

熊本県水産研究センター研究報告

第5号

目次

熊本県におけるカワノリの分布について	吉田好一郎	1
ヒラメの性分化におけるアロマターゼ遺伝子の発現に関する研究	北野 健	7
高水温を用いたアコヤガイの選抜育種に関する研究	松本聖治・木村武志・倉田清典	25
冬季低水温漁場を用いた赤変を伴うアコヤガイの大量へい死対策について	深浦雄一・糸山力男・木村武志・倉田清典	31
赤変を伴う異常アコヤガイの低塩分飼育試験について	深浦雄一・糸山力男・北野健・倉田清典・中野平二	35
海産系人工生産アユの下顎側線孔の欠損について	清田季義	39
熊本県主要河川における冷水病の発生状況について	松尾竜生・清田季義	43
菊池川河口域におけるアサリ浮遊幼生の分布状況について	陣内康成・鎌賀泰文・鳥羽瀬憲久	47
熊本県におけるマダイの放流効果について	中尾和浩・平山泉・陣内康成・山下博和・鳥羽瀬憲久	51
2000年7月に八代海で発生した <i>Cochrodinium Porykrikoides</i> 赤潮について	吉村直晃・安東秀徳・木村武志・小山長久	55
有明海で漁獲されたクルマエビからのPCRを用いたPRDV遺伝子の検出	木村武志・宮崎孝弘	65

平成14年3月

熊本県水産研究センター

熊本県におけるカワノリの分布について

吉田 好一郎

Geographical distribution of "Kawanori" (*Prasiola japonica* Yatabe) in Kumamoto prefecture

Koichiro Yoshida

キーワード：カワノリ、熊本、分布

淡水産緑藻のカワノリは、日本水産資源保護協会の希少水生生物の基礎資料¹⁾によると、山岳地帯でのダム・道路建設などにより、生息溪流への汚染物質、土砂の流入が増加し、カワノリの生育範囲が狭められるなどの理由で、その生育は減少し、希少種に分類されている。

日本のカワノリの分布について、岩本²⁾は従来のカワノリ関係の文献と情報の収集及び実地調査を行い、北は栃木県那珂川から南は鹿児島県鹿屋市までの68ヶ所をあげ、熊本県では、東³⁾が八代郡泉村の椗木川、久連子川で、遠藤⁴⁾、東⁵⁾、瀬川⁶⁾及び右田⁷⁾等が菊池市の菊池水源で生育を報告している。

なお、鹿児島県鹿屋市のカワノリについては、岩本は1976年の鹿児島県肝属郡教育事務所に問い合わせた結果、カワノリに関する情報が一切得られなかったとのことから、少なくとも1984年までの日本のカワノリの分布の南限は本県久連子川であるとしている。

今回、熊本県南部の緑川水系及び球磨川水系を実地調査し、9ヶ所の分布を確認したので報告する。

材料および方法

1996年3月1日～9月28日の期間、熊本県緑川水系の緑川、鴨猪川、内大臣川、五老ヶ滝川の4河川、球磨川水系の球磨川、横才川、川辺川、久連子川、入鴨谷の6河川を実地調査し、一部写真撮影を行った。

結果

熊本県上益城郡矢部町 宮崎県境の向坂山(標高1,638 m)に源を発する一級河川緑川の流域である上益城

郡矢部町で、4ヶ所のカワノリの生育を確認した(Fig.1)。

1996年9月18日に同町大字下名連石字山口、緑川支流五老ヶ滝川で、水の落ち込み部の岩面にカワノリの繁茂を認めた。五老ヶ滝川は南阿蘇外輪山の地

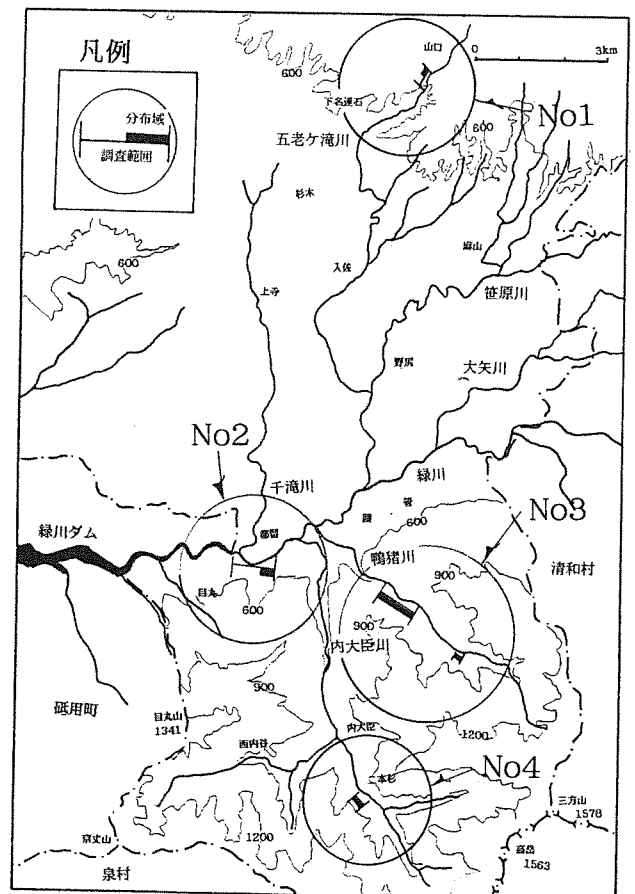
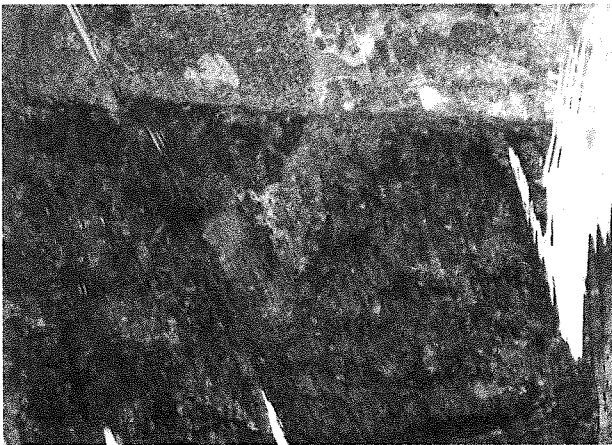


Fig.1 上益城郡矢部町におけるカワノリの分布

震が岩（標高約1,300m）に源を発する溪流で、カワノリの分布域は標高600~700mの地点である。同集落住民の話によれば、現在でもカワノリを採取し、板海苔状に乾燥し、自家用として食用に供している（No. 1）。

1996年9月26日に熊本県水産研究センター内水面研究所の堀田、岩村、栃原が同町大字津留の緑川本流津留堰の魚道壁でカワノリの着生を認めた。同地は緑川本流に位置し、標高200mの地点であるが、近くに後述の内大臣川、鴨猪川の吐合及び西内谷からの発電用取水の出水口があり、水温はかなり低く、溪流帯に属している（No. 2、phot.1）。



phot.1 矢部町大字津留のカワノリの繁茂状況

1996年9月14日に同町大字菅字圀の緑川支流鴨猪川の岩面にカワノリの繁茂を認めた。同河川は久保の息（標高1,476m）に源を発する溪流で、カワノリの分布域は標高600~800mの地点である（No. 3）。

1996年6月22日に同町大字目丸字二本松、内大臣川でカワノリの着生が見られた。同河川は国見岳（標高1,739m）に源を発する溪流で、カワノリの分布域は標高800mの地点である（No. 4）。

熊本県八代郡泉村 宮崎県境の国見岳（標高1,739m）に源を発する一級河川川辺川流域である八代郡泉村で、2ヶ所のカワノリの生育を確認した（Fig. 2）。

1996年8月25日に同村大字縦木字栗野、9月7日に同村大字縦木字四方田の川辺川本流でカワノリの着生を認めた。カワノリの分布域は標高800~900mの地点である。同地は、東³⁾が八代郡泉村五家の荘の五ツ木川と記録し、岩本²⁾が1977年に泉村教育委員会に問い合わせ、縦木川に大量でないが生息するとの回答を得ている河川にあたるが、今回生息を確認した場所は溪流釣りをを行うものが入渓するような急峻な溪相であり、東、岩本等の地点よりかなり上流になると考えられる（No. 5）。

1996年5月28日に同村大字久連子字久連子、川辺川支流久連子川でカワノリの繁茂を認めた。同河川は上福根山（標高1,645m）に源を発する溪流で、カワノリの分布域は標高700mの久連子ダムの上流域

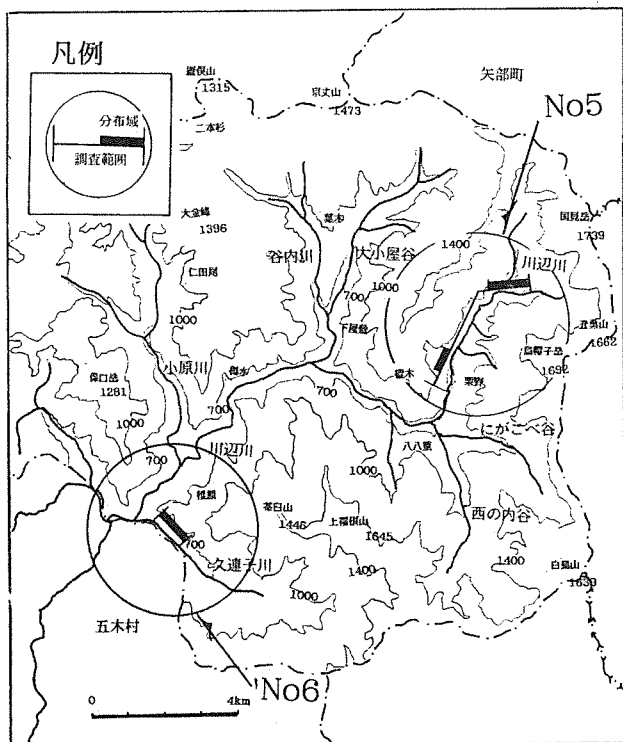


Fig. 2 八代郡泉村におけるカワノリの分布

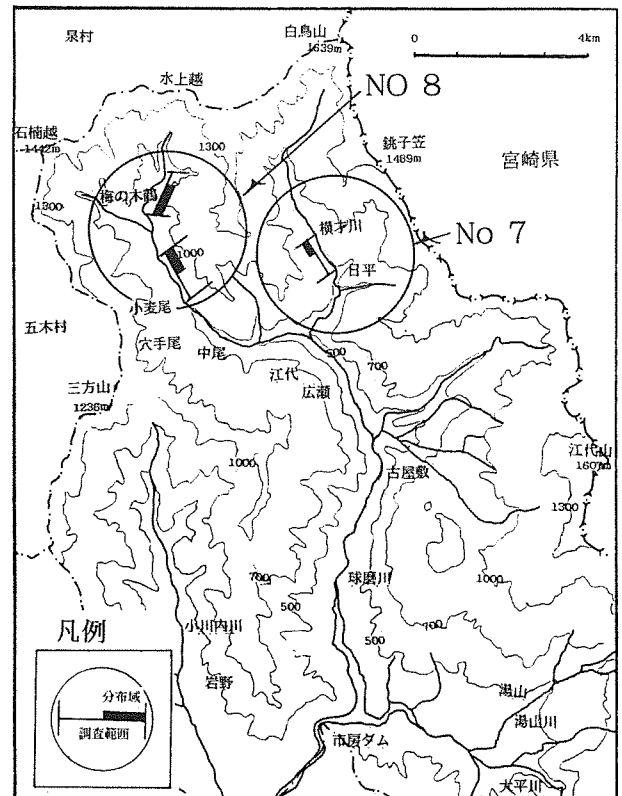


Fig. 3 球磨郡水上村におけるカワノリの分布

である (No.6)。

熊本県球磨郡水上村 泉村との村境の水上越 (標高1,500m) に源を発する一級河川球磨川流域である球磨郡水上村で、2ヶ所のカワノリの生息を確認した (Fig.3)。

1996年9月28日に同村日平の球磨川支流横才川で



Phot.2 水上村日平のカワノリの繁茂状況



Phot.3 水上村小麦尾のカワノリの繁茂状況

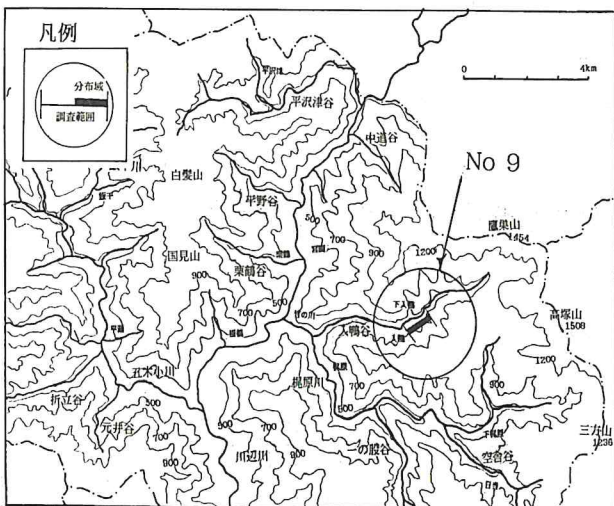
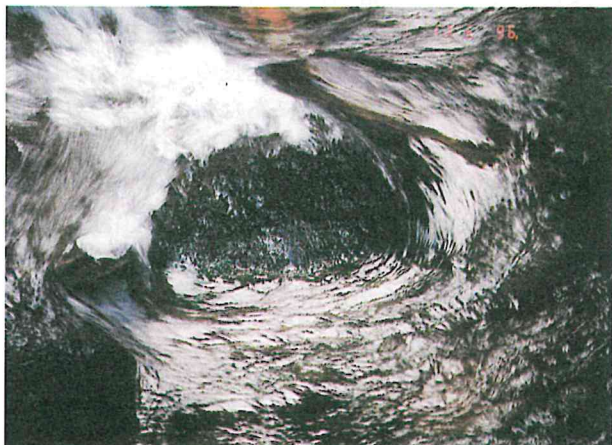


Fig.4 球磨郡五木村におけるカワノリの分布

カワノリの着生を確認した。同河川は宮崎県境の白鳥山 (標高1,639m) に源を発する溪流で、カワノリの分布は標高600mの地点である (Phot.2、No.7)。

1996年5月25日に同村梅の木鶴、同年6月1日、7月26日及び8月31日に同村小麦尾の球磨川本流の源流帯でカワノリの繁茂を確認した。カワノリの分布域は標高900~1,000mの地点である (Phot.3、No.8)。熊本県球磨郡五木村 宮崎県境の国見岳 (標高1,739m) に源を発する一級河川川辺川流域である球磨郡五木村で、1ヶ所のカワノリの生息を確認した (Fig.4)。

1996年9月21日に同村入鴨の入鴨谷でカワノリの着生を確認した。同河川は泉村との村境の鷹巣山 (標高1,454m) に源を発する溪流で、カワノリの分布は標高700mの地点である (Phot.4、No.9)。



Phot.4 五木村入鴨のカワノリの繁茂状況

考 察

熊本県におけるカワノリの分布は、今までに縦木川、久連子川及び菊池川の3河川が報告されているが、今回新たに、緑川水系の緑川本流、五老ヶ滝川、鴨猪川及び内大臣川の4河川、川辺川水系の川辺川本流、久連子川及び入鴨谷の3河川、球磨川水系の球磨川本流及び横才川2河川の合計9河川でカワノリの生育を確認した。

右田⁷⁾は、筑後川水系の馬場川 (南小国町)、白川水系の宮川 (一の宮町手野)、球磨川水系の万江川 (山江村) でカワノリの生育を確認しているが、その後の右田の教育委員会への聞き取りでは、万江川、縦木川 (川辺川本流の泉村縦木) では消失しているとのことであり、熊本県水産研究センターの板崎も万江川では1987年頃まではみられたが、1996年には消失していると言っている。

以上のことから、熊本県のカワノリの分布は、筆者が確認した9河川と右田が確認している3河川の合計12河川でみられることになる。

岩本は、カワノリの生息と地質、地形を調べた結果、①古生代、中生代の地層の露出地域（九州、四国、奈良県、群馬県、長野県）②中央構造線に沿った古い地層地域（九州、四国、奈良県）③火山周辺地域（阿蘇、始良カルデラ周辺、富士山周辺、日光地方の火山周辺）④フォッサマグナ地域（神奈川県、山梨県、静岡県）の4つの地域の1つ又は2つ以上に該当する地域にカワノリが分布する²⁾としている。

このことについて、熊本県高等学校地学教育研究会の本県地質³⁾と今回及び既知のカワノリの分布を比較すれば、南小国町の馬場川、一の宮町の宮川、菊池市の菊池川、矢部町の五老ヶ滝川及び緑川の5河川は阿蘇火砕流堆積物地層にあたり、岩本の分類の③火山周辺地域に該当している。

また、矢部町の鴨猪川、内大臣川、泉村の川辺川、久連子川、五木村の入鴨谷の5河川は、古生代の地層の露出地域と中央構造線の延長の一つである臼杵～八代構造線に沿った地域にあたり、岩本の分類の①古生代、中生代の地層の露出地域と②中央構造線に沿った古い地層地域の二つに該当している。

さらに、水上村の球磨川、横才川及び山江村の万江川の3河川は、中生代の地層の露出地帯にあたり、岩本の分類の①古生代、中生代の地層の露出地域に該当している (Fig.5)。

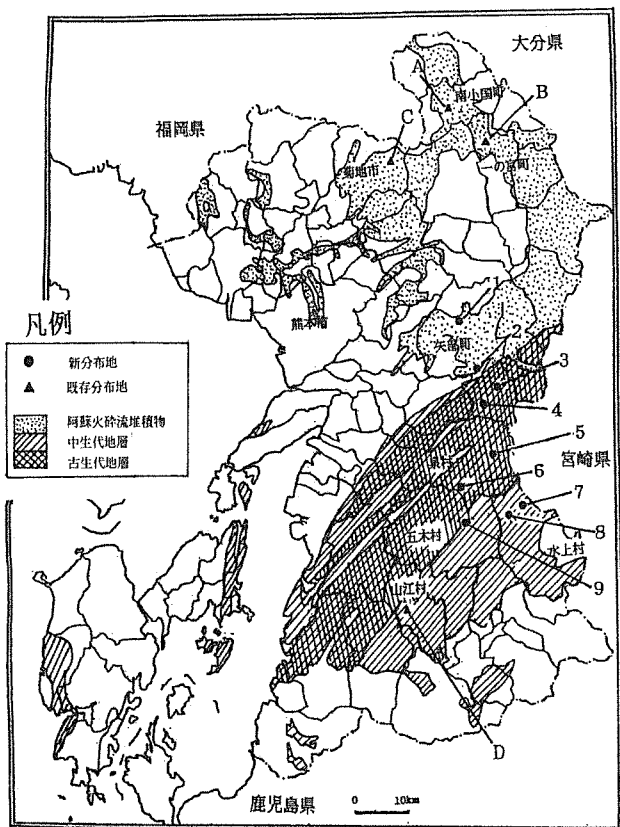


Fig.5 カワノリの分布と地質との関係

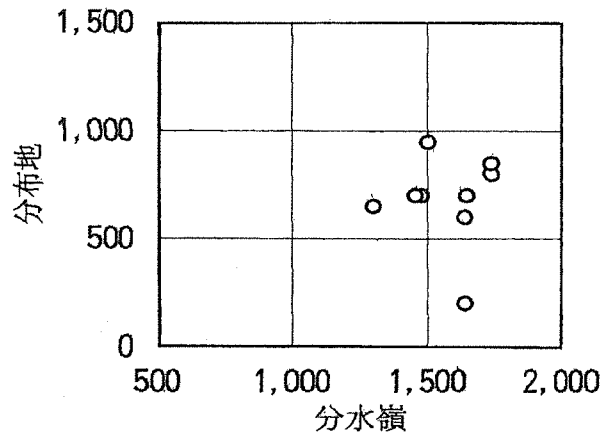


Fig.6 カワノリの分布と分水嶺の標高との関係

一方、今回カワノリの分布を確認した地点とその河川の分水嶺の標高の関係は、概ね分水嶺1,200m以上の河川の標高600m以上の場所で、熊本県におけるヤマメ生息域にあっている (Fig.6)。

このような観点から、今回確認した分布域以外に生育可能と思われる地域は、阿蘇火砕流堆積物地層である菊池川水系の内田川 (菊鹿町)、迫間川、鉾ノ甲川、木護川、杉生川 (菊池市)、筑後川水系の湯田川、中原川 (南小国町)、五ヶ瀬川水系の川走川 (高森町)、緑川水系の笹原川 (矢部町) 等が考えられる。

また、古生代、中生代の地層の露出及び中央構造線に沿った地帯として、川辺川水系の大小屋谷、小原川、西の内谷 (泉村)、平沢津谷、栗鶴谷、下梶原川、五木小川 (泉村)、椎葉谷川、藤田谷川 (相良村) 等が、中生代の地層の露出地帯として、球磨川水系の小川 (球磨村)、宇那川 (山江村)、小川内川、湯山川、大平川 (水上村) 等が考えられる。

しかし、本県ではほとんどがカワノリを食用として採取しておらず、急峻な溪流のごく限られた狭小の場所に生育しているため、その分布を知る人が少なく、その溪流毎に下流から上流へ踏破しなければならず、未調査の所が多い。本種は希少種であることを考慮し、早急にその分布を調査する必要があると考えられる。

要 約

- 1 希少種であるカワノリについて、熊本県内の緑川水系緑川、鴨猪川、内大臣川、五老ヶ滝川、球磨川水系の球磨川、横才川、川辺川水系の川辺川、久連子川、入鴨谷でその生育を確認した。
- 2 これらの生息地は、岩本²⁾の火山周辺地域、古生代・中生代の地層の露出地域及び中央構造線に沿った古い地層地域の一つまたは二つ以上の該当する地域に分布するとした説に一致していた。

3 分水嶺1,200m以上の河川の標高600m以上の地域に分布し、それらの地点は本県のヤマメ分布域とも一致している。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、県北部のカワノリの分布情報並びにとりまとめに際し多大のご指導を賜った右田清治長崎大学名誉教授に感謝の意を表す。また、カワノリの分布について貴重な情報を頂いた熊本県水産研究センター 板崎清、同内水面研究所の堀田英一、岩村征三郎、栃原正久の諸氏に対し感謝する。

文 献

1) (社)日本水産資源保護協会：日本の希少な野生水生生物に関する基礎資料Ⅱ、566-572 (1995)

2) 岩本康三：日本におけるカワノリの分布、藻類 32、167-185 (1984)

3) 東道太郎：カハノリに就いて、陸水学雑誌 5、60-63 (1935)

4) 遠藤吉三郎：かはのり、海産植物学 (博物館、東京、) 236-241 (1911)

5) 東道太郎：菊池川苔に就いて、水産研究誌17、13-15 (1922)

6) 瀬川宗吉：カワノリ動配偶子再検討事情、採集と飼育10、338-340 (1948)

7) 右田清治：菊池川におけるカワノリの環境に就いて、長崎大学水産学部研究報告 4、11-14 (1956)

8) 熊本県高等学校地学教育研究会：熊本県地質巡検ガイドブック、1-4 (1970)

ヒラメの性分化におけるアロマターゼ遺伝子の 発現に関する研究

北 野 健

Studies on P450 aromatase (P450arom) gene expression in sex differentiation
in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Takeshi Kitano

キーワード：ヒラメ、性分化、アロマターゼ遺伝子

Phenotypic sex of some teleost fishes including flounders can be experimentally altered by treatment of embryos or larvae with varied temperature or sex steroid hormones. To analyze the sex determination mechanism, especially the role of cytochrome P450 aromatase (P450arom), an enzyme that catalyzes the conversion of androgens to estrogens, in temperature-dependent gonadal sex differentiation in Japanese flounder, I have generated two populations of larvae, both having XX (genetic females), but each growing up to display all phenotypic females or males, by rearing the larvae at normal (18°C) or high (27°C) water temperatures respectively from days 30 to 100 after hatching. First, I have isolated a P450arom cDNA containing the complete open reading frame from the ovary. Semi-quantitative analyses by RT-PCR (reverse transcription- polymerase chain reaction) of P450arom mRNA levels in gonads during sex differentiation showed no difference between the female and male groups when the gonad was sexually indifferent (day 50 after hatching). However, after the initiation of sex differentiation (day 60), the mRNA levels increased rapidly in the female group, whereas they decreased slightly in the male group. These results suggest that induction of sex reversal of genetically female larvae to phenotypic males by rearing at high water temperature causes a suppression of P450arom gene expression and that P450arom activity is thermo-sensitive.

To elucidate the role of P450arom in gonadal sex differentiation, I treated the genetic females (XX) with fadrozole (aromatase inhibitor; AI) during the sex differentiation, resulting in that it induced sex-reversal into phenotypic males. The effect of AI was counteracted by co-administration of estradiol-17 β . These results indicate that estrogen plays a major role in ovarian differentiation, whereas the decrease of the estrogen content in the gonad is important for testicular differentiation. RT-PCR showed that P450arom mRNA was barely expressed in the gonads of the phenotypic males which were sex-reversed by treatment with AI, whereas it was highly expressed in the gonads of phenotypic females which were produced by treatment with AI + estradiol-17 β or controls. Moreover, treatment of genetically female larvae with 17 α -methyltestosterone induced sex-reversal as well as suppression of P450arom gene expression. These results indicate that sex-reversal of the genetically female larvae by AI or 17 α -methyltestosterone may be due to the suppression of P450arom gene expression and the resultant decrease in the amount of estrogen.

In application of the difference between the female and male in the level of P450arom gene expression, I have developed the sex distinction method in early stages of hatchery-reared Japanese flounder by detecting P450arom mRNA by RT-PCR. As balanced sex ratio appears to be a very important element for successful stock enhancement of the flounder, it has been required to check sex of the hatchery-reared juveniles at as early stage as possible. I demonstrated that detection of P450arom mRNA level by RT-PCR was an excellent method to check sexes of the flounder juveniles.

第1章 緒 言

1-1 緒 言

脊椎動物の性決定は、基本的に遺伝的支配に基づいている。しかしながら、爬虫類、両生類、魚類では、しばしば生育環境が性決定を左右することが知られている (Adkins Regan, 1987)。魚類においては、水温やPHが性分化に影響を与える例がいくつか報告されている (Conover and Kynard, 1981 ; Rubin, 1985 ; Sullivan and Schultz, 1986)。例えば、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) の性は、雄性ヘテロ型 (XX-XY型) である (Tabata, 1991 ; 山本ら, 1992)。しかしながら、性分化時期において、通常水温 (17.5-22.5℃) よりも高水温または低水温で飼育すると、遺伝的雌は生理的雄へと性転換し、雄の割合が劇的に増加する (山本, 1995 ; Yamamoto, 1999)。このことは、生物の種類によっては、性分化に対する遺伝的支配が弱く、環境条件によって遺伝的性とは逆の性に転換可能であることを示している。さらに魚類では、性ホルモンを投与することにより、人為的に性をコントロールすることが可能である (Hunter and Donaldson, 1983 ; Yamazaki, 1983)。Yamamoto (1953) は、メダカを用いた実験で、性ホルモンにより容易に性転換を誘導できることを初めて明らかにし、魚類の性分化における性ホルモンの重要性を示した。ヒラメにおいても、性分化時期に17 α -メチルテストステロンやエストラジオール-17 β を投与することにより、容易に性転換を誘導できる (田中, 1988 ; Tabata, 1991)。このように、ヒラメは環境条件の制御や性ホルモンの投与などにより人為的に性転換させることが可能であるため、魚類の性分化機構を明らかにする上で、優れた実験動物になりうると考えられる。

ヒラメは、日本周辺海域から東シナ海にかけて分布する浅海性のカレイ目魚類である。養殖も全国各地で盛んに行われており、水産業上、大変重要な増養殖対象魚種である。ヒラメは、雌が雄よりも成長が速いという特徴があるため (中本・小野山, 1985)、全雌生産が養殖には効率的であることから、染色体操作技術を用いた遺伝的全雌種苗の生産技術が開発されている (田畑, 1991)。近年、染色体操作技術を応用して、クローン集団の生産にも成功している (山本, 1995)。このように、染色体操作を用いた性統御技術はほぼ確立されたが、ヒラメの性分化は環境要因に左右されるなど不安定な要素があるため、安定した全雌生産を行うことは容易でないのが現状である。そこで、性統御を効率よく行うためにも、ヒラメの性分化機構をより詳細に調べることは重要である。

近年の分子生物学の著しい進歩により、哺乳類における性決定および性分化機構に関する研究が分子レベルで急速に進展している。哺乳類では、Y染色体上に存在する精巢決定遺伝子としてSRY (Sex-determining region Y chromosome : Gubbay *et al.*, 1990 ; Sinclair *et al.*, 1990) が同定されたのを初め、SF-1 (steroidogenic factor-1: Luo *et al.*, 1994)、DAX- (DSS-AHC critical region on the X chromosome-1: Muscatelli, 1994 ; Zenaria *et al.*, 1994) などの転写因子が生殖腺の分化に深く関与していることが明らかにされている。一方、魚類においては、SRYに相当するような性決定に関与する遺伝子は未だ見つかっておらず、また、性分化機構についても、分子生物学的なアプローチがほとんどなされていない。そこで本研究では、魚類の性分化機構を明らかにするため、魚類の性分化と深く関わっていると考えられる性ホルモンの合成に関与する酵素の中で、特にアンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であるアロマターゼの分子レベルでの役割を明らかにすることを目的に研究を行った。また、実験動物として、人為的に性転換させることが可能で、水産業上価値の高いヒラメを用いた。

1-2 References

- Adkins-Regan, E. (1987) : In *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*, pp. 1-29. (Norris, D.O., and Jones, R.E., eds.) Plenum Press, New York.
- Conover, D.O. And Kynard, B.E. (1981) : Environmental sex determination : interaction of temperature and genotype in a fish. *Science*, 213, 577-579.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. And Lovell-Badge, R. (1990) : Agene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346, 245-250.
- Hunter, G.A. And Donaldson, E.M. (1983) : Hormonal sex control and its application to fish culture. In *Fish Physiology*, Vol. 9B, pp.223-303. (Hoar, W.S., Randall, D.J., and Donaldson, E.M., eds.) Academic Press, New York.
- Luo, X., Lkeda, Y. And Parker, K.L. (1994) : A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77, 481-490.
- Muscatelli, F., Strom, T.M., Walker, A.P., Zanaria, E., Recan, D., Meindl, A., Bardoni, B., Guioli, S., Zehetner, G., Rabl W., Schwarz, H.P., Kaplan, J.-C., Camerino,

- G., Meitinger, T. and Monaco, A.P. (1994) : Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature*, 372, 672-676.
- 中本幸一, 小野山弘 (1985) : 飼育ヒラメにおける雌雄の成長差について. 兵庫水試研報, 23, 57-61
- Rubin, D.A. (1985) : Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). *Copeia*, 1985, 233-235.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.-M., Lovell-Badge, R. And Goodhellow, P.N. (1990) : A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346, 240-244.
- Sullivan, J.A. And Schultz, R.J. (1986) : Genetic and environmental basis of variable sex ratios in laboratory strains of *Poeciliopsis lucida*. *Evolution*, 40, 152-158.
- 田畑和男 (1991) : ヒラメの染色体操作に関する研究. 兵庫水試研報, 28, 1-134.
- Tabata, K. (1991) : Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 57, 845-850.
- 田中秀樹 (1988) : ヒラメの生殖腺の性分化に及ぼすエストラジオール-17 β の影響. 養殖研報, 13, 17-23.
- 山本栄一, 平野ルミ, 増谷龍一郎 (1992) : ヒラメのメチルテストステロン投与で全雄に誘導した雌性発生2倍体および通常の2倍体の検定交配と性を決定する遺伝子型についての考察. 鳥取水試報告, 33, 9-17.
- 山本栄一 (1995) : ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究. 鳥取水試報告, 34, 1-145.
- Yamamoto, E. (1999) : Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture*, 173, 235-246.
- Yamamoto, T. (1953) : Artificially induced sex-reversal in genotypic males of medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, 123, 571-594.
- Yamazaki, F. (1983) : Sex control and manipulation of fish. *Aquaculture*, 33, 329-354.
- Zenaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., McCabe, E.R., Meitinger, T., Monaco, A. P., Sassone Corsi, P. And Camerino, G.(1994): An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature*, 372, 635-641.

