

淡水産二枚貝マシジミ属 *Corbicula* の教材化

(大学院教育学研究科)	玉 井 直 樹*
(教育学部生物学教室)	新 井 範 子
(教育学部生物学教室)	稲 本 安 恵
(教育学部生物学教室)	柴 部 佳 子
(北海道大学農学部)	柴 田 洋
(教育学部生物学教室)	家 山 博 史

An attempt to use fresh water bivalve *Corbicula* for teaching materials

Naoki TAMAI, Motoko ARAI, Yasue INAMOTO, Yosiko SHIBABE,
Fukashi SHIBATA and Hiroshi IEYAMA

(平成20年6月11日受理)

1. はじめに

日本のシジミ属には、*Corbicula japonica* Prime, 1864. ヤマトシジミ, *C. sandai* Reinhardt, 1878. セタシジミ, *C. leana* Prime, 1864. マシジミの3種がある¹⁾。しかし、川の水質汚濁や護岸工事など環境の変化により、日本産シジミの漁獲が減少してきたので、中国産シジミや韓国産シジミなどが輸入されるようになった。それらの輸入シジミは食卓に上がるまでに、宍道湖や琵琶湖などをはじめとして、各地で蓄養、放流されることがある。また、シジミは生きたまま流通することが多いので投棄されることもある。このため、各地で上記3種とは殻形態の異なるシジミ類の生息が確認されるようになった。最も古い記録は西村・波部²⁾で、魚屋で購入したシジミの中に台湾シジミとカワムラガイが混入していた。外来シジミの生息確認は増田・波部³⁾に始まり、増田、ほか⁴⁾は西日本各地で台湾シジミ種群の生息を確認した。また、石橋・古丸⁵⁾は琵琶湖淀川水系では大和川を除くほとんどの水域でマシジミが姿を消し、台湾シジミ *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) が繁殖していると報告している。関東では神奈川県立向上高等学校生物部が相模川水系と金目川水系の台湾シジミ出現

状況を詳しく調べている⁶⁾。

マシジミや台湾シジミなどのマシジミ類は、雌雄同体で体内に卵と精子の両方を持ち、主に自家受精によって発生する⁷⁾。卵胎生で、受精卵は親貝の鰓でふ化し、体外へ放出されるが、一部の卵と精子はそのまま殻外に放出され、放出された卵はすぐに底質に沈下する沈性卵である⁸⁾。一般的な生物では、減数分裂によって染色体数が半減した卵（雌の遺伝情報をもつ）と精子（雄の遺伝情報をもつ）がつくられる。軟体動物の多くでは、卵は第一減数分裂の途中で受精し、第一、第二の2回の減数分裂によって2個の極体を放出し、卵核と精核とが合体して雌雄両方の遺伝情報をもつ受精卵となって発生が進んでいく。しかし、マシジミ類では、卵母細胞は第一減数分裂時に2個の極体を形成する。しかも、卵母細胞に含まれていた染色体はすべて2個の極体の中に移り、卵にはまったく含まれない。その結果、受精卵の中には精核しか残らず、この精子の遺伝情報だけで発生が進んでいく⁹⁾。これを「雄性発生」という。このため、マシジミ類の精子は減数分裂をしないでつくられる。他家受精であれば、一世代で精子（雄の遺伝情報をもつ）の遺伝情報に置きかわることになる。

