

## エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA-2Na)を用いた イタヤガイの自家受精防除の検討

田中正隆  
(2001年10月1日受付)

### Prevention of Self-fertilization of Japanese Bay Scallop *Pecten (Notovala) albicans* treated with Disodium Ethylenediamine-tetraacetate (EDTA-2Na)

Masataka Tanaka \*

On the occasion of spawning inducement of Japanese bay scallop, *Pecten (Notovala) albicans* which is hermaphrodite, it was studied whether spawning in sea water containing disodium ethylenediamine-tetraacetate(EDTA-2Na) is effective to prevent self-fertilization.

Experiments were carried out with an insemination ratio of 10,000 sperm to 1 egg. Under this condition, sperm was considered to adhere to egg membrane certainly.

Fertilization was effectively prevented at more than 1.0 mM of EDTA. When the inseminated eggs were treated with 1.0 mM of EDTA for 10 minutes, about 20% of the eggs were fertilized by second insemination after washing by decantation. However, eggs treated with 1.0 mM of EDTA for 30 minutes were hardly fertilized by second insemination. Moreover, for eggs treated with 1.5 mM of EDTA, incidence of fertilization by second insemination was low, and egg deformity was frequent.

These results indicate that EDTA concentration necessary to efficiently prevent self-fertilization in sea water is about 1.0 mM and that it is adequate to collect eggs within 10 minutes of spawning.

**Key words:** Japanese bay scallop, hermaphrodite, spawning inducement, self-fertilization, EDTA-2Na

邦産イタヤガイ *Pecten (Notovala) albicans* (以下イタヤガイとする)の人工種苗生産は、養殖用種苗の安定供給を目的として、1980年代より本格的な技術開発が行われた。<sup>1-9)</sup>そのうち採卵に関しては、母貝養成、<sup>1,4-6,10,11)</sup>産卵誘発、<sup>1,3,5,6,12,13)</sup>受精方法等について種々の検討がなされ、<sup>3-6,12)</sup>技術確立に結びつく知見が集積されている。

二枚貝類には雌雄同体現象を示す種が多く確認されており、それらはその雌雄同体性の出現パターンにより4つの型に分類されている。<sup>14-16)</sup>このうち精子と卵がほぼ並行して造られる「機能的雌雄同体現象」を示す型にあてはまる種が多く、イタヤガイもこの型に含まれると考えられている。<sup>17)</sup>雌雄同体のイタヤガイは自家受精が可能であり、<sup>17,18)</sup>自家受精により発生した幼生は正常に成長したとの報告がある。<sup>19)</sup>一方でアメリカイタヤガイ *Aquiptecten irradians* の自家受精卵は他家受精卵よりも

孵化率や幼生の成長が劣るとされ、<sup>20)</sup>通常は放卵と放精の間に自ら時間差を設けることで自家受精の機会を少なくしていると考えられている。<sup>15,16,21)</sup>イタヤガイの採卵においても先に放精がおこり、その後放卵する個体が多く見られるため、<sup>1,5)</sup>この現象はアメリカイタヤガイと同様、自家受精の機会を減らす手段とも考えられる。実際、自家受精卵よりも他家受精卵から、正常なD型幼生が多く孵化したという実験結果が報告されており、<sup>3)</sup>現在、種苗生産の現場では極力自家受精を避け、異個体の卵と精子で受精を行うことが望ましいと考えられている。しかし実際は先に放卵する個体や、放精と放卵を繰り返す個体も見られる。さらには見かけ上放卵のみが観察され、精子の付着していない卵を確保したつもりでも、検鏡すると自家受精している場合もある。この原因として、イタヤガイの卵と精子がともに同じ生殖導管より放

\* 石川県水産総合センター技術開発部 (〒927-0435 石川県鳳至郡能都町宇出津新港3-7)