第2章 ヒラメの性分化に対する水温の影響

2-1 序 論

山本 (1995) は、20℃前後の飼育水温では遺伝的雌ヒラメの雄への性転換頻度は低いが、高水温条件下 (25または27.5℃) では高い頻度で起こり、低水温条件下 (15℃) でもその傾向が強かったと報告している。また彼は、このような飼育水温の調節により誘導した雌、雄集団を用いてヒラメの性分化過程を調べた結果、卵巣への分化は全長30mm前後の稚魚で卵巣腔の形成により確認でき、精巣への分化は全長37mmの稚魚で生殖細胞の分布様式と特異な体細胞の発達状況を指標として確認できること、及び、生殖細胞の減数分裂開始による生殖母細胞への分化は、卵巣では全長69mmの稚魚で兆候がみられ、精巣では全長129mmの稚魚で確認されるなど、性分化よりかなり遅い時期であることを報告している。

そこで、本章では、山本 (1995) により得られたヒラメの基礎的知見を確認することを目的に、ヒラメにおいて飼育水温が与える性分化への影響と性分化過程を調べた。

2-2 材料および方法

2-2-1 材料および試験方法

供試魚は、熊本県水産研究センターにおいて、平成9年1月に通常雌と通常雄との自然交配により作出した通常群と、通常雌と雌性発生雄 (性転換雄) との自然交配により作出した遺伝的全雌群である。雌性発生雄の作出は、まず1,000erg/mm²の紫外線を照射したヒラメ精子を卵に媒精し、媒精4分後に受精卵を1℃の低温海水に浸漬して第2極体の放出を阻止し、雌性発生2倍体を誘起した (田畑ら, 1986)。次に、この雌性発生2倍体に17 α -メチルテストステロン (10 μ g/g飼料) を混合した人工飼料 (ラブラーバ, マルハ社製) を日齢30-100に投与して、生理的雄に誘導した (Tabata, 1991)。

試験区として、通常群と遺伝的全雌群の2群を用い、日齢30-100、飼育水温を15℃、18℃、25℃、27℃に保った区を設けた。全試験区において、日齢0-30は水温18℃で飼育し、日齢100以降は自然水温 (12-28℃) で飼育した。性比調査は、試験魚を約10カ月間飼育し、生殖腺の外部形態、組織像および精子の搾出状況を調べるにより行った (山本, 1995)。

2-2-2 組織学的観察

遺伝的全雌群を用いて、日齢30-100、飼育水温を18℃または27℃に保った区を用いて、それぞれ日齢50、60、80、100の個体をブアン氏液で固定した。固

定後、常法によりパラフィンに包埋し、5 μ mでパラフィン切片を作製してヘマトキシリン-エオシンの二重染色を施し、光学顕微鏡で観察を行った。また、成長については、日齢10-100、10日毎にそれぞれ10-20個体の全長を測定した。

2-3 結 果

2-3-1 水温が与える性分化への影響

通常群と遺伝的全雌群を用いて、飼育水温による性比を調べた結果、18 $^{\circ}$ Cでは両者とも雌の割合が最も高く、高水温(25 $^{\circ}$ Cまたは27 $^{\circ}$ C)では雄の割合が最も高かった(Fig.1)。特に、遺伝的全雌群については、18 $^{\circ}$ Cでは全雌になる一方、27 $^{\circ}$ Cでは全雄となり、完全な性転換が確認された。

2-3-2 性分化過程

遺伝的全雌群を用いて、日齢30-100、飼育水温を18 $^{\circ}$ Cまたは27 $^{\circ}$ Cに保ち、それぞれ雌、雄への分化過程を調べた。その結果、日齢40、50での雌雄の生殖腺は、細長く、生殖細胞がまばらに存在しており、雌雄の違いは認められなかった(Fig.2-A, B, C, D)。しかし、日齢60(全長31mm)の雌では、卵巣に向けて特徴的な形態を示し、生殖腺の背縁と腹縁の体細胞

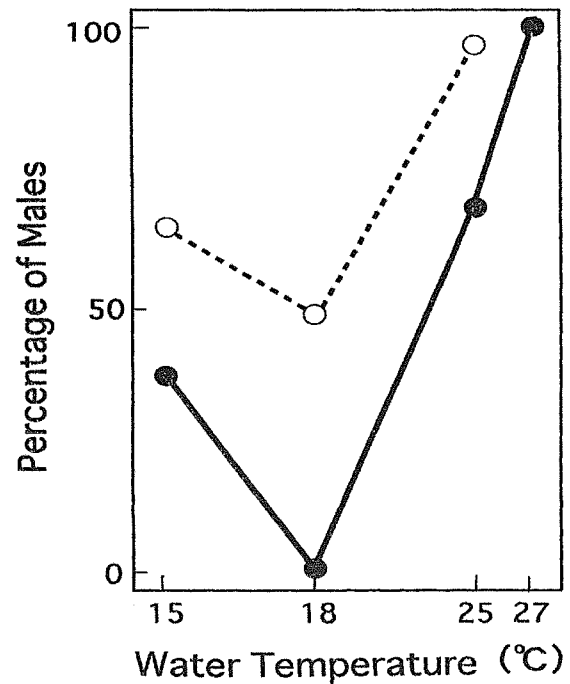


Fig.1 Percentage of males on the flounders reared at various water temperatures from 30 to 100 days after hatching. Solid circles represent the genetic female group (XX). Open circles represent the normal group (XX+XY).

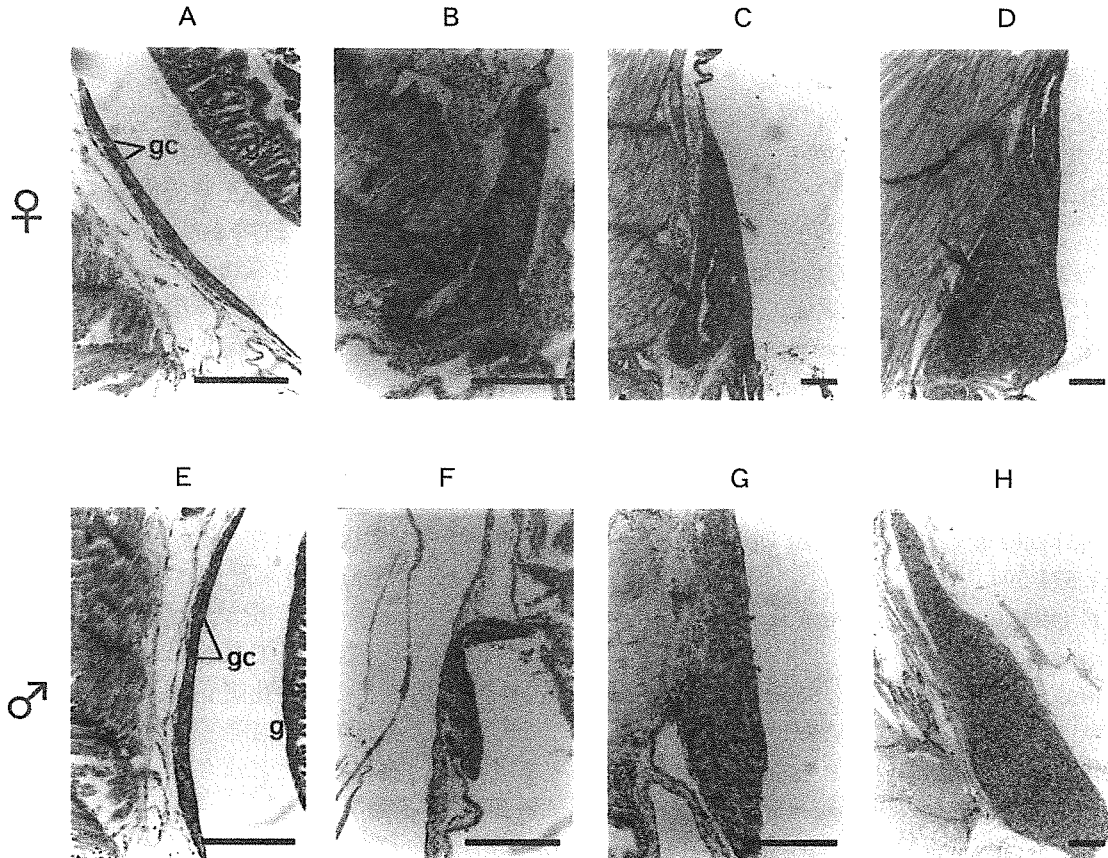


Fig. 2 Cross sections of female and male gonads on the genetic female flounders at 50-100 days after hatching. A, B, C, D : female gonads; E, F, G, H : male gonads. A,E: 50days; B, F: 60days; C,G: 80 days; D, H: 100 days. Gc: germ cells; g: gut; arrow: ovarian cavity. Scale bars=100 μ M

性要素が伸長して融合し、将来卵巣腔になると考えられる内腔が形成された。また、生殖腺内の体細胞、生殖細胞の数が増加した (Fig.2-E)。一方、日齢60 (全長37mm) の雄では、生殖腺の形態が棒状に変化して卵巣とは違う変化をみせた。また、体細胞が増加したにもかかわらず、生殖細胞の数および形状に変化はなかった (Fig.2-F)。日齢80 (全長50mm) の雌では、卵巣腔の周囲に、卵巣薄板に発達すると考えられるひだ状構造が形成された。その周辺には卵原細胞が多数分布し、一部で減数分裂初期の卵母細胞の包囊が観察された (Fig.2-G)。一方、日齢80の雄では、生殖腺が体細胞に富み、依然として生殖細胞の数および形状に変化はなかった (Fig.2-H)。日齢100の雌では、生殖腺が尾部筋肉中に伸長し、生殖腺内では卵母細胞の包囊が多数観察される一方、日齢100の雄では、生殖腺が細長い形態を示し、腹腔後部に接して存在した (Fig.2-I,J)。

成長については、日齢60以降、27℃区は18℃区に比べて平均全長が大きくなり、有意差が認められた (t-test, $p < 0.05$) (Fig.3)。

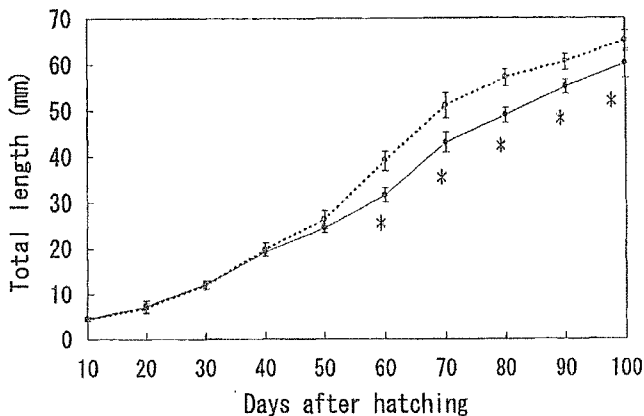


Fig. 3 Growth curve of Japanese flounder in the female group (●) reared at normal water temperature (18°C) and the male group (○) reared at higher water temperature (27°C) from 10 to 100 days after hatching. Values indicate means \pm standard deviations (N = 10-20). Asterisk indicates significant difference from value of male group (Student's t-test, $P < 0.05$).

2-4 論 議

2-4-1 水温が与える性分化への影響

山本 (1995) は、遺伝的全雌群を用いて、日齢40 - 90、飼育水温を17.5 - 22.5℃に保った区では、雌の割合が88.5 - 97.2%と高いが、27.5℃の区では、0%または51.1%と低かったと報告している。本研究においても、飼育水温が20℃では全雌になる一方、27℃では全雄となり、先の報告を裏付ける結果となった。今回温度調節により完全に全雌、全雄を誘導できた

ことは、温度による性転換機構を明らかにするうえで、大変意義深いと考えられる。また将来、この実験モデルを使うことにより、温度依存性決定機構だけではなく、脊椎動物全体の性決定機構の解明につながることを期待される。

2-4-2 性分化過程

卵巣の分化開始は、卵母細胞の出現に先立ち、卵巣腔の形成により確認され、精巣の分化開始は、特徴的な体細胞の発達状況が指標となることが報告されている (田中, 1987; 山本, 1995)。本研究においても、雌雄とも同様な性分化過程が観察された。また、組織像の観察により、遺伝的全雌群を用いて誘導した生理的雌 (18℃飼育) と雄 (27℃飼育) は、それぞれ全長31mm、37mmの日齢60において、すでに形態的に生殖腺の雌雄差が認められることが明らかになった。

2-5 References

- Adkins-Regan, E. (1987) : In *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*, pp. 1-29. (Norris, D.O., and Jones, R.E., eds.) Plenum Press, New York.
- Conover, D.O. and Kynard, B.E. (1981): Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science*, 213, 577-579.
- Hunter, G.A., and Donaldson, E.M. (1983) : Hormonal sex control and its application to fish culture. In *Fish Physiology*, Vol. 9B, pp. 223-303. (Hoar, W.S., Randall, D.J., and Donaldson, E.M., eds.) Academic Press, New York.
- Rubin, D.A. (1985) : Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). *Copeia*, 1985, 233-235.
- Sullivan, J.A. and Schultz, R.J. (1986) : Genetic and environmental basis of variable sex ratios in laboratory strains of *Poeciliopsis lucida*. *Evolution*, 40, 152-158.
- 田畑和男, 五利江重昭, 中村一彦 (1986) : 紫外線によるヒラメの雌性発生 2 倍体の誘起条件. *日水誌*, 52, 1901-1904.
- Tabata, K. (1991) : Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 57, 845-850.
- 田中秀樹 (1987) : ヒラメの生殖腺の性分化過程. *養殖研報*, 11, 7-19.
- 田中秀樹 (1988) : ヒラメの生殖腺の性分化に及ぼすエストラジオール-17bの影響. *養殖研報*, 13, 17-23.
- Wallace, R.A. (1985) : Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In *Developmental Biology*, pp127-177. (Browder, L.W., Ed) Plenum Press, New York.

- 山本栄一 (1995) : ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究 鳥取水試研報, 34, 1-145.
- Yamamoto, E. (1999) : Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture*, 173, 235-246.
- Yamazaki, F. (1983) : Sex control and manipulation of fish. *Aquaculture*, 33, 329-354.

第3章 ヒラメのアロマターゼcDNAの単離と発現

3-1 序 論

シトクロムP450アロマターゼは、アンドロゲンを変換する芳香化酵素である。脊椎動物においては、この酵素は、さまざまな組織で発現し、エストロゲンの合成を制御することにより、重要な生理機能を担っている (Matsumine *et al.*, 1986 ; Pasmanik and Callard, 1985 ; Sasano *et al.*, 1997)。さらに、アロマターゼの働きにより生成されるエストラジオール-17bは、卵巣の発達に不可欠である (Wallace, 1985)。最近、性分化におけるアロマターゼの発現に関する研究がいくつか報告されている。鳥類では、性分化時期において、生殖腺でのアロマターゼ mRNA が遺伝的雄では検出されず、遺伝的雌では検出される (Yoshida *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 1997)。温度依存性決定機構を持つ爬虫類や両生類では、生殖腺でのアロマターゼ活性が、精巣分化時よりも卵巣分化時の方が有意に高い (Desvages and Pieau, 1992 ; Desvages *et al.*, 1993 ; Chardard *et al.*, 1995)。硬骨魚類であるテラピア (*Oreochromis niloticus*) では、免疫組織化学的に観察され、アロマターゼが卵巣へ分化している生殖腺では観察されるが、精巣へ分化している生殖腺では観察されない (Chang *et al.*, 1997a)。

このように、アロマターゼは性分化において重要な役割を果たしていると考えられたため、本章では、卵巣からアロマターゼ cDNA の単離を試み、性分化時期における生殖腺でのアロマターゼ遺伝子の発現パターンを、18℃飼育により作出した全雌集団と27℃飼育により性転換した全雄集団とで比較した。

3-2 材料および方法

3-2-1 ヒラメのアロマターゼ cDNA の単離

ヒラメの卵巣 cDNA ライブラリーの作製は、まず、2年魚の卵黄形成期の卵巣 1g からグアニジンチオシアネート法 (Chirgwin *et al.*, 1979) により全RNAを抽出し、オリゴdTセルロースカラム (Pharmacia社製) に

よりmRNAを精製した。次に、このmRNA 5 μ g からZAP cDNA synthesis kit (Stratagene社製) を用いてcDNAを合成した。このcDNA 0.1 μ g をクローニングファージベクター λ ZAP II (Stratagene社製) と連結し、Gigapack III Packaging Extract (Stratagene社製) にパッケージすることにより作製した。ヒラメのアロマターゼ cDNA の単離は、テラピア卵巣から単離されたアロマターゼ cDNA (Chang *et al.*, 1997) を、DIG DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim社製) を用いてジゴキシゲニン (DIG) で標識し、これをプローブに用いて、ヒラメのcDNAライブラリーからDIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim社製) によりスクリーニングを行った。単離された cDNA の塩基配列の決定は、Dideoxy法 (Sanger *et al.*, 1977) を利用したALFexpress DNA シークエンサー (Pharmacia社) により決定した。また、アロマターゼcDNA の5'上流域は、5'-RACE (rapid amplification of 5'-cDNA ends) (Frohman *et al.*, 1988) により5'RACE System (Gibco BRL社製) を用いて単離された。まず、ヒラメの卵巣から抽出されたmRNA 0.5 μ g から、ヒラメのアロマターゼ cDNA に特異的な塩基配列 (fAS) -1 (5'-ATGATGCCTCTCTCATAACAT-3') をプライマーとしてSuperscript II RT (Gibco BRL社製) を用いて cDNA を合成した。次に、このcDNA を鋳型とし、AmpliQ Gold (Perkin Elmer社製) を用いてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行った。プライマーは、first PCR にfAS-2 (5'- GCTCAGTCCCTGCTTGCTCC-3') とアンカープライマー (5'- GGCCACGCGTCTGACT AGTACGGGIIIGGGIIGGGIIG-3') (Gibco BRL社製) を、nested PCR にfAS-3 (5' TGGCTGATGCTCTGCTGAGG 3') とユニバーサルプライマー (5'- GGCCACGCGTCTGACTAGTAC - 3') (Gibco BRL社製) を用いた。PCR 条件は、両者とも95℃10分間の熱処理後、94℃30秒、59℃30秒、72℃1分で30回とした。5'-RACE により得られたcDNA断片は、Original TA Cloning Kit (Invitrogen社製) を用いて単離され、前途の方法で塩基配列が決定された。

3-2-2 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) によるアロマターゼmRNAの定量

日齢50、60、80、100の稚魚の生殖腺、または成魚のさまざまな組織からISOGEN (日本ジーン社製) を用いて全RNAを抽出した。この全 RNA 1 μ g からRNA PCR Kit (Perkin Elmer社製) を用いてcDNAを合成した後、AmpliQ Gold (Perkin Elmer社製) を用いてPCRを行った。PCR条件は、95℃10分間の熱処理後、94℃30秒、59℃30秒、72℃1分で25回とした。プライマーは、fAS-3とfAS-4 (5'-ATCGGATCCCTG CCTGTGAC-3') とし、内部標準として同時にペプチド鎖伸長因子-1a (EF-1a) を増幅するため、ヒラメの

EF-1a の cDNA に特異的な塩基配列 (5'-AGTTCGAG AAAGAAGCTGCC-3' と 5'-ATCCAGAGCATCCAGC AGTG-3') も用いた。PCR 産物は、2% アガロースゲルで電気泳動してナイロンメンブレン (Amersham 社製) に転写し、ヒラメのアロマターゼ cDNA または EF-1 acDNA をプローブとして DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim 社製) によりサザンブロット解析を行った。アロマターゼ mRNA 量は、メンブレン上のシグナル量をイメージアナライザーソフトウェア (PDI 社製) により測定し、EF-1amRNA のシグナル量の相対値として表した。

3-2-3 EIA (Enzyme Immunoassay) によるステロイドホルモン量の測定

日齢 20、40、60、80、100 の稚魚を、Phosphate Buffered Saline (PBS: 137mM NaCl, 2.68mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄; pH7.4) 中でホモジナイズ

した。そのホモジナイズ液はジエチルエーテルで 3 回抽出した後、真空乾燥し、Enzyme Immunoassay Kit (Cayman Chemical 社製) を用いてエストラジオール-17b 量およびテストステロン量が測定した。

3-3 結 果

3-3-1 ヒラメのアロマターゼ cDNA の単離

ヒラメの卵巣 cDNA ライブラリーを用いて 100 万個のクローンからスクリーニングを行ったところ、2 個のポジティブクローンが得られた。長い方のクローンの長さは 1672bp で、444bp の非翻訳領域を含んでいた。他の種類のアロマターゼ cDNA の全翻訳領域の長さは 1500bp であるため、このクローンは全翻訳領域を含んでいないと考えられた。そこで、5'-RACE によりそのクローンの 5'-末端側の cDNA 断片を単離した。ライブラリークローンと 5'-RACE クロ

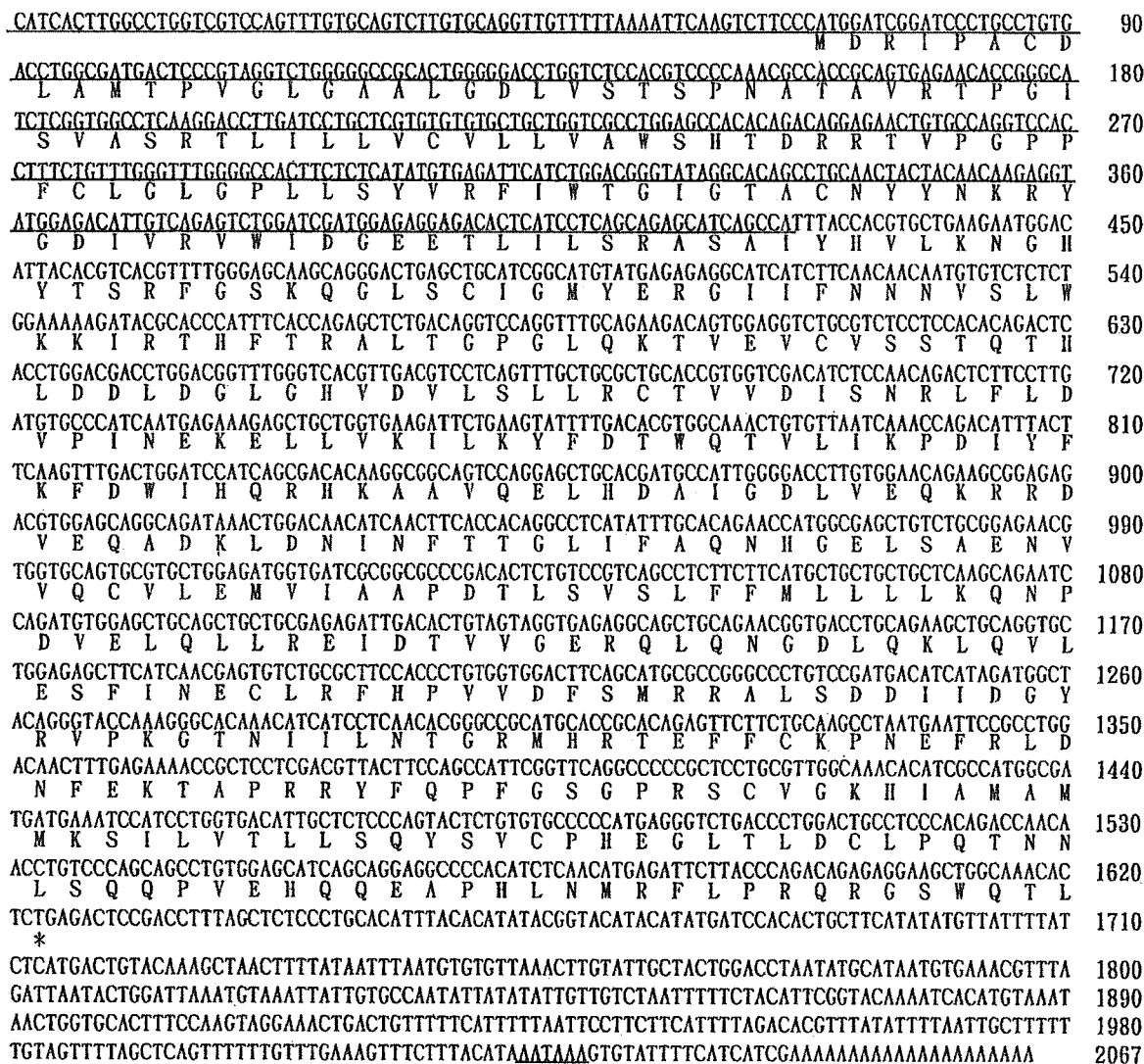


Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Japanese flounder ovarian P450arom cDNA. The portion of the cDNA fragment (426bp) determined by 5'-RACE is underlined. The polyadenylation signal is double underlined.

