短 報

消化管内容物の走査型電子顕微鏡観察に
基づく二枚貝浮遊幼生の食性解析

伯耆匠二

(2020年11月26日受付, 2021年3月31日受理,

2021年6月11日J-STAGE早期公開)

三重大学大学院生物資源学研究所

Dietary analysis of bivalve larvae based on observation
of the stomach contents using a scanning electron
microscope

SHOUJI HOUKI

Graduate School of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie
514-8507, Japanキーワード: 珪藻, 消化管内容物, 走査型電子顕微鏡,
二枚貝浮遊幼生

海洋無脊椎ベントスにおいて、浮遊幼生期の餌料環境は、生活史初期の成長と生残や着底量、個体群加入量に大きな影響を及ぼす重要な環境要因である。^{1,2)}ここ数十年にわたり、日本のアサリ資源は全国的に極めて低い水準で推移しており、その要因について様々な議論が交わされてきた。³⁾これまでに、アサリ資源の減耗・減少と餌料環境との関係を実証的に検証した研究例はないものの、沿岸域の貧栄養化に伴う微細藻類の減少や種組成の変化と、アサリ資源量の減少・低迷との関連が示唆されている。^{4,5)}餌料不足は、アサリの全生活史における潜在的な減耗要因であるが、飢餓耐性の低い浮遊幼生期や着底初期といった生活史初期においては特に致命的と考えられ、本種の資源加入を著しく減じる要因となりうる。それゆえ、アサリ資源の変動機構や資源の減少・低迷要因を解明するためには、浮遊幼生期における餌料環境、すなわち餌の質と量を把握することが重要な課題といえる。しかしながら、アサリに限らず、二枚貝浮遊幼生の食性に関する知見は世界的に見ても限定的であり、⁶⁾特に天然海域における具体的な餌料はほとんど明らかになっていない。

Raby *et al.*⁷⁾は、消化管内容物の光学顕微鏡観察に基づき、天然海域の二枚貝浮遊幼生が、5 µm 未満のナノプランクトンや 5–15 µm の珪藻を摂食していたことを報告した。また、Maloy *et al.*⁸⁾は、天然海域で採集した *Mysella* spp. やヨーロッパヒラガキ *Ostrea edulis* の浮遊幼生の消化管内容物の分子学的解析を実施し、消化管内から検出された DNA 配列の 70–90% を珪藻が占めていたと報告している。珪藻は、海洋の基礎生産の 35–75% を占める微細藻類の主要な構成成分群であり、⁸⁾多くの懸濁物食性の動物プランクトン、ベントスの重要な餌料源と位置付けられている。珪藻は珪酸質の細胞殻を有し、その形態的特徴に基づいて属や種の同定が可能であ

るが、細胞殻が脆弱な種については、捕食者による摂食・消化過程で破壊されてしまうため、光学顕微鏡による観察や同定は非常に困難となる。⁹⁾消化管内容物の分子学的情報に基づく網羅的解析についても、餌生物のデータベースが十分でないことに加え、¹⁰⁾栄養源として寄与しない生物が消化管内に取り込まれた場合、それを判別することができないといった問題点がある。そこで本研究では、光学顕微鏡に比べて非常に高い分解能を持つ走査型電子顕微鏡による消化管内容物観察⁹⁾と、ポイント法¹¹⁾を組み合わせた食性解析手法を確立し、特に珪藻に注目して、天然海域における二枚貝浮遊幼生の食性の定量解析を試みた。

