

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：82405

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290084

研究課題名(和文) 希少淡水二枚貝のイシガイ類保全のための人工増殖に向けた餌資源の解明

研究課題名(英文) Elucidation of food resources for the conservation of endangered freshwater bivalves (Unionoida)

研究代表者

田中 仁志 (Tanaka, Hitoshi)

埼玉県環境科学国際センター・水環境担当・担当部長

研究者番号：40415378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：淡水二枚貝イシガイ類は、懸濁物質を除去する水質浄化や天然記念物イタセンパラなどタナゴ類の繁殖に産卵母貝として、健全な生態系を維持するために役立っている。しかし、イシガイ類は全国的に生息地や個体数が減少しており、直ちに保護対策が必要である。

イシガイ類イシガイが高密度で生息する河川の調査結果から、貝が成長する高水温期には餌となる有機物(藻類)が十分に供給されていることが分かった。また、体内で合成できず餌から取り入れている必須脂肪酸の解析結果は、イシガイが緑藻・珪藻などの微細藻類や細菌を餌源としている証拠を示した。これらの結果を踏まえ、培養・市販藻類を用いた給餌試験を行い、長期飼育に成功した。

研究成果の概要(英文)：Freshwater bivalves (Unionoida) help maintain river ecosystems by acting as host shells for Japanese bitterlings and purifying water by removing suspended matter. Habitats and populations of bivalves have decreased throughout Japan, making protection measures urgent. Surveys of rivers with high densities of *Unio douglasiae nipponensis* showed that the microalgae they feed on were in sufficient supply during the warm water period, which marks the bivalve growing season. Analysis of essential fatty acids, that cannot be synthesized in the body and originate from the natural diet, showed that *U. douglasiae nipponensis* assimilate green algae and diatoms as well as bacteria. Based on these results, we conducted feeding experiments on *U. douglasiae nipponensis* using cultured and commercial algae, and achieved successful long-term breeding.

研究分野：環境生物学

キーワード：イシガイ類 希少淡水二枚貝 餌資源 遺伝子解析 必須脂肪酸 生息環境 タナゴ類 人工飼料

1. 研究開始当初の背景

イシガイ類は湖沼や河川等に生息する淡水二枚貝で、特有の繁殖様式を持つことで知られる。親貝から放出されたグロキジウム幼生は、宿主となる魚類のエラやヒレに寄生した後、脱落して初めて底生生活を開始する(近藤高貴(2008)イシガイ類図鑑)。そして、イシガイ類は天然記念物イタセンパラなどタナゴ類の産卵場としても不可欠な水生生物である。一方、近年、環境省のレッドデータブックが改訂されるごとに、イシガイ類の記載種は増え、絶滅が懸念され、早急な保護対策が必要である。人工増殖は重要な保護手段となるが、生育に適した餌環境を人工的に創出・維持できないことが障害の一つである(根岸淳二郎ら(2008)日本生態学会誌,58,37-50)。先行研究において、我々はイシガイ類稚貝の種苗技術を確立するとともに、コンクリート製実験池においてドブガイの成貝(繁殖可能とされる殻長5cm)を得ているが、イシガイ類の成貝までの生存率を高めるためには、利用餌の解明と給餌方法の確立が必要である。イシガイ類の生息場所における餌源(食性)は、近年の研究においても情報は不足しており、特定されるには至っていないものの、イシガイの生息地調査の結果では、夏季のクロロフィルa量(藻類)の最大値が大きい地点で個体密度が大きい(田中ら(2011)投稿準備中)。また、遺伝子解析の結果、イシガイ腸内容物と河川水中の懸濁物質に共通して見られる細菌が確認できた(田中ら(2011)投稿中)。イシガイは微細藻類や細菌を餌源としている可能性が示された。

2. 研究の目的

イシガイ類の人工増殖に適した給餌システムの構築を目的として、(1)イシガイ類の餌の可能性が高い、微細藻類を対象とした遺伝子解析、(2)脂肪酸-安定同位体比解析から生息環境における利用餌の解明及び(3)有望餌藻類を培養・給餌し、イシガイ類を稚貝から成貝まで成長させる実証実験による人工増殖技術の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子解析による餌源解析