ーンとの重なった領域 (31bp) が全く一致していたことから、5'- RACEクローンはヒラメのアロマトアーゼの5'- 末端側であると考えられた。この2つのクローンを結合した長さは、全翻訳領域1554bp (推定アミノ酸 : 518残基) を含む2067bpであった (Fig.4)。しかしながら、最初の開始コドン (ATG) の30bp下流に、他の

開始コドンが存在した。両方の開始コドンは、Kozak (1986) によって提案された配列と同様な配列を有していたことから、ヒラメのアロマトアーゼにおける本当の開始コドンは不確かである。非翻訳領域の長さは444bpで、ポリ(A)を持ち、Polyadenylation signal (AATAAA) はポリ(A)の最初のAから18bp上流であ

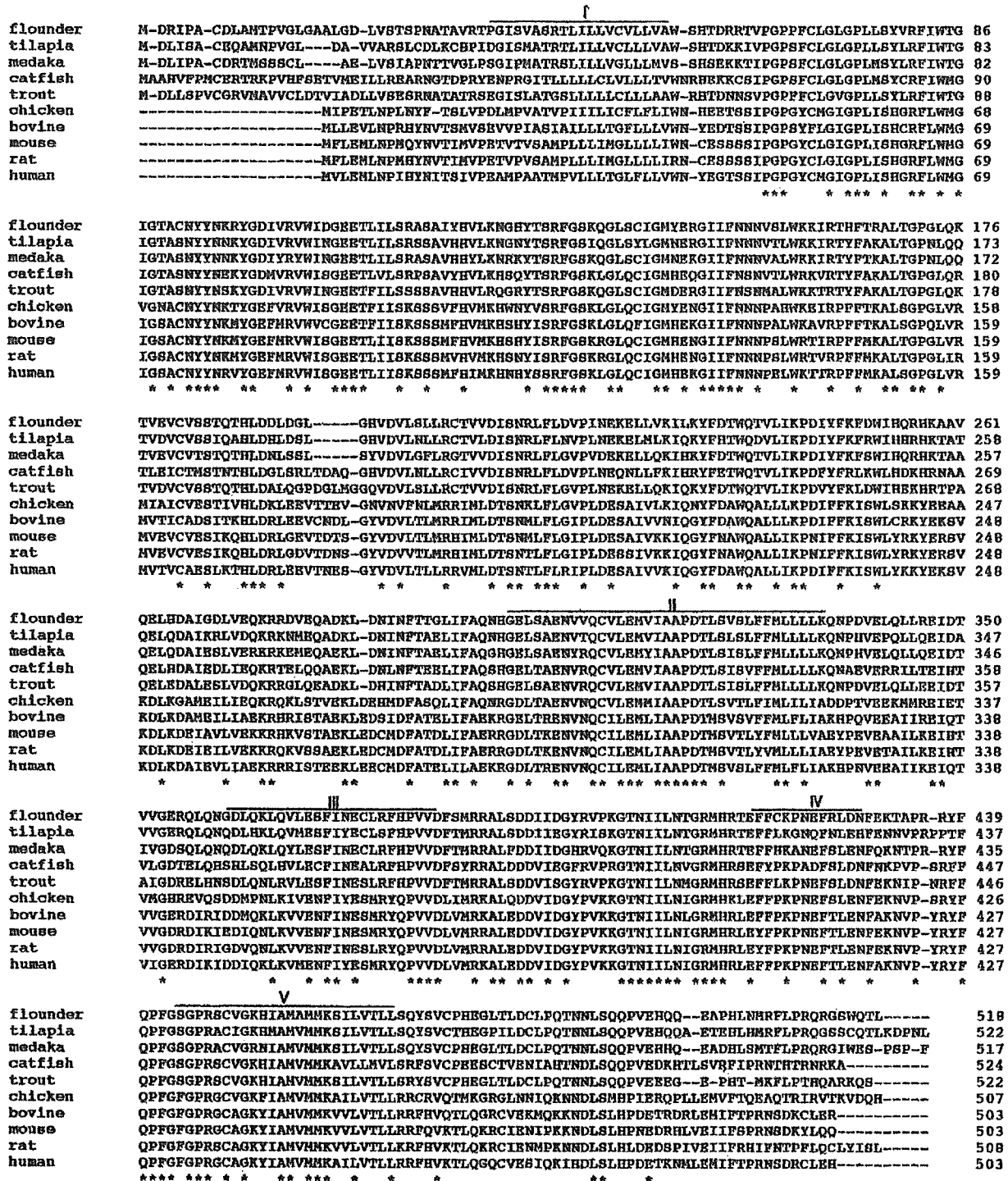


Fig. 5 Alignment of the amino acid sequence of Japanese flounder P450arom with tilapia, medaka, catfish, rainbow trout, chicken, mouse, rat and human. Asterisks indicate identical amino acid residues. Roman numerals indicate the membrane-spanning region (I), helix region (II), Ozols peptide region (III), aromatic region (IV) and heme-binding region (V).

った。

ヒラメのアロマトラーゼの推定アミノ酸配列が他の種類と比較された (Fig.5)。ヒラメと人間 (Corbin *et al.*, 1988 ; Harada, 1988)、ラット (Hickey *et al.*, 1990 ; Lephart *et al.*, 1990)、マウス (Terashima *et al.*, 1991)、牛 (Hinshelwood *et al.*, 1993)、ニワトリ (McPhaul *et al.*, 1988) との

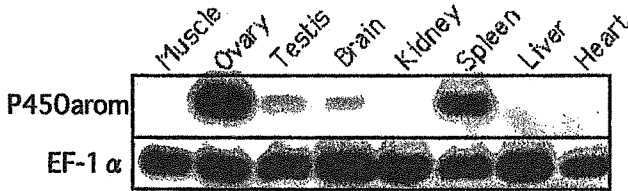


Fig. 6 Tissue-specific expression of P450arom transcript in adult Japanese flounder. EF-1 α serves as an internal control for loading difference. RT-PCR amplified fragments specific for P450arom and EF-1 α are predicted to be 344bp and 577bp, respectively. PCR products were fractionated on 2% agarose gel and confirmed by Southern blotting with the labeled P450arom or EF-1 α cDNA.

全体的な相同性は、それぞれ50.3、51.2、51.9、50.9、50.4%であった。また、ヒラメとニジマス (Tanaka *et al.*, 1992)、ナマズ (Trant, 1994)、メダカ (Tanaka *et al.*, 1995)、テラピア (Chang *et al.*, 1997b) との相同性はそれぞれ 74.9、61.5、76.7、76.2%であり、硬骨魚類においては高い値を示した。Membrane-spanning (37-56残基)、 α -Helix (302-336残基)、Ozols peptide (361-383残基)、Aromatic (419-430残基)、Heme-binding (444-467残基) 領域は、他の種類の同様な領域と比較することにより確認できた。

3-3-2 各組織でのアロマトラーゼ遺伝子の発現

各組織におけるアロマトラーゼ遺伝子の発現量をRT-PCRにより調べた。その結果、卵巣で最も強く発現し、次に脾臓で発現し、精巣と脳では弱い発現が観察された (Fig.6)。一方、肝臓、腎臓、心臓、筋肉では雌雄とも発現が検出できなかった。

3-3-3 性分化時期でのアロマトラーゼ遺伝子の発現

性分化時期における雌雄の生殖腺でのアロマトラーゼ遺伝子の発現量をRT-PCRにより調べた。その結

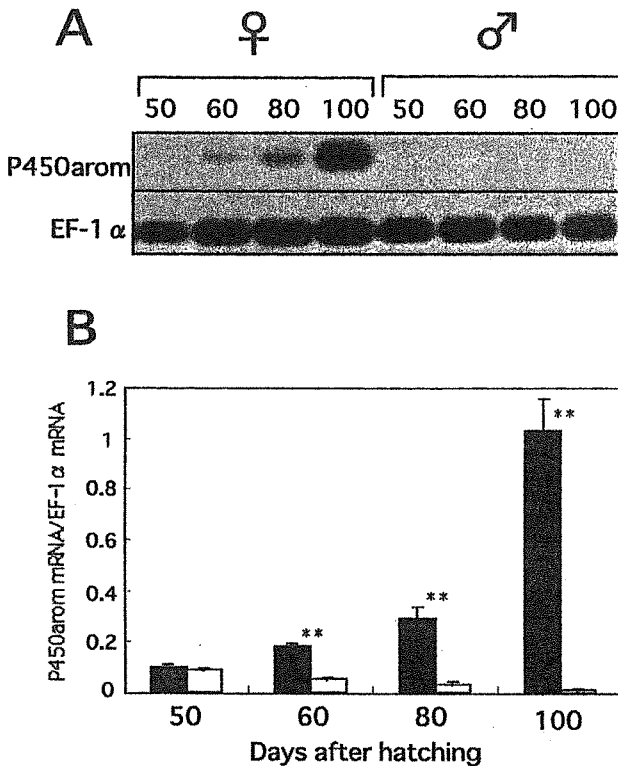


Fig. 7 Differential expression of P450arom transcripts in female and male gonads during sex differentiation. (A) P450arom transcript levels in total RNA isolated from ten pooled gonads from either the female or male group were examined by RT-PCR at 50, 60, 80 or 100 days after hatching. RT-PCR is as in Fig. 6. (B) Relative amounts of P450arom mRNA in female (■) and male (□) gonads were normalized to EF-1 α . Vertical bars indicate the mean \pm standard error of the five replicates. Double asterisks indicate significant difference from value of male group (Student's t-test, $P < 0.01$).

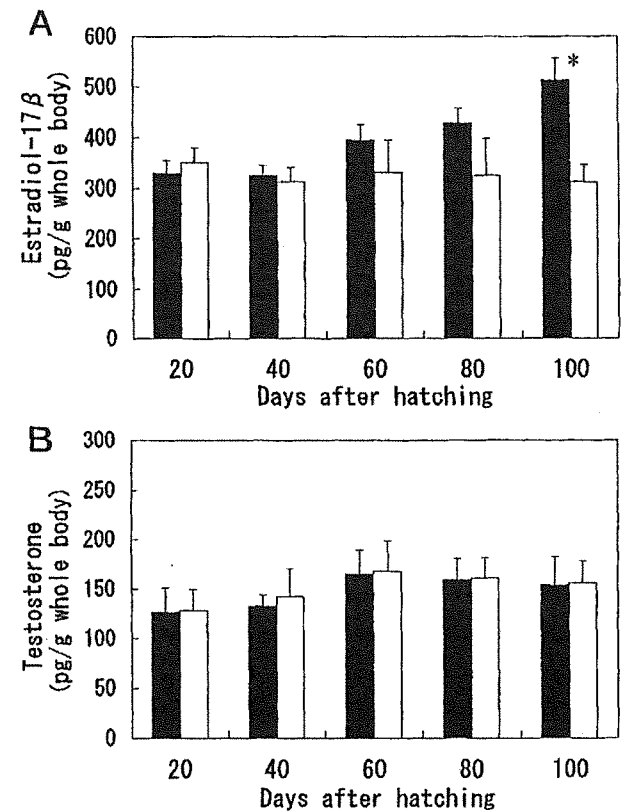


Fig. 8 Whole body concentrations of estradiol-17 β (A) and testosterone (B) in the female (■) and male (□) groups during development. Sex steroid hormones extracted from five to twenty pooled larvae juveniles on 20,40,60,80 or 100 days after hatching were measured by enzyme immunoassay. Vertical bars indicate the means \pm standard error of the five replicates. Asterisk indicates significant difference from value of male group (Student's t-test, $P < 0.05$).

果、日齢50では雌雄で差が認められなかったが、日齢60以降、雌では急激に増加し、雄では減少した (Fig.7)。

3-3-4 性分化時期でのステロイドホルモン量の測定

性分化時期における雌雄でのエストラジオール-17b量およびテストステロン量をEIAにより測定した (Fig.8)。その結果、テストステロン量は、成長に伴う雌雄の違いは認められなかった。しかし、エストラジオール-17b量は、日齢60以降、雌は雄より高い値を示し、日齢100では、有意差が認められた (t-test ; $p < 0.05$)。

3-4 議 論

3-4-1 ヒラメのアロマターゼcDNAの単離

本研究で単離したヒラメの卵巣におけるアロマターゼ cDNAは、ニジマス、メダカ、テラピアと同様に2つの開始コドンと考えられる塩基配列を持っていた。また、ナマズのアロマターゼ cDNAは3つの開始コドンと考えられる塩基配列を持っている。しかし、硬骨魚類における本当の開始コドンはまだ不確かである。

ヒラメのアロマターゼ cDNAの塩基配列から予想されるアミノ酸配列の長さは、最初の開始コドンから数えると518残基、2番目から数えると508残基である。また、他の硬骨魚類でも、最初の開始コドンから数えると517-524残基、2番目から数えると507-517残基であり、これらをほ乳類と鳥のアロマターゼのアミノ酸配列の長さ (502-508残基) と比較すると、硬骨魚類の方が長い傾向にあると思われる。

3-4-2 各組織でのアロマターゼ遺伝子の発現

ヒラメの各組織でのアロマターゼ遺伝子の発現は、卵巣、精巣、雌雄の脳だけでなく、雌雄の脾臓で観察された。ナマズでは、RT-PCRにより調べアロマターゼ遺伝子の発現が精巣と脳でシングルバンド、卵巣でダブルバンドとして観察されている (Trant *et al.*, 1997)。アロマターゼ遺伝子の発現が脾臓で観察されたのは、人間の胎児だけである (Price *et al.*, 1992)。ほ乳類のアロマターゼは、さまざまな組織に分布し、エストロゲンの生成量を調節することにより、各組織の重要な生理機能を担っていると考えられているが、脾臓でのアロマターゼの生理機能については分かっていない。しかし、ほ乳類ではコレステロール側鎖切断酵素のmRNAの存在が脾臓で検出されていることから (諸橋, 私信)、今後ヒラメの脾臓でのアロマターゼ遺伝子の発現の意義を調べる必要があるだろう。

3-4-3 性分化時期でのアロマターゼ遺伝子の発現 性分化時期における雌雄の生殖腺でのアロマター

ゼ遺伝子の発現量をRT-PCRにより調べた。前章の組織学的観察により、ヒラメの卵巣および精巣への分化は、両者とも日齢60が開始時期であると考えられる。したがって、雌雄の生殖腺でのアロマターゼ遺伝子の発現量は、性的未分化時期である日齢50では、雌雄で差が認められないが、性分化が開始される日齢60以降、雌では急激に増加し、雄では減少することが明らかになった。

この研究で用いられた雌、雄集団は、通常雌と性転換雄との人工交配により作出されたため遺伝的全雌である。それゆえ、遺伝的全雌は、適水温飼育下では全雌となり、アロマターゼ遺伝子の発現量が急激に増加する一方、性分化時期の高水温処理により性転換を行い、アロマターゼ遺伝子の発現も抑えられることが明らかになった。温度依存性決定機構を持つ爬虫類においては、性分化時期の温度調節により作られた雌雄の副腎-腎臓-生殖腺の混合組織でのアロマターゼ遺伝子の発現量をRT-PCRにより調べた結果、雌が雄よりも有意に高いことが報告されている (Jeyasuria and Place, 1997)。このように、温度依存性決定機構を持つ魚類および爬虫類において、温度はアロマターゼ遺伝子の発現制御に重要であると考えられる。

3-4-4 性分化時期でのステロイドホルモン量の測定

性分化時期における魚体でのステロイドホルモン量を調べた結果、テストステロン量は雌、雄集団での違いは認められなかったが、エストラジオール-17b量は、性分化開始時期 (日齢60) 以降、雌集団の方が雄集団に比べて高い値を示した。アロマターゼは、アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素である。アロマターゼ遺伝子の発現が観察された脳、脾臓において、性分化時期でのこの量の雌雄の差が認められなかったことから (data not shown)、雌集団におけるエストラジオール-17b量の増加は、生殖腺でのアロマターゼ遺伝子の発現量の増加に基づいていると思われる。このことは、アロマターゼ遺伝子の発現量の変化がタンパク質量の変化と一致することを示唆している。

最近、サケ類において、性的未分化時期の遺伝的全雌にアロマターゼインヒビターを投与することにより、雄化することが報告された (Piferrer *et al.*, 1994)。このことは、いくつかの硬骨魚類においては、アロマターゼの活性化およびエストロゲンの合成が雌への性分化に不可欠であることを示唆している。

ヒラメにおいては、卵巣への分化にはアロマターゼ遺伝子の発現量およびエストラジオール-17b量の増加が不可欠であり、精巣への分化にはこれらの増加の抑制が重要であると考えられる。

3-5 References

- Chang, X.T., Nakamura, M., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (1997a) : Immunocytochemical localization of steroidogenic enzymes in gonads during sex differentiation in tilapia. *J. Reprod. Develop.*, 43, 73-74.
- Chang, X.T., Kobayashi, T., Kajiura, H., Nakamura, M. and Nagahama, Y. (1997b) : Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. *J. Mol. Endocrinol.*, 18, 57-66.
- Chardard, D., Desvages, G., Pieau, C. and Dournon, C. (1995) : Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 99, 100-107.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. (1979) : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18, 5294-5299.
- Corbin, C.J., Graham-Lorence, S., McPhaul, M., Mason, M., Mendelson, C.R. and Simpson, E.R. (1988) : Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in non-steroidogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8948-8952.
- Desvages, G. and Pieau, C. (1992) : Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 41, 851-853.
- Desvages, G., Girondot, M. and Pieau, C. (1993) : Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 92, 54-61.
- Frohman, M.A., Dush, M.K. and Martin, G.R. (1988) : Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts : amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8998-9002.
- Harada, N. (1988) : Cloning of a complete cDNA encoding human aromatase: immunochemical identification and sequence analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 156, 725-732.
- Hickey, G.J., Krasnow, J.S., Beattie, W.G. and Richards, J.S. (1990) : Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA. *Mol. Endocrinol.*, 4, 3-12.
- Hinshelwood, M.M., Corbin, C.J., Tsang, P.C.W. and Simpson, E.R. (1993) : Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology*, 133, 1971-1977.
- Kozak, M. (1986) : Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44, 283-292.
- Jeyasuria, P. and Place, A.R. (1997) : Temperature-dependent aromatase expression in developing diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*) embryos. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 61, 415-425.
- Lephart, E.D., Peterson, K.G., Noble, J.F., George, F.W. and McPhaul, M.J. (1990) : The structure of cDNA clones encoding aromatase P-450 isolated from a rat Leydig cell tumor line demonstrates differential processing of aromatase mRNA in rat ovary and a neoplastic cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 70, 31-40.
- Matsumine, H., Hirato, K., Yanaihara, T., Tamada, T. and Yoshida, M. (1986) : Aromatization by skeletal muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63, 717-720.
- McPhaul, M.J., Noble, J.F., Simpson, E.R., Mendelson, C.R. and Wilson, J.D. (1988) : The expression of a functional cDNA encoding the chicken cytochrome P-450 arom (aromatase) that catalyzes the formation of estrogen from androgen. *J. Biol. Chem.*, 263, 16358-16363.
- Pasmanik, M. and Callard, G.V. (1985) : Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 60, 244-251.
- Price, T., Aitken, J. and Simpson, E.R. (1992) : Relative expression of aromatase cytochrome P450 in human fetal tissues as determined by competitive polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74, 879-883.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M. and Smith, M. (1977) : Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265, 687-695.
- Sasano, H., Uzuki, M., Sawai, T., Nagura, H., Matsunaga, G., Kashimoto, O. and Harada, N. (1997) : Aromatase in human bone tissue. *J. Bone Miner. Res.*, 12, 1416-1423.
- Smith, C.A., Andrews, J.E. and Sinclair, A.H. (1997) : Gonadal sex differentiation in chicken embryos : expression of estrogen receptor and aromatase genes.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 60, 295-302.

Tanaka, M., Telecky, T.M., Fukada, S., Adachi, S., Chen, S. and Nagahama, Y. (1992) : Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450 arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17b in the ovary. *J. Mol. Endocrinol.*, 8, 53-61.

Tanaka, M., Fukada, S., Matsuyama, M. and Nagahama, Y. (1995) : Structure and promoter analysis of the cytochrome P-450 aromatase gene of the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *J. Biochem.*, 117, 719-725.

Terashima, M., Toda, K., Kawamoto, T., Kuribayashi, I., Ogawa, Y., Maeda, T. and Shizuta, Y. (1991) : Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 285, 231-237.

Trant, J.M. (1994) : Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) form of cytochrome P450arom. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 95, 155-168.

Trant, J.M., Lehrter, J., Gregory, T., Nunez, S. and Wunder, J. (1997) : Expression of cytochrome P450 aromatase in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 61, 393-397.

山本栄一 (1995) : ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究 鳥取水試研報, 34, 1-145.

Yoshida, K., Shimada, K. and Saito, N. (1996) : Expression of P45017a hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 102, 233-240.

第4章 アロマターゼインヒビターが与える性分化への影響とアロマターゼ遺伝子の発現制御

4-1 序 論

近年、非ステロイド性のアロマターゼインヒビターであるファドロゾールによる雄への性転換が、鳥類 (Elbrecht and Smith, 1992)、爬虫類 (Dorizzi *et al.*, 1994 ; Wibbles and Crews, 1994)、両生類 (Chardard and Dournon, 1999)、魚類 (Piferrer *et al.*, 1994) で報告されている。

そこで本章では、ヒラメの性分化機構をさらに詳細に調べるため、アロマターゼインヒビター (ファドロゾール) を投与することによる性分化への影響を調べた。また、アロマターゼインヒビターおよび性ホルモンの投与によるアロマターゼ遺伝子の発現機構を明らかにした。

4-2 材料および方法

供試魚は、平成10年1月に、前章の方法に従って作出した性転換雄と通常雌との人工交配により生産した遺伝的全雌群である。試験区は、日齢30-100に、18℃で飼育してアロマターゼインヒビター (ファドロゾール) (AI) を1、10、100mg/g飼料の濃度で投与した区、AI (100mg/g飼料) とエストラジオール-17b (1mg/g飼料) を混合して投与した区、17a-メチルテストステロン (10mg/g飼料) を投与した区と対照区である。また、性転換の感受期を明らかにするため、日齢30-60、45-75、60-90、75-105に、18℃で飼育してAI (100mg/g飼料) を投与した区、または高水温 (27℃) で飼育した区も設けた。アロマターゼ遺伝子の発現は、日齢100の個体から生殖腺を取り出し、ISOGEN (日本ジーン社製) を用いて全RNAを抽出し、前章の方法 (Kitano *et al.*, 1999) に従ってRT-PCRにより調べた。性比の確認は、各区を自然水温で飼育し、孵化後約10ヶ月の個体の生殖腺の外部形態、組織像および精子の搾出状況を調べるにより行った (山本, 1995)。

4-3 結 果

4-3-1 アロマターゼインヒビターの投与濃度による性比

遺伝的全雌群に通常の飼料を投与した対照区では、雌の割合が100%であったのに対して、日齢30-100にアロマターゼインヒビター (AI) を飼料に混合した区では、投与したAIの濃度に伴って性転換雄の割合が増加し、100mg/g飼料の濃度で100%雄化した (Fig.9)。

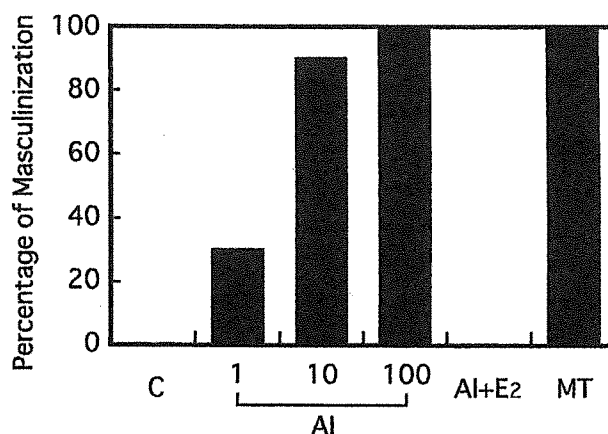


Fig. 9. Masculinization efficiency by treatment of the genetically female larvae with 1 μ g/g diet (1, n=20), 10 μ g/g diet (10, n=24), 100 μ g/g diet (100, n=20) fadrozole (AI), 17 α -Methyltestosterone (MT, n=20), or a combination of fadrozole and estradiol-17 β (AI+E2, n=20) from days 30-100 after hatching. C: no treatment (n=48). Phenotypic sex was determined at 10 months of age by the following criteria: morphology, histology of the gonad, and capacity of sperm ejaculation.

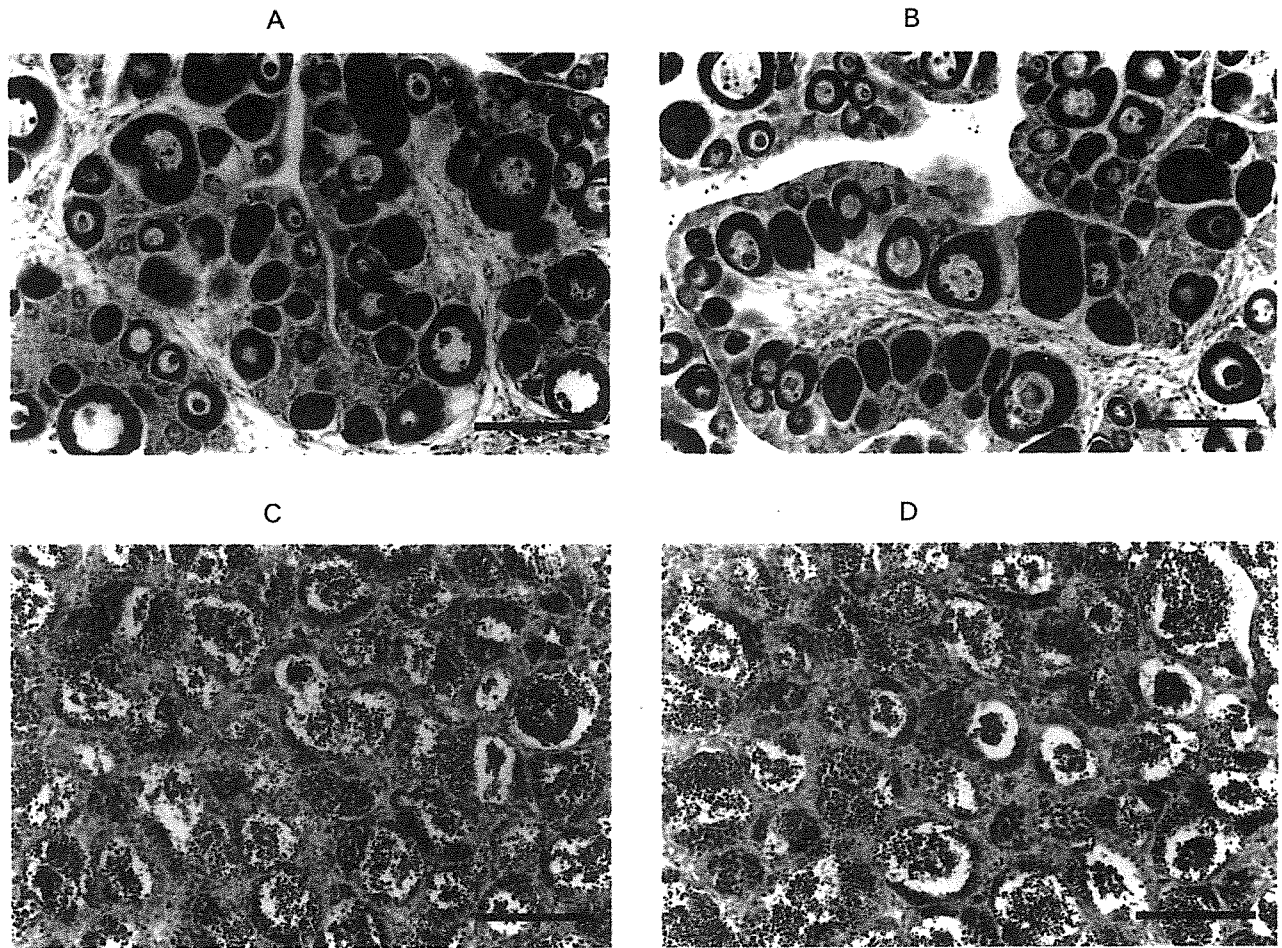


Fig. 10 Cross sections of the flounder gonads at 10 months age produced by the following treatments from 30 to 100 days after hatching. A: no treatment (ovary); B: aromatase inhibitor (AI) +estradiol-17 β (Ovary); C: AI (testis); D: 17 α -Methyltestosterone (testis). Scale bars = 100 μ M

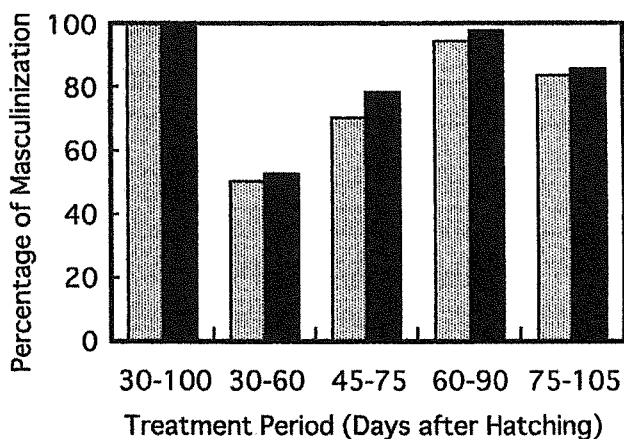


Fig. 11 Masculinization efficiency by treatment of the genetically female larvae with fadrozole(100 μ G/g diet, AI, dotted column) or high water temperature (27 $^{\circ}$ C, T, closed column) during days 30-100 (AI, n=24; T, n=31), 30-60 (AI, n=20; T, n=21), 45-75 (AI, n=20; T, n=41), 60-90 (AI, n=34; T, n=38), or 75-105 (AI, n=20; T, n=41), 60-90 (AI, n=34; T, n=38), or 75-105 (AI, n=34; T, n=48) after hatching. Phenotypic sex was determined at 10 months of age by the following criteria: morphology, histology of the gonad, and capacity of sperm ejaculation.

また、17 α -メチルテストステロンの投与による雄化率は100%であった。一方、AI (100mg/g飼料) とエストラジオール-17 β を同時に投与した区では、性転換の影響は認められず、雌の割合が100%であった。

試験区における孵化後約10ヶ月の個体の生殖腺の組織像を観察した結果、対照区とAI+エストラジオール-17 β 区の個体の卵巣、およびAI区と17 α -メチルテストステロン区の個体の精巣の間には、組織像において違いが認められなかった (Fig.10)。

4-3-2 アロマターゼインヒビターの投与期間による性比

AI (100mg/g飼料) の投与期間による性転換の割合を調べた (Fig.11)。その結果、投与期間が日齢30-100では、雄の割合が100%であったのに対して、日齢30-60では、50%と性転換の割合が減少した。しかし、投与期間が日齢45-75、60-90、75-105では、雄の割合がそれぞれ70、94.1、83.3%であり、高い性転換の割合を示した。一方、高水温 (27 $^{\circ}$ C) の飼育期間による性転換の割合は、日齢30-100では、100%であっ

たのに対して、日齢30-60では、52.4%と減少したが、投与期間が日齢45-75、60-90、75-105では、それぞれ78、97.4、85.4%と高かった。このことから、性転換に影響するAI投与期間と高水温飼育期間とは一致していることが明らかになった。

4-3-3 アロマターゼインヒビターの投与によるアロマターゼ遺伝子の発現制御

ヒラメの遺伝的雌に、AIまたは性ステロイドホルモンを投与した日齢100の稚魚の生殖腺におけるアロマターゼ遺伝子の発現を調べた (Fig.12)。その結果、日齢 30-100 にAI (100mg/g飼料) を投与した区 (性転換の割合: 100%) では、すべての個体において生殖腺でのアロマターゼ遺伝子の発現が抑制された。また、17 α -メチルテストステロンを投与した区 (性転換の割合:100%) においても同様であった。一方、AI (100mg/g飼料) とエストラジオール-17 β を同時に投与した区 (雌の割合: 100%) では、対照区 (雌の割合: 100%) の個体と同様に、すべての個体でアロマターゼ遺伝子の発現が観察された。

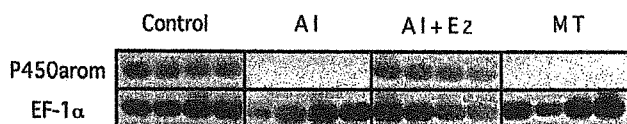


Fig. 12. Expression of P450arom mRNA in the gonad of genetically female juveniles which were treated without (control) or with 100 μ g/g diet of fadrozole (AI), 10 μ g/g diet of 17 α -Methyltestosterone (MT), or a combination of 100 μ g/g diet of fadrozole and 1 μ g/g diet of estradiol-17 β (AI+E2) from 30 to 100 days after hatching. To compare the amount of P450arom mRNA quantitatively among total RNA samples extracted from the gonads of individuals immediately after treatment, EF-1 α served as an internal control. Fragments specific to P450arom and EF-1 α cDNAs amplified by RT-PCR are predicted to be 344bp and 577bp in length, respectively. The products were electrophoresed on a 2% agarose gel. Relative quantities were determined by southern blotting with labeled P450arom or EF-1 α cDNA (Normalization control).