出されることが示唆されている。<sup>18)</sup> 実際、雌雄同体であるヨーロッパホタテガイ *Pecten maximum* では生殖葉の連続切片を観察した結果、卵と精子が放出される生殖導管がはじめは別々に存在するが、最終的に1本の腎管に合流することが判明している。<sup>22)</sup> こうしたことから、自家受精の起こらないような採卵技術の開発が必要といえる。

ところで海産無脊椎動物の多くは、海水中の Ca イオン濃度が低レベルにあると受精が起こらないとされている。<sup>23,24)</sup> イタヤガイと同じく雌雄同体であるトリガイにおいて、金属イオンと水溶性のキレート錯体を形成するエチレンジアミン四酢酸塩（以下 EDTA とする）を含んだ海水中で放卵させることで、自家受精を防止する方法が検討されている。<sup>25)</sup> そこで今回 EDTA による処理がイタヤガイの自家受精の防除にも応用できるかどうか実験を行った。

### 材料および方法

**実験1：媒精割合の検討** EDTA によるイタヤガイの自家受精防止試験を行うにあたり、媒精時の精子濃度が低い場合、EDTA による受精阻害でなく、単に精子の割合が少ないために卵膜への精子の付着が見られないという可能性がある。このため EDTA を用いた受精阻害試験に先立ち、卵膜に精子が確実に付着するための媒精割合（卵1個あたりに必要な精子数）を検討した。

試験に用いたイタヤガイは能登島周辺海域で採集された殻長68.9~84.6mm（平均殻長76.3mm）の8個体である。これらに紫外線処理海水を用いた温度刺激法による産卵誘発を行った。<sup>5)</sup> すなわち紫外線流水殺菌装置（ユートロン-SS-110S, (株)三輝）で一定処理した<sup>26)</sup> 水温11.7°Cの海水を貯めたアクリル水槽（45×90×45cm）に、1時間空中干出させたイタヤガイを収容し、その後チタニウム水中ヒーター（AC100V-1KW, 日東機材（株））を用いて水温21.8°Cまで上昇させた。アクリル水槽内で放卵あるいは放精を開始した個体はただちに持ち上げ、それぞれ個体別に紫外線処理していない水温約20°Cの海水を貯めたボールへ移した。その後ボール内で放精した精子および放卵した未受精卵を実験に供した。未受精卵は放精より先に放卵した1個体から得られた。先に放精した3個体分の精子を混合し、トーマ氏血球計算盤（萱垣医理工工業（株））を用いて精子懸濁液の濃度を求めた。精子数がそれぞれ  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  となるよう100mL 精子懸濁液を作成した。200mL ピー

カーにこの精子懸濁液と未受精卵10,000個を収容し受精させた。媒精約15分後に各試験区の任意の卵50個（精子数  $2 \times 10^7$  個以上の区では任意の卵25個）を生物顕微鏡（BX50, オリンパス光学工業（株））下で観察し、 $\times 300$  の平面視野で卵1個あたりに付着している精子数を計数した。また媒精から約13時間30分後に各試験区の任意の卵100個を取り出し、同顕微鏡下で発生が進行している卵（受精卵）と発生が進行していない卵（未受精卵）との割合（以下受精率とする）を調べた。

**実験2：EDTA 処理による自家受精阻害試験** 試験に用いたイタヤガイは能登島周辺海域で採集された殻長61.2~99.4mm（平均殻長76.9mm）の16個体である。産卵誘発および採卵の方法は実験1と同様にした。精子の採取については今回の産卵誘発では十分な精子量を得ることができなかった。イタヤガイの精子は意図的に切り出した精子でも十分受精能力があるとされている。<sup>5)</sup> よって本実験では放卵していない3個体の精巣部分よりメスで切り出した精子を使用した。なお精子濃度は実験1の方法と同様に求めた。