2018年6月10日から12日にかけて、伊勢湾内の4点および三河湾内の2点（電子付録, SUISAN-D-20-00069_ESM）において、三重大学練習船勢水丸を用いて試料採集を行った。目合い 60 µm のノルバックネットを水深 15 m もしくは 20 m から水面まで鉛直に曳網し、得られた二枚貝浮遊幼生（以下、浮遊幼生とする）試料を即座に 50 mL の遠沈管に収容して 99% エタノールで固定した。三重大学の実験室に持ち帰った浮遊幼生から、殻長 140–240 µm の個体を選び出してブアン氏液（ピクリン酸：ホルマリン：酢酸 = 15 : 5 : 1）中に浸漬し、貝殻を脱灰するとともに軟体組織を固定した。その後、定法に従って厚さ 10 µm のパラフィン薄切切片を作成してスライドガラス上に伸展した。浮遊幼生の胃の断面を含む切片が載ったスライドガラスの領域（約 8 mm 四方）をガラスカッターで切り出し、レモゾールに 2 回浸漬してパラフィンを除いたのち、100% エタノールに 2 回、*t*-ブチルアルコールに 3 回、いずれも 5 分間ずつ浸漬した。*t*-ブチルアルコール中のスライド小片を -20°C で凍結させた後、真空デシケーターおよび真空ポンプ（G-50SA, ULVAC）を用いて真空凍結乾燥を施した。スライド小片を銅箔テープで SEM 試料台（Type-GM, 日新 EM）に貼り付け、イオンスパッタ（E-1010, HITACHI）中で金パラジウム合金を真空蒸着して観察試料とした。なお、本研究で対象とした浮遊幼生は非常に小さく、パラフィン包埋や凍結乾燥の際の散逸・脱落が比較的多かったことから、最終的に観察できた個体数は各調査点につき 3–8 個体、6 調査点で計 28 個体となった。走査型電子顕微鏡（S-4000, HITACHI）で浮遊幼生の消化管（胃）の断面を倍率 10000 倍で観察し、その全領域の画像を取得した。取得した画像上に、1 辺 1 µm に相当する正方格子を重ねて表示し、格子の各交点と重なった珪藻の属を同定した後、属ごとに交点の数を集計した。調査点ごとに、消化管内における各珪藻の被度（percentage coverage, %C）の個体間平均、各珪藻分類群を摂食していた浮遊幼生の出現頻度（percentage frequency, %F）をそれぞれ求めた。同一個体の消化管断面が複数の切片に渡っていた場合、それらすべてを合わせて 1 個体分のデータとして扱った。また、粘液や浮遊幼生の体組織などについては解析から除外し、珪藻細胞殻のデータのみを解析に用いた。

浮遊幼生の消化管内に出現した珪藻属と、それらの消

化管内における被度および出現頻度を Table 1 に示す。すべての調査点において、*Pseudo-nitzschia* spp. の被度および出現頻度が最も高かった。これらの細胞殻のほとんどが大きく損傷して原形を留めていなかったが、縦溝 (raphe) の形態から同定が可能であった (Fig. 1a, b)。本属は細長い針型を呈し、浮遊幼生の摂食の障害となるような突出した構造を持たない。特に、今回観察された本属の細胞幅は約 $2\ \mu\text{m}$ 程度と非常に細く、浮遊幼生はこれらを容易に摂食できたと推察される。

Chaetoceros spp. は、St. 4 を除くすべての調査点において浮遊幼生の消化管中に認められたが、その被度および出現頻度は、*Pseudo-nitzschia* spp. と比べて概して低

かった。本属の細胞殻も消化管内において細かく断片化していたが、刺毛 (seta) の形態から属の同定が可能であった (Fig. 1c)。本研究では環境水中の微細藻類組成や密度を調べていないが、消化管内における *Chaetoceros* spp. の被度および出現頻度が低かった一因として、調査時の本海域において本属の懸濁密度が低かった可能性が考えられる。また、本属は、細胞殻の四方に長く張り出した刺毛を備えるほか、生時には、多くの種が直鎖状や螺旋状の群体を形成する。このような細胞殻や群体の形態は、カイアシ類や繊毛虫類といった小型捕食者に対する有効な被食防御と見做されている。¹²⁾ 顎や歯といった咀嚼器をもたず、餌料粒子を丸飲みする

Table 1 Diatom taxa observed in stomachs of bivalve larvae, average of percentage coverage (%C) and percentage frequency (%F) of each diatom taxa in each site