4-4 議 論

4-4-1 アロマターゼインヒビターの投与濃度による性比

ヒラメにおいて、非ステロイド性のAI (ファドロゾール) の投与により、遺伝的雌が生理的雄へ性転換することが明らかになった。ファドロゾールはアロマターゼに対して競合的に働く阻害剤である (Steele et al., 1987)。このファドロゾールによる雄への性転換が、鳥類 (Elbrecht and Smith, 1992)、爬虫類 (Dorizzi et al., 1994; Wibbles and Crews, 1994)、両生類 (Chardard

and Dournon, 1999)、魚類 (Piferrer et al., 1994) で報告されている。これらのことは、鳥類、爬虫類、両生類、魚類においては、アロマターゼの活性化およびエストロゲンの合成が雌への性分化に不可欠であることを示唆している。

一方、AIとエストラジオール-17 β を同時に投与することにより、完全に雄への性転換が回避された。これは、体内でのエストラジオール-17 β 量の増加が雌への性分化を誘導したためであると考えられる。

4-4-2 アロマターゼインヒビターの投与期間による性比

性転換に影響するAI投与期間と高水温飼育期間とは一致していることが明らかになった。この結果は、高水温飼育による遺伝的雌の雄への性転換において、アロマターゼが深く関与していることを裏付けるものである。また、筆者らは前章において、遺伝的雌の高水温飼育は、雄へと性転換を誘導すると同時に、アロマターゼ遺伝子の発現を抑制するため、アロマターゼ遺伝子の活性化は温度感受性があると推測した。したがって、AIの性転換を誘導する感受期は、アロマターゼ遺伝子の活性化の感受期と一致しているために、アロマターゼ活性の阻害はアロマターゼ遺伝子の発現を抑制すると推測される。

4-4-3 アロマターゼインヒビターの投与によるアロマターゼ遺伝子の発現制御

AIを投与した遺伝的雌の稚魚の生殖腺におけるアロマターゼ遺伝子の発現は、抑制されていた。AIによるアロマターゼ活性の阻害は、結果的に生殖腺におけるエストロゲンの合成を阻害していると思われる。また、Tanaka et al. (1995) は、メダカのアロマターゼ遺伝子のプロモーター領域にエストロゲン応答配列の後半部分が存在することを報告し、アロマターゼ遺伝子の発現は、エストロゲンによるポジティブフィードバック機構が存在するかもしれないと推測している。これらのことから判断すると、アロマターゼ遺伝子の発現抑制機構は、AIによるエストロゲンの合成阻害により、フィードバック機構の不活化が起こったためかもしれない。一方、AIとエストラジオール-17 β の同時投与は、エストロゲン量の減少を妨げるため、アロマターゼ遺伝子の発現に影響を与えないと考えられる。

17 α -メチルテストステロンは、雄への性転換に使われるアンドロゲンとして有名であるが (Hunter and Donaldson, 1983; Yamazaki, 1983)、これによる性転換機構は分かっていない。したがって、17 α -メチルテストステロンの投与によりアロマターゼ遺伝子の発現が抑制されるという結果は、本研究において初めて明らかにされた。今後は、この17 α -メチルテス

トステロンがアロマターゼ遺伝子の発現を直接抑制するかどうかを明らかにする必要がある。

4-5 References

- Abinawanto, Shimada, K., Yoshida, K., and Saito, N. (1996) : Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P450_{17 α} and P450_{arom} messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 102, 241-246.
- Chardard, D. and Dournon, C. (1999) : Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool.*, 283, 43-50.
- Dorizzi, M., Richard-Mercier, N., Desvages, G., and Pieau, C. (1994) : Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Differentiation*, 58, 1-8.
- Elbrecht, A., and Smith, R.G. (1992) : Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science*, 255, 467-470.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Abe, S.-I. (1999) : Suppression of P450 aromatase (P450_{arom}) gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at high water temperature during a period of sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. MOL. Endocrinol.* 23, 167-176.
- Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Solar, I.I., Devlin, R.H., and Donaldson, E.M. (1994) : Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *J. Exp. Zool.*, 270, 255-262.
- Steele, R.E., Mellor, L.B., Sawyer, W.K., Wasvary, J.M., and Browne, L.J. (1987) : In vitro and in vivo studies demonstrating potent and selective estrogen inhibition by the nonsteroidal aromatase inhibitor CGS 16949A. *Steroids*, 50, 147-161.
- Tanaka, M., Fukada, S., Matsuyama, M., and Nagahama, Y. (1995) : Structure and promoter analysis of the cytochrome P-450 aromatase gene of the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *J. Biochemistry*, 117, 719-725.
- Wibbles, T., and D. Crews (1994) : Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and in a turtle with temperature-dependent sex determination. *J. Endocrinol.*, 141, 295-299.
- 山本栄一 (1995) : ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究 鳥取水試研報, 34, 1-145.

第5章 アロマターゼ mRNA の検出による早期性別別

5-1 序 論

ヒラメの栽培漁業は、ほぼ全国各地の沿岸で行われており、平成8年度の我が国での総放流稚魚数は2400万尾を超えている(水産庁, 1998)。また、各県の放流平均サイズは42-135mmであるが、このサイズの稚魚の生殖腺は、組織学的観察において雌雄差が認められるため(山本, 1995)、放流時期には性がほぼ決定していると思われる。一方、ヒラメは、性分化時期に高水温や高密度で飼育すると、遺伝的雌が生理的雄へと性転換し、雄の割合が増加することが知られている(山本, 1995; Tabata, 1995)。したがって、放流までの飼育環境がヒラメの性分化にとって極めて重要であるため、飼育環境を適切にコントロールし、放流前に種苗の性比を確認して適正な性比で放流することは、水産資源の生産能力を維持するうえで不可欠であると思われる。従来知られている魚類の早期性別別方法としては、性染色体の観察による方法(上田ら, 1984)、雌血中に特異的に出現するピテロゲニンを検出する方法(Le Bail and Breton, 1981; 太田ら, 1984)、外部形態の雌雄差を利用する方法(本庄ら, 1973; 中本ら, 1985)、および生殖巣の組織像による判別法が挙げられる。ヒラメでは、性染色体の間に形態的な差がない(Sakamoto and Nishikawa, 1980)、性転換する可能性があることから、性染色体の観察により、その個体の生理的性を調べることは困難である。また、ピテロゲニンは、雌の排卵約2ヶ月前になってようやく雌雄差が検出され始めるため(高野, 私信)、放流前に性別別を行うことは不可能である。外部形態においても、放流直前の稚魚では雌雄間に差がないため、現在放流前の性別別としては、生殖腺の組織像観察に頼るしかない。しかし、この方法は時間がかかるうえに熟練した観察技術を必要とするため、迅速かつ簡便に性別別できる新しい方法が望まれていた。そこで、雌雄におけるアロマターゼ遺伝子の発現パターンの違いを利用して、ヒラメ放流用種苗の放流前の性別別に適用できるかどうかを検討した。

5-2 材料および方法

供試魚は、平成10年1月に通常雌と通常雄との自然交配により作出し、日齢0-90日間を15-17℃で飼育しA群と、日齢0-75日間を18-20℃で飼育したB-D群である。日齢90日(全長50-65mm)または日齢75日(全長45-73mm)の生殖腺からISOGEN(日本ジーン社

製)を用いて全RNAを抽出し、第1章の方法 (Kitano *et al.*, 1999) に従ってRT-PCRにより生殖腺におけるアロマターゼmRNAの有無を調べた。また、性比の確認は、同群を自然水温で飼育し、孵化後約9ヶ月の個体の生殖腺の外部形態および組織像を観察することにより行った。

5-3 結 果

放流用種苗の雌の割合とRT-PCRによりアロマターゼ mRNAが検出できた個体の割合をTable 1に示している。全ての群において、雌の割合とアロマターゼmRNAの検出できた個体の割合との間に有意差は認められなかった (χ^2 検定; $P < 0.05$)。以上の結果は、生殖腺において、アロマターゼ mRNAを発現している個体の割合がその集団の雌個体の割合を反映していることを示している。このことから、この方法は全長 45-73mmにおける放流種苗の性判別に極めて有効であることが明らかになった。

5-4 議 論

アロマターゼ mRNAの検出によるヒラメの早期性判別法を開発した。この性判別法は、PCR 技術を用いているため、生殖腺の組織学的観察による性判別に比べて短時間かつ簡便に行うことができる。

一般的に、性比に偏りがある種苗を放流することは、天然海の生態系を乱し水産資源の生産能力を低下させる原因になるおそれがある。そのため、放流は自然界の性比に則した形で行われるべきであるが、現在のところ、ヒラメにおいては自然界でどの様な比率で性比が決定しているのか明らかになっていない。今後、まず自然界における性決定時の性比を明らかにし、放流用人工種苗の性比をコントロールする必要がある。今回明らかにした性判別法は、長期的な水産資源の確保において有効な手段になると考えられる。

5-5 References

Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Abe, S.-I. (1999): Suppression of P450 aromatase

(P450arom) gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at high water temperature during a period of sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. MOL. Endocrinol.* in press.

本庄鉄夫, 原武史 (1973): ヤマメ・アマゴ, 緑書房, 東京, pp.184.

Le Bail, P. Y. and Breton, B. (1981): Rapid determination of the sex of puberal salmonid fish by a technique of immunoagglutination. *Aquaculture*, 22, 367-375.

中本幸一, 小野山弘 (1985): 飼育ヒラメにおける雌雄の成長差について. 兵庫水試研報, 23, 57-61.

太田博巳, 神力義仁, 本間政男, 原彰彦, 松原孝博, 東谷隆幸, 山内皓平 (1984): 卵黄蛋白抗血清を用いた池産サクラマス早期雌雄判別. 水産孵化場研報, 39, 67-74.

Sakamoto, K. and Nishikawa, S. (1980): Chromosomes of three flatfishes (*Pleuronectiformes*). *Japan. J. Ichthyol.*, 27, 268-272.

水産庁・(社) 日本栽培漁業協会 (1998): 平成8年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績, 水産庁・(社) 日本栽培漁業協会, 88-91.

Tabata, K. (1995): Reduction of female proportion in lower growing fish separated from normal and feminized seedlings of hirame *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.*, 61, 199-201.

上田高嘉, 小島吉雄 (1984): ヒメマスの性染色体. 日水誌, 50, 1495-1498.

山本栄一 (1995): ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究. 鳥取水試研報, 34, 1-145.

第6章 総合的考察

この研究では、ヒラメの性分化におけるアロマターゼ遺伝子の役割を明らかにするため、まず、性分化を調べるための実験系を確立するため、遺伝的全雌群を用いて水温調節により全雌および全雄に誘導するための条件を明らかにした。すなわち、日齢30

Table.1 Percentages of flounders with juvenile gonads in which P450arom mRNA was detected and which were identified as females by histological observation of gonads at 9 months age

Group	Number of fishes	Percentage of fishes with juvenile gonads in which P450arom mRNA was detected (%)	Number of fishes	♂ : ♀	Percentage of fishes which were identified as females by histological observation of the gonads at 9 months of age (%)
A	50	30.0	54	37 : 17	31.5
B	50	48.0	128	70 : 58	45.3
C	50	38.0	132	78 : 54	40.9
D	50	46.0	126	69 : 57	45.2

-100に飼育水温を18℃に保つことにより全雌に誘導でき、同期間27に保つことにより全雄に誘導できる。次に、ヒラメの卵巣からアロマターゼ cDNAを単離して全翻訳領域を含む塩基配列を決定し、性分化時期における雌雄での生殖腺のアロマターゼ遺伝子の発現量をRT-PCRにより調べた。その結果、組織学的観察により性的未分化時期である日齢50では、雌雄共にアロマターゼ遺伝子の発現がわずかに観察されたが、両者に違いは認められなかった。しかし、組織学的観察により性分化が開始される日齢60以降、アロマターゼ遺伝子の発現量が雌では急激に増加したが、雄では緩やかに減少した。この研究で用いられた雌雄は、通常雌(XX)と性転換雄(XX)との人工交配により作出した遺伝的全雌(XX)であり、日齢30-100での18℃または27℃飼育により、それぞれ全雌または全雄に誘導したものである。したがって、遺伝的全雌の稚魚の生殖腺におけるアロマターゼ遺伝子の発現は、性分化時期での18℃飼育により急激に増加する一方、27℃飼育により抑制されることが明らかになった。このことから、アロマターゼ遺伝子の活性化は温度感受性があると推測される。温度依存性決定機構を持つ爬虫類においても、性分化時期の温度調節により作られた雌雄の副腎-腎臓-生殖腺の混合組織において、アロマターゼ遺伝子の発現量が、雌が雄よりも有意に高いことが報告されている(Jeyasuria and Place, 1997)。おそらく、温度依存性決定機構を持つ全ての生物において、温度がアロマターゼ遺伝子の活性化に何らかの影響を与えるために、性が温度により決定されるに違いない。

また、ヒラメの性分化機構をさらに詳細に調べるため、アロマターゼインヒビター(AI)であるフェドロゾールを投与することによる性分化への影響を調べた。その結果、AIの投与により、遺伝的全雌が生理的雄へ性転換することが明らかになった。一方、AIとエストラジオール17bとを同時に投与することにより、完全に雄への性転換が回避された。これらのことは、エストロゲンの合成阻害により雄化する一方、外因性のエストロゲンの投与により雌化することを示しており、体内のエストロゲン量が雌雄の性分化に重要な役割を果たしていることを示唆していると思われる。また、遺伝的全雌の性転換に影響するAI投与期間と高水温(27℃)飼育期間とは一致していた。この結果は、高水温飼育による遺伝的全雌の雄への性転換において、アロマターゼが深く関わっていることを裏付けるものである。

さらに、日齢100での生殖腺におけるアロマターゼ遺伝子の発現は、AIを投与した遺伝的全雌の稚魚においては抑制されたが、AIとエストラジオール17b

とを同時に投与した稚魚では強く検出された。これらのことから、アロマターゼ遺伝子の発現は、エストロゲンによるポジティブフィードバック機構が存在するかもしれないと推測される。したがって、今後、ヒラメのアロマターゼ遺伝子のプロモーター領域の解析が期待される。また、17a-メチルテストステロンの投与により、完全に遺伝的全雌が生理的雄へと性転換し、アロマターゼ遺伝子の発現も抑制されたことから、17a-メチルテストステロンによるアロマターゼ遺伝子の発現抑制機構についても詳細に調べる必要があると思われる。

本研究で明らかにされた雌雄における生殖腺でのアロマターゼ遺伝子の発現パターンの違いを利用して、ヒラメ放流用種苗の放流前の性判別に適用できるかどうかを検討した。その結果、45-73mmにおける放流種苗の性判別に極めて有効であることが明らかになった。この性判別法は、PCR技術を用いているため、生殖腺の組織学的観察による性判別に比べて短時間かつ簡便に行うことができる。一般的に、性比に偏りがある種苗を放流することは、天然海の生態系を乱し水産資源の生産能力を低下させる原因になるおそれがある。したがって、放流用人工種苗の性比を確認するために、この性判別法は有効な手段になると考えられる。

References

- Jeyasuria, P. and Place, A.R. (1997) : Temperature-dependent aromatase expression in developing diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*) embryos. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 61, 415-425.

摘 要

第1章

1. ヒラメの遺伝的全雌群を用いて、日齢30-100に飼育水温を18℃に保つことにより全雌に誘導でき、同期間27℃に保つことにより全雄に誘導できた。
2. ヒラメにおける卵巣の分化開始は、卵母細胞の出現に先立ち、卵巣腔の形成により確認され、精巣の分化開始は、特徴的な体細胞の発達状況が指標となることが示された。また、ヒラメの生殖腺は、日齢60において、すでに形態的に雌雄差が認められることが明らかになった。

第2章

1. ヒラメの卵巣から単離したアロマターゼ cDNAの塩基配列の長さは2067bpであり、推定されるアミノ酸配列の長さは518残基であった。

2. 各組織におけるアロマターゼ遺伝子の発現量をRT-PCRにより調べた結果、卵巣で最も強く発現し、次に脾臓で発現し、精巣と脳では弱い発現が観察された。一方、肝臓、腎臓、心臓、筋肉では雌雄とも発現が検出できなかった。

3. 性分化時期における雌雄の生殖腺でのアロマターゼ遺伝子の発現量は、組織学的に性的未分化時期である日齢50では雌雄で差が認められなかったが、組織学的に性分化が開始される日齢60以降、雌では急激に増加し、雄では減少した。

4. 性分化時期における雌雄でのエストラジオール-17b量およびテストステロン量をEIAにより測定した結果、テストステロン量は、成長に伴う雌雄の違いは認められなかった。しかし、エストラジオール-17b量は、日齢60以降、雌は雄より高い値を示し、日齢100では、有意差が認められた。

第3章

1. 日齢30-100にアロマターゼインヒビター (AI) を投与することにより、遺伝的雌が生理的雄へ性転換することが明らかになった。一方、同期間AIとエストラジオール17bとを同時に投与することにより、完全に雄への性転換が回避された。

2. 遺伝的雌の性転換に影響するAI投与期間と高水温 (27°C) 飼育期間とは一致していた。

3. 日齢100での生殖腺におけるアロマターゼ遺伝子の発現は、AIを投与した遺伝的雌の稚魚においては抑制されたが、AIとエストラジオール17bとを同時に投与した稚魚では強く検出された。また、日齢30-100に17a-メチルテストステロンを投与することにより、完全に遺伝的雌が生理的雄へと性転換し、アロマターゼ遺伝子の発現も抑制された。

第4章

1. 雌雄における生殖腺でのアロマターゼ遺伝子の発現パターンの違いを利用して、ヒラメ放流用種苗の放流前の性判別に適用できるかどうかを検討した結果、45-73mmにおける放流種苗の性判別に極めて有効であることが明らかになった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、数多くの御指導、御助言を賜りました安部眞一先生に深く感謝の意を表します。また、多くの御指導を賜りました高宗和史先生に厚く感謝申し上げます。さらに、適切な御助言と材料を御提供下さった基礎生物学研究所の長濱嘉孝先生、ならびに小林亨先生、有益な御助言を賜りました鳥取県水産試験場の山本栄一博士に厚く感

謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、多大な便宜をはかって頂いた熊本県水産研究センターの平田満所長、ならびに中村郁也前所長に厚く御礼申し上げます。また、飼育などで援助した頂いた同センターの応用技術研究部の方々に感謝申し上げます。

※本論文は1999年9月熊本大学大学院自然科学研究科学位論文である。

高水温を用いたアコヤガイの選抜育種に関する研究

松本聖治・木村武志・倉田清典

Studies on the selection breeding of Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*)
with high temperature water.

Seiji Matsumoto, Takeshi Kimura, Kiyonori Kurata

キーワード：アコヤガイ、選抜育種、高水温

静かな入り江等を利用する真珠養殖漁業は本県の重要な水産業の1つである。

しかし、漁場環境の悪化・異常気象等によるアコヤ母貝の生残率の低下が問題化し、近年は大きな被害をもたらすに至っている。そこで九州海域に適した生残率の高いアコヤガイの新たな品種作出のため、高水温を利用した選抜方法について検討したので報告する。

材料および方法

高水温による選抜 和歌山県で人工採苗された約52.5gのアコヤガイ166個を用いて1994年に高水温による選抜を2回行った。まず第一次選抜として1994年8月に自然水温(28℃)から1日に約0.5℃ずつ昇温し、最高で約35℃まで上昇させ、生残個体が約半数になるまで飼育を行った。一次選抜で生残したアコヤガイを1ヶ月自然水温で休養させ、さらに二次選抜を一次選抜と同様の方法で1994年10月に実施した。二次選抜の際、対照区として、一次選抜を行っていない同じ和歌山県産人工採苗貝41個を用いた。

また、高水温に強い貝の生理的な特性を把握するため、血リンパ中の蛋白質量に着目し、高水温選抜により生残した貝と、へい死した貝の血リンパ中の蛋白質量を比較するため、あらかじめ血リンパ中の蛋白質量を測定して選抜に供試した。

選抜は500ℓプラスチック水槽で行い、実施中は止水とし、朝夕の2回全飼育水を交換した。また給餌は植物プランクトン十分量を与えた。

血リンパ中の蛋白質量は開口器で貝殻を開き、閉殻筋から注射器で約100μℓを採取し、Lowry法によ

て測定した。

高水温選抜貝を親貝に用いた次世代の評価 高水温により2度選抜を行った群から、さらに血リンパ中の蛋白質の高い個体を雌雄10個ずつ親貝に用いて1995年3月に種苗生産を行い、高水温選抜第1世代群(以下「S1」という。)を作出した。対照区として無選抜群を雌雄10個用いて同時に種苗生産を実施して対照第1世代群(以下「C1」という。)を作出し、成長及び形態を比較した。また両群の血リンパ中の蛋白質量を測定を1996年4月から1997年1月にかけて3ヶ月毎に実施し、差異を調査した。

両群の高水温耐性形質の差異を検討するため、ふ化200日齢後及び1年後に高水温選抜試験を実施し、高水温耐性形質の遺伝について検討した。高水温による選抜は、環境水温の22℃から約2週間かけて最高水温34℃まで上昇させ、その後徐々に環境水温まで下降させ、その後の生残率を調査した。飼育は、室内2ℓ水槽で流水とし、給餌は1日2回十分量を与えた。

また、夏期の高水温下での生残率を比較するため両群を水産研究センター沖の筏で飼育し、生残、成長及び飼育終了後の血リンパ中の蛋白質濃度を測定し、比較を行った。

結果および考察

高水温による選抜 一次選抜は、昇温開始後12日目に最高水温の35℃になり、へい死は13日目に9個と最大になったが、殆どのへい死は図1に示すように、開始後9日～15日の水温上昇期に発生した。高水温による刺激中にへい死した個体は55個であり、刺激終了後の1ヶ月間の休養中に50個がへい死し、

表1 二次選抜の結果

	供試個体数	致死個体数	半数致死までの日数 (日)	最高水温 (°C)
一次選抜区	61	4	*30日まで半数致死に至らず終了	33.6
対照区	41	26	12	33.8

表2 二次選抜による対照区の生残貝とへい死貝の血リンパ中の蛋白質量

区分	測定個体数	血リンパ中の蛋白質量の平均 (mg/ml)
生残個体	15	1.128 ± 0.189
へい死個体	26	0.605 ± 0.178*

選抜前に全個体を測定し、個体識別を行って選抜を実施した。

*危険率0.1%で有意差あり

表3 採卵に用いた母貝の雄・雌別の血リンパ中の蛋白質量 (単位: mg/ml)

区分	個数	雄の血リンパ中の蛋白質量	雌の血リンパ中の蛋白質量
選抜基本群*	57個	0.895	1.020
選抜親貝区	10個ずつ	1.030	1.140
対照区	10個ずつ	0.679	0.635

*高水温による選抜を2回行い、生残した個体 数値はいずれも平均値

表4 高水温選抜第1世代と対照区第1世代の血リンパ中の蛋白質濃度 (単位: mg/ml)

区分	測定個体数	血リンパ中の蛋白質濃度 (平均値)
高水温選抜第1世代	30	1.050 ± 0.035
対照区第1世代	30	0.779 ± 0.021

表5 高水温選抜第1世代及び対照区第1世代の血リンパ中蛋白質量の月変化
(単位: mg/ml)

区 分	4月	7月	10月	1月
高水温選抜第1世代	1.325±0.329	1.050±0.351	1.213±0.289	1.256±0.296
対照区第1世代	0.932±0.270	0.779±0.211	0.863±0.277	1.081±0.341

表6 高水温選抜第1世代及び対照区第1世代の高水温選抜結果(ふ化後200日目)

区 分	選抜個体数	へい死個体数	へい死率(%)
高水温選抜第1世代	40	6	15
対照区第1世代	40	18	45

表7 高水温選抜第1世代及び対照区第1世代の高水温選抜結果(ふ化後1年目)

区 分	選抜個体数	へい死個体数	へい死率(%)
高水温選抜第1世代	50	11	22
対照区第1世代	50	24	48

表8 高水温選抜第1世代及び対照区第1世代の海面筏における夏季のへい死率及び血リンパ中の蛋白質量

区 分	へい死率(%)	血リンパ中の蛋白質量(単位: mg/ml)
高水温選抜第1世代	2.8	1.242±0.267
対照区第1世代	13.9	1.042±0.231

最終的に一次選抜で生残した個体は61個であった。

二次選抜は環境水温の25℃から昇温開始後24日目に最高水温の33.8℃に達した。一次選抜による生残貝は表1に示すように、対照区が昇温開始後12日目で半数致死に至ったのに対して、30日目まで半数致死に至らず選抜を終了した。

二次選抜に用いた対照区について選抜開始前に血リンパ中の蛋白質量を測定しておいたところ、表2に示すように、値の低い個体により多くのへい死が発生した。血リンパ中の蛋白質量は生残個体の平均

が1.128mg/ml、へい死個体の平均は0.605mg/mlで有意な差が見られた。

高水温による一次選抜で生残したアコヤガイは二次選抜でもほとんどへい死は見られないことから、高水温に対する耐性に個体差があることが推察され、選抜による高水温耐性形質の固定化が図れる可能性が示唆された。

また、高水温選抜による生残個体は、血リンパ中の蛋白質濃度がへい死個体に比べ、高いことが示され、貝の活性指標として血リンパ中の蛋白質濃度が

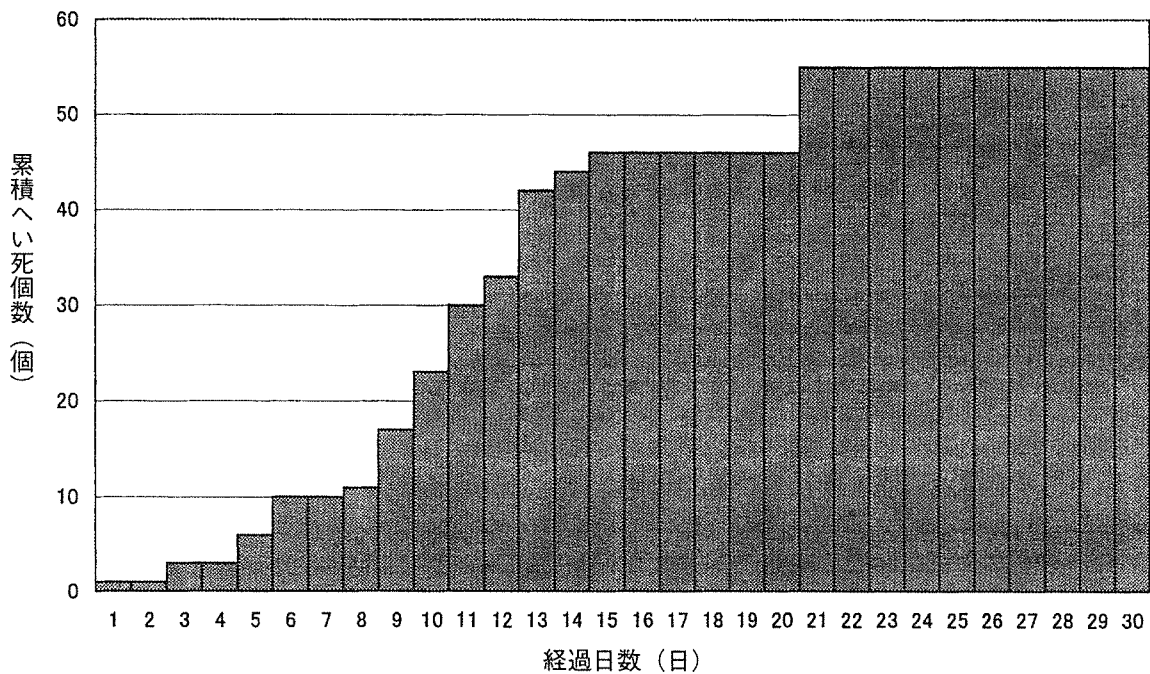


図1 高水温選抜によるへい死状況

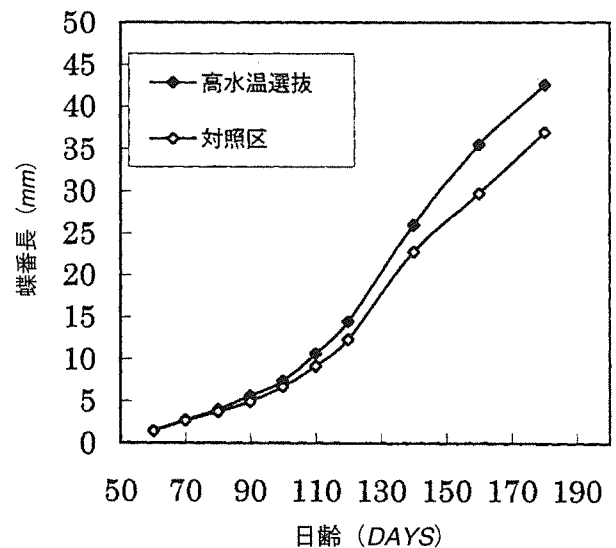
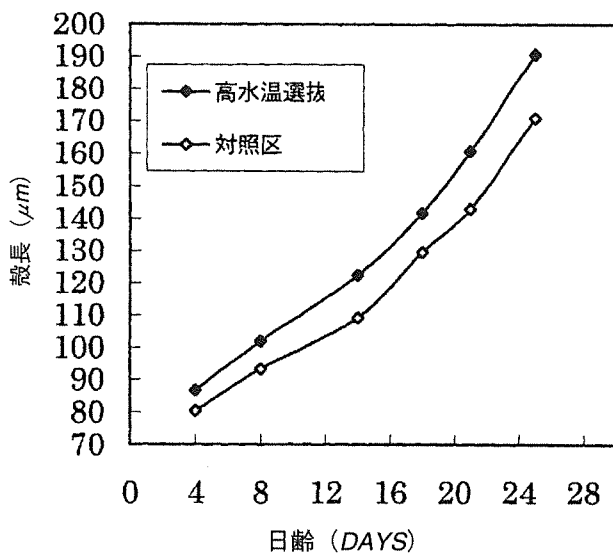