調査は、2015年3月~10月に、富山県氷見市のイシガイ(*Unio (Nodularia) douglasiae nipponensis*、以下、イシガイと記す)の生息地で、イシガイの生息密度が大きい万尾川(写真1)と生息密度が小さい中谷内川の2生息地を対象として行った。各河川において2定点ずつ、計4定点から採取した河川水(懸濁物質)堆積物及びイシガイから得られた遺伝子を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE)法によって分析した。また、主要なバンドの塩基配列を決定し、得られた配列をDNAデータベースに対してBLAST検索を用い

て相同性検索を行い、近縁種を推定した。

(2) 必須脂肪酸による餌源解析

万尾川と中谷内川の2地点を対象として、イシガイの同化している餌源について脂肪酸バイオマーカーを用いて調べた。2015年6月にそれぞれの河川の1ヶ所から殻長7cm程度のイシガイを5個体ずつ採取した。軟体部を凍結乾燥させ、脂肪酸組成を測定した。脂肪酸組成は全脂肪酸を用いて主成分分析で組成の比較を行った。

さらに、2014年4月以降毎月1回、潜在餌源として分析したイシガイを採取した地点を含む、河川水の懸濁物質中の脂肪酸組成を分析した。

(3) 大型水槽を用いた給餌実験

実験は、2016年8月~11月の99日間行った。氷見市矢田部川においてイシガイ55個体(平均殻長約30mm)を採取し、直ちに実験を開始した。埼玉県環境科学国際センターの屋外(屋根状構造物下)に設置したダイライト水槽(容量1,000L)3基(水槽A、B、C)に、脱塩素処理水道水を500L入れ、常時エアレーションを行った。各水槽にはイシガイ(18~19個体)をかごに入れ、垂下した。給餌飼料は、培養細胞と同様の給餌効果が確認(田中ら(2016)第50回日本水環境学会年会講演集,156。)している市販クロレラパウダー(商品名:エメラルド、デサン社製)を使用した。クロレラパウダーはミキサーを用いて蒸留水中に十分に分散させた後、添加後の



写真1 淡水二枚貝イシガイが高密度で生息する万尾川の風景(富山県氷見市) 2016年7月撮影



写真2 イシガイの給餌実験に用いた野外大型水槽群(埼玉県環境科学国際センター/加須市)

濃度が水槽 A 及び B に対して水槽 C は 3 倍量を 2~3 回/週の頻度で給餌した。毎月 1 回、計 4 回、イシガイの殻長と重量を測定した。また、生息地における成長速度を調べるために、イシガイが高密度で生息する氷見市万尾川において、矢田部川のイシガイ 15 個体(平均殻長約 30mm) をかごに入れ、2016 年 5 月~12 月に成長を観察した(写真 3)。



写真 3 万尾川におけるイシガイ成長速度調査の様子(2016 年 12 月)

4. 研究成果

(1) 遺伝子解析による餌源解析

河川水と堆積物の真核微生物群集構造は異なる結果となった。イタセンパラとイシガイが多く生息している地点の試料について、河川水からは藻類(緑藻綱や珪藻綱)や繊毛虫(旋毛綱や梁口綱)などが検出されたのに対し、堆積物からは緩歩動物(真クマムシ綱)、扁形動物(有棒状体綱)、線形動物(クロマドラ綱やエノプルス綱)などの動物種が多く検出される新たな知見が得られた。イシガイの成長期にあたる 6 月~8 月に各月 5 個体程度採取して、研究室で腸内容物の DGGE 解析を行った。その結果、イシガイ腸内容物は、各月毎にバンドパターンが類似しており、月毎の変化が認められた。主要なバンドの同定を行ったところ、珪藻綱の *Cyclotella* sp. が各月の個体から検出され、この付着珪藻がイシガイの餌源となっていた可能性が考えられた。