このような特別な発生様式をとるマシジミ類が、愛媛県では学校区内の身近な川や田用水路に生息しているこ

*現：愛媛県立松山東高等学校

と、また、マシジミと近縁の外来種タイワンシジミが侵入していることからマシジミ類の教材化を検討した。

2. 松山平野のタイワンシジミについて

タイワンシジミ *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) は日本産のマシジミ *C. leana* Prime, 1864に非常によく似ており、多くの色彩型があって、形態の変異も大きく、マシジミはタイワンシジミのシノニムとされることもある¹⁰⁾。愛媛県で見つかったタイワンシジミは殻色が黄色で、殻皮のはがれた殻頂部は薄い桃色を呈し、殻内面は白色、ヒンジ部分は紫色に着色している。ヒンジ部分の着色は殻長1 mmの幼貝でも見られ、マシジミの幼貝と区別することが出来る。これらの特徴は、愛媛で見つかったものがタイワンシジミのカネツケシジミ型 *Corbicula fluminea* f. *insularis* であることを示しているが、愛媛で見つかったタイワンシジミが本当にマシジミとは別種なのか、同定に誤りはないかを確認する必要がある。そこで、松山平野で同所的に生息しているマシジミとタイワンシジミ（カネツケシジミ型）の鰓細胞染色体上のリボソーム DNA の局在を FISH 法を用いて調べたところ、マシジミでは5 SrDNA, 18SrDNA とともに3対のシグナルが見られ、うち1対は同一の染色体（短腕に18SrDNA, 長腕に5 SrDNA）に現れた（図1 a）。タイワンシジミでは5 SrDNA は2対、18SrDNA は1対のシグナルとして見られた（図1 b）。また、45SrDNA の ITS 領域を PCR 法で増幅し、長さを両種で比べたところ両種の ITS の長さに違いが見られた（図1 c）。さらに両種の精子と鰓の核 DNA 量をフォイルゲン染色核の吸光度で調べたところ、両種とも鰓と精子の値に大きな差は見られず、非減数精子が次世代を担っている雄性発生であること、また、両種を比較すると DNA 量はマシジミが約1.5倍高い値であることが分かった（表1）。

表1 マシジミ類のフォイルゲン染色核の吸光度定量による DNA 量

	核面積(μm^2 , S.D.)	核 DNA 量(pg, S.D.)	細胞数
マシジミ			
鰓細胞	17.55 \pm 2.78	6.48 \pm 1.11	207
精細胞	10.91 \pm 1.71	6.69 \pm 0.82	354
タイワンシジミ			
鰓細胞	13.76 \pm 2.55	4.15 \pm 1.06	593
精細胞	7.42 \pm 0.96	3.91 \pm 0.48	634

これらのことから松山のタイワンシジミはマシジミとは別種である。マシジミは3倍体とされ¹¹⁾、タイワンシジミは2~4倍体であるとされている¹²⁾。しかし、松山では両種とも FISH のシグナルは3つ組で現れることはな