20°Cに調温した精密濾過海水（メムコア超精密濾過装置-0.2 $\mu$ m, 三井造船（株））に、1N NaOH を適量加えながらエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（ナカライテスク（株））（以下 EDTA-2Na とする）を溶解し2.0mM 溶液 1 L を作成した。これを精密濾過海水で希釈して EDTA-2Na の最終濃度が0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5mM となるよう100mL ビーカーに調製した。放精より先に放卵した1個体より得られた未受精卵を、各ビーカーに5,000個ずつ収容した。さらに精子を卵数の10,000倍となるよう添加し、最終容量が100mL となるよう精密濾過海水を加えた。なお、EDTA-2Na 0, 0.5, 1.0, 1.5mM 濃度については、それぞれ精子を全く入れない実験も併せて行った。

すべてのビーカーは、水分の蒸発を防ぐために表面をパラフィルムで覆った後、20°Cに設定したインキュベーター（MIR-152NL, 三洋電機（株））に収容した。媒精約3時間30分後に各試験区とも任意の100個の卵を取り出し、生物顕微鏡（ $\times 300$ ）で観察した。観察した卵は、極体の放出あるいは正常卵割の進行が確認できたものを「受精卵」、極体の放出が確認されず卵割も見られないものを「未受精卵」、卵の崩壊や不完全な卵割が見られたものを「異常卵」として分類し計数した。さらに未受精卵を20個無作為に抽出し、実験1と同様の方法で卵1個あたりに付着している精子数を計数した。

**実験3：EDTA 処理後の再媒精方法の検討** EDTA により自家受精を防止した後の最終的な媒精方法を検討す

るため以下の実験を行った。最終濃度 0.5, 1.0, 1.5mM EDTA-2Na 溶液下で媒精した後, 各濃度とも以下の3種類の処理を行う実験区を設けた。①媒精10分後に洗卵し精密濾過海水中に入れる(以下洗卵のみ区とする), ②媒精10分後に洗卵し再媒精する(以下10分後再媒精区とする), ③媒精30分後に洗卵し再媒精する(以下30分後再媒精区とする)。洗卵はミュラーゲーゼ(オープニング20 $\mu$ m)製の網で卵を濾し精密濾過海水を注ぐ

方法とし, 再媒精はEDTAの含まれていない精密濾過海水下で行った。最初の媒精から約6時間30分後に卵の分類, 計数および付着精子の計数を行った。なお使用した卵および精子, EDTA-2Naの濃度調整法, 媒精における精子濃度, 卵の分類と計数および精子付着数の計数法については実験2と同様にした。

実験2および3で設定した計22の試験区の条件を Table 1にまとめた。

Table 1. Experimental condition for Japanese bay scallop

Beaker No.	Concentration of EDTA-2Na(mM)	Insemination ratio	Treatment
1	0		
2	0.05		
3	0.1		
4	0.25	egg:sperm (1:10,000)	no decantation. incubation at 20°C. observation after 3.5h.
5	0.5		
6	0.75		
7	1.0		
8	1.25		
9	1.5		
-----			
10	0		no decantation.
11	0.5	only egg (without sperm)	incubation at 20°C. observation after 3.5h.
12	1.0		
13	1.5		
-----			
14	0.5	egg:sperm (1:10,000)	decantation after 10 min.
15	1.0		addition only sea water.
16	1.5		incubation at 20°C.
			observation after 6.5h.
-----			
17	0.5	egg:sperm (1:10,000)	decantation after 10 min.
18	1.0		addition sperm(same concentration).
19	1.5		incubation at 20°C. observation after 6.5h.
-----			
20	0.5	egg:sperm (1:10,000)	decantation after 30 min.
21	1.0		addition sperm(same concentration).
22	1.5		incubation at 20°C. observation after 6.5h.

The amount of each solution was 100ml.

The number of eggs in each beaker was  $5 \times 10^3$ , and the number of sperm in each beaker was  $5 \times 10^7$ .