図2 高水温選抜第1世代と対照区第1世代の成長比較

有効であるというこれまでの報告¹⁾を支持する結果となった。

高水温選抜貝を親貝に用いた次世代の評価 採卵に用いた母貝の血リンパ中の蛋白質質量は表3に示すように、同環境下で、対照区に比べ明らかに高い値であった。また雌雄の間には血リンパ中の蛋白質質量の差は見られなかった。

S1の成長は対照区と比較すると、卵径、ふ化直後の大きさには差が見られなかったものの、給餌開始後から差が見られはじめ、図2に示のように、140日齢以降で、水温が25℃を上回る時期からS1が良好な成長を示し、C1と明瞭な差が見られた。

200日齢でS1とC1の血リンパ蛋白質濃度を調査したところ、それぞれ平均で1.050mg/ml、0.779mg/mlとS1が有意な差をもって高かった。

また、高水温への曝露試験の結果、表6に示す様にS1は15%のへい死率で、C1の45%に比べ、明らかに高水温に対する耐性が見られた。

ふ化1年後における同様の高水温選抜試験では、表7に示すようにS1のへい死率が22%であったのに対し、C1は48%とS1が高水温に対し耐性を持つことが示された。

S1及びC1の水産研究センター沖の海面筏での7月～8月の高水温期(期間中の最高水温は28℃程度であった。)におけるへい死率は、表8に示すようにS1が2.8%、C1が10%以上と差が見られた。

これらの結果より、高水温選抜を親貝に用いて生産された次世代の貝は、高水温耐性を持っていることが推察され、選抜を繰り返すことで、高水温耐性形質の固定化が図れる可能性が示唆された。

高水温耐性貝は血リンパ中の蛋白質質量が高いことが示され、選抜基本群の血リンパ中蛋白質質量の平均値が0.954mg/mlで、これからの選抜集団が1.071mg/ml、選抜集団を親に用いた次世代が1.062mg/mlと、この生理的形質も次世代に遺伝することが示唆された。

高水温耐性貝は血リンパ中の蛋白質質量が高いことが示されたが、血リンパ中の蛋白質質量と、血清中のグルコース量及びグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、ロイシンアミノペプチターゼ(LAP)等の酵素活性は、血リンパ中の蛋白質質量の高い個体がいずれも高いことが報告²⁾されていることから、酵素活性の高低が蛋白質質量の高低となって示されると考えれば、血リンパ中の蛋白質質量の高い個体は生理活性が高いと推察され、高水温というストレスのみならず、他のストレスについても耐性を持つ貝が作出できる可能性が考えられ、今後種々のストレスに対する耐性試験により特性を明らかにする必要があると考えられる。

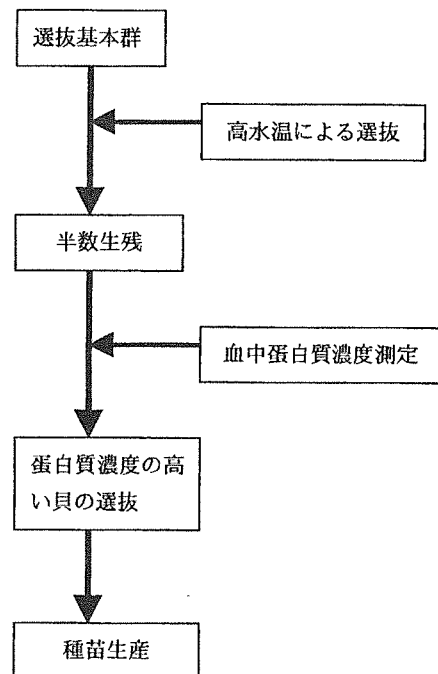


図3 選抜手法のフロー

最後に図3に本研究から考えられた選抜育種計画について示したが、選抜による育種効果を継代を重ねることでもどの程度まで高めることが可能なのかについても今後の検討が必要である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、貝の飼育管理等試験全般に貴重な助言を頂いた辻川 章氏(倉岳真珠:当時)にお礼申し上げます。

本研究は水産庁委託事業「新品種作出基礎技術開発事業」により行った。

参考文献

- 1) 船越将二:アコヤガイ血清蛋白質量の季節変化. 全真連技術会議報告 2:47-51 (1986)
- 2) 沼口勝之:大量へい死発生養殖場におけるアコヤガイの血清成分・平成10年度日本水産工学会学術講演会資料

冬季低水温漁場を用いた赤変を伴うアコヤガイ 大量へい死対策について

深浦雄一・糸山力生・木村武志・倉田清典

Studies on the countermeasure for preventing mass mortality of Japanese
pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) by cool culture field in winter

Yuichi Fukaura, Rikio Itoyama, Takeshi Kimura, Kiyonori Kurata

キーワード：アコヤガイ、赤変、大量へい死、冬季低水温漁場

1996年に顕在化した閉殻筋の赤変を伴うアコヤガイ大量へい死については、感染症が原因とされているが病原体の特定までは至っていない^{1), 2), *1, *2}。この大量へい死では夏から秋にかけてまず貝柱が赤褐色に着色した個体が多数出現し、急激に衰弱がみられ、大量へい死が発生した。秋から冬に掛けての水温低下に伴いへい死率は激減し、水温への依存が高いことが言われていた^{3), 4)}。

この大量へい死対策に関して、冬季に低水温漁場で管理したアコヤガイのへい死が少ないことが報告^{5)~7)}された。そこで本県の真珠養殖漁場においても北部（冬季低水温）漁場で冬季の管理をすることにより大量へい死が防げるかどうかを検証するため、アコヤガイの漁場移動による試験を行った。

材料および方法

供試貝は試験開始時に南部漁場（図1）である牛深市久玉町の天草海真珠株式会社漁場で飼育管理されていた1998年産の愛媛天然貝と（財）熊本県栽培漁業協会が生産した人工貝の2品種を用いた。冬季低水温漁場として図1に示す天草郡大矢野町の有限会社塩田真珠の基地筏を用い、1999年1月13日～4月19日（97日間）まで越冬管理を行った。4月19日以降にそのまま北部漁場（4月26日からは天草郡松島町の天草海真珠株式会社漁場に移動）で管理する群（以下「北北群」とする。）と、南部漁場へ移動する群（以下「北南群」とする。）の2群を設けた。対照区として全期間を通じて南部漁場で管理した群（以下「南南群」とする）を用いた。各区とも1品種当たり50個収容した

真珠養殖用提灯籠を8個使用し、2段吊りして4組を用いた。うち1組をへい死調査用とし、別の1組は赤変調査サンプル抽出用として用いた。なお死亡率を調査する籠は調査毎に死亡貝を除き、残りの2組から随時追加して収容個数を一定とした。調査は

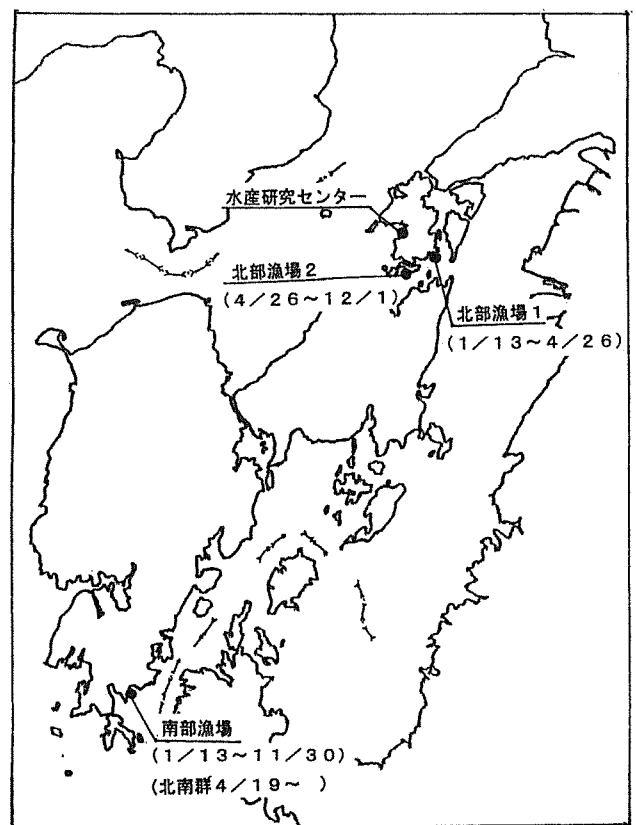


図1 試験漁場の位置

月1回実施し、死亡貝数及び貝柱の赤変度(L*a*b*表色系a*値)を三重県の方法⁸⁾に準じて10個測定し平均を求めた(使用機器:ミノルタ彩色色差計CR-200)。調査期間は1999年11月までとした。水温については試験開始時から供試貝を入れた養殖籠に米国O社製の小型水温記録計を設置して測定を行った。

結果および考察

水温経過 試験期間中の北部漁場及び南部漁場の水温は図2及び図3に示すように、南部漁場が2月下旬に14℃台に低下した他は15℃を下回ることにはなかったのに対し、北部漁場は越冬期間中15℃を上回る

ことがなく、1月中旬から3月中旬までの2ヶ月間は13℃以下であった。移動後の5月中旬以降から10月までは両漁場とも同じ様な水温経過をたどった。
へい死状況 試験期間中のへい死状況については図4に示すように、北部漁場では冬季管理終了時に愛媛天然貝が19.0%、協会産が7.7%見られたのに対し、対照区の南部漁場では愛媛天然貝、協会生産貝ともへい死が見られなかった。低水温の影響や低水温に対する品種間の差異がうかがわれた。漁場移動後のへい死状況は北北群、北南群では10月になってからわずかに見られ初め、11月に若干のへい死が見られたのに対し、対照区の南南群では9、10月に約30%

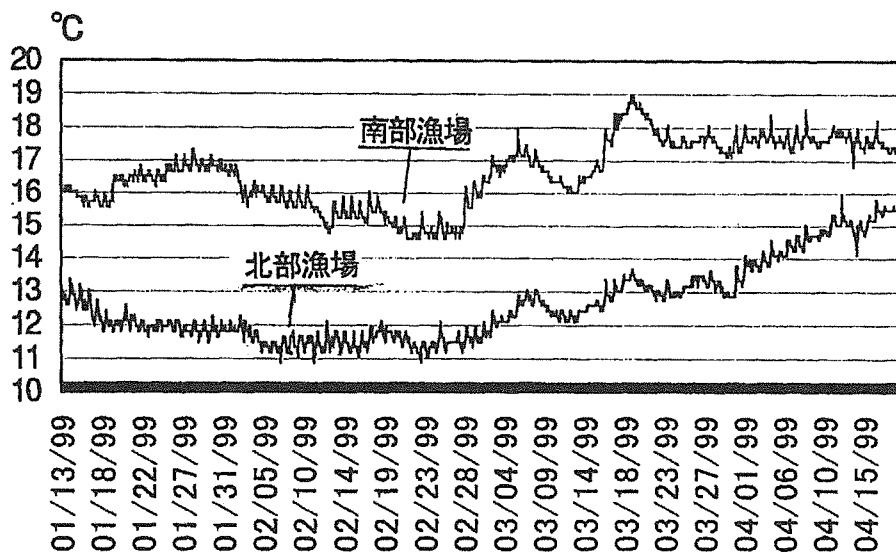


図2 越冬期間中の水温経過 (99.1.13~4.1.19)

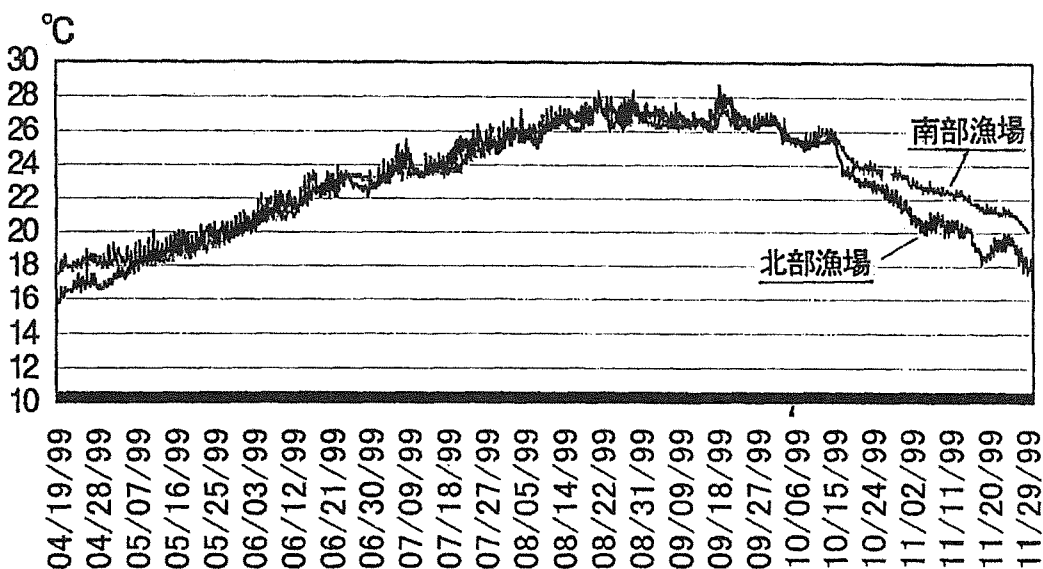


図3 越冬管理後の水温経過 (99.4.19~12.1)

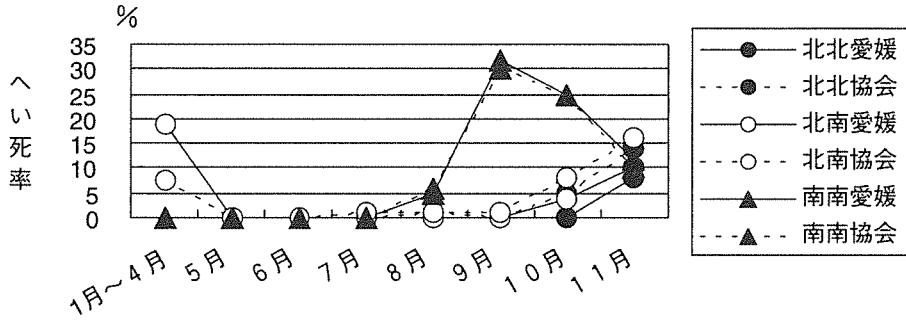


図4 月別へい死

程度の大量へい死が発生した。

試験期間中の累積の生残率は表1に示すように、2品種間の平均で北北群が75.0%、北南群で69.5%、南南群で43.5%と有意な差が見られた。

表1 試験期間中の累積生残率

	北北群	北南群	南南群
	%	%	%
愛媛天然貝	75.0	70.0	43.0
協会生産貝	75.0	69.0	44.0
平均	75.0	69.5	43.5

赤変化状況 赤変化については図5に示すように、対照区の南南群においては大量へい死が発生する1ヶ月前の8月から観察され、北南群はそれより1月遅れの9月から見られるようになったのに対し、北北群は10月にかけてわずかに観察されただけであった。

積算水温と赤変化の関係 15℃を超えた日からの積算水温とa*値の関係については図6に示した。図には7月調査からの関係を示した。南部漁場で15℃を超えた日からの積算水温が赤変発生日途(3600℃)⁹⁾に達したのは8月21日で、南南群は7月調査時(積

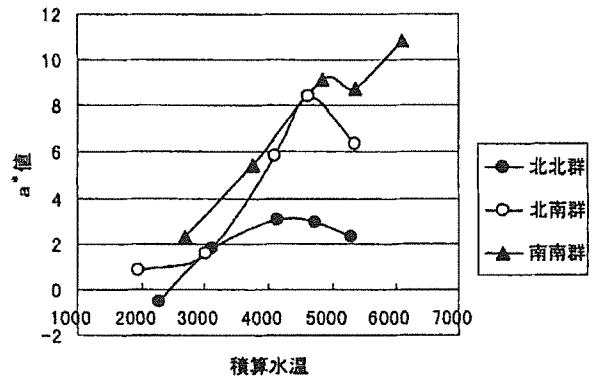


図6 積算水温とa*値(愛媛天然貝)の関係 (15℃を超えてからの積算)

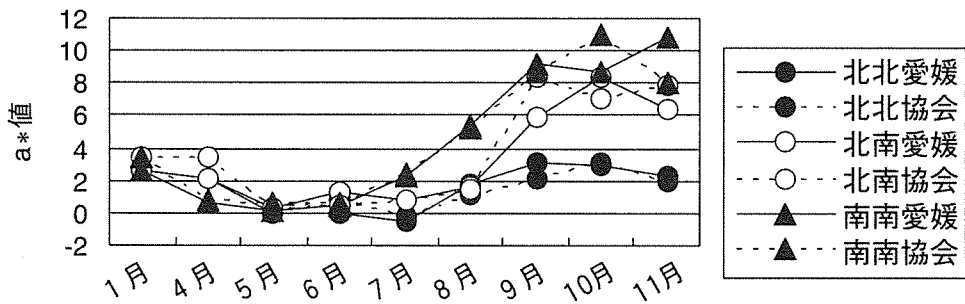


図5 貝柱赤変度推移

算水温2683℃)のa*値2.35が8月下旬の調査時(積算水温3762℃)にはa*値5.48となっていた。他方、北北群の積算水温が赤変発生日途に達したのは9月18日で、9月調査時(積算水温4139℃)にはa*値3.04に上昇していたが、すぐに水温下降期となり10月調査時でもa*値の上昇は見られなかった。一方、北南群の積算水温は北北群と同じにもかかわらず9月調査時(積算水温4103℃)にa*値5.83と赤変が進んでいた。これは同一漁場内で先に赤変化し大量へい死が発生したアコヤガイ(南南群及び他養殖貝)からの再感染に起因する疑いが濃いものと考えられ、積算水温以外の飼育環境の影響が考えられた。

以上のことから本県でも冬季の越冬管理を北部漁場で行うことで、赤変化を遅滞させ大量へい死を防ぐことが可能なことが明らかになった。これは他県での事例^{5), 6), 7)}と同じく本県北部漁場での冬季13℃以下の水温が2ヶ月近く続いたためと考えられた。しかし、北部海域で越冬管理した後南部海域へ移動した群(北南群)は大量へい死までは至らなかったが、同一漁場内の赤変貝からの再感染に起因すると思われる赤変化と若干のへい死が発生しており、南部漁場へ再移動する際には、低水温漁場越冬群と他の群を完全に分離することや漁場全体の養殖貝を低水温海域で冬季管理すること等の他の防疫的措置を組み合わせることが対策をより効果的なものにするために重要と考えられた。

要 約

1. 冬季低水温漁場での管理による赤変を伴う大量へい死防止対策が本県でも有効かどうか検証するため、北部漁場へアコヤガイを移動し冬季管理を行った。
2. 北部漁場でそのまま管理したアコヤガイは死亡率、赤変化とも値が低く、大量へい死対策としての有効性が認められた。
3. 北部漁場で冬季管理を行った後南部漁場へ移動したアコヤガイは、大量へい死までは至らなかったが赤変化と若干のへい死が発生しており、他の防疫的措置を組み合わせることが重要と考えられた。

謝 辞

本試験を行うにあたり、試験用アコヤガイや試験漁場の提供、サンプリング等に多大な援助を頂いた天草海真珠株式会社及び同社の川辺道夫氏、梅田礼一氏、岩本十三志氏、有限会社塩田真珠及び同社の松藤等氏に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) 黒川忠英・鈴木 徹・岡内正典・三輪 理・永井清仁・中村弘二・本城凡夫・中島員洋・芦田勝朗・船越将二：*Pinctada fucata martensii*の閉殻筋の赤変化を伴う疾病の人為的感染。日本水産学会誌。65。241-251 (1999)
- 2) 森実庸男・内村祐之・藤田慶之・川上浩史・林政博・中島員洋・岩本仁司・前野幸男・釜石隆・吉永知義・船越将二・芦田勝朗：実験感染によるアコヤガイ赤変化の再現。平成10年度日本魚病学会秋季大会講要。5 (1998)
- 3) 和田浩爾：貝柱褐色化アコヤガイの大量へい死に関する疫学的調査研究中間結果から。SHINJUけんきゅう N0 8.2-24 (1997)
- 4) 全国真珠養殖漁業協同組合連合会：平成8年度海面養殖業高度化推進対策事業 真珠養殖業全国推進検討会報告書。(1997)
- 5) 松山紀彦：平成8年～10年度秋抑制に関する試験研究 冬期低水温漁場にて冬越しさせた母貝を使用しての事例報告。アコヤ貝大量へい死防止事例発表大会(全真連)。19-24 (1998)
- 6) 愛媛県：養殖管理試験。平成10年度高品質アコヤ貝育成促進事業報告書。(1999)
- 7) 長崎県対馬水産業普及指導センター：第6回アコヤ貝へい死要因に関する研究会資料。(1998)
- 8) 三重県：赤変化関連試験。平成9年度高品質アコヤ貝育成促進事業報告書(1998)
- 9) 熊本県：平成11年度の赤変貝の発生、へい死率等状況調査の結果。平成11年度海面養殖業高度化推進対策事業真珠養殖業全国推進検討会報告書。41-45。(2000)

その他資料

- * 1 水産庁養殖研究所：平成9年度アコヤ貝大量へい死緊急調査対策研究担当者会議プレスリリース。(1998)
- * 2 水産庁養殖研究所：平成10年度アコヤ貝大量へい死緊急調査対策研究担当者会議プレスリリース。(1999)

赤変を伴う異常アコヤガイの低塩分飼育試験 について

深浦雄一・糸山力生・北野 健・倉田清典・中野平二

Effect of the low salinity rearing on the abnormal Japanese pearl oyster
(*Pinctada fucata martensii*) accompanying red-brown adductor muscles

Yuichi Fukaura, Rikio Itoyama, Takeshi Kitano,
Kiyonori Kurata, Heizi Nakano

キーワード：アコヤガイ、大量へい死、赤変異常貝、低塩分飼育

1996年に顕在化した閉殻筋の赤変を伴うアコヤガイ大量へい死対策については、高水温、高かん水の天草下島南部海域の牛深地区が早く発症している¹⁾こと、また原因が疑われていた原虫類 (*Perkinsus Marinus*) の知見で低塩分での発症の遅れ、感染率の低下があげられている²⁾ ことなどがあり、赤変した異常アコヤガイを低塩分環境において飼育してへい死等に差が出るかどうか検討した^{3), 4)}。

材料および方法

供試貝は熊本県内の養殖漁場で採取した赤変したアコヤガイ(97年人工生産貝)を用いた。試験区は全海水、5/6海水、4/6海水、半海水区の4区をダブルで設定し、1区20個のアコヤガイを供した。98年10月8日から11月26日(50日間)の間、止水で通気をして給餌を行いながら飼育した。使用海水は水産研究センターの砂ろ過海水を用い、希釈水は1日以上通気して消毒用塩素を抜いた水道水を用いた。飼育水温は試験前半では自然水温(25~20℃)とし、試験後半の10月29日からはウォーターバスで加温して25℃前後を保った。へい死による飼育水の汚れ等に伴い適宜換水を行った。試験水槽は当初は100lポリカーボネイト水槽を用い、加温期は30lポリカーボネイト水槽を用いた。餌料については屋外培養したテトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* と

室内培養したキートセロス *Chatoceros calcitrans* を試験前半は飼育水100l に培養液 1l (テトラ0.7l+キート0.3l)、後半は飼育水 30l に0.5l (テトラ0.3l+キート0.2l) を1日1回与えた。試験の評価については、試験区毎のへい死個数及び生残個体閉殻筋の赤変の測定値 (L*a*b*表色系の a*値、測定機器：ミノルタ色彩色差計CR-200) で判定^{4), 5)} した。

結果および考察

水温及び塩分経過 試験期間中の飼育水の水温経過を図1に示す。当初自然水温で行ったので、気温の下降に従い飼育水温の低下が見られたが、加温した後からは25℃を保ちながら経過した。

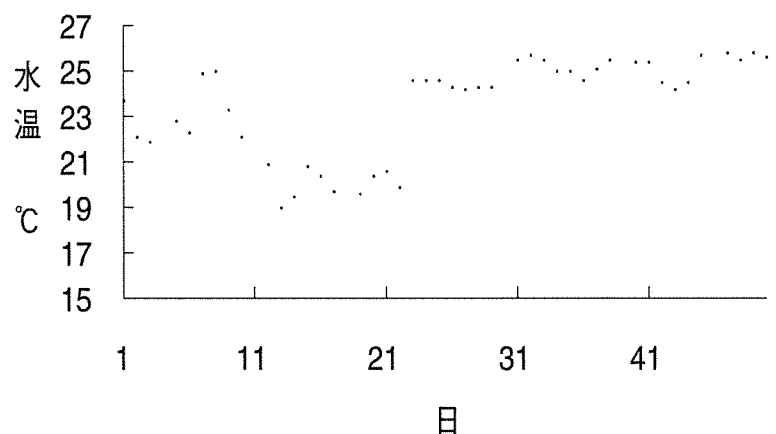


図1 飼育水水温

塩分については図2に示す。全海水区で32~33、5/6海水区で28前後、4/6海水区で23前後、半海水区で17前後であった。加温期の初めに塩分が上昇した期間があったが、その外はほぼ設定どおりの塩分を保っている。

へい死状況 試験期間中の累積のへい死個数については図3に示すように、全海水区は両水槽とも試験期間中20個中18個のへい死で合わせて40個体中36個体のへい死、5/6海水区は12個体と18個体合わせ

て40個体中30個体のへい死、4/6海水区は11個と7個と両水槽合わせて18個のへい死、半海水区で15個体と9個体合わせて24個体で結果であった。生残個数は4/6海水区>半海水区>5/6海水区>全海水区の順に多い結果となった。特に、一番生残が良かった4/6海水区は、A水槽の初期のへい死を除いて考えれば更に生残が良かったものと思われた。