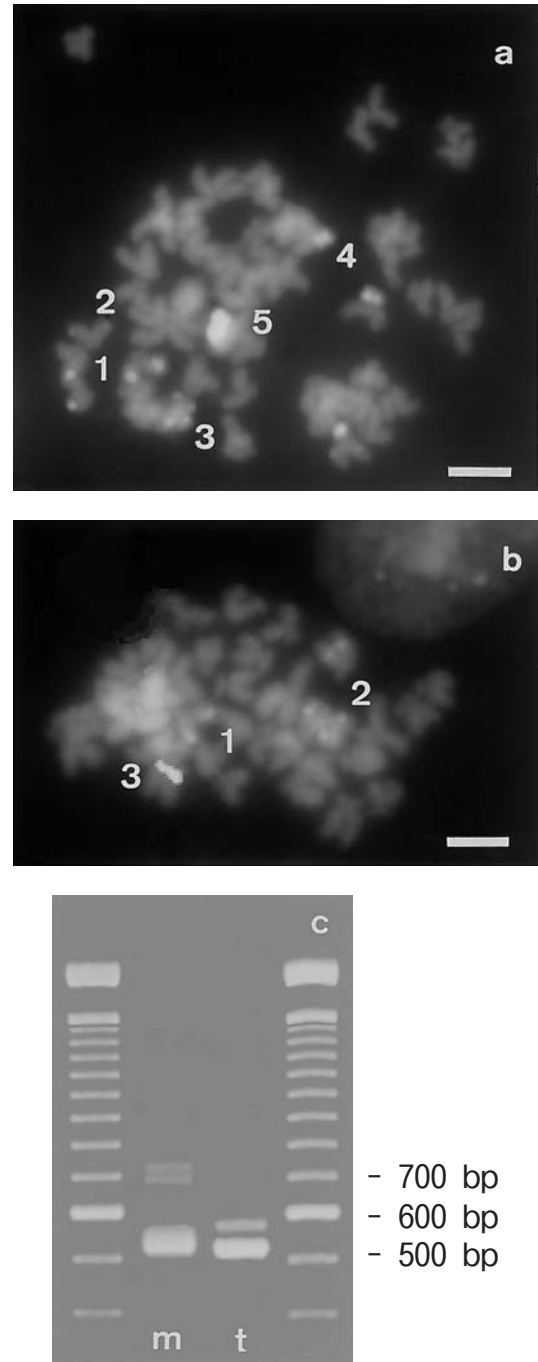


図1 マシジミ, タイワンシジミの5 SrDNA と18SrDNA シグナルおよび45SrDNA の ITS 領域長の比較

a : マシジミ染色体に見られる5 SrDNA シグナル (1, 2, 3) と18SrDNA シグナル (3, 4, 5), b : タイワンシジミ染色体の5 SrDNA シグナル (1, 2) と18SrDNA シグナル (3), c : 電気泳動によるマシジミ (m) とタイワンシジミ (t) の ITS 1 -ITS 2 領域の長さの違い。Scale bar = 5 μm

く、2倍体であることが示唆された。

3. 発生教材としてのマシジミ類

高等学校の生物では発生教材として、ウニ、カエル、イモリがほとんどの教科書に紹介されている。さらに生物の発生について実験観察する場合、ウニを材料としていることが多い。しかし、入手する時期が比較的短い繁殖期によって限定されること、採集が容易ではないこと、海水での飼育や発生の観察に手間がかかる等の問題があり、授業の進度に合わせた実験を行えないことがある。そこで、身近な川に生息し採集や飼育も簡単で、5月から11月にかけて比較的簡単に産卵させることができるマシジミ類を用いて発生の実験観察を行い、その教材化について検討した。さらに、マシジミ類が雄性発生という特別な発生様式をとることと、最近マシジミの生息域がタイワンシジミに置換しているという現状が報告されていることの関連などについても考えてみた。

a. 材料の採取と飼育

マシジミやタイワンシジミは今治市、松山市、東温市、松前町、大洲市、宇和島市などの田用水路で採集できるが、その水路は底質が砂礫で覆われ、常に流れがあって、1年中涸れないもので、タイワンシジミのほうが流れの速い清澄な水路に多く見られる。飼育は20°以下の水温に保って、エアレーションすれば1～2週間は実験に使える。

b. 放卵・放精

放卵・放精は松山では5月～11月に観察できるが、6、7、9月が最も良い。マシジミ類を0.01% セロトニン(5-hydroxytryptamine, 5-HT)に30分間浸す。セロトニン処理のあいだ、シジミは足をだしたり、殻を大きく開くような反応を見せる。セロトニン液は濾過して冷蔵保存すれば数回使用できる。処理後、貝を大きめのシャーレに移し、真水を加え、遮光しておく。約30分ほどで放卵・放精が見られるようになる。殻長18mm以上の貝で放卵・放精が可能であった。藤原⁸⁾は温度差の刺激でマシジミの放卵を促すことが出来ると報告しているが、セロトニン処理ほど確実ではない。マシジミ類の卵は沈性卵で出水管から放出されるとすぐにシャーレの底に沈み、堆積されていく。

c. 発生の観察

1. 放卵・放精された時点で卵は受精するので、シャーレに堆積している卵をスポイトで吸い上げ、スライドグラスや時計皿に移してすみやかに検鏡する。卵の表面に多数の精子が集まっている様子や、受精膜が上がっているところを観察できる。また、スライドグラスに滴下してカバーガラスを載せ、高倍率で検鏡すると尾を2つもつ精子を観察できる(図2a)。