(2) 必須脂肪酸による餌源解析

万尾川及び中谷内川における各採集地点間のイシガイの脂肪酸組成は異なっており(図 1) それぞれの地点でイシガイの同化している餌源が異なっていることが分かった。さらに、2014 年 4 月から 11 月にかけての万尾川の河川水中の懸濁物質中の脂肪酸組成の経時変化を図 2 に示す。全脂肪酸に対する多価不飽和脂肪酸の割合は、6 月から 8 月にかけては最大で 40% を超え、10~20% であった他の時期よりも高くなった。多価不飽和脂肪酸はエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)などの動物には生合成できない必須脂肪酸であるため、餌から取り入れる必要がある。採水地点はイシガイの生息密度が大きく、イシガイの成長期には、餌を通じて必須脂肪酸も取り込むことが可能

なことが推察される理想的な生息環境であることが分かった。

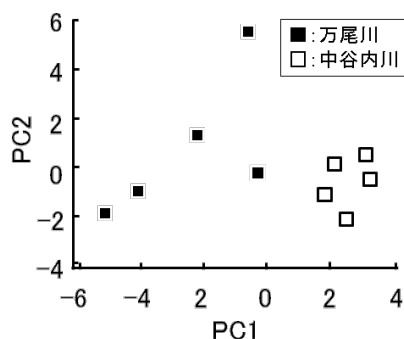


図 1 全脂肪酸組成を対象とした主成分分析

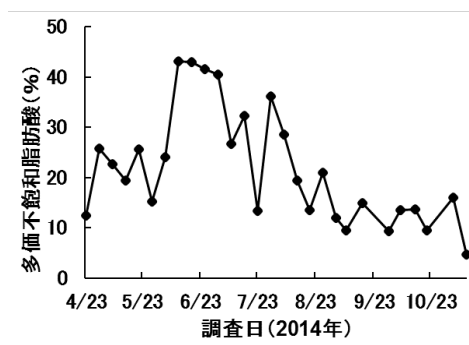


図 2 万尾川河川水懸濁物質中の全脂肪酸に対する多価不飽和脂肪酸の割合の変化

(3) 大型水槽を用いた給餌実験

水槽 B 及び C のイシガイは、実験終了時までには 18 個体すべてが生残したが、水槽 A は 2 個体が死亡したため、それらを除いた 17 個体のデータを用いて各個体の成長速度を求めた。実験開始時及び終了時におけるイシガイの平均殻長は、水槽 A ではそれぞれ 34.2mm 及び 34.5mm、水槽 B では 35.1mm 及び 35.4mm、水槽 C では 34.9mm 及び 35.0mm となり、平均成長速度(d^{-1})は、水槽 A : 0.00010、水槽 B : 0.00029 及び水槽 C : 0.000014 で、水槽 A、B に対して水槽 C が一桁小さい値であった。全水槽のイシガイの殻長は成長したものの、本実験では、給餌量は水槽 A、B に対して水槽 C を 3 倍量に設定したが、成長速度は逆に小さくなっており、殻長で評価した成長を低下させる結果となった。一方、生息地における観察の結果、最もイシガイの成長が観察されたのは 5 月~8 月で、殻長の成長速度(d^{-1})は 0.0023、日中の調査時の水温は約 22~31 であった。一方、日中の水温が 21 より低くなる 9 月下旬~12 月の成長速度は 0.00017 で、5 月~9 月に比べて小さく、成長速度は水温に影響していることが考えられた。本実験水槽における昼夜間の水温は約 8~28 で、10 月以降は 21 より低くなった。本実験では殻の成長速度は小さかったが、この理由は、水温も影響した可能性がある。

その上、矢田部川で採取した産地を同一とするイシガイは、異なる実験を終了した後、

万尾川で飼育実験を行って明確な成長が見られた個体とクロレパウダーを使った給餌実験後の個体から、それぞれ任意の5個体の脂肪酸解析を行った。その結果、給餌実験に使用した個体は万尾川で成長した個体に対して、EPA や DHA の含有割合(%)が半分以下に低いことが分かった。このことから、不足していると考えられた必須脂肪酸を補うために EPA を含む珪藻や DHA を含む渦鞭毛藻類を供給することにより、イシガイの大きな成長速度が期待できると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Megumu Fujibayashi, Osamu Nishimura and Hitoshi Tanaka, Evaluation of Food Sources Assimilated by Unionid Mussels Using Fatty Acid Trophic Markers in Japanese Freshwater Ecosystems, *Journal of Shellfish Research*, 査読有, 35, 2016, 231-235.