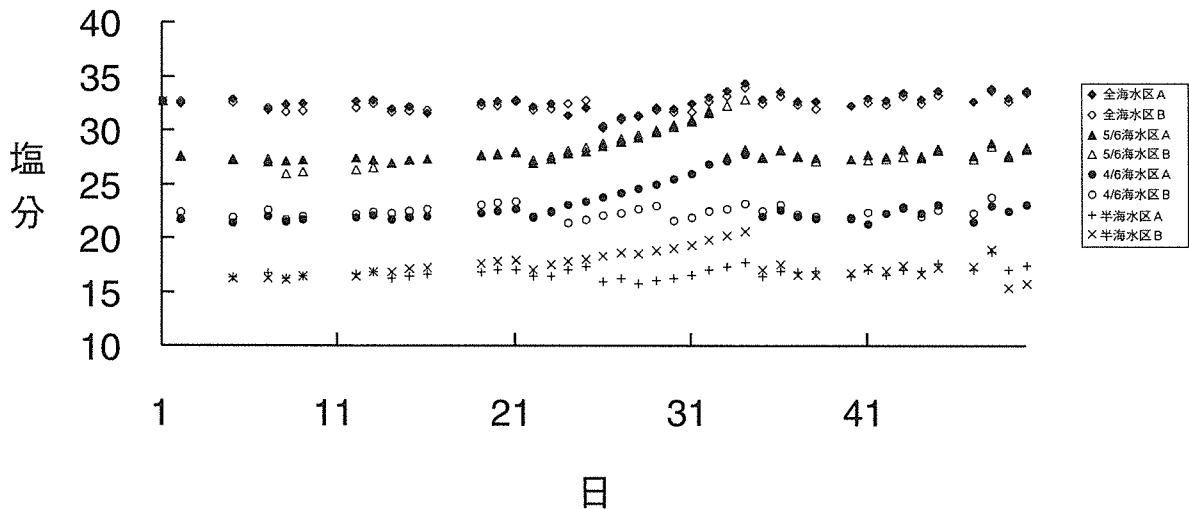


図2 飼育水塩分濃度

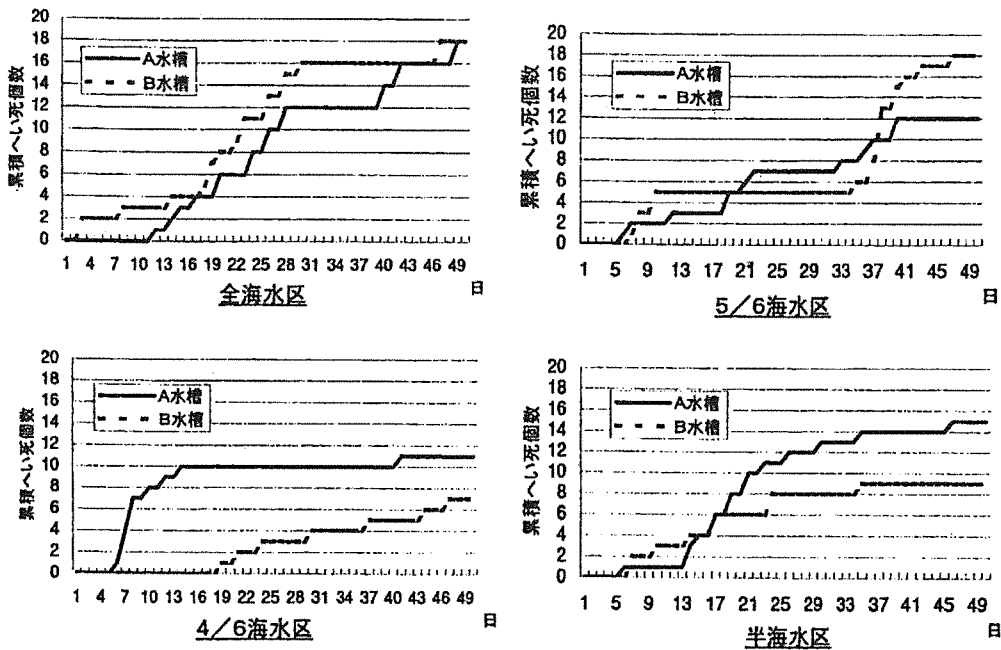


図3 累積へい死個数

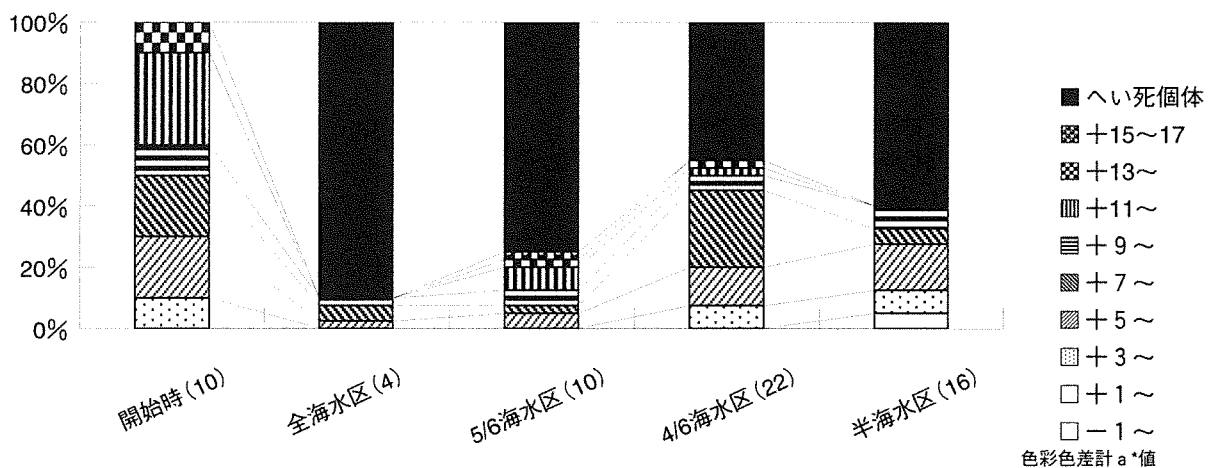


図4 へい死及び生残個体閉殻筋赤変状況
(() 内は a* 値測定個数)

赤変化状況 試験終了時のへい死個体数と生残個体の赤変の状況を図4に示した。図の縦軸は2水槽分を合計した供試個数40個を100%として表し、へい死個数と生残個体閉殻筋 a* 値の階層毎の割合を示した。なお、開始時のみ測定10個体を100%とした。

開始時は90%が a* 値 5 以上の完全な赤変³⁾で、11以上の重篤の赤変も40%見られていた。全海水区の生残は4個で全て a* 値 5 以上の赤変であった。11以上の重篤のものは見られず、赤変がひどかったものはへい死したと考えられた。

5/6 海水区は10個の生残で a* 値 5 から17の赤変で11以上の重篤のものが半分見られた。4/6 海水区は22個の生残で a* 値 3 から5の軽い赤変のもののみみられ、5以上の完全な赤変のものも9未満が大部分であった。赤変はほとんど進んでおらず、赤変がひどかったものがへい死し、比較的軽いものが生残したとも考えられた。半海水区は16個の生残で a 値 11以上のひどい赤変のものは見られなかった。生残個体の1/3程度が a* 値 5 未満の軽い赤変で、なかでも開始時にも見られなかった3未満のわずかな着色程度のものも見られた。どちらかといえば赤変が回復しているとも伺える結果を示した。

以上により赤変を伴う異常アコヤガイのへい死について、低塩分飼育による延命の可能性が示唆された。へい死個数からは4/6 海水区、生残個体の閉殻筋の赤変からは半海水区が一番有効に思われた。

なお、赤変が軽くなったと思われた半海水区が4/6 海水区よりへい死が多く、過度の低塩分飼育についてはアコヤガイの生理的な問題もあることが示唆された。

要 約

1. 閉殻筋の赤変を伴うアコヤガイ大量へい死対策の一環として、赤変した異常アコヤガイの低塩分飼育を行いへい死等に差が出るかどうか検討した。
2. 飼育試験の結果、赤変を伴う異常アコヤガイの低塩分飼育による延命の可能性について示唆された。へい死個数からは4/6 海水、生残個体の閉殻筋の赤変からは半海水が一番有効に思われた。
3. 赤変が軽くなったと思われた半海水区が4/6 海水区よりへい死が多く、過度の低塩分飼育についてはアコヤガイの生理的な問題もあることが示唆された。

謝 辞

本試験を行うにあたり、試験用アコヤガイの提供していただいた熊本真珠有限会社佐藤吉生氏に感謝いたします。また、本研究の日本魚病学会口頭発表にあたりご指導いただいた養殖研究所病理部長（当時）松里寿彦氏に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 熊本県：平成9年産母貝赤変化一斉調査について。平成10年度海面養殖業高度化推進対策事業真珠養殖業全国推進検討会報告書。31-32。(1999)
- 2) Chu F. L.E.: Laboratory investigation of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research*, 15, 57-66. (1996)
- 3) 深浦雄一、糸山力生、北野 健、中野平二、松里寿彦：赤変を伴う異常アコヤガイの低塩分飼育試験について。平成11年度日本魚病学会春季大会講要 (1999)
- 4) 熊本県：低塩分飼育試験。平成10年度海面養殖業高度化推進対策事業真珠養殖業全国推進検討会報告書。35-37。(1999)
- 5) 三重県：赤変化関連試験。平成9年度高品質アコヤ貝育成促進事業報告書 (1998)

海産系人工生産アユの下顎側線孔の欠損について

清田 季義

Observation of lack of pit organ on the lower jaw for artificial seed produced Ayu

Sueyoshi Kiyota

キーワード：人工生産アユ、下顎側線孔、標識形質

アユ *Plecoglossus altivelis* の下顎には肉眼で確認できる孔器が認められ¹⁾、天然アユは縦2列に4対整列しているが、熊本県における人工生産アユには列や数が不揃いなものが多くみられた²⁾。

このアユの下顎孔器（この報告では以下、下顎側線孔と呼称する。）の欠損頻度について、天然アユと人工生産アユを比較し、人工生産アユに特有のものであることを確認するとともに、人工生産アユの標識形質としての有効性についても考察した。

材料および方法

供試魚 供試魚の概要を表1に示した。「天然アユ」は、アユの遡上期に球磨川及び緑川の河口域の堰で採捕したものを、熊本県水産研究センター内水面研究所に運搬し、コンクリート水槽に収容した後、配合餌料を与え、下顎の孔器が肉眼で明瞭に確認できるまで養成したものをを用いた。人工生産アユは、当研究所において採卵し、発眼卵を(助)熊本県栽培漁業協会に運搬し、ふ化後0.3~0.5gまで飼育し、その後当研究所において養成したものをを用いた。なお、表1に示すように、「人工継代アユ」は海産系のアユで、当研究所において継代3代目のものであり、「トビ選抜2Fアユ」は1998年に人工継代2代目でトビ群

を選抜したアユを親魚として人工生産したものである。また、「天然親魚由来アユ」は球磨川河口堰採捕養成アユを親魚として人工生産したアユである。

観察方法 アユの頭部を下から観察すると、通常、下顎の先端から後端まで白色であり、側線孔はアユの左右下顎の先端部から中後部にかけて左右4対配列しているのが観察される(図1、図2)。

しかし、人工生産アユには列や数が不揃いなものがみられ、側線孔は先端部1対の側線孔を除く3対(左右6孔)の側線孔のいずれかが欠損している個体が多く見られた(図3、図4)。

先端部1対の側線孔を除く3対(左右6孔)の側線孔のパターンを欠損数により、-：3対が整列している、+：孔が1つ無い、++：孔が2つ無い、+++：孔が3つ以上無い、の4つに分類した。

標識形質としての有効性 親魚の由来が違う人工生産アユ3群のうち2群にそれぞれ脂鰭、腹鰭を切除し標識とした後、それぞれをコンクリート水槽で配合餌料を給餌した区(池中養殖区という)、コンクリート水槽内の飼育水を水中ポンプで流水を発生させ増殖した珪藻等のみによって養成した区(池中無給餌区という)、試験魚以外のアユが生息していない緑川ダム上流域に放流した区(天然水域放流区とい

表1 種苗概要

種類	天然アユ		人工生産アユ		
	球磨川河口堰採捕養成アユ	緑川河口堰採捕養成アユ	人工継代アユ	トビ選抜2Fアユ	天然親魚由来アユ
採捕日	1998.4.17	1999.4.2	-	-	-
採卵日	-	-	1998.10.14	1998.10.16	1998.10.13
ふ化率	-	-	34.6%	18.6%	6.9%

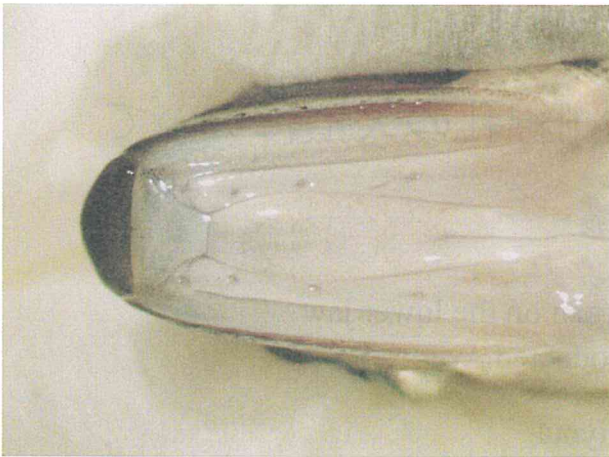


図1 球磨川河口堰採捕養成アユ（6月5日撮影）



図2 緑川河口堰採捕養成アユ（9月13日撮影）

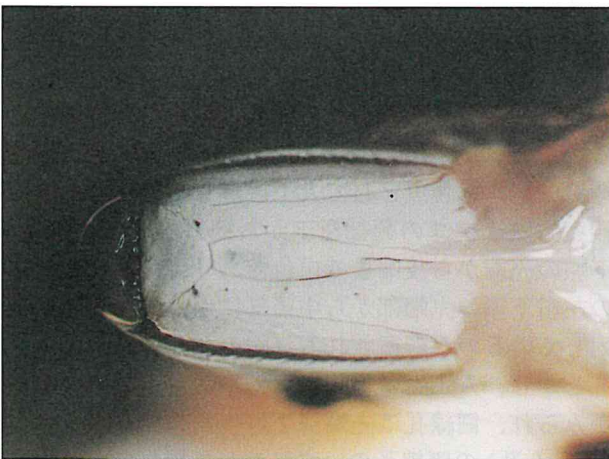


図3 人工生産アユ（+）



図4 人工生産アユ（+++）

う)について下顎側線孔の欠損頻度を調べた。

側線孔の観察は、人工生産アユ群については試験開始時の5月6日に行った他、各区の試験終了時（天然水域放流区は採捕時）に行った。

結 果

天然アユの下顎側線孔欠損頻度は図5、図6に示すように、-の比率が非常に高く、また、養成後も

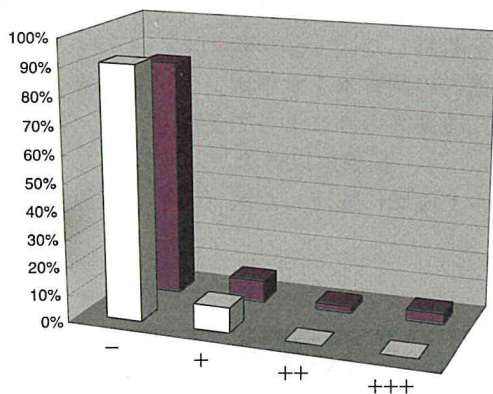


図5 球磨川河口堰採捕養成アユの下顎側線孔欠損頻度

□ 6月5日観察、n=11、BL=8.6±0.7
 ■ 11月6日観察、n=126、BL=19.3±1.1

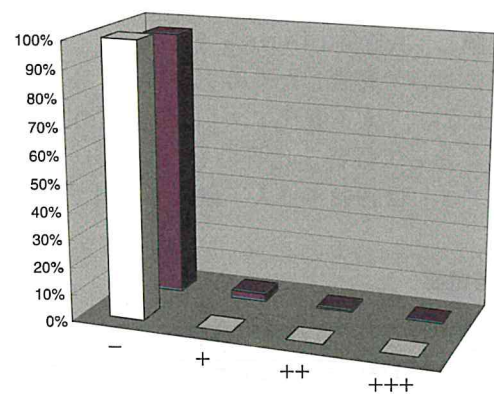


図6 緑川河口堰採捕養成アユの下顎側線孔欠損頻度

□ 5月6日観察、n=34、BL=9.0±0.8
 ■ 9月13日観察、n=184、BL=18.3±1.2

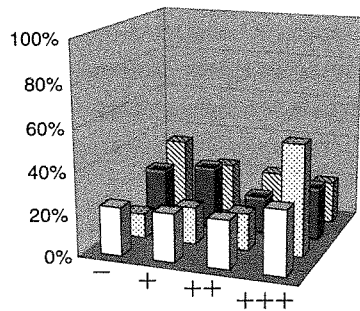


図7 人工継代アユの下顎側線孔欠損頻度
 □ 開始時 (5月6日観察)、n=52
 ▨ 天然水域放流区 (7月~9月観察)、n=17
 ■ 池中養殖区 (8月9日観察)、n=301
 ▩ 池中無給餌区 (8月9日観察)、n=50

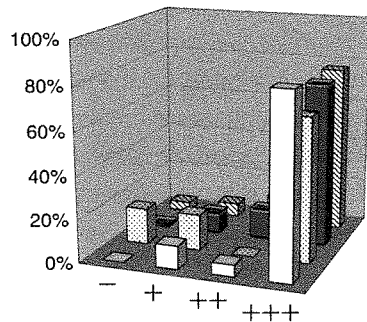


図8 トビ選抜2Fアユの下顎側線孔欠損頻度
 □ 開始時 (5月6日観察)、n=56
 ▨ 天然水域放流区 (7月~9月観察)、n=12
 ■ 池中養殖区 (8月13日観察)、n=202
 ▩ 池中無給餌区 (8月9日観察)、n=48

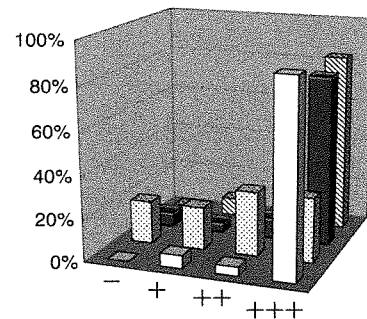


図9 天然親魚由来アユの下顎側線孔欠損頻度
 □ 開始時 (5月6日)、n=50
 ▨ 天然水域放流区 (7月~9月観察)、n=10
 ■ 池中養殖区 (8月13日)、n=135
 ▩ 池中無給餌区 (8月9日観察)、n=48

その傾向に変化はなかった。

人工生産アユの下顎側線孔欠損頻度は図7、図8、図9に示すように、いずれも+++の比率が高く、天然水域放流区を除けば各群とも開始時の頻度

と同じような傾向を示した。天然水域放流区は緑川ダム上流での増水等の影響で7月から9月にかけて刺し網、投網、友釣り等で合計39尾しか採捕できず十分な精度が得られなかった。

考 察

この報告で分類した-をアユの正常型とし、+・++・+++を非正常型すると、堀田が報告している結果¹⁾からも天然アユの殆どが正常型であり、人工生産アユは生産群によって違いはあるものの非正常型が多い傾向にあった。また、その頻度は成長段階や飼育環境の違いによっても同様の傾向を示したことから、体長9.0cm時点で形成されている下顎側線孔はその後の変化は殆ど無く、その種苗群の特徴を示すものと考えられた。さらに、天然アユを親魚として人工生産した天然親魚由来アユも非正常個体の比率が高く、発生要因として、人工種苗生産過程での環境、餌質等が関与していることが推察された。

これらのことから、河川に放流する人工生産アユの下顎側線孔欠損頻度をあらかじめ把握しておけば、漁獲されるアユの下顎側線孔を調べることによって、天然アユと人工生産アユの比率を判別することが出来るものと考えられ、マダイの鼻孔連結³⁾やヒラメの白化(黒化)個体と同様に人工生産種苗の標識形質として用いることができると考えられた。

文 献

- 1) 落合明：魚類解剖図鑑、28 (1987)
- 2) 堀田英一、堤泰博、齋藤剛、岩村征三郎、栃原正久：アユ資源増殖総合対策事業Ⅱ、熊本県水研センター事業報告、224-229 (1998)
- 3) 後藤政則：養殖マダイにみられた鼻孔の異常形態について、栽培漁業技術開発研究、15巻1号 87-88 (1986)

熊本県主要河川における冷水病の発生状況について

松尾竜生・清田季義

Occurrence of bacterial coldwater disease of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Kumamoto

Ryuusei Mastuo, Sueyoshi Kiyota

キーワード：アユ、冷水病

1999年6月、2000年5月に球磨川水系川辺川で冷水病の発生が認められ、河川におけるアユ等の漁業に被害を及ぼした。

アユ冷水病は、グラム陰性長桿菌である *Flavobacterium psychrophilum* に起因し、鰓や内臓の貧血を伴い体側、尾柄部や下顎などの出血あるいは潰瘍を主症状とする日和見的感染症¹⁾である。

本種による冷水病の発生は、全国の養殖場や湖沼・河川のアユ漁業などで被害が出ているところであり、熊本県における冷水病の発生は、1995年から現在までアユ養殖場で確認されている²⁾⁻⁶⁾。しかし、熊本県における天然水域での発生はこれまで例がなく、今回初めて河川アユ等に漁業被害をもたらした。そこで、本研究では冷水病対策につながる知見を蓄積するため、天然水域におけるアユ、その他常在魚種の冷水病発生状況を把握する目的で調査を行った。

材料および方法

1. 調査河川

県内主要河川(A~F川)において、1999年6月~11月に6河川(A・B・C・D・E・F川)で、2000年6月~11月に5河川(A・B・C・E・F川)で友釣り、投網、刺し網で捕獲したアユ、その他の魚種を用いて保菌検査を行った。また、2000年5月~6月に球磨川水系において球磨川堰、万江川(支流)、川辺川(支流)、深田村、市房ダムの合計5カ所の定点(図1)を設け、保菌検査を行った。また、球磨川水系川辺川の柳瀬において2000年5月~2001年3月に毎月1回アユ、オイカワを捕獲し保菌検査を行うとともに斃死状況の聞き取りを行った。

2. 検査方法

現場調査で得られた検体や漁協から持ち込まれた死魚等を検査に供した。得られた検体は、鰓、腎臓、病患部から改変サイトファーガ寒天培地(馬血清10%添加)を用いて、5℃、14日間で冷水病菌の分離を行い、スライド凝集法、PCR法⁷⁾で菌の同定を行った。

結果および考察

1. 冷水病の発生状況

1999年は、球磨川水系川辺川で体側の潰瘍、顎の欠損等を示すアユが6月~9月に確認され、2000年においても、球磨川水系川辺川で5月~9月、A川支流で10月に同様な症状を示すアユが認められた(表1)。斃死状況は、川辺川では死魚の流下、淵や岩の間隙での死魚の堆積が確認され、A川支流では死魚の流下が認められた。これらの死魚を検査したところ腎臓から冷水病菌が検出されたことから、冷

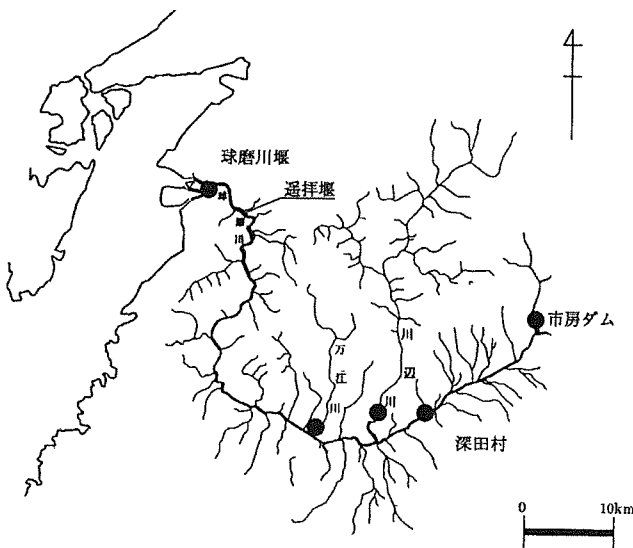


図1 球磨川水系における調査地点図

水病と判断された。冷水病発生時の水温は、1999年は15～16℃、2000年は17.0～20℃の範囲にあり、冷水病の発生事例のある水温12～21℃前後⁸⁾での発生が県内においても多く認められた。

表1 河川における冷水病による死魚の発生状況

発生河川名	発生時期	発生時水温(℃)
球磨川水系川辺川	1999年6月4日	15～16
	6月17日	15～16
	9月9日	不明
	2000年5月22日	17.5
	6月15日	17.0
	9月5日	20
A川水系支流	10月8日	不明

2. 主要河川における保菌状況

県内主要河川の冷水病の保菌状況を表2・3に示した。1999年は6河川中5河川、2000年は5河川中2河川で保菌アユが確認され、E川水系では21.7～33.3%と高い保菌率を示した。

表2 1999年主要河川におけるアユの保菌状況

河川名	調査日	検体数	検出尾数	保菌率(%)
A川	99-11-01	6	5	-*
B川	99-11-17	4	1	25.0
C川	99-07-08	1	1	-*
D川	99-11-30	5	0	0
E川	99-11-12	23	5	21.7
F川	99-11-30	22	3	13.6

※A川、C川は、作為抽出のため保菌率は不明。

表3 2000年主要河川におけるアユの保菌状況

河川名	調査日	検体数	平均体重(g)	検出尾数	保菌率(%)
A川	00-06-15	30	74.1	1	3.3
B川	00-06-20	60	14.2	0	0
C川	00-11-06	35	58.7	0	0
E川	00-06-16	51	29.5	17	33.3
F川	00-07-27	51	85.1	0	0

3. 球磨川水系における保菌状況

2000年5～6月に調査した球磨川水系におけるアユの保菌状況を表4に示した。感潮域である球磨川堰下流では52.2%と高率で保菌しており、万江川は

表4 球磨川水系におけるアユの保菌状況

河川名	調査日	検体数	平均体重(g)	検出尾数	保菌率(%)
球磨川堰	00-06-16	23	28.3	12	52.2
万江川		12	24.3	3	25.0
川辺川		7	34.4	1	14.3
深田村		9	30.8	1	11.1
市房ダム	00-05-10	20	2.7	4	20.0

保菌率25.0%、川辺川は14.3%、深田村で11.1%であった。最上流定点の市房ダムでは、20.0%の保菌が認められた。このように球磨川水系においては、全ての調査定点で保菌魚が認められ、水系全体に冷水病菌が拡散していることが明らかとなった。

次に、川辺川におけるアユの月別の保菌状況を表5に示した。2000年5月下旬から10月中旬までの検体から3.3～44.4%の範囲で冷水病菌が検出され、漁解禁前からアユ産卵期まで継続して保菌アユの常在が確認された。11月以降の調査については、アユが球磨川本流へ流下することから採捕されなかった。

表5 川辺川柳瀬におけるアユの保菌状況

調査日	検体数	平均体重(g)	検出尾数	保菌率(%)
00-05-22	9	31.3	4	44.4
00-06-16	7	34.4	1	14.3
00-07-19	9	110.1	2	22.2
00-08-11	9	53.6	2	22.2
00-09-25	30	123.4	1	3.3
00-10-17	43	133.6	3	6.9

4. アユ以外の魚種での保菌状況

球磨川水系の各種調査で得られたアユ以外の魚種の保菌状況を表6に示した。漁獲された4科10魚種の内、オイカワ、ウグイで保菌が確認され、特に川辺川におけるオイカワは、高率で冷水病菌が検出され、下顎や体側の発赤、鰓蓋の欠損等の外観症状が認められた。

表6 球磨川水系におけるアユ以外の魚種の保菌状況

場所	調査日	魚種	検体数	検出尾数	保菌率(%)
球磨川堰	00-06-16	オイカワ	2	0	0
		カワムツ	2	0	0
		マハレ	1	0	0
		フナ類	1	0	0
		カマツカ	2	0	0
		スズキ	2	0	0
		ボラ	2	0	0
		コゴイ	2	0	0
		ウグイ	2	0	0
		チチフ	2	0	0
万江川	00-06-16	オイカワ	2	0	0
		ウグイ	2	0	0
		カワムツ	2	0	0
川辺川	00-05-22	カワムツ	6	0	0
	00-06-15	オイカワ	35	15/16*	≥42.9
	00-07-19	ウグイ	5	1/5	20.0
深田村	00-06-16	オイカワ	2	0	0
		カマツカ	1	0	0

※外観症状のある検体のみ検査に供した。

次に、川辺川柳瀬におけるオイカワの月別の保菌状況を表7に示した。2000年6月～7月に保菌魚が確認され、6月は42.9%以上の高い保菌率を示し、死魚が出たとの地元漁業者からの聞き取りを得ている。その後、夏期から冬期にかけて保菌魚及び死魚

は確認されなかった。しかし、2001年2月中旬から3月中旬にかけて、調査時に下顎の発赤または体側が退色症状を示すオイカワ死魚や瀕死魚が認められた。2月は32尾中死魚2尾から冷水病菌が検出され保菌率は6.3%であった。また、3月は31尾中瀕死魚1尾から検出され保菌率は3.2%であった。球磨川水系への天然遡上アユの掬い上げ及び人工種苗アユの放流は、3月上旬から始まっていることから、2月の段階でアユからオイカワへの感染の可能性は低く、オイカワがアユ流下後の冷水病菌の潜伏場所の一つとして考えられた。このことは、オイカワ等の河川に常在する魚種が、3月以降放流されるアユへの感染源の一つとなる可能性を示唆している。今後は、アユ以外の魚種と放流アユ（天然遡上アユ、人工種苗アユを含む）間の感染の可能性を検討し、感染経路を解明する必要がある。

表7 川辺川柳瀬におけるオイカワの保菌状況

調査日	検体数	平均体重(g)	検出尾数	保菌率(%)
00-05-22	6	12.6	0	0
00-06-15	35	14.5	15/16*	≥42.9
00-07-31	24	15.9	2	8.3
00-10-16	20	10.7	0	0
00-11-22	32	9.6	0	0
00-12-25	30	11.1	0	0
01-01-19	30	7.6	0	0
01-02-22	32	8.3	2	6.3
01-03-15	31	11.1	1	3.2

*外観症状のある検体のみ検査に供した。

5. 冷水病の発生と水温

冷水病による死魚の発生が多い川辺川柳瀬と、保菌魚は確認されたが死魚の発生が少なかった本流の深田村と遥拝堰（球磨川堰から約4km上流）の水温を比較した。

川辺川柳瀬における1時間毎の水温は、2000年4月14日～8月28日で11.4～23.6℃の範囲で推移（図2）し、平均17.9℃であった。一方、川辺川合流前の本流（深田村）と川辺川柳瀬との水温差（図3）は、-2.0℃～+6.4℃の範囲にあり、川辺川が平均2.0℃低かった。また、川辺川合流後の本流（遥拝堰）との水温差（図4）は-1.8℃～+5.9℃の範囲にあり、川辺川が平均2.6℃低かった。このことから、2000年の川辺川柳瀬の水温は、春期から夏期にかけて球磨川本流の水温に比べ、やや低めに推移しており、特に夏期の水温差が大きいことが明らかとなった。冷水病は、18℃前後の発生事例が多い⁸⁾ことから、川辺川は原因菌にとって有利な水温変動を示す水域であることが考えられ、発生が多い要因の一つであることが推察された。