2. 放卵後約60分で2個の極体が見られるようになる(図2b)。

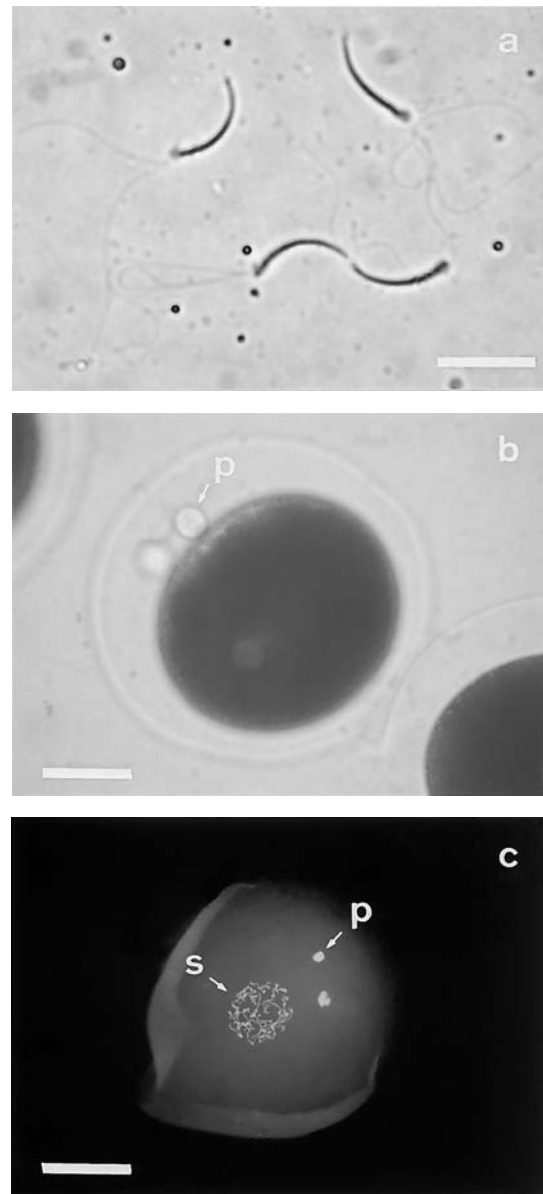


図2 放出されたマシジミの精子と受精卵

a: 精子 (Scale bar=10 μ m), b: 極体が形成された受精卵, c: DAPI 染色による極核 (p) と精子由来の染色体 (s).
b, c の Scale bar=50 μ m

3. 卵内の卵核・精核の観察

卵内の精核・卵核の挙動を観察するために、DAPI 染色とフォイルゲン染色の2方法を示す。DAPI 染色は鮮明な画像を観察できるが(図2c)、蛍光顕微鏡が必要で、光学顕微鏡の場合は、フォイルゲン染色が適しているが、やや不鮮明な画像となる。中期染色体を観察するには採卵した卵を0.01%コルヒチンで30分処理するとよい。

(a) 蛍光色素4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) による染色とその観察

- ① 卵をカルノア固定液(エタノール:酢酸:クロロホルム=3:1:1)で20分間固定する。固定時間中に固定液は3回取りかえる。固定した卵は、冷凍庫に保存する。
- ② 固定した卵を時計皿に取り、50%酢酸を加えて15分間静置する。
- ③ パスツールピペットで卵を吸い上げ、スライドグラスに滴下したあと一度吸い戻し、もう一度滴下する。こうすると卵はスライドグラス上に同心円状に分散する。カバーガラスを載せ、卵を軽く押しつぶす。ドライアイスや液体窒素を用いて凍結させ、その後、カバーガラスを剥がして、風乾させる。
- ④ 緩衝液(McIlvaine buffer pH7.0:Na₂HPO₄·12H₂O (MW358.14) 58.99g/l, クエン酸 (MW 210.14) 3.71g/l) に5分間浸す。
- ⑤ 4℃のDAPI染色液(0.1μg/ml DAPI)で5分間染色する。
- ⑥ 再び緩衝液に5分間浸す。
- ⑦ 50%グリセリン溶液(緩衝液)を滴下し、カバーガラスをかける。
- ⑧ 落射蛍光顕微鏡(フィルター UV)で観察する。作成したプレパラートは冷蔵庫で保管すればかなり長い間使用できる。

(b) フォイルゲン染色とその観察

- ① 卵をカルノア固定液(エタノール:酢酸:クロロホルム=3:1:1)で20分間固定する。固定時間中に固定液は3回取りかえる。固定した卵は、冷凍庫に保存する。
- ② 卵を時計皿に取り、50%酢酸を加えて15分間静置する。

