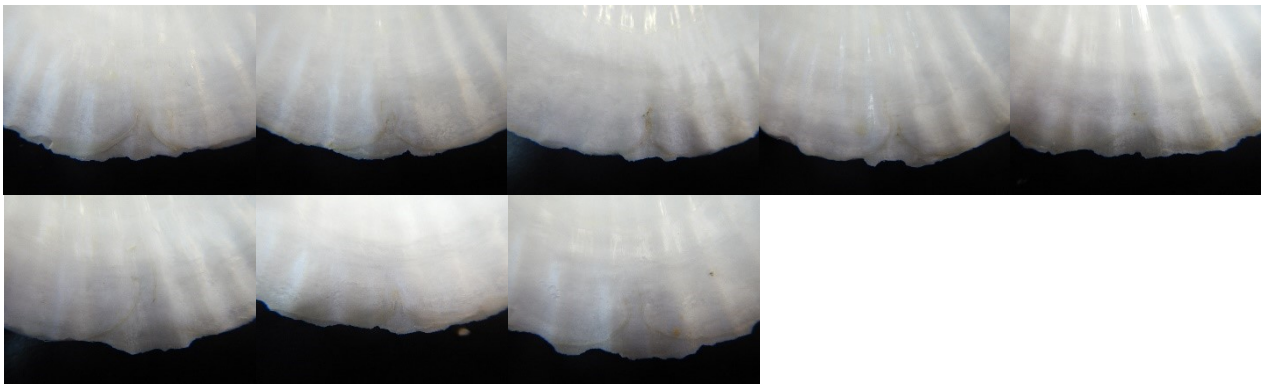
付図 3. 11 日目（7/30）における内面着色発現個体（2018 年、新貝）