要 約

- 1) 熊本県下の主要6河川の内、5河川で冷水病の保菌が認められ、2河川で冷水病による死魚の流下が認められた。
- 2) 川辺川では、漁解禁前からアユ流下直前まで継続して保菌アユの常在が確認された。
- 3) アユ放流前に冷水病によるオイカワ死魚が確認されたことから、オイカワが放流アユ（天然遡上アユ、人工種苗アユ）への感染源の一つとなる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 浅川牧夫・清田季義・松尾竜生・南部豊揮：熊本県におけるアユ冷水病の発生について。熊本大学教育学部紀要，第49号，47-55 (2000)。
- 2) 堀田英一：内水面魚病対策試験。平成7年度熊本県水産研究センター事業報告書，221-222 (1995)。
- 3) 堀田英一・吉田好一郎・齋藤剛・岩村征三郎・栃原正久：内水面魚病対策試験。平成8年度熊本県水産研究センター事業報告書，219-222 (1996)。
- 4) 堀田英一・堤泰博・齋藤剛・岩村征三郎・栃原正久：内水面魚類養殖対策試験Ⅰ。平成9年度熊本県水産研究センター事業報告書，201-204 (1997)。
- 5) 齋藤剛・岩下徹・清田季義：内水面魚類養殖対策試験Ⅰ。平成10年度熊本県水産研究センター事業報告書，199-201 (1998)。
- 6) 松尾竜生・清田季義・宮原才郎・岩村征三郎・栃原正久：内水面魚類養殖対策試験Ⅰ。平成11年度熊本県水産研究センター事業報告書，171-172 (1999)。
- 7) S. Izumi and H. Wakabayasi : Use of PCR Detect *Cytophaga psychrophila* from Apparently Healthy Juvenile Ayu and Coho Salmon Eggs. *Fish Pathol.*, 32 (3), 169-173 (1997)。
- 8) アユ冷水病対策研究会・水産庁：アユ冷水病の現状と対策。アクアネット，2 (9)，54-60 (2000)。

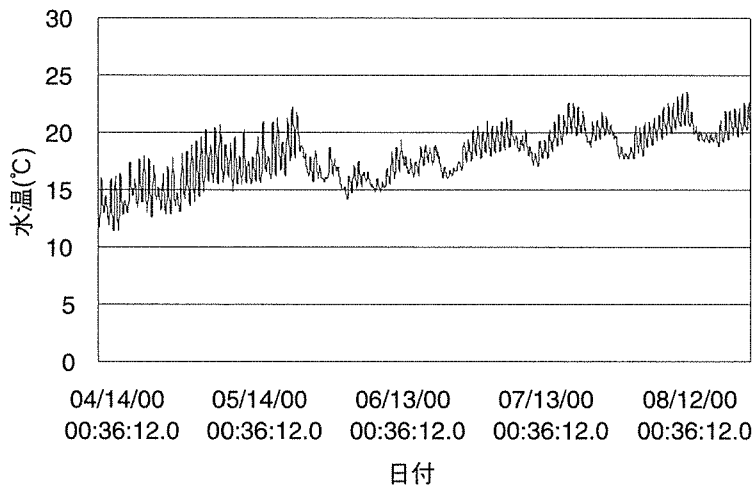


図2 川辺川柳瀬における水温

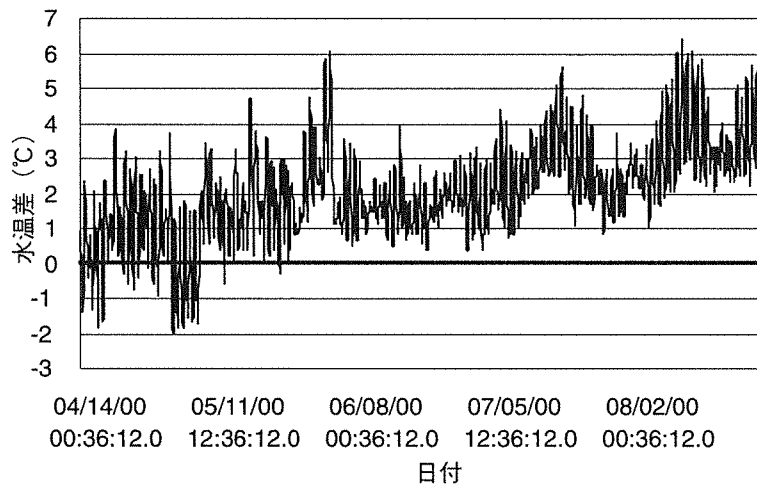


図3 深田村と柳瀬の水温差

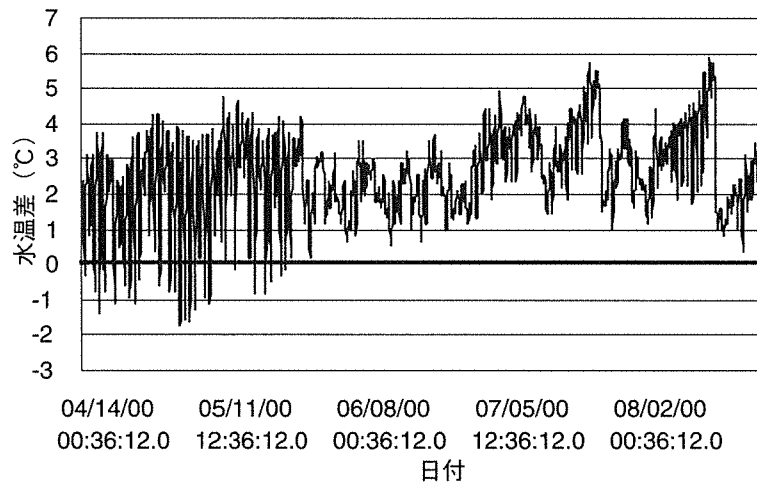


図4 遙拝堰と柳瀬の水温差

菊池川河口域におけるアサリ浮遊幼生の分布状況について

陣内康成・鎌賀泰文・鳥羽瀬憲久

Studies on the distribution of larval of *Ruditapes philippinarum* in the estuary, Kikuti river.

Yasunari Jinnai, Yasufumi Kamaga, Norihisa Tobase

キーワード：アサリ、浮遊幼生、干潟

本県におけるアサリの生産量は1977年の65,732トン进行ピークに年々減少し、1989年1万トンを割り込み、最近数年間は数千トンで推移しており、極めて深刻な状況にある。

人工種苗を生産し稚貝をまき付けて育成し漁獲することは可能であるが、人工種苗の生産コスト、量産のための施設の確保等で限界があり、この手法だけで県内干潟全域の生産量を回復させることは困難である。県内の漁場全体の生産量増大を図っていくには、自然発生する稚貝の増加を図ることが必要である。

初期資源量の増加を図るうえで、アサリの発生から、浮遊期を経過して、着底し稚貝に至る機構の解明が不可欠である。今回、アサリ浮遊幼生の干潟近

辺での分布状況を調査したので報告する。

材料および方法

(調査地点)

玉名市滑石地先の菊池川河口域において、干潟上にst.a(地盤高1.5m)、干潟縁辺部の斜面にst.b(水深約5m)、さらに沖合の平坦部にst.c(水深約11m)を設定した。(図1)

(調査方法)

1999年5月27日12時から28日12時にかけて、st.aでは2層(表層、海底から0.5m)、st.bでは潮位に応じ3~4層(2m間隔)、st.cでは潮位に応じ4~5層(3m間隔)で、2時間間隔で24時間、計12回浮遊幼生の採取を行った。

採取にはエンジンポンプを用い各層の海水を100ℓ採水し、オープニング100μmのプランクトンネットでろ過し、残留物をサンプル瓶に収容し調査船の冷凍庫で冷凍して持ち帰った。

持ち帰ったサンプルについて、アサリ及びその他の二枚貝類の浮遊幼生(D状期、アンボ期、フルゲロウン期)の個数計数を行った。アサリ浮遊幼生識別にはモノクローナル抗体を利用した間接蛍光抗体法を用いた。

結果および考察

St.aにおける浮遊幼生の出現状況を表1に示した。

調査当日は波浪があり、干潟上で採取を行えたのは28日の午前6時及び午前8時の2回であった。2回の時間帯ともにアサリ浮遊幼生の大部分はフルゲロウン期であった。これに対してその他の貝類の浮

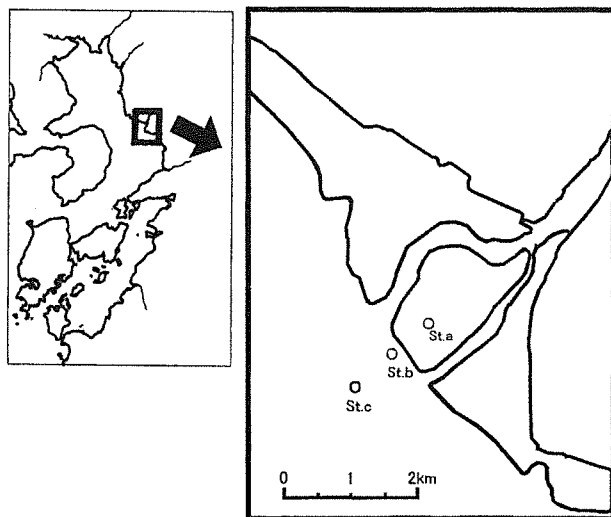


図1 菊池川河口域及び浮遊幼生採集地点

表1 st.aにおける幼生出現状況

			5/28	
			6:00	8:00
ア	D状期	表層	0	0
		底層	0	0
サ	アンボ期	表層	1	2
		底層	0	1
リ	フルグロウン期	表層	14	9
		底層	26	2
その 他 の 貝 類	D状期	表層	11	20
		底層	2	4
	アンボ期	表層	42	46
		底層	33	4
	フルグロウン期	表層	1	12
		底層	2	0

遊幼生はアンボ期が最も多く、次いでD状期が多く出現した。

St.bにおける浮遊幼生の出現状況を図2に示した。

アサリD状期幼生は27日18時～20時及び28日4時～10時に出現し、下層よりも上層で出現数が多かった。その他貝類D状期幼生は27日16時～22時及び28日4時～10時に出現し、下層よりも上層で出現数が多かった。

アサリアンボ期幼生は27日14時、27日18時～28日0時及び28日4時～10時に出現し、出現数の多い層は時刻により変化した。その他貝類アンボ期幼生は27日16時～22時及び28日2時～10時に出現し、アサリ同様出現数の多い層は時刻により変化した。

アサリフルグロウン期幼生は27日14時～20時、28日0時及び28日4時～10時に出現し、上層よりも下層で出現数がやや多かった。その他貝類フルグロウン期幼生は27日18時及び28日2時～10時に出現し、出現数の多い層は時刻により変化した。

St.cにおける浮遊幼生の出現状況を図3に示した。アサリD状期幼生は27日14時及び16時を除く全時間帯で出現したが出現数は極端に少なかった。その他の貝類D状期幼生は全ての時間帯で出現し、下層よりも上層で出現数が多かった。

アサリアンボ期幼生は27日18時を除く全時間帯で出現したが、出現数の多い層は時刻により変化した。その他の貝類アンボ期幼生は全時間帯において多数出現し、出現数の多い層は時刻により変化した。

アサリフルグロウン期幼生は27日18時及び20時を除く全時間帯で出現したが出現数は極端に少なく、出現する層に特定の傾向はみられなかった。その他の貝類フルグロウン期幼生は全時間帯において出現したが出現数は少なく、出現する層に特定の傾向は

みられなかった。

アサリD状期幼生は、満潮時の干潟上には出現せず、干潟へのかけ上がり部分で満潮時のみ集中して出現し、沖合での出現は僅かであった。満潮時かけ上がり部分に出現した幼生が干潮時にはどこへいってしまうのか分からない結果となったが、アサリ幼生のD状期の期間は3～5日と短くパッチの規模が小さいため、干潟上や沖合でうまく採取されなかった可能性が考えられた。その他の貝類D状期幼生は沖合で常時出現し、かけ上がり部分では満潮時中心に出現しているため、アサリD状期幼生も同様の移動・分布をしていると考えられた。

アサリアンボ期幼生は、満潮時の干潟上には僅かに出現し、干潟へのかけ上がり部分で満潮時中心に出現し、沖合では潮汐に関係なく出現した。このことからアサリアンボ期幼生は、干潮時は沖合で待機し満潮時にはかけ上がり部分まで移動するものの、干潟上までは積極的に移動しないと考えられた。

アサリフルグロウン期幼生は、満潮時の干潟上に出現し、干潟へのかけ上がり部分で満潮時中心に出現し、沖合では潮汐には関係なく僅かに出現した。このことからアサリフルグロウン期幼生は常時岸寄りに分布し、満潮時には積極的に干潟上へ移動していると考えられた。

今回の調査でアサリ浮遊幼生が成長段階、潮汐で分布域が変化することが確認された。今後アサリ浮遊幼生を定期的にモニターしていく際には、このことに気を付けて採水地点、採水層、採取時刻等の設定をおこなう必要がある。

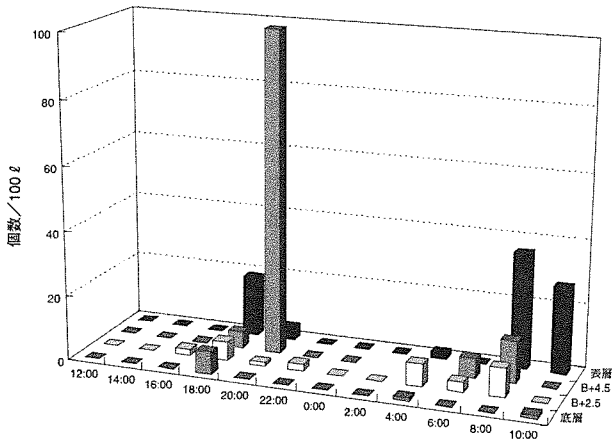
要 約

- 1 アサリ浮遊幼生の水深別分布状況を、干潟上、漸深帯及びその沖合で一昼夜観測した。
- 2 満潮時干潟上に出現したアサリ浮遊幼生の大部分はフルグロウン期であった。
- 3 漸深帯では、アサリ浮遊幼生はD状期、アンボ期、フルグロウン期ともに満潮時中心に出現した。
- 4 漸深帯では、D状期幼生は上層をフルグロウン期幼生は下層を中心に出現した。
- 5 沖合部では、アサリ浮遊幼生は潮汐に関係なく出現し、アンボ期の占める割合が大きかった。

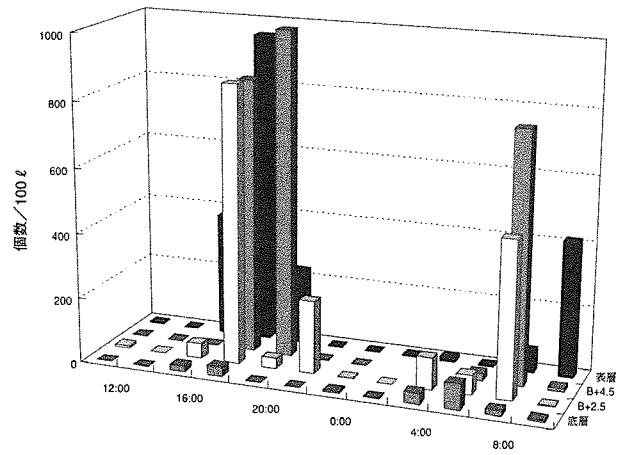
文 献

- 1) 黒田伸郎、松村貴晴、岡本俊治、浜口昌巳 (1999) 日本水産学会講演要旨集512
- 2) 松村貴治、岡本俊治、黒田伸郎、岩崎員郎、浜口昌巳 (1999) 日本水産学会講演要旨集513

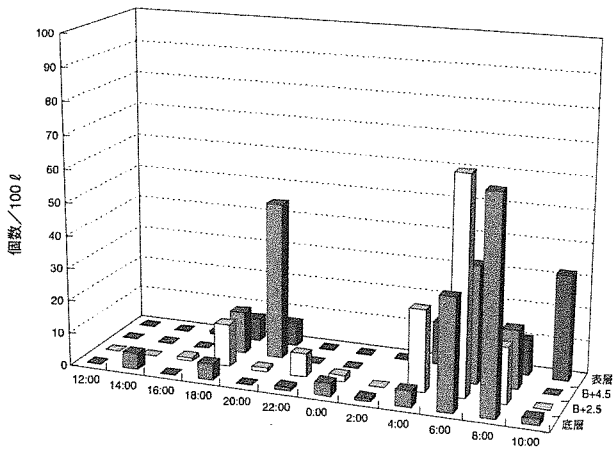
アサリ・D 状期 (St.b)



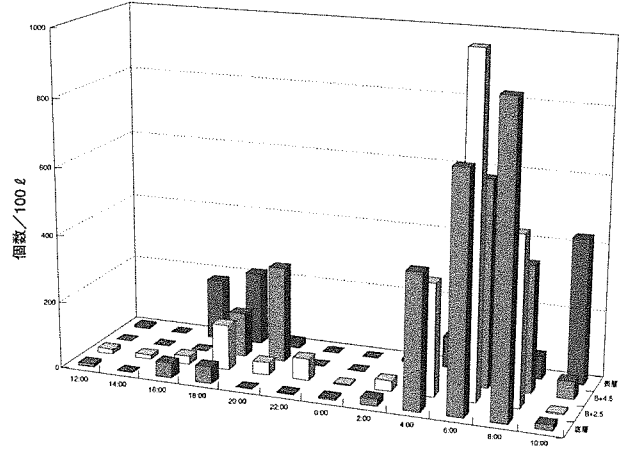
その他の貝類・D 状期 (St.b)



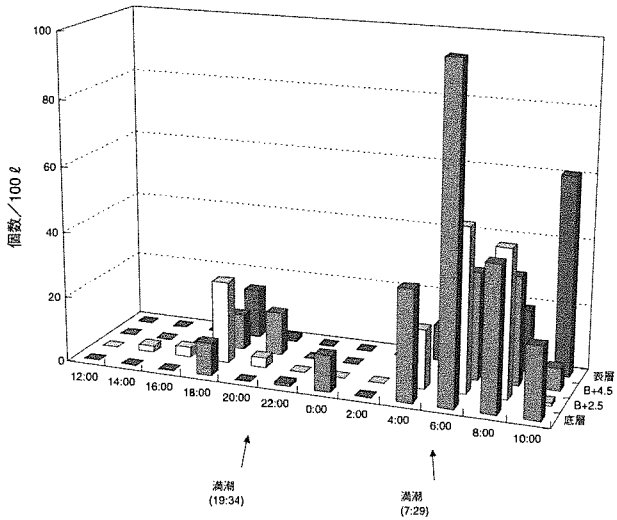
アサリ・アンボ期 (St.b)



その他の貝類・アンボ期 (St.b)



アサリ・フルグロウン期 (St.b)



その他の貝類・フルグロウン期 (St.b)

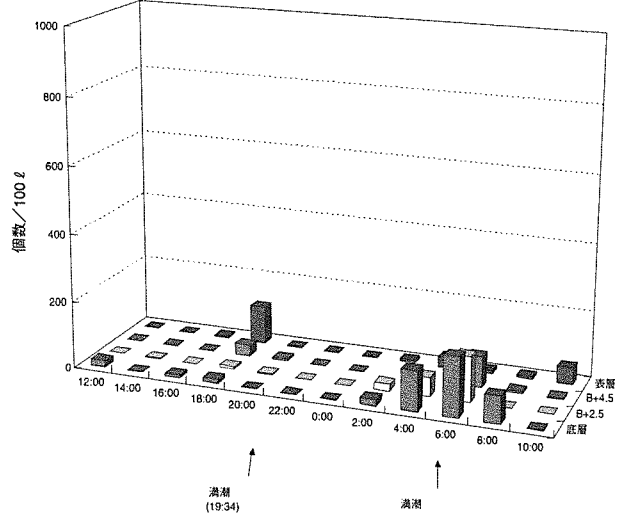
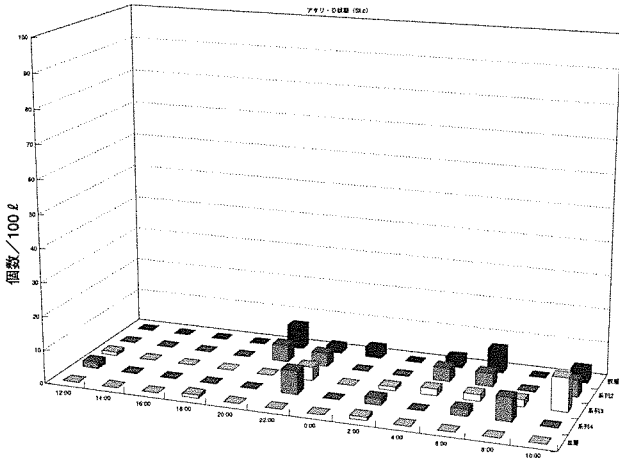
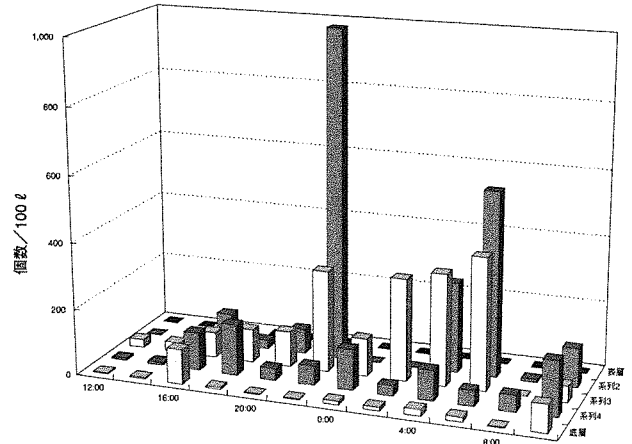


図2 st.bにおけるアサリ及びその他貝類浮遊幼生出現状況

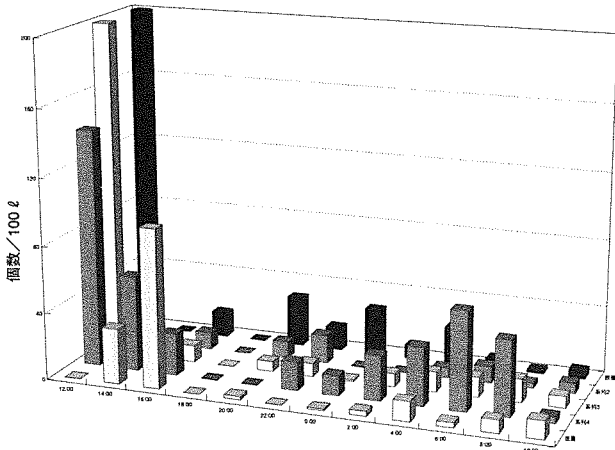
アサリ・D 状期 (St.c)



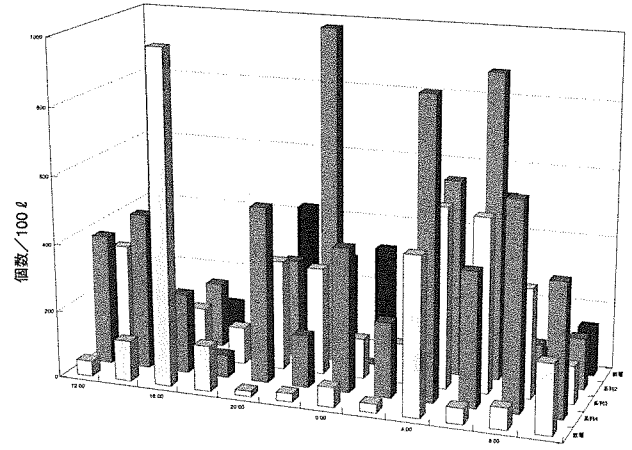
その他の貝類・D 状期 (St.c)



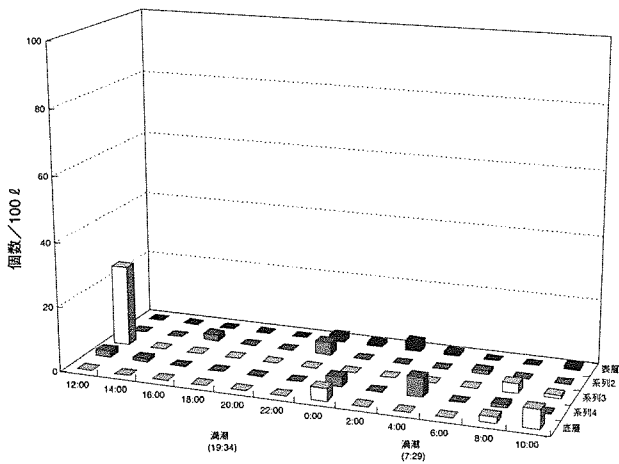
アサリ・アンボ期 (St.c)



その他の貝類・アンボ期 (St.c)



アサリ・フルグロウン期 (St.c)



その他の貝類・フルグロウン期 (St.c)

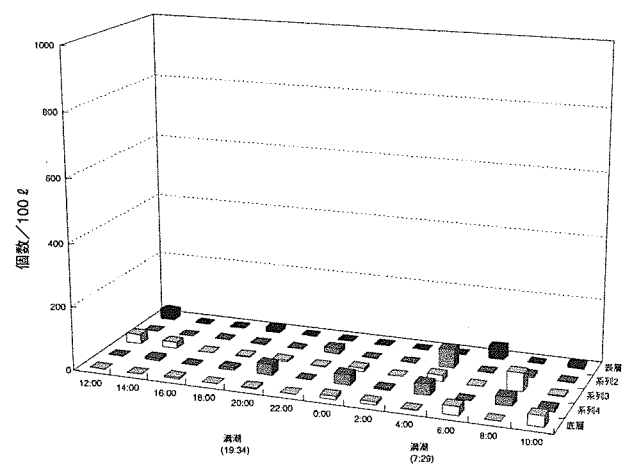


図3 st.cにおけるアサリ及びその他貝類浮遊幼生出現状況

熊本県におけるマダイの放流効果について

中尾和浩・平山 泉・陣内康成・山下博和・鳥羽瀬憲久

The stocking efficiency for Red sea bream (*Pagrus major*) off the coast of Kumamoto prefecture

Kazuhiro Nakao, Izumi Hrayama, Yasunari Jinnai,
Hirokazu Yamashita, Norihisa Tobase

キーワード：マダイ、放流効果、混獲率

本県の重要魚種であるマダイの人工種苗放流は、1970年代に種苗生産技術が確立し、熊本県栽培漁業センターの設置、(財)熊本県栽培漁業協会の設立とともに、盛んに行なわれるようになった。また、平成5年度から栽培漁業の定着化を図るため天草地域栽培漁業推進協議会を設立し中間育成、種苗放流を効率よく組織的に実施し、平成12年度からは熊本県栽培漁業地域展開協議会マダイ部会として漁業者自ら放流効果の把握に着手し始めたところである。今回、これまで実施してきたマダイの種苗の放流効果について経済効果を含め試算したので報告する。

材料および方法

種苗生産・中間育成・放流 マダイの種苗生産は、熊本県栽培漁業協会が実施し、中間育成・放流は、原則、漁業者、県内漁業協同組合が行なった。

放流効果調査 放流効果の把握は、市場調査及び伝票調査等により行なった。市場調査は、熊本市場（大海水産株式会社、熊本魚株式会社）、松島市場（松島漁業協同組合）、本渡市場（本渡市漁業協同組合）、牛深市場（牛深市漁業協同組合）の4ヶ所で行い月1回全数調査を原則として実施した。測定項目は、鼻孔連結状況（鼻孔隔皮欠損）、尾叉長、箱内魚体重、出荷者名等を調査した。また、調査は、熊本県漁業協同組合連合会、関係漁業協同組合、漁業者、牛深市役所、熊本県栽培漁業協会、天草水産産業指導所（現：天草地域振興局水産課）の協力を得て行なった。また、伝票調査は、関係市場の会計担当者の協力を得て実施した。

放流魚の識別 天然魚と放流魚の識別は、鼻孔隔皮

の左右どちらか、または、両方が欠損している個体を放流魚とした。

混獲率の推定 混獲率の推定は、市場調査で求められた放流魚尾数、調査尾数の割合に放流時の鼻孔隔皮欠損率を除いて求めた。

放流魚推定回収尾数、推定回収重量 広域資源培養管理対策推進事業で定めた種々のパラメータを用いて、天然魚と放流魚に分け図1に示した方法で年別、市場別を実施した。

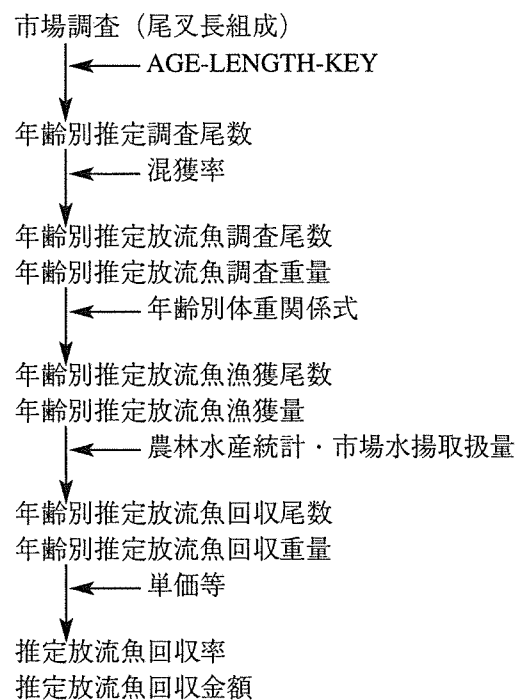


図1 回収率・回収金額推定方法

経済効果の試算 放流事業の経済効果については、千葉県¹⁾ 今井²⁾ の報告を参考に簡易な方法で算出を試みた。

効果の評価には、「総収益」、「利潤率（放流費用に対する粗利益の割合）、事業効率（総費用に対する総収入の割合）の3種類を用いた。また、算出にあたっては、計算方法は、下記のとおりである。

$$\begin{aligned} \text{総収益} &= (\text{漁業による収入}) - (\text{漁業経費} + \text{種苗放流費用}) \\ &= (\text{漁業による収入}) - \{ (\text{漁業による収入} \times \\ &\quad (1 - \text{漁業所得率}) + \text{種苗放流費用}) \} \end{aligned}$$

$$\text{利潤率} = \frac{(\text{漁業による収入}) - (\text{漁業経費})}{\text{種苗放流費用}}$$

$$\text{事業効率} = \frac{(\text{漁業による収入})}{(\text{漁業経費} + \text{種苗放流費用})}$$

結果および考察

混獲率 表1に、調査尾数に占める放流魚の割合、混獲率を示した。1989年～1999年の平均は、11.9%であったが、1998年～1999年は減少傾向を示した。これは、従来から比較的高い0～3才の混獲率が低下していることが要因にあげられる。また、混獲率の低下の兆候は、1997年の当才魚にみられる。混獲率の低下原因は、