- ③ パスツールピペットで卵を吸い上げ、スライドグラスに滴下したあと一度吸い戻し、もう一度滴下する。カバーガラスを載せ、卵を軽く押しつぶす。ドライアイスや液体窒素を用いて凍結させ、その後、カバーガラスを剥がして、風乾させる。
- ④ 標本を6 mol/l 塩酸で15分間加水分解する。
- ⑤ 蒸留水で洗浄し分解を止める。
- ⑥ Pararosanine-shiff 染色液で60分間染色する。
保存染色液:Pararosanine hydrochloride 3 gを60℃の蒸留水600mlで溶かし、60℃の恒温器に一晩置く。次に亜硫酸水素ナトリウム3 gを加えて攪拌し、さらに1 mol/l HCl 60ml加えて12~24時間冷蔵庫に置く。次に活性炭6 gを加え、1~2分強く振り濾紙(Na101)で濾過し、褐色瓶で冷蔵保存する。
グリシン緩衝液:グリシン7.505 g, NaCl 5.850 g/蒸留水1 l
染色には保存染色液15ml, 15%亜硫酸水素ナトリウム15ml, グリシン緩衝液72ml, 0.1mol/l HCl 48mlの割合で混合したものを用いる。
- ⑦ 重亜硫酸ナトリウムグリシン緩衝液(グリシン緩衝液72ml, 0.1molHCl 48ml, 15%亜硫酸水素ナトリウム13ml)で3回リンスする。
- ⑧ 蒸留水で水洗後、そのまま光学顕微鏡で観察する。

4. 初期発生の観察

約3時間で不等卵割して2細胞期となる(図3a)この後、卵割を続け4細胞期(産卵後4時間)(図3b)、8細胞期(産卵後5~6時間)、そして桑実胚期(産卵後24~25時間)が観察される。産卵後26時間で胞胚期となり(図3c)、ヴェリジャー幼生(産卵後28時間、長径約160μm)になると、ヴェーラム(口前繊毛環)が発達し、胎殻も見え始める。D型幼生(産卵後70時間、長径約180μm)(図3d)になると、足が発達し、はい回るようになり、胎殻もはっきりしている。

本研究では次のような視点でマシジミ類が発生教材として適当であると考えた。①材料が得やすい、実験までの飼育が容易、シャーレ内で放卵する様子が観察でき、採卵も簡単である。