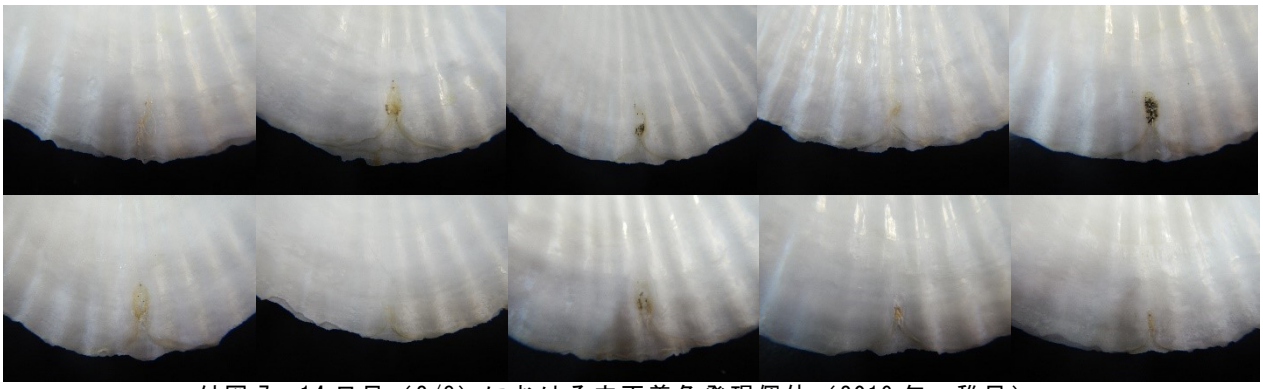
付図 4. 14 日目（8/2）における内面着色発現個体（2018 年、新貝）



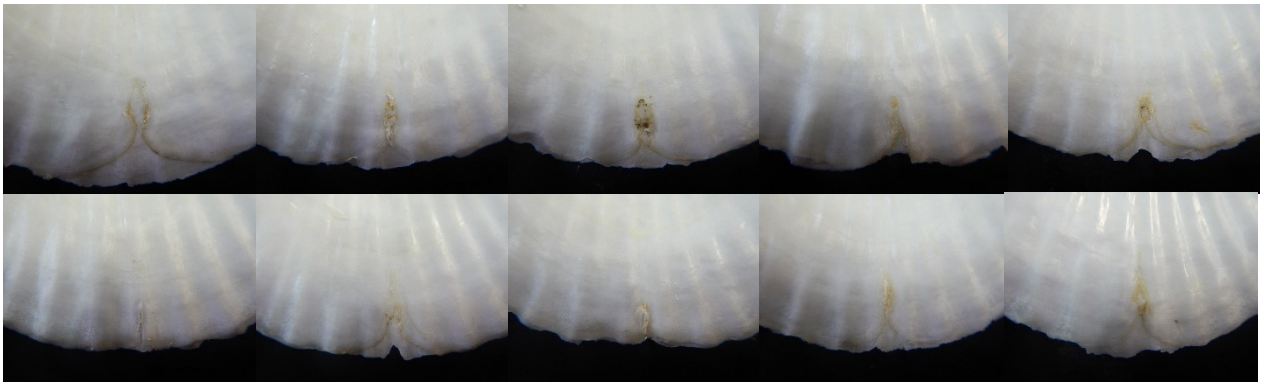
付図 5. 19 日目（8/7）における内面着色発現個体（2018 年、新貝）



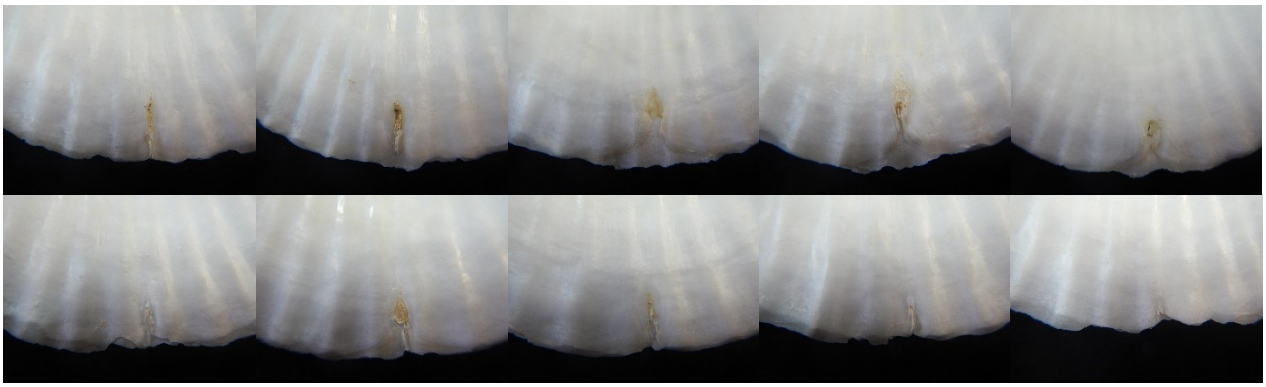
付図 6. 10 日目（2/4）における内面着色発現個体（2019 年、稚貝）



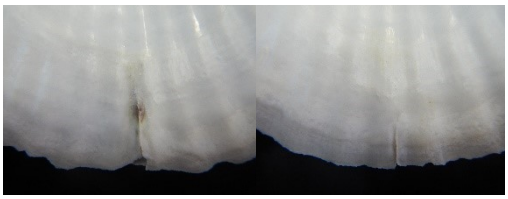
付図 7. 14 日目（2/8）における内面着色発現個体（2019 年、稚貝）



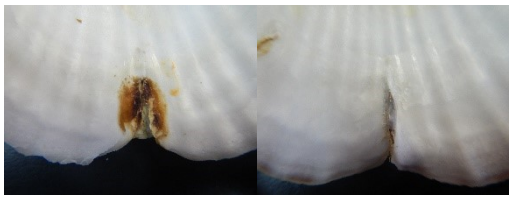
付図 8. 18 日目（2/12）における内面着色発現個体（2019 年、稚貝）



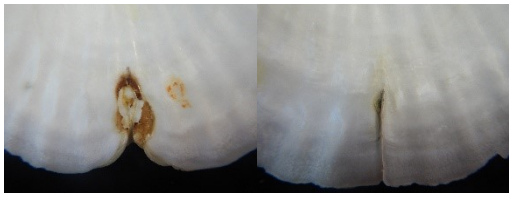
付図 9. 22 日目（2/16）における内面着色発現個体（2019 年、稚貝）.