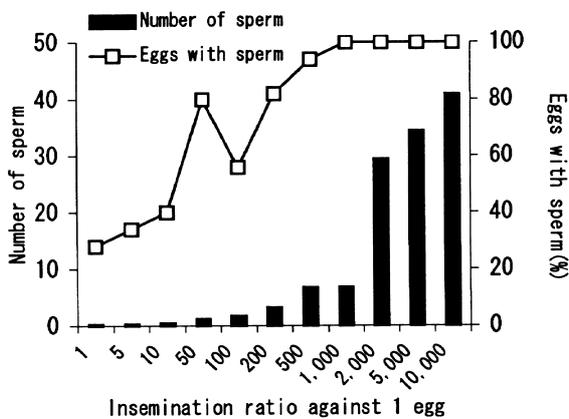


Fig.1. Relation between insemination ratio and average number of sperm which adhered to egg membrane, and percentage of eggs which were adhered by sperm.

## 結果

実験1: 媒精割合の検討 媒精割合を変化させた時の卵1個に対する平均付着精子数および精子が付着していた卵の割合を Fig.1に示した。媒精割合500倍までは精子の付着していない卵が存在したが, 1,000倍以上の媒精割合ではすべての卵に精子の付着が見られた。また卵1個あたりの平均付着精子数は, 媒精割合1,000倍までは10個以下であり, 2,000倍以上になると30個を上回った。媒精割合を変化させた時の媒精から約13時間30分後の受精率を Fig.2に示した。媒精割合500倍までは受精率が65%以下であったが, 媒精割合1,000倍では受精率82%, 10,000倍では受精率98%となった。

実験2：EDTA 処理による自家受精阻害試験  
EDTA-2Na 濃度を变化させた時の受精卵および未受精卵の割合を Fig.3 に示した。EDTA-2Na 濃度が 0.75mM までは受精卵の割合が 25~39% と高く、未受精卵の割合は 30~54% であった。1.0mM では受精卵の割合がかなり減って 7% となり、未受精卵の割合が 76% となった。1.5mM では、受精卵の割合が 2% とさらに低下し、未受精卵の割合が 96% と高くなった。

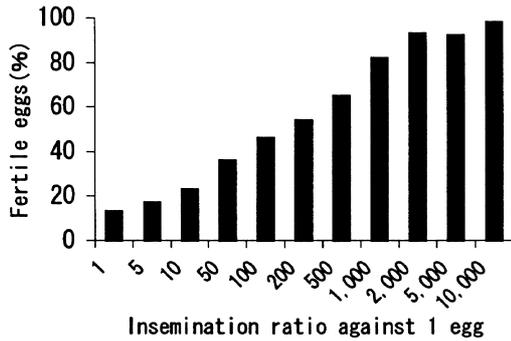


Fig.2. Relation between insemination ratio and percentage of fertile eggs.

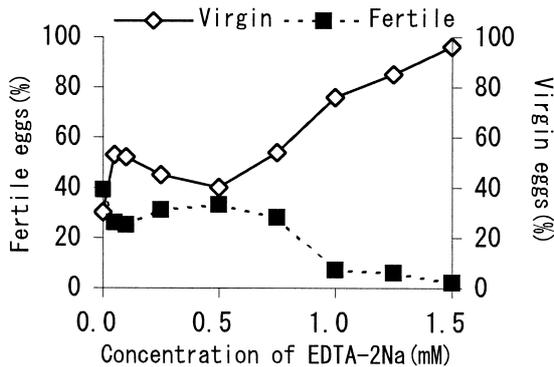


Fig.3. Relation between concentration of EDTA-2Na and percentage of fertile eggs and that of virgin eggs.

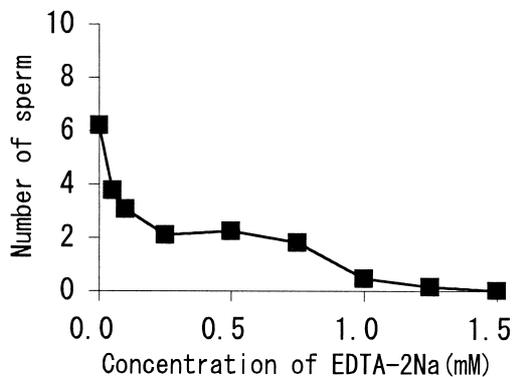


Fig.4. Relation between concentration of EDTA-2Na and average number of sperm which adhered to egg membrane.