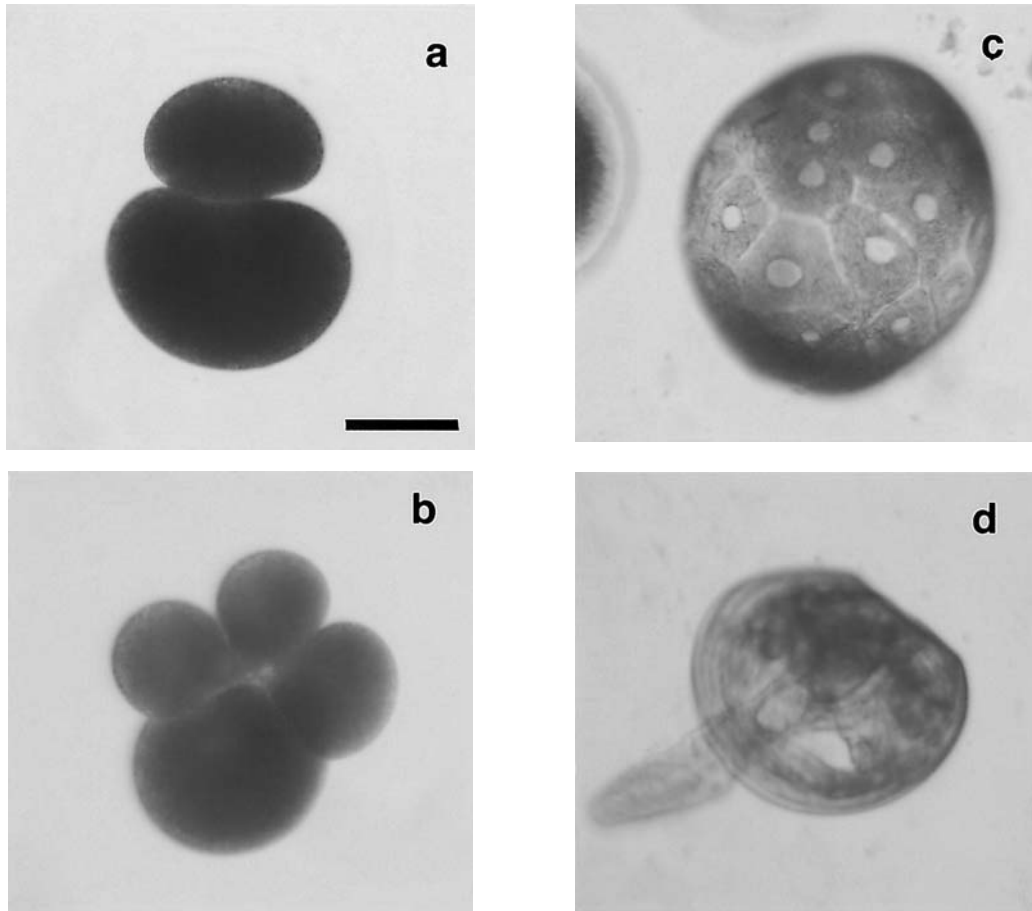


図3 マシジミの胚発生
a : 2細胞期, b : 4細胞期, c : 胞胚, d : D型幼生。Scale bar=50 μ m

②初期発生は特殊な様式であるが、極体が観察できること、精核のみで発生が進むことから生殖について発展的な教材として使用できる。

4. 環境問題の教材としてのマシジミ類

人の活動は地球上の様々な生態系に影響を与えている。特に、生物種が失われていく生物多様性の喪失は色々な場面で見ることができ、水田を中心とした里山の自然も圃場整備や水質汚濁の影響で多くの生物が絶滅の危険に瀕している。また、外来種が在来種を減ぼしたり、病気を持ち込んだりする脅威もある。環境問題や外来種問題の教材として田用水路の底質に生息する生物、特にマシジミ類について検討した。

1. 調査方法

用水路の環境調査：川幅、水深、流速、水温、pH。その他に、パックテストを用いてCOD、硝酸イオン、アンモニウムイオン、リン酸イオン、などを調べるが、

COD 以外は場所、季節によって大きな変化はみられない。

採集：底質に30cmの方形枠を置き、砂泥を集め、5%ホルマリンで固定。なるべくはやく生物を選別する。生物は70%エタノールに保存する。種の同定、個体数、湿重量を計る。マシジミとタイワンシジミは殻長も計測する。

2. 結果

2006年1月～12月の調査結果の1例を紹介する。表2は松山市南高井の幅200cmの用水路の環境と見つかった生物と水質を示している。この水路は年間を通して比較的安定した環境で、夏場の水温上昇も低めで、CODもあまり高くない。コンクリート張りの底質でありながら、その上に堆積した薄い砂泥底に多くの生物が生息していることが分かる。特に、二枚貝ではマシジミ、タイワンシジミ、ドブシジミ、チビマメシジミの4種が生息し、マシジミ類が優占種となっている。採集された生

表2 2006年に松山市南高井の用水路で見つかった底生動物と水環境

種名	環境
扁形動物	川幅 200cm
ナミウズムシ <i>Dugesia gonocephala</i>	水深 5~24cm
環形動物	流速 0.2~1.0 m/sec
イトミミズ <i>Tubifex hattai</i>	水温 12.9~21.7°C
ヒラタビル <i>Glossiphonia complanata</i>	pH 6.3~10.1
ヌマビル <i>Holobdella stagnalis</i>	酸化還元電位
シマイシビル <i>Erpobdella lineata</i>	+94~187mV
節足動物	硝酸イオン
ミズムシ <i>Asellus hilgendorfi</i>	1~10mg/l
フタバコカゲロウ <i>Baetiella japonica</i>	アンモニウムイオン
コガタシマトビケラ <i>Hydropsychodes brevilineata</i>	0~0.4mg/l
ヒラタドロムシ <i>Mateopsephenus japonicus</i>	リン酸イオン
軟体動物	0~0.5mg/l
カワナナ <i>Semisulcospira libertina</i>	COD 0~20mg/l
モノアラガイ <i>Radix japonicus</i>	
サカマキガイ <i>Physa acuta</i>	
マシジミ <i>Corbicula leana</i>	
タイワンシジミ <i>Corbicula fluminea</i> f. <i>insularis</i>	
ドブシジミ <i>Musculium japonicum</i>	
チビマメシジミ <i>Pisidium parvum</i>	

物种をみると、おもにβ中腐水性の環境であることが分かる。この場所はタイワンシジミの個体数が非常に多く、マシジミは1年で消失するかと追跡調査をした場所であるが、タイワンシジミへの置換は見られず、両種とも同じような月変化を示した(図4)。

