

モノクローナル抗体法による海洋生物卵・幼生の同定技術

大西庸介 (株)環境総合テクノス)

キーワード：モノクローナル抗体、卵、稚仔、幼生、同定

1．海洋生物卵・幼生の同定

1.1 現状と問題点

沿岸域の環境アセスメントにおける生物調査や水産生物の資源調査において、プランクトンネットで採集される魚類の卵や稚仔、甲殻類や軟体類等の卵や幼生の同定(種の査定)は重要な業務である。

浮遊性卵や幼生類は遊泳能力を持たないか非常に乏しいため、これらを調査することにより定量性の高い現存量データが取得できる。しかし、卵や幼生類は比較形質が乏しいため同定困難な種が多く、不明卵、不明幼生としてデータ処理されるケースが多い。また海洋の生物調査では、一般的に現地で採取したサンプルをホルマリン等の薬剤で固定処理し、実験室に持ち帰ってから観察・同定が行われる。この固定処理によって、重要な比較形質である色素が消失して同定不可能となる。¹⁾これを補うために魚卵については、生きたサンプルを採取し実験室に持ち帰って孵化試験を行い、稚仔魚の比較形質で同定が行われる。^{1),2)}しかし、時間、労力、費用、飼育技術、同定者の熟練等の面で全ての定点で実施できず、定量的なデータが得られない。

1.2 新しい同定技術

開発当初の1990年代前期には、海洋生物卵・幼生の同定、種判別に適用しうる新技術として、次の4手法が考えられた。

- 走査型電子顕微鏡での微細構造観察³⁾
- 生体分子の化学的判別(アイザ'ィ分析)⁴⁾
- 遺伝子解析(DNA法)⁵⁾
- 免疫学的手法(抗体法)⁶⁾

海洋の生物調査では、多地点、多層でサンプリングが行われるため、多数の同定分析サ

ンプルが生じる。これらの手法の内、客観的かつ簡便で、高精度なものは、分子生物学的手法であるDNA法と抗体法(ポリおよびモノクローナル抗体)が挙げられた。

我々は、ホルマリン固定サンプルへの適用性(過去の保存サンプルにも適用)、サンプルの非破壊性(後に観察することで発生段階が査定可能)、多種多数の卵・幼生が混在する1ネットごとの分析が可能であることから抗体法の方が有利と判断し、中でも特異性が高く、抗体産生細胞の継代培養によって継続的生産が可能なモノクローナル抗体法による海洋生物卵、幼生の同定技術の開発を行った。

2．モノクローナル抗体法

2.1 概要

哺乳類等の高等動物には、組織内に極微量でも異物(抗原)が侵入するとこれを認識し排除する機能が存在する。これは免疫系と呼ばれ、体内で異物(抗原)に対する抗体が作られ、特異的に反応し排除する生態防御システムである。モノクローナル抗体法とはこの抗原抗体反応を応用したものであり、バイオテクノロジーを利用して人為的に抗体を産生する細胞を作製し、その細胞により特異的で均質な抗体を得、高感度に抗原物質を検出する技術である。

2.2 利用分野

モノクローナル抗体法は1970年代に確立された技術で、現在では感染症やガン診断等の医療分野、食中毒菌の検出等の食品衛生分野、環境ホルモン等微量物質の検出等の化学分析、有用生理活性物質等の精製の製薬分野といった多くの分野で利用されている。⁷⁾