また EDTA-2Na 濃度と未受精卵の卵膜に付着していた精子数との関係を Fig.4 に示した。EDTA-2Na 濃度が低い時は付着精子数が多く、EDTA-2Na 濃度が高くなるにつれ付着精子数が減少し、1.5mM では精子の付着が全く見られなかった。

媒精せずに卵のみを EDTA-2Na を含んだ海水に収容した場合の異常卵の割合を Fig.5 に示した。EDTA-2Na を全く含まない海水では異常卵はほとんど見られなかったが、1.0mM では 10% の、1.5mM では 14% の異常卵が観察された。

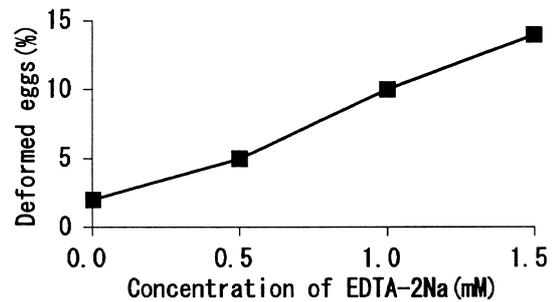


Fig.5. Relation between concentration of EDTA-2Na and percentage of deformed eggs.

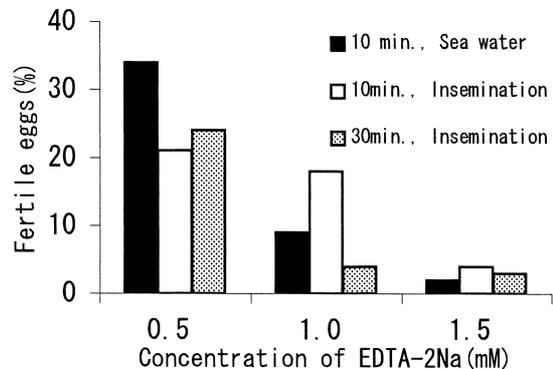


Fig.6. Percentage of fertile eggs which were treated with different conditions after washing eggs by decantation.

実験3：EDTA 処理後の再媒精方法の検討 各試験区での受精卵の割合を Fig.6 に、また異常卵の割合を Fig.7 に示した。EDTA-2Na 濃度が 1.0mM の場合、洗卵のみ区では受精卵の割合は 10% 未満であった。また 10 分後再媒精区では同割合は 20% 近くに達した。しかし 30 分後再媒精区ではほとんどが受精していなかった。

一方、0.5mM の場合は、洗卵のみ区では再媒精していないにもかかわらず 34% の受精卵が確認された。また他の 2 区では両区とも約 20% の受精卵が見られ、再媒精

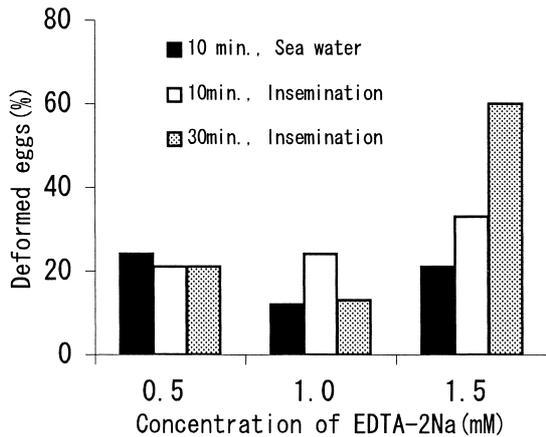


Fig.7. Percentage of deformed eggs which were treated with different conditions after washing eggs by decantation.