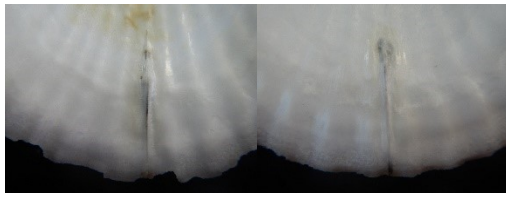
付図 10. 53 日目（3/19）における内面着色発現個体（2019 年、稚貝）



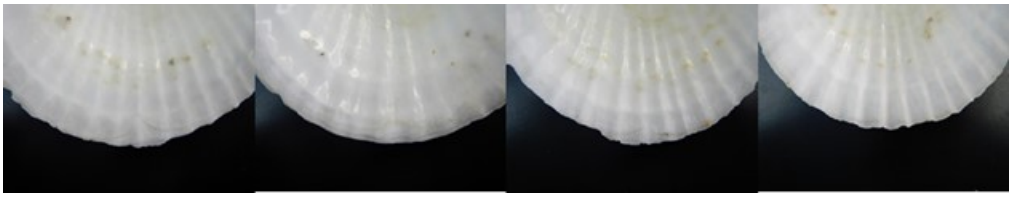
付図 11. 81 日目（4/16）における内面着色発現個体（2019 年、稚貝）



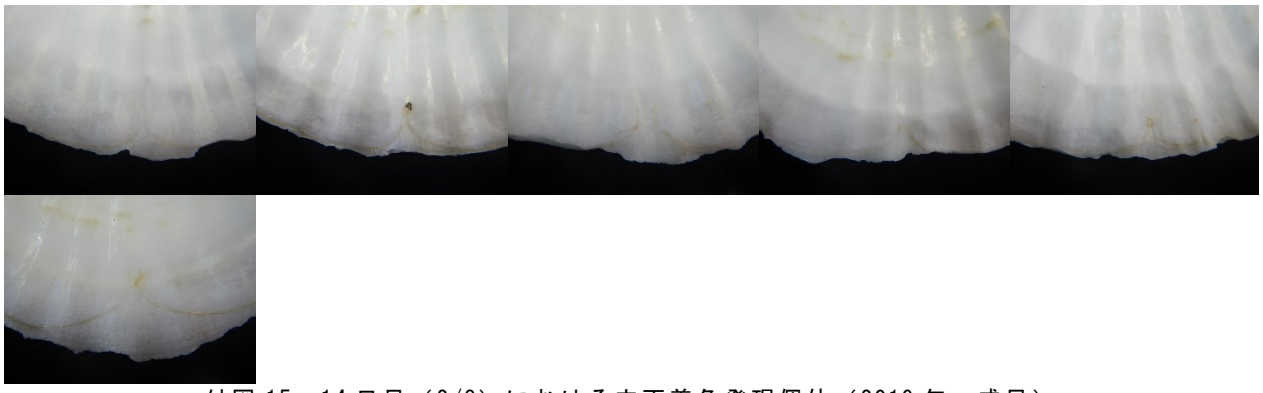
付図 12. 110 日目（5/15）における内面着色発現個体（2019 年、稚貝）



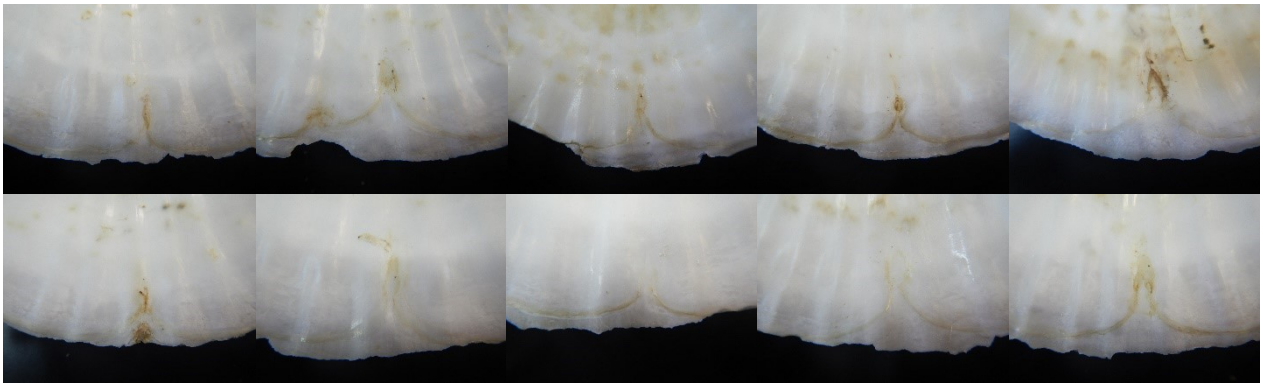
付図 13. 140 日目（6/14）における内面着色発現個体（2019 年、稚貝）