Diatom taxa	St. 1 (N=3)		St. 2 (N=8)		St. 3 (N=8)		St. 4 (N=3)		St. 5 (N=3)		St. 6 (N=3)	
	%C	%F	%C	%F	%C	%F	%C	%F	%C	%F	%C	%F
<i>Asterioneopsis</i> spp.	—	—	0.2	12.5	—	—	—	—	—	—	2.0	33.3
<i>Aulacoseira</i> spp.	7.4	—	1.2	25.0	1.1	37.5	—	—	—	—	—	—
<i>Chaetoceros</i> spp.	4.3	33.3	5.7	62.5	2.7	37.5	—	—	2.5	33.3	11.8	100.0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	—	—	—	—	0.6	12.5	—	—	—	—	—	—
<i>Cymatosira</i> sp.	—	—	—	—	4.5	12.5	—	—	—	—	—	—
<i>Ditylum</i> spp.	3.2	—	1.8	37.5	1.3	25.0	—	—	2.7	66.7	6.0	100.0
<i>Hemiaulus</i> spp.	—	—	—	—	0.4	12.5	—	—	—	—	—	—
<i>Cyclotella</i> sp.	—	—	—	—	—	—	—	—	11.0	33.3	—	—
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	60.4	100.0	59.7	100.0	41.3	100.0	72.1	100.0	51.0	100.0	29.2	100.0
<i>Skeletonema</i> spp.	—	—	—	—	11.2	12.5	1.8	33.3	—	—	5.8	66.7
<i>Thalassiosira</i> spp.	—	—	10.6	50.0	19.7	75.0	10.8	33.3	2.5	33.3	26.6	100.0
Resting spores of <i>Chaetoceros</i> spp.	—	—	7.0	25.0	5.5	37.5	—	—	11.1	33.3	—	—
Unidentified diatom	24.8	—	13.8	62.5	11.7	62.5	15.3	33.3	19.3	66.7	18.6	100.0

Fig. 1 Scanning electron microscope images of diatoms observed in the stomachs of bivalve larvae: (a, b) *Pseudo-nitzschia* spp. (r, raphe), (c) *Chaetoceros* spp. (s, seta; v, valve), (d, e) Resting spores of *Chaetoceros* spp., (f, g) *Thalassiosira* spp., (h) *Cyclotella* sp., (i) *Cymatosira* sp. (indicated by the arrow).

浮遊幼生にとって、*Chaetoceros* 属の刺毛や群体が、摂食を阻害する大きな要因となっている可能性も考えられる。

St. 2, St. 3, St. 5 においては *Chaetoceros* 属の休眠胞子 (resting spore, Fig. 1d, e) が、St. 1 を除くすべての調査点においては *Thalassiosira* spp. (Fig. 1f, g) が、細胞の原形を保った状態で観察された。それぞれ 1 個体の消化管内から観察された *Cyclotella* sp. (Fig. 1h) および *Cymatosira* sp. (Fig. 1i) についても、細胞殻に大きな損傷はなく、細胞の原形が保たれていた。電子顕微鏡像に基づいてこれらの珪藻のサイズを推定したところ、細胞径もしくは細胞幅は約 3.0–8.4 μm であった。

上述の通り、天然海域において浮遊幼生が多様な珪藻を摂食していることが明らかになった一方で、摂食された珪藻の中には浮遊幼生の栄養源として寄与しないものも存在する可能性が考えられた。珪藻の細胞殻の物理的強度は種間で大きく異なり、^{9,13)} アサリ稚貝を用いた室内実験においては、堅い珪藻の消化率は、脆い珪藻よりも有意に低いことが明らかになっている。⁹⁾ 本研究において浮遊幼生の消化管内に認められた珪藻のうち、*Chaetoceros* 属の休眠胞子や *Thalassiosira* spp. などについては細胞の原形を概ね留めていたことから、これらの細胞殻は比較的頑健であり、浮遊幼生の消化管内で破壊・消化されにくかったと推察される。これらの珪藻の細胞殻にも損傷は認められたが、損傷部縁辺が平面的かつ局所的であったことから、ミクロトームによる薄切の際に生じた可能性がある。ただし、現在のところ、珪藻の細胞殻に生じた損傷が浮遊幼生の消化活動によって生じたのか、ミクロトームによる切断によって生じたのかを厳密に判別するのは難しい。今後、消化管内の珪藻の破壊の有無を検討するためには、ミクロトームによる細胞殻の切断痕の特徴を把握するとともに、細胞内容物の残存の有無などに基づいた客観的な判別基準を確立する必要がある。