前の EDTA 処理時間の違いによる差は見られなかった。さらに1.5mM の場合は全区ともほとんど受精していなかった。また崩壊した異常卵の割合が0.5, 1.0mM の場合よりも高く、特に30分後再媒精区では60%の異常卵が確認された。

## 考 察

雌雄同体であるイタヤガイの自家受精を防止するために、金属イオンのキレート作用を持つ EDTA を含んだ海水中での採卵が有効であるかを検討した。

EDTA を用いた自家受精防止実験を開始するにあたり、媒精時の精子量が少なければ、媒精後の観察で未受精卵が存在した場合、それが EDTA による受精阻害作用であるのか、単に精子量が少なかったためなのか判定が困難となる。そこで精子が確実に卵膜へ付着するために必要な媒精割合を検討した結果、卵1個に対し精子1,000個以上の割合ですべての卵に精子が付着することが示された。受精率は、媒精割合が高くなるほど高い割合となり、卵：精子=1：10,000ではほぼ100%の卵が受精し、発生の進行が確認された。しかし同時に異常な卵割をする卵も多く見られた。卵：精子=1：2,000以上では卵膜に付着する精子数が急増していることから、卵膜に精子が多量に付着すると異常な卵割に結びつくと考えられる。従って実際の種苗生産工程での媒精割合は、卵：精子=1：1,000が適当と考えられる。ただし今回の EDTA を用いた自家受精防止試験では、切開により得た精子を用いたため若干運動能の低い精子が含まれていると考えられた。このため媒精割合を卵：精子=1：

10,000として確実に精子を卵に接触させることとした。実験2の結果から EDTA-2Na を1.0mM 以上添加することにより、卵と精子が遭遇しても、かなりの割合で受精を防止できることが示された。また EDTA の濃度が高くなると未受精卵の卵膜に付着している精子数が減少し、EDTA-2Na が1.5mM の時は全く精子が付着していなかったことから、EDTA の存在が精子の卵膜への付着そのものを阻害していると考えられる。

トリガイの場合は EDTA-2Na を100mg/L (約0.27mM) 含んだ海水中では受精率がほぼ100%であり受精の防止効果がなかったが、200mg/L (約0.54mM) 含んだ海水中では全く受精が見られず受精の防止効果があったとされている。<sup>24)</sup>この時の卵および精子濃度は明らかにされていないが、イタヤガイの場合はトリガイよりも EDTA 濃度を高くすることが必要と考えられた。ただし EDTA 濃度をあまり高くしすぎると異常卵が多く生じることが明らかとなったため、今回の実験においては EDTA-2Na 濃度1.0mM が最も効果的であると思われた。

一方 EDTA の処理後の再媒精法を検討した結果、EDTA-2Na 濃度が1.0mM の場合、EDTA の処理時間を10分間とした時の方が30分間とした時よりも、その後の再媒精による受精率が高かった。トリガイにおいても、EDTA の処理時間が長くなるほどその後の再媒精による受精率が低下し、60分間ではほとんど受精しないと報告されている。<sup>24)</sup>

以上のことから、イタヤガイの自家受精を防除するためには、EDTA-2Na 濃度約1.0mM の海水中で放卵させ、約10分後に卵を回収した後、洗卵、再媒精することが効果的であると考えられた。しかしながらこれら一連の作業は、産卵個体が1個体の場合は対応できるが、同時に何個体も放卵する実際の種苗生産現場では作業の煩雑さ等多くの問題を抱えている。今後は今回の結果を踏まえてより実効性のある手法を検討していく必要がある。

## 謝 辞

本研究に用いたイタヤガイ成員の収集にご尽力下さった、石川県能登島町の漁業者の方々に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 吉尾二郎：イタヤガイの種苗生産について。日本海ブロック試験研究集録、日本海区水産研究所、19、89-93 (1990)。