海洋生物の同定では、赤潮やアオコといった微細藻類^{8),9)}、フジツボ幼生¹⁰⁾、ヒトデ幼生¹¹⁾、さらにはアサリ幼生¹²⁾の同定・識別にも利用されている。

3．抗体による海洋生物卵、幼生の同定

3.1 開発の概要

モノクローナル抗体の作製と抗体を利用したアッセイ・検出は、ある程度一般化された技術である。しかし、数ミリメートルのサイズである水産生物の卵や幼生を対象とした前例は無かった。そこで、特異的であること、サンプルを非破壊で識別できること（細胞表面の抗原を標的）、肉眼で識別できること、ホルマリン固定サンプルにも適用できることを課題として開発を行った。¹³⁾ 開発の工程を大きく分けると、a)モノクローナル抗体の作製と b)得られた抗体の野外サンプルでの検証となる。

a) モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体の作製対象生物は、水産資源として重要でかつ同定が困難な種類とし、魚卵ではマダイ、ヒラメ、カレイ類、ブリ属、甲殻類幼生ではズワイガニ、ガザミ類とした。作製工程は、免疫、抗血清（ポリクローナル抗体）産生の確認、細胞融合、目的抗体産生細胞のスクリーニング（特異

性の確認）とクローニング（クローン化）大量培養と細胞の凍結保存、抗体が分泌された培養液上清の精製となる。なお、我々はおよび、の工程で前述の課題が達成できるよう、独自の改良を加えた。また、との工程で行うアッセイでは、間接酵素抗体法による免疫組織染色（図1）を利用している。¹³⁾ この結果、マダイ卵（図2）、ホシガレイ卵（図3）、ズワイガニゾエア幼生（図4）の3種類について、モノクローナル抗体を得た。また、免疫を行った全ての種類でポリクローナル抗体（抗血清）を得た。

b) 野外サンプルへの適用性

3種類のモノクローナル抗体の内マダイ卵について、野外サンプルへの適用性を調べた。マダイ卵が出現する海域で採取した生サンプルから、マダイ卵の特徴、すなわち単一油球、卵径1mm前後の分離浮性卵を取り出し、水槽内で飼育して卵の発生を進めた。この特徴を有する卵には、クロダイ卵、ヘダイ卵等のマダイ近縁種やマダイ卵と酷似するヒラメ卵が混在するケースが多い。卵内の組織が発達し、孵化前の胚体の特徴からマダイ卵と同定できた卵と他種の卵に分別した上で各々ホルマリン固定し、それぞれについてマダイ卵のモノクローナル抗体との反応性を調べた。この結果、マダイと同定された卵のみに陽性反応が