本研究で確立した食性解析手法により、浮遊幼生の消化管内の珪藻組成を定量化できることが明らかとなった。一方、本手法では、珪酸質の細胞殻を持たない微細藻類などの観察が困難であり、それらが優占する環境下においては、実際の食性と乖離した解析結果を導く懸念がある。近年、二枚貝浮遊幼生^{6,10)} やカイアシ類、¹⁴⁾ アミ類¹⁵⁾などを対象として、消化管内容物や糞粒のメタゲノム解析に基づく食性研究が実施されている。現在のところ、餌料生物の分子学的情報のデータベースが十分でないといった課題が残されているものの、¹⁰⁾ 電子顕微鏡では観察が困難な餌料生物を検出できるという点において非常に強力な手法といえる。今後、消化管内容物の電子顕微鏡観察とメタゲノム解析を並行して実施することで、天然海域における浮遊幼生の餌料を幅広く探索できると考えられる。また、本研究では二枚貝の種同定を行っていないが、二枚貝種間において摂食・消化能力が異なる可能性を考慮すると、モノクローナル抗体等を用いた種同定を行った上で食性解析を実施するのが望ましい。さらに、同種の二枚貝であっても、成長に伴って摂食・消化能力が変化する可能性も考えられる。二枚貝の種・発達段階ごとの好適餌料の解明に加え、それらを環境水中から抽出する技術が確立されれば、浮遊幼生の生理・生態に即した餌料環境の把握・評価が初めて可能になり、二枚貝資源量の変動機構の解明に有用な知見を提供できると期待できる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、三重大学大学院生物資源学研究科の石川輝教授、田口和典助教、ならびに三重大学練習船勢水丸船舶職員の方々に野外調査の便宜を図っていただいた。ここにお礼申し上げる。本研究は、三重大学地域拠点サテライト伊勢志摩サテライト運営費およびクリタ水・環境科学振興財団 (KWEF) 国内研究助成の助成を受けて実施した。

文 献

- 1) Kheder RB, Quéré C, Moal J, Robert R. Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part A: Quantitative and qualitative diet effects. *Aquaculture* 2010; **305**: 165–173.
- 2) Olson RR, Olson MH. Food limitation of planktotrophic marine invertebrate larvae: does it control recruitment success? *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1989; **20**: 225–247.
- 3) Toba M. Revisiting recent decades of conflicting discussions on the decrease of Asari clam *Ruditapes philippinarum* in Japan: A review. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2017; **83**: 914–941 (in Japanese with English abstract).
- 4) Hamaguchi M. Relationship among primary production, marine environment and fisheries production of bivalves in the Seto Inland Sea. *Bull. Fish. Res. Agen.* 2011; **34**: 33–47 (in Japanese with English abstract).
- 5) Tsurushima D, Nagao K, Nakata K. *J. JSCE, Ser. B2, Coastal engineering* 2019; **75**: I_1111–I_1116 (in Japanese with English abstract).
- 6) Maloy AP, Culloty SC, Slater JW. Dietary analysis of small planktonic consumers: a case study with marine bivalve larvae. *J. Plankton Res.* 2013; **35**: 866–876.
- 7) Raby D, Mingelbier M, Dodson J, Klein B, Lagadeuc Y, Legendre L. Food-particle size and selection by bivalve larvae in a temperate embayment. *Mar. Biol.* 1997; **127**: 665–672.
- 8) Nelson DM, Tréguer P, Brzezinski MA, Leynaert A, Quéguiner B. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem. Cycles* 1995; **9**: 359–372.
- 9) Houki S, Kawamura T, Ogawa N, Watanabe Y. Efficient crushing of hard benthic diatoms in the gut of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* —Experimental and observational evidence. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2018; **505**: 35–44.
- 10) Lindeque PK, Dimond A, Harmer RA, Parry HE, Pemberton KL, Fileman ES. Feeding selectivity of bivalve larvae on natural plankton assemblages in the Western English Channel. *Mar. Biol.* 2015; **162**: 291–308.
- 11) Chamrad AD, Box TW. A point frame for sampling rumen contents. *J. Wildl. Manage.* 1964; **28**: 473–477.
- 12) Pančić M, Kjørboe T. Phytoplankton defence mechanisms: traits and trade-offs. *Biol. Rev.* 2018; **93**: 1269–1303.
- 13) Hamm CE, Merkel R, Springer O, Jurkojc P, Maier C, Prechtel K, Smetacek V. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. *Nature* 2003; **421**: 841–843.
- 14) Craig C, Kimmerer WJ, Cohen CS. A DNA-based method for investigating feeding by copepod nauplii. *J. Plankton Res.* 2014; **36**: 271–275.
- 15) Nakamura Y, Tuji A, Makino W, Matsuzaki S-iS, Nagata N, Nakagawa M, Takamura N. Feeding ecology of a mysid species, *Neomysis awatschensis* in the Lake Kasumigaura: combining approach with microscopy, stable isotope analysis and DNA metabarcoding. *Plankton Benthos Res.* 2020; **15**: 44–54.