- 2) 勢村均： 島根県のイタヤガイ養殖。日本海ブロック試験研究集録，日本海区水産研究所，23，59-64 (1992)。
- 3) 島根県，宮崎県： 平成4年度地域特産種増殖技術開発事業報告書（二枚貝グループ，イタヤガイ），1993。
- 4) 島根県： 平成5～9年度地域特産種量産放流技術開発事業報告書（二枚貝グループ，イタヤガイ），1998。
- 5) 石田健次，勢村均： イタヤガイ，「種苗生産マニュアル」（島根県栽培漁業センター編），1995，pp.1-16。
- 6) 石田健次，近藤徹郎，勢村均： 島根県栽培漁業センターにおけるイタヤガイ種苗生産の現状。栽培技研，23(2)，135-139 (1995)。
- 7) 勢村均： イタヤガイ幼生飼育において飼育水中に出現する細菌の数量的変動と幼生に及ぼす影響。水産増殖，42(1)，157-164 (1994)。
- 8) 勢村均，山本倫久，佐藤利夫： イタヤガイ浮遊幼生に対する止水海水飼育系と流水海水飼育系における飼育水中の細菌叢の影響。日本海水学会誌，53(4)，267-275 (1999)。
- 9) 田中正隆： イタヤガイの種苗生産および能登島周辺海域における養殖試験について。日本海区水産試験研究連絡ニュース，392，1-3 (2000)。
- 10) 田中邦三： イタヤガイの生態とその増養殖（総説）。栽培技研，15(1)，89-99 (1986)。
- 11) 勢村均： イタヤガイ成貝における餌料プランクトンの種および濃度と濾水速度，消化率，同化速度との関係。日水誌，61(5)，673-678 (1995)。
- 12) 西広富夫： イタヤガイ *Pecten (Notovala) albicans* の産卵誘発とふ化について。京都海洋センター研報，5，47-50 (1981)。
- 13) 田中彌太郎，村越正慶： セロトニン注射によるイタヤガイの放精・放卵誘起。養殖研報，7，9-12 (1985)。
- 14) W. R. Coe： Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. *Quart.Rev.Biol.*，18，154-164 (1943)。
- 15) 森勝義： 二枚貝の繁殖生理，「栽培漁業技術研修事業基礎理論コース 親魚養成シリーズ NO.7」（（社）日本栽培漁業協会編），pp.1-34 (1990)。
- 16) 森勝義： 二枚貝の成熟，発生，成長とその制御，「水族繁殖学」（隆島史夫，羽生功編），緑書房，東京，1989，pp.325-363。
- 17) 田中彌太郎： イタヤガイの発生について。養殖研報，5，19-25 (1984)。
- 18) 田中彌太郎： 雌雄同体，卵生型二枚貝での自家受精—イタヤガイ（資料）。水産増殖，18(4)，209-210 (1971)。
- 19) 田中彌太郎，N. D. Rio： 自家受精により発生したイタヤガイの幼生について。水産増殖，26(2)，58-59 (1978)。
- 20) P. G. Beninger and M. L. Pennek： Functional anatomy of scallops, "Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 21" edited by Sandra. E. Shumway, pp.133-223。
- 21) A. N. Sastry： Reproduction of the bay scallop, *Aequipecten Irradians* influence of temperature on maturation and spawning. *Biol.Bull.*，125，146-153 (1963)。
- 22) I. Widowati, G. Dorange, M. Le .Pennek, and J. C. Cochard: Genital tract and oocytic pathway during spawning in *Pecten maximum* (Mollusca, Bivalvia). *Invert. Rep. Dev.*，28: 3, 153-160 (1995)。
- 23) 団勝磨： 総説，「無脊椎動物の発生（上）」（団勝磨，関口晃一，安藤裕，渡辺浩編），培風館，東京，1983，pp.1-49。
- 24) 沢田允明： 軟体動物（二枚貝類），「海産無脊椎動物の発生実験」（石川優，沼宮内隆晴編），培風館，東京，1988，pp.87-96。
- 25) 藤原正夢： EDTA 処理によるトリガイの自家受精防止について（短報）。京都海洋センター研報，20，75-77 (1998)。
- 26) 浮永久，菊地省吾： 紫外線照射海水のホタテガイ *Patinopecten yessoensis* に対する産卵誘発効果。東北水研報，34，87-92 (1974)。