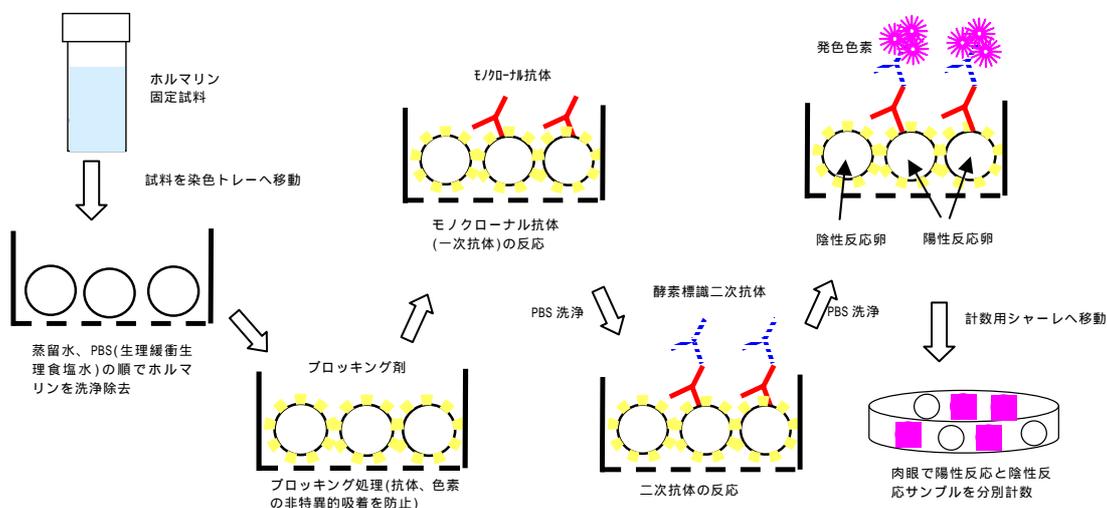


図1 モノクローナル抗体による免疫組織染色の概要

認められ、野外サンプルにも適用できること

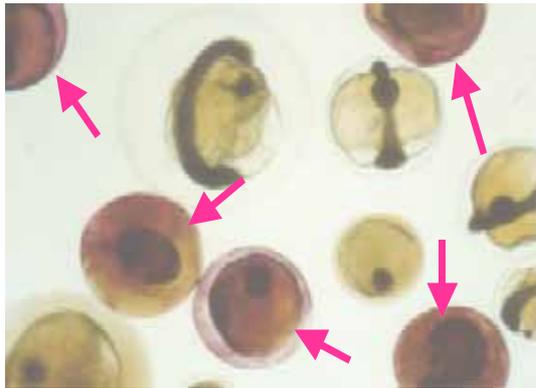


図2 モノクローナル抗体によるマダイ卵の識別
(矢印が陽性反応 = マダイ卵を示す)



図3 モノクローナル抗体による杉ガレイ卵の染色
(陽性反応(左)と陰性反応卵(右))

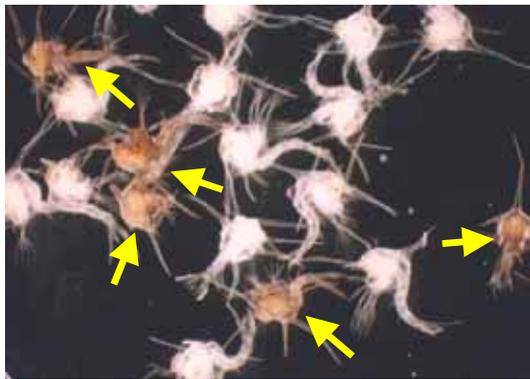


図4 モノクローナル抗体によるスズリガことハズリ幼生の識別
(矢印が陽性反応 = スズリガ幼生、陰性反応 = ハズリを示す)

が確認できた。^{13), 14)}

また、1999年5月と6月に若狭湾での魚卵調査において、抗マダイ卵モノクローナル抗体が使用され、従来からマダイの産卵場として推定されていた天然礁付近に陽性反応卵が多く分布することが報告されている。¹⁵⁾

c) モノクローナル抗体法の特徴

モノクローナル抗体法のメリットは、特異的で精度が高くこれまで困難であった生物の同定が可能となること、2時間程度で迅速に同定できること、同定作業に特別な機器が不要であること、長期保存されたホルマリン固定試料にも適用可能であること、多種多量の卵や幼生が混在する野外試料を非破壊で識別できること、抗体産生細胞を適切に維持することで半永久的に抗体の生産が可能であり、同じ基準で同定できることが挙げられる。

近年、より感度の高いDNA法による生物同定の研究が進展し、短期間であればホルマリン固定サンプルにも適用可能であることが報告されている。¹⁶⁾しかし、1個体ずつからDNAの抽出と高価な機器による増幅・解析操作が必要である。卵稚仔調査では、数ミリメートルレベルの魚卵や幼生を大量に処理する必要があり、一度に処理する際には抗体法が便利と考えられる。

デメリットとしては、モノクローナル抗体産生細胞を得ることが容易でないこと、また特異性(交差反応)確認のために予め種が明確な親生物が産卵した卵や幼生を入手しておく必要があることが挙げられる。ただ、多くの種類について抗血清(ポリクローナル抗体)が得られることを確認していることからモノクローナル抗体が得られる可能性があり、スクリーニングやクローニングの工程を改善、効率化する必要がある。

4. 今後の課題

海洋生物の卵や幼生が同定可能となることで、親資源量の把握、自然死亡係数の推定、産卵時期、産卵場の把握、移送・分散過程および集積場の把握、初期生活史の解明等が可能となり、水産資源の適正管理や持続的利用、環境影響評価の高精度化と効率的保全技術の実施が期待できる。