(2) Masaki Nishio, Hitoshi Tanaka, Daisuke Tanaka, Ryosuke Kawakami, Kaneaki Edo and Yuji Yamazaki, Managing Water Levels in Rice Paddies to Conserve the Itasenpara Host Mussel *Unio douglasiae nipponensis*, *Journal of Shellfish Research*, 査読有, 35, 2016, 857-863.

〔学会発表〕(計 10 件)

田中仁志, 田中大祐, 酒徳昭宏, 西尾正輝, 河地正伸, 藤林恵, 西村修, 実験水槽を用いた市販藻類による淡水二枚貝イシガイの飼育系確立の検討, 第 51 回日本水環境学会年会講演集, 2017, 516.

田中大祐, 能村典未, 新田杏菜, 西尾正輝, 山崎裕治, 酒徳昭宏, 中村省吾, 田中仁志, イタセンパラとイシガイ科二枚貝が生息する富山県下の小川における真核微生物群集構造の解析, 第 50 回日本水環境学会年会講演集, 2016, 525.

田中仁志, 田中大祐, 酒徳昭宏, 西尾正輝, 藤林恵, 西村修, 河地正伸, 淡水二枚貝イシガイの保護を目的とした実験水槽を用いた培養藻類の給餌実験, 第 50 回日本水環境学会年会講演集, 2016, 156.

田中仁志, 木持謙, 木幡邦男, 高橋和暉, 田中大祐, 酒徳昭宏, 中村省吾, 藤林恵, 西村修, 西尾正輝, 富山県氷見市におけるイタセンパラとイシガイ類が生息する小川の水質調査, 第 49 回日本水環境学会年会講演集, 2015, 559.

藤林恵, 西村修, 西尾正輝, 田中仁志, 脂肪酸バイオマーカーを用いたイシガイ科二枚貝類の同化餌源の推定, 日本陸水学会第 80 回大会講演要旨集, 2015, 170.

Osamu Nishimura and Hitoshi Tanaka, Approach to biodiversity conservation in Japan: Habitat survey and conservation activities

research of freshwater shellfish, *Abstract of the 36th International Symposium on Environmental Issues*, 2015, Yeungnam University, Korea.

田中大祐, 高橋透陽, 田岸恵理花, 西尾正輝, 山崎裕治, 酒徳昭宏, 中村省吾, 田中仁志, 木持謙, 西尾正輝, イタセンパラとイシガイ科二枚貝が生息する富山県下の小川における微生物群集構造の解析, 第 48 回日本水環境学会年会講演集, 2014, 256.

Hitoshi Tanaka, Kazuki Takahashi, Yuzuru Kimochi, Daisuke Tanaka, Toyo Takahashi, Akihiro Sakatoku, Shogo Nakamura, Masaki Nishio, Megumu Fujibayashi, Osamu Nishimura and Kunio Kohata, *Abstract of the 16th International Symposium on River and Lake Environment (ISRLE)*, 査読有, 161, 2014.

田中仁志, 希少二枚貝イシガイ科の保護を目的とした生息個体密度が異なる水路における水質の比較, 第 41 回環境保全・公害防止研究発表会講演集, 2014.

Hitoshi Tanaka, Environmental Investigation on the Habitat for Conservation of Endangered Freshwater Unionid Mussels in Saitama Prefecture, Japan, *Abstract of the 9th Korea-Japan Environment Symposium*, 2013, Jeju University, Korea.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 仁志 (TANAKA HITOSHI)

埼玉県環境科学国際センター・水環境担当・担当部長

研究者番号: 40415378

(2) 研究分担者

田中 大祐 (TANAKA DAISUKE)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・教授
研究者番号: 40360804

酒徳 昭宏 (SAKATOKU AKIHIRO)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・助教
研究者番号: 20713142

(H25: 研究協力者)

(3) 連携研究者

西村 修 (NISHIMURA OSAMU)

東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 80208214

藤林 恵 (FUJIBAYASHI MEGUMU)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教
研究者番号: 70552397

河地 正伸 (KAWACHI MASABOBU)

国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・室長

研究者番号: 80311322

(4) 研究協力者

西尾 正輝 (NISHIO MASAKI)

氷見市教育委員会・主任学芸員