田用水路は田への灌水と中干しや落水による水量の増

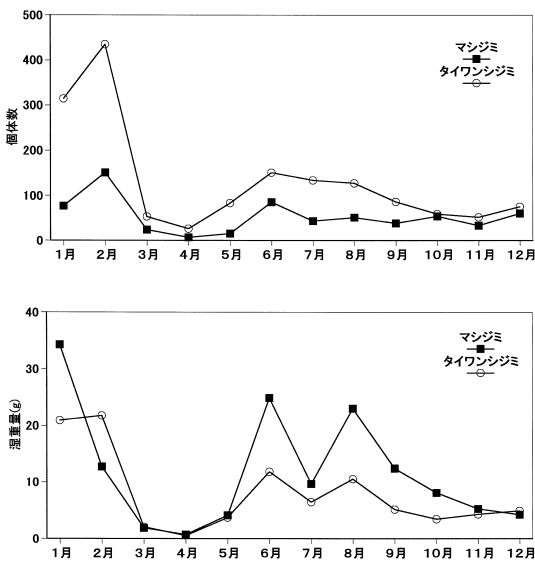


図4 松山市南高井のマシジミ類個体数および湿重量の季節変化

減、さらに清掃といった人の作業の影響を受ける不安定な環境である。このため、用水路の主流となる、年間を通じて渇水しない水路が生物観察の場となる。しかし、主要水路でも人の作業の影響で生物相は激しく変化する。図4でマシジミ類の個体数が3月に急激な減少を示しているのは水路清掃が行われたためで、その後、個体数はゆっくりと回復している。

水路の生物観察は身近な環境にも多様な生物が生息していることや、それらの生物が人間の生活の影響を受けている実態を知る機会を提供できる。松山平野ではマシジミからタイワンシジミへの置き換わりは起こっていないようであるが、タイワンシジミがマシジミより多くなっている箇所もある。愛媛では今まさにタイワンシジミが分布を拡大しつつあり、外来種の侵入について追跡観察する教材として利用できることにもなるだろう。

参考文献

- 1 肥後俊一・後藤芳央(1993) 日本及び周辺地域産軟体動物. エル貝類出版局.
- 2 西村 正・波部忠重(1985) 秋田県男鹿市で中国産淡水貝カワムラガイとタイワンシジミを買う. ちりぼたん, 16: 62-63.
- 3 増田 修・波部忠重(1988) 岡山県倉敷市にすみついたカネツケシジミ. ちりぼたん, 19: 39-40.
- 4 増田 修, ほか(1998) 西日本におけるタイワンシジミ種群とシジミ属不明2種の産出状況. 兵庫陸水生生物, 49: 22-35.
- 5 石橋 亮・古丸 明(2003) 琵琶湖淀川水系, 大和川水系におけるタイワンシジミの出現状況. Venus, 62: 65-70.
- 6 園原哲司, ほか(2005) 相模川水系, 金目川水系におけるタイワンシジミの出現状況. ちりぼたん, 36: 18-25.
- 7 Ikematsu, W. and Yamane, S. (1977) Ecological studies of *Corbicula leana* Prime. *Bull. Jpn. Soc. Fish.*, 43: 1139-1146.
- 8 藤原次男(1975) マシジミの生殖法について. Venus, 34: 54-56.
- 9 Komaru, A., Kawagishi, T. and Konishi, K. (1998)

- Cytological evidence of spontaneous androgenesis in the freshwater clam *Corbicula leana* Prime. *Development Genes and Evolution*, 208 : 46–50.
- 10 Morton, B. (1986) *Corbicula* in Asia - an updated synthesis. *Amer. malac. Bull.*, 2 : 113–124.
- 11 Okamoto, A. and Arimoto, B. (1986) Chromosomes of *Corbicula japonica*, *C. sandai* and *C. (Corbiculina) leana* (Bivalvia: Corbiculidae). *Venus*, 45 : 194–202.
- 12 Komaru, *et al.* (1997) Hermaphroditic freshwater clams in the genus *Corbicula* produce non-reductional spermatozoa with somatic DNA content. *Biol. Bull.*, 193 : 320–323.