モノクローナル抗体法はこれを可能とす

る技術と考えるが、前述の抗体作製の効率化をクリアし、調査水域のニーズに応じた生物種のモノクローナル抗体を開発し、多くの研究者や調査機関で使用され実証データを蓄積し水平展開することが課題である。また、完成した抗体の維持管理と供給体制の確立、抗体染色後の自動判別・計数も重要な課題と考える。

5. 引用文献

- 1) 池田知司, 水戸 敏 (1991): 卵の検索, 日本産稚魚図鑑, 東海大学出版会, 999-1119.
- 2) 池田知司 (1983): 冬~春季の若狭湾沿岸に出現する無油球卵の同定, 水産増殖, 31, 81-87.
- 3) Hirai A. (1988): Fine structure of the micropyles of pelagic eggs of some marine fishes, Japanese Journal of Ichthyology, 35, 351-357.
- 4) 左子芳彦, 足立真佐雄, 石田祐三郎 (1992): アイソザイム、モノクローナル抗体法による微細藻の識別, 微生物の生態 18, 学会出版センター, 61-78.
- 5) 張 成年, Waslsh, P.J. (1992): 魚類卵稚仔の種判別に対する PCR 法の有効性, 平成 4 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 89.
- 6) Hiroishi, S., Uchida, A., Nagasaki, K., and Ishida, Y. (1988): A new method for identification of inter-and intra-species of the red tide algae *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae) by means of monoclonal antibodies, J. Phycol., 24, 442-444.
- 7) 井上國世 (1996): モノクローナル抗体の利用の現状, 化学と生物, 34, 240-253.
- 8) Adachi, M., Sako, Y., and Ishida, Y. (1993): The identification of conspecific dinoflagellates *Alexandrium tamarense* from Japan and Thailand by monoclonal antibodies, Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 327-332.
- 9) 幸 保孝, 吉田天士, 広石伸互 (2002): 有毒アオコの分子識別と予察への応用, 有毒・有害藻類ブルームの予防と駆除, 恒星社厚生閣, 34-42.
- 10) Miller, K. M., Jones, P., and Roughgarden, J. (1999): Monoclonal antibodies as species-specific probes in oceanographic research: examples with intertidal barnacle larvae, Molecul. Mar. Bio. and Biotech., 1, 35-47.
- 11) Ikegami, S., Mitsuno, T., Kataoka, M., Yajima, S., and Komatsu, M. (1991): Immunological survey of planktonic embryos and larvae of starfish *Asterina Pectinifera*, obtained from the sea, using a monoclonal antibodies directed against egg polypeptides, Bio. Bull., 181, 95-103.
- 12) 浜口昌巳, 薄 浩則, 石岡宏子 (1997): モノクローナル抗体によるアサリ浮遊幼生の同定法の検討, 平成 9 年度春季水産学会講演要旨集, 95.
- 13) 大西庸介, 池田知司, 広石伸互, 沖山宗雄 (2003): モノクローナル抗体を用いた浮遊性魚卵の同定, 日本水産学会誌, 69, 170-177.
- 14) Hiroishi, H., Yuki, Y., Yuruzume, E., Onishi, Y., Ikeda, T., Komaki, H., and Okiyama, M. (2004): Identification of formalin-preserved eggs of red sea bream (*Pagrus major*) (Pisces: Sparidae) using monoclonal antibodies, Fish. Bull., 102, 555-560.
- 15) 安達辰典, 大西庸介 (2001): モノクローナル抗体を用いて識別したマダイ卵の小浜湾における分布について, 平成 13 年度日本水産学会中部支部会講演要旨集, 9-11.
- 16) 瀬崎啓次郎, 久保島康子, 三谷 勇, 福井 篤, 渡部終五 (2001): ミトコンドリア・シトクローム b 遺伝子によるマサバおよびゴ

マサバの種判定とホルマリン固定浮遊卵同定
への応用, 日本水産学会誌, 67, 17-22.