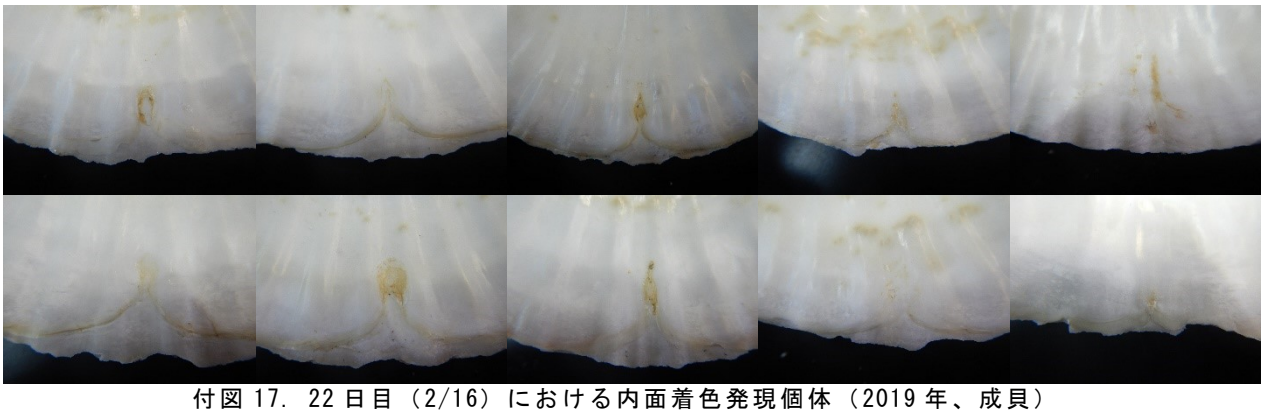
付図 14. 10 日目（2/4）における内面着色発現個体（2019 年、成貝）



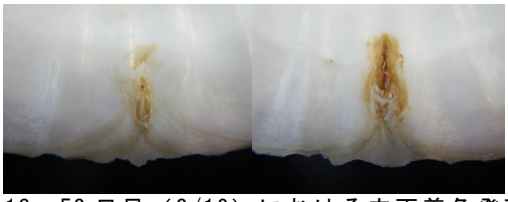
付図 15. 14 日目（2/8）における内面着色発現個体（2019 年、成貝）



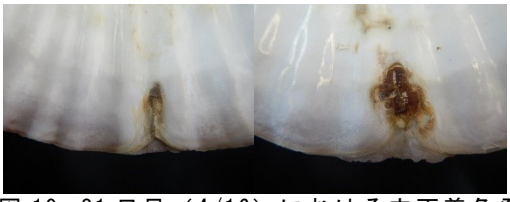
付図 16. 18 日目（2/12）における内面着色発現個体（2019 年、成貝）



付図 17. 22 日目（2/16）における内面着色発現個体（2019 年、成貝）

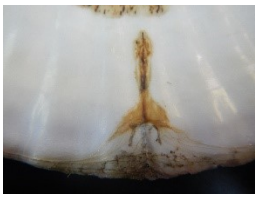


付図 18. 53 日目（3/19）における内面着色発現個体（2019 年、成貝）



付図 19. 81 日目（4/16）における内面着色発現個体（2019 年、成貝）

付図 20. 110 日目（5/15）における内面着色発現個体（2019 年、成貝）



付図 21. 140 日目（6/14）における内面着色発現個体（2019 年、成貝）