1 福岡県³⁾ の事例のように近年、マダイ幼魚の資源水準が高水準で推移したり、卓越年級群の発生により資源量そのものが大きくなり人工種苗が過小評価され混獲率が低下する。

2 鹿児島県⁴⁾ の事例のように放流直前の疾病の発生による放流後の生残の低下や放流尾数総数の減少により低下する。

3 近年の遊漁者の増加による放流直後の釣獲により低下する。以上の点が主原因と推察されるが、本県の場合、中間育成は、順調に実施しており大量へい死につながる疾病等は発生していないこと、放流種苗総数は計画どおり実施されていることなどから、混獲率低下の要因は、マダイ幼魚の資源水準が高水準で1998年及び1999年の1才魚に卓越年級が発生し天然資源の増大によるもの。また、放流直後における遊漁者の漁獲圧の影響によるものではないかと推察される。

放流魚推定回収尾数、推定回収重量 放流魚回収尾数、回収重量、回収率の推定結果を表2に、年別回収金額を表3に示した。熊本県海域の放流マダイ累積回収状況は、1989年～1999年放流群を推定し試算した結果、平均回収尾数は167,220尾で、平均回収率は、8.8%となった。また、回収重量は、約98.5トン、回収金額は、約185百万円となり、平均事業費

63百万円に対する比率は約2.9倍と推定された。これは、1989年～1995年⁵⁾ と比較すると回収金額、回収率とも低下しているが、その要因として、1997年～1999年の混獲率低下が影響している。

経済効果の試算 経済効果について、以下のとおり算出した。漁業による収入は、表3の平均回収金額を用いた。漁業所得率は⁶⁾、の東シナ海区動力漁船1～3トンと3～5トンの{(漁業生産物収入－漁業支出)／漁業生産物収入}の平均を用いた。

種苗放流費用は、平成5年度から平成10年度の種苗放流経費の平均金額を用いた。

$$\begin{aligned} \text{総収益} &= 185 \text{百万円} - \{ (185 \text{百万円} \times (1 - 0.45) \\ &\quad + 63 \text{百万円}) \} \\ &= 20 \text{百万円} \end{aligned}$$

$$\text{利潤率} = \frac{185 \text{百万円} - 102 \text{百万円}}{63 \text{百万円}} = 1.3$$

$$\text{事業効率} = 1.1$$

効果の評価については、神奈川県²⁾ 同様総収入、利潤率、事業効率いずれもプラスあるいは1以上となり経済効果があることが確認された。

要 約

- (1) 熊本県海域におけるマダイの放流効果を推定した。
- (2) 放流魚マダイの混獲率は、減少傾向にあることがわかった。これは、0～3才の混獲率の減少によるもので、マダイ幼魚資源が高水準であること、1998年及び1999年の1才魚に卓越年級群が発生し天然資源が増大していること、放流直後における遊漁者による漁獲圧の増大が要因と考えられた。
- (3) 1989年～1999年までの放流群の平均回収率は、8.8%であった。平均回収金額は、185,602千円と推定された。
- (4) 経済効果の試算をした結果、純利益は20百万円、利潤率は1.3、事業効率1.1であった。その結果、経済効果があることが確認された。

文 献

- 1) 千葉県(1997)：平成9年度資源管理型漁業推進総合対策事業広域栽培資源放流管理手法開発調査(マダイ)報告書 太平洋中ブロック
- 2) 今井利為(1997)：神奈川県におけるマダイ種苗放流の経済的評価について. 栽培技研, 26(1)
- 3) 福岡県(1998)：平成10年度福岡県水産海洋技術

センター事業報告

- 4) 鹿児島県(1998):平成10年度鹿児島県水産試験場事業報告書漁業部編
- 5) 熊本県(1996):平成8年度熊本県水産研究センター事業報告書
- 6) 九州農政局情報統計部(2000):第46次熊本県農林水産統計年報

表1 年齢別混獲率

年/年齢		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10以上	計
1989年	調査尾数(A)	2,646	4,660	2,605	1,063	347	176	101	88	48	34	38	11,806
	放流魚数(B)	228	542	270	77	30	19	3	8	0	0	0	1,177
	混獲率(C)	8.6%	11.6%	10.4%	7.2%	8.6%	10.8%	3.0%	9.1%	0.0%	0.0%	0.0%	10.0%
1990年	A	1,836	4,788	3,045	1,696	1,016	588	399	246	161	90	162	14,027
	B	81	853	497	201	65	32	14	8	2	2	0	1,755
	C	4.4%	17.8%	16.3%	11.9%	6.4%	5.4%	3.5%	3.3%	1.2%	2.2%	0.0%	12.5%
1991年	A	4,179	4,325	3,354	1,608	952	531	343	219	156	93	154	15,910
	B	532	738	633	289	123	54	25	9	4	2	2	2,408
	C	12.7%	17.1%	18.9%	18.0%	12.9%	10.1%	7.2%	3.9%	2.3%	2.2%	1.0%	15.1%
1992年	A	6,521	3,861	3,663	1,519	887	474	286	191	150	95	145	17,792
	B	982	623	769	377	181	75	35	9	5	2	3	3,061
	C	15.1%	16.1%	21.0%	24.8%	20.4%	15.8%	12.2%	4.7%	3.3%	2.1%	2.1%	17.2%
1993年	A	3,844	8,151	5,664	2,493	1,432	972	677	413	308	192	222	24,368
	B	543	1,513	753	397	272	117	73	23	13	12	3	3,719
	C	14.1%	18.6%	13.3%	15.9%	19.0%	12.0%	10.8%	5.6%	4.2%	6.3%	1.4%	15.3%
1994年	A	4,063	3,931	3,304	2,221	966	541	367	278	205	128	181	16,185
	B	274	477	562	404	168	142	47	18	9	9	1	2,111
	C	6.7%	12.1%	17.0%	18.2%	17.4%	26.2%	12.8%	6.5%	4.4%	7.0%	0.6%	13.0%
1995年	A	1,890	4,534	4,445	1,751	1,063	710	405	312	215	128	131	15,584
	B	232	425	480	306	177	125	54	23	18	6	5	1,851
	C	12.3%	9.4%	10.8%	17.5%	16.7%	17.6%	13.3%	7.4%	8.4%	4.7%	3.8%	11.9%
1996年	A	1,042	3,872	3,676	2,156	1,153	728	466	408	328	219	241	14,289
	B	125	814	484	288	194	113	60	49	14	11	9	2,161
	C	12.0%	21.0%	13.2%	13.4%	16.8%	15.5%	12.9%	12.0%	4.3%	5.0%	3.7%	15.1%
1997年	A	3,230	3,741	3,865	2,173	1,446	874	482	351	272	202	241	16,877
	B	80	591	1,058	326	162	109	32	26	16	5	3	2,408
	C	2.5%	15.8%	27.4%	15.0%	11.2%	12.5%	6.6%	7.4%	5.9%	2.5%	1.2%	14.3%
1998年	A	4,100	8,280	5,401	1,786	1,190	761	476	385	238	148	239	23,004
	B	44	192	366	314	129	51	42	27	12	4	4	1,185
	C	1.1%	2.3%	6.8%	17.6%	10.8%	6.7%	8.8%	7.0%	5.0%	2.7%	1.7%	5.2%
1999年	A	2,129	9,087	5,174	2,480	1,273	858	502	329	246	184	252	22,514
	B	100	310	165	144	137	55	33	10	9	5	6	974
	C	4.7%	3.4%	3.2%	5.8%	10.8%	6.4%	6.6%	3.0%	3.7%	2.7%	2.4%	4.3%
平均	A	3,225	5,385	4,018	1,904	1,066	656	409	293	212	138	182	17,487
	B	293	643	549	284	149	81	38	19	9	5	3	2,074
	C	9.1%	12.0%	13.7%	14.9%	14.0%	12.4%	9.3%	6.5%	4.4%	3.8%	1.8%	11.9%

表2 放流年別回収尾数・回収重量

放流年/年齢	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10以上	計	放流尾数	回収率
1989年	45,876	87,675	64,258	42,648	17,055	12,672	4,800	3,555	1,126	256	351	280,271	920,000	30.5%
回収尾数(A)	3,532	21,568	33,414	41,070	21,796	24,431	12,159	11,379	4,372	1,168	1,844	176,734		
回収重量(B)	8,310	74,969	87,085	24,847	15,027	11,136	4,364	1,822	563	288	351	228,764	1,421,000	16.1%
1990年	640	18,442	45,284	23,928	19,204	21,471	11,055	5,834	2,187	1,317	1,844	151,206		
A	53,800	70,374	47,220	36,137	15,820	8,193	2,232	739	528	272	351	235,666	821,000	28.7%
B	4,143	17,312	24,555	34,800	20,218	15,795	5,654	2,365	2,050	1,242	1,844	129,979		
1992年	111,475	95,034	50,214	27,308	14,064	7,665	2,010	573	739	272	351	309,704	1,368,000	22.6%
A	8,584	23,378	26,111	26,298	17,973	14,779	5,090	1,833	2,870	1,242	1,844	130,003		
B	33,975	42,523	42,782	20,975	11,363	3,116	1,922	1,045	610	277	351	158,939	1,623,500	9.8%
1993年	2,616	10,461	22,247	20,199	14,522	6,007	4,868	3,344	2,369	1,267	1,844	89,744		
A	24,336	37,982	35,230	22,870	8,221	3,185	2,055	785	626	274	351	135,915	1,569,000	8.7%
B	1,874	9,344	18,319	22,024	10,507	6,141	5,204	2,514	2,430	1,251	1,844	81,451		
1995年	20,717	59,035	74,305	6,626	7,975	4,655	1,995	801	658	274	351	177,395	2,530,900	7.0%
A	1,595	14,523	38,639	6,381	10,193	8,976	5,054	2,563	2,556	1,253	1,844	93,577		
B	9,078	41,473	11,056	8,344	9,187	3,652	1,991	877	631	275	351	86,915	2,596,000	3.3%
1996年	699	10,202	5,749	8,035	11,741	7,041	5,042	2,807	2,452	1,257	1,844	56,870		
A	5,666	18,008	9,604	12,614	8,461	3,831	2,014	821	638	274	351	62,283	2,700,600	2.3%
B	436	4,430	4,994	12,147	10,813	7,386	5,100	2,628	2,479	1,254	1,844	53,512		
1998年	12,327	17,922	31,655	9,195	8,541	4,046	2,000	833	643	275	351	87,787	2,693,500	3.3%
A	949	4,409	16,461	8,854	10,915	7,801	5,066	2,666	2,496	1,255	1,844	62,716		
B	5,805	25,801	17,438	10,051	8,730	3,843	2,001	844	638	275	351	75,776	2,636,450	2.9%
1999年	447	6,347	9,068	9,679	11,156	7,410	5,069	2,700	2,476	1,255	1,844	57,451		
平均												167,220	1,898,177	8.8%

□ は、推測値

表3 年別回収金額

	1989年	1990年	1991年	1992年	1993年	1994年	1995年	1996年	1997年	1998年	1999年	平均
回収重量 kg	176,734	151,206	129,979	130,003	89,744	81,451	93,577	56,870	53,512	62,716	57,451	98,477
単価 円/kg	2,250	2,198	2,107	1,938	1,791	1,662	1,657	1,741	1,650	1,386	1,052	1,767
回収金額・千円	397,691	332,318	273,897	251,890	160,759	135,332	155,095	99,002	88,295	86,897	60,446	185,602

2000年7月に八代海で発生した *Cochlodinium polykrikoides* 赤潮について

吉村直晃・安東秀徳・木村武志・小山長久

Studies on *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) causing red tide
in Yatushiro sea in July 2000

Naoaki Yoshimura, Hidenori Andoh, Takeshi Kimura and Nagahisa Oyama

キーワード：赤潮、*Cochlodinium polykrikoides*、八代海

2000年7月7日、八代海において *Cochlodinium polykrikoides* (以下「コックロディニウム」と訳す。)による赤潮が発生した。この赤潮は8月1日まで26日間にわたり発生し、発生海域は八代海のほぼ全域におよんだ。これまでの研究で、本種による赤潮発生は、表1に示すように梅雨明け後の天候に依存することがわかったが¹⁾、その発生初期段階から赤潮形成にいたる間、現場海域の海況や他の生物との相互作用等の本種をとりまく環境が、どのように影響を及ぼしているのかについてはよく知られていない。本報告では、コックロディニウムの増殖機構を解明するため、発生海域のプランクトンの動態把握と、それに及ぼす環境要因について検討した。また今回の赤潮被害は表2に示す1978年以降の赤潮被害と比較して甚大であったため、被害内容についても記載した。

方 法

赤潮の調査は調査船「ひのくに」による図1に示す9定点を6月から9月にかけて実施する週1回の赤潮定期調査により行った。調査内容は表3に示す、

表1 8月のコックロディニウムポリクリコイデス赤潮の発生を予察する7月の気象条件

項 目	条 件
7月の平均気温	27℃以上
7月中下旬の降水量	200mm以下
7月の日照時間	200時間以上

水温、塩分、透明度、水色、DO、クロロフィル a、栄養塩 (NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N、PO₄-P)、プランクトンについて実施し、赤潮発生時は調査船「あさみ」及び「つぐみ」による臨時調査を行い、発生海域、赤潮生物種、細胞数について調査を行った。

八代海の水温及び塩分の連続的な変化については芦北郡田浦町地先に設置した自動観測ブイによる表層水の1時間毎の観測データを1日の平均値に変換して用いた。

気象観測については熊本地方気象台が発行する「気象月報」を用いた。

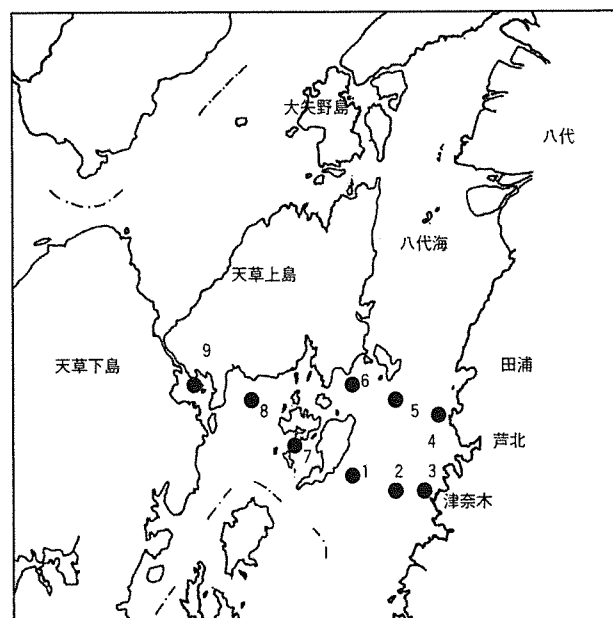


図1 調査定点

表2 1978年から1998年までの熊本県における赤潮による漁業被害状況

年	赤潮発生状況		熊本県水産振興課とりまとめ							構成プランクトン					
	発生	～ 終息	海域	発生場所	種別	魚種等	尾数	重量(kg)	金額(千円)						
1978	7月24日	～	8月3日	八代海	龍ヶ岳町	養殖業	タイ	37,430		15,670	Gymnodinium				
							ブリ	12,150		13,632					
		御所浦町	養殖業	ブリ	180		648								
		津奈木町	養殖業	タイ	200		70								
8月21日	～	9月2日	八代海	龍ヶ岳町	養殖業	ブリ	2,600		8,491	Gymnodinium					
						漁獲物	ボラ		1,710		678				
						御所浦町	養殖業	ブリ	6,500			17,621			
					計				57,210						
1979	被害なし														
1980	被害なし														
1981	8月10日	～	8月12日	八代海	御所浦町	魚類養殖	ブリ(2年)	6,000		12,000	Cochilodinium '78八代型				
							ブリ(3年)	200		1,200					
						計				13,200					
1982	被害なし														
1983	被害なし														
1984	9月3日	～	9月5日	八代海	津奈木町 田浦町	覆蓋	ハモ	320	200	278	Gymnodinium breve				
							かご	メバル	80			6			
								カサゴ	10						
								カワハギ	10						
					計				284						
1985	8月31日	～	9月17日	八代海	芦北町	養殖業	マダイ	132,700		55,700	Cochilodinium '78八代型				
							イシダイ	100		210					
							クロダイ	1,800		693					
							アジ	22,200		2,629					
							その他	900		90					
							計			59,322					
1986	被害なし														
1987	被害なし														
1988	8月20日	～	8月28日	八代海	御所浦町	元浦	養殖業	マアジ	2,000		245	Heterosigma akashiwo Prorocentrum sp.			
	8月26日	～	8月28日	八代海	新和町	養殖業	ハマチ	3,760		1,580	Chaetonea antiqua				
							ブリ	3,860		10,370					
						アジ	2,500		300						
	8月24日	～	8月28日	八代海	龍ヶ岳町	養殖業	ハマチ	7,477		7,103	Chaetonea antiqua				
						ブリ	1,923		7,115						
	8月24日	～	8月28日	八代海	河浦町	宮野河内	養殖業	ハマチ	1,500		675	Chaetonea antiqua			
						ブリ	1,753		3,330						
	9月4日	～	9月8日	八代海	姫戸町	姫浦	漁獲物	ボラ	3,750		1,350	Chaetonea antiqua			
	9月10日	～	9月14日	八代海	本渡市	楠浦湾	養殖業	ブリ	850		2,100	Chaetonea antiqua			
	9月26日	～	9月29日	八代海	河浦町	宮野河内	養殖業	ハマチ	300		135	Heterosigma akashiwo			
					ブリ	1,549		2,943							
					アジ	1,000		130							
10月25日	～	11月22日	有明海	熊本県北部	ノリ養殖	ノリ色落	不明		不明	Chaetoceros curvisetum 等					
					計				37,376						
1989	8月6日	～	8月21日	八代海	中部全域	養殖業	マダイ	31,100		9,450	Gymnodinium nagasakiense				
							ブリ	70,170		92,704					
							トラフグ	83,500		54,490					
							マアジ	305,000		1,900					
			漁獲物	カサゴ等		50									
	12月11日	～	12月13日	有明海	長洲町～三角町	ノリ養殖	ノリ色落	不明		不明	Skeletonema costatum 等				
12月20日	～	12月22日	有明海	菊池川尻～館田町	ノリ養殖	ノリ色落	不明		不明	Skeletonema costatum					
					計				158,594						
1990	7月6日	～	7月31日	有明海	熊本県ほぼ全域	養殖業	ブリ	26,998		51,585	Chaetonea antiqua				
	7月16日	～	8月7日	八代海	熊本県ほぼ全域	養殖業	ブリ	822,689		990,562	Chaetonea antiqua				
						マダイ	11,100		1,493						
						イシダイ	550		136						
						アジ	3,000		450						
9月2日	～	9月10日	八代海	水俣、芦北地域	養殖業	トラフグ	1,000		130	Cochilodinium '78八代型					
					チヌ	2,500		750							
					ブリ	50		200							
					マダイ	3,600		9,000							
					計				1,054,338						
1991	1月30日	～	3月20日	有明海	熊本県全域	ノリ養殖	ノリ色落	不明		不明	Eucampia zoodiacus 等				
	8月5日	～	8月14日	八代海	田浦町	養殖業	マダイ	25,000		2,750	Cochilodinium '78八代型				
						クロダイ	2,000		900						
					マアジ	1,000		140							
					津奈木町	トラフグ	3,000		6,300	Cochilodinium '78八代型					
					ブリ	600		3,000							
					計				13,090						
1992	8月19日	～	9月3日	有明海	大矢野町、有明町	養殖業	ブリ	158,400		300,990	Chaetonea antiqua				
1993	被害なし														
1994	9月6日	～	10月12日	八代海	本渡市	楠浦湾	養殖業	アコヤガイ	679,000		185,000	Heterocapsa sp.			
							天然	アサリ		100 t	40,000				
1995	2月7日	～	2月19日	有明海	長洲～荒尾地先	ノリ養殖	ノリ色落	不明		不明	Chaetoceros spp. 等				
	2月7日	～	2月19日	有明海	網田～横島地先	ノリ養殖	ノリ色落	不明		不明	Chaetoceros spp. 等				
1996	6月9日	～	1日間	八代海	御所浦町	ウドシ	養殖業	トラフグ	10,000		不明	Gymnodinium sp.			
								御所浦町	牧島	養殖業	トラフグ		10,000		不明
								新和町	大多尾	養殖業	トラフグ		15,000		不明
								水俣市		養殖業	ハモ		不明		不明
					計										
1997	被害なし														
1998	7月17日	～	8月6日	有明海	有明町	大浦	養殖業	ブリ	160		128	Chaetonea antiqua Ceratum furca			
	8月6日	～	8月16日	八代海	津奈木町		養殖業	ブリ	30		57	Cochilodinium '78八代型			
							計			185					
1999	2月12日	～	3月29日	有明海	長洲町～宇土市長浜	ノリ養殖	ノリ色落	不明		不明	Eucampia zoodiacus				
	8月19日	～	8月26日	八代海	津奈木町	養殖業	トラフグ1年	13,450		4,707	Cochilodinium polykrikoides				
						トラフグ2年	15,250		53,200						
						計				57,907					

表3 調査項目および測定方法

調査項目	測定方法	使用機器
水温	白金測温抵抗体	メモリークロテック モデル ALC208DK (アレック電子株式会社製)
塩分	電磁誘導型セル	メモリークロテック モデル ALC208DK (アレック電子株式会社製)
クロロフィル	蛍光強度測定法	メモリークロテック モデル ALC208DK (アレック電子株式会社製)
濁度	赤外後方散乱式	メモリークロテック モデル ALC208DK (アレック電子株式会社製)
透明度	セッキー板法	セッキー板
NH ₄ -N	インドフェノール青法	TRAACS 2000 (ブラン・ルーベ株式会社製)
NO ₂ -N	ジアゾ化法	TRAACS 2000 (ブラン・ルーベ株式会社製)
NO ₃ -N	Cd-Cuカラム還元-ナフチルエチレンジアミン吸光度法	TRAACS 2000 (ブラン・ルーベ株式会社製)
PO ₄ -P	モリブデン青法	TRAACS 2000 (ブラン・ルーベ株式会社製)

発生海域の経時的な変動については調査船による調査の他、御所浦町水産研究センター、熊本県養殖漁業協同組合、津奈木町漁業協同組合及び水産研究センターに赤潮生物計数依頼のため赤潮海水を持ち込んだ漁業協同組合からの聞き取り情報を用いた。また水産庁九州漁業調整事務所が行う航空機による赤潮発生海域調査の情報も合わせて用いた。

被害状況については、天草及び八代地域振興局水産課が関係4市22町で調査を行い水産振興課でとりまとめた内容を用いた。

結 果

気 象

表4及び図2に6月から8月にかけての熊本市における旬別平均気温変化を示した。気温は6月以降高めに推移し、特に6月下旬から7月下旬にかけて0.6℃以上高い状態が続いた。

表5及び図3に6月から8月にかけての熊本市における旬別平均降水量の変化を示した。6月中旬から7月の中旬にかけては、梅雨にあたるため、平均で100 mm以上の降雨を記録するが、1999年は6月下旬から平年値を下回り、特に例年であれば200 mm近い降雨を記録する7月上旬では、ほとんど雨が降らなかった。

表6及び図4に6月から8月にかけての熊本市における旬別平均日照量の変化を示した。7月上旬に

表4 熊本市における気温の推移および平均差(6~8月)

	平年値	1999年	平年差
6月上旬	22.0	21.8	-0.2
中旬	22.8	22.8	0.0
下旬	24.0	25.6	1.6
7月上旬	25.5	27.5	2.0
中旬	27.1	28.1	1.0
下旬	28.0	28.6	0.6
8月上旬	28.0	28.3	0.3
中旬	27.8	27.9	0.1
下旬	27.1	28.7	1.6

ほとんど降雨がなかったことから、特にこの時期の日照が多かった。

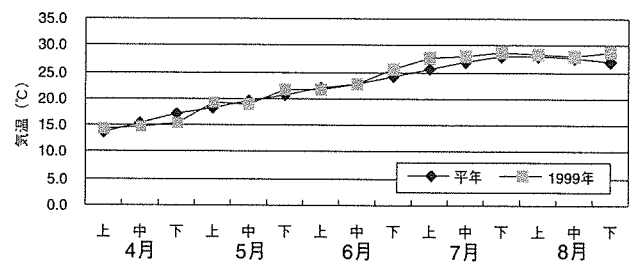


図2 4月～8月にかけての熊本市における気温の推移(1999年と平均値の比較)

表5 熊本市における降水量の推移および平均差(6~8月)

	平年値	1999年	平年差
6月上旬	71.6	153.0	81.4
中旬	126.6	132.0	5.4
下旬	194.6	160.5	-34.1
7月上旬	195.0	3.0	-192.0
中旬	127.9	85.0	-42.9
下旬	69.8	72.0	2.2
8月上旬	57.6	11.5	-46.1
中旬	55.5	53.5	-2.0
下旬	76.5	83.5	7.0

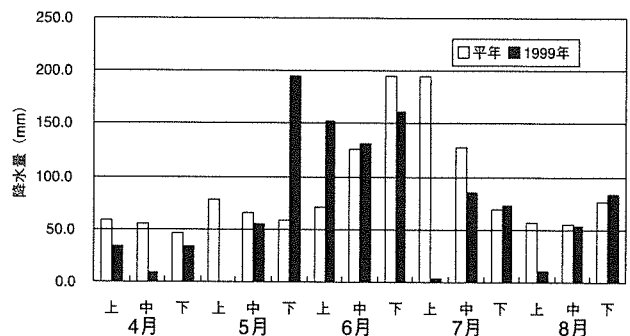


図3 4月～8月にかけての熊本市における降水量の推移(1999年と平均値の比較)

表6 熊本市における日照時間の推移および平均差(6~8月)

	平年値	1999年	平年差
6月上旬	61.6	55.2	-6.4
中旬	43.5	49.6	6.1
下旬	39.2	27.8	-11.4
7月上旬	46.8	89.5	42.7
中旬	58.7	58.9	0.2
下旬	81.1	64.4	-16.7
8月上旬	72.2	73.4	1.2
中旬	69.6	60.2	-9.4
下旬	69.3	81.2	11.9

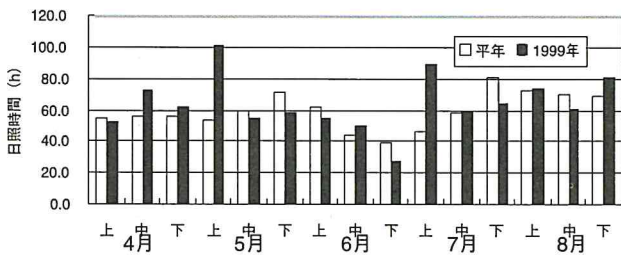


図4 4月~8月にかけての熊本市における日照時間の推移(1999年と平均値の比較)

プランクトン発生状況

図5に御所浦島東南海域にある定点1の6月15日から8月9日にかけての水深10mまでの柱状採水によるプランクトンの種組成の変化を示した。現場海域における種組成の変化は、7月7日までは珪藻が優占したが、13日および18日ではコックロディニウムが優占した。8月1日には珪藻の急激な増殖がみられ、再び優占種となった。

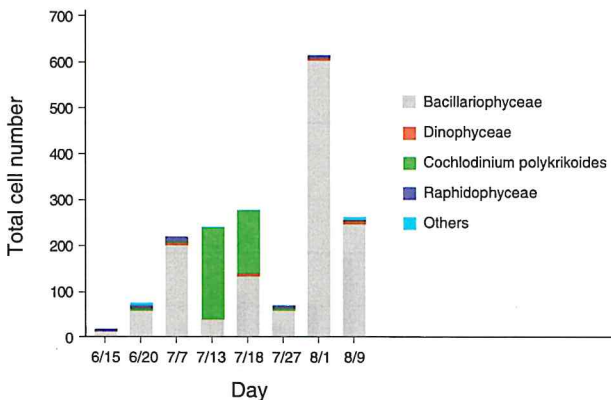


図5 St.1におけるプランクトン組成(細胞数)の経時変化

水温、塩分およびクロロフィルの鉛直的变化

図6に定点1の6月8日から8月9日にかけての水温、塩分およびクロロフィルaの鉛直的变化を示

した。気温の上昇による表層水温の上昇に伴い、水温躍層は表層から10~20mに形成された。水温躍層は7月18日~27日にかけて特に発達し、表層水温は25~27.5℃に達した。その後、7月下旬の台風接近による降雨により表層水が冷却され、8月1日には水温躍層が一時的に崩壊していたが、天候の安定により、再び強固な躍層が形成された。塩分については、水温と同様の変化を示した。

クロロフィルaは、期間中3つのピークが確認された。観測当初、珪藻の増殖による濃度上昇が見られたが、6月20日には減少した。7月7日から18日にかけては、コックロディニウムの増殖に伴う濃度上昇が見られたが、27日には減少し、8月1日には珪藻の増殖による濃度上昇が再び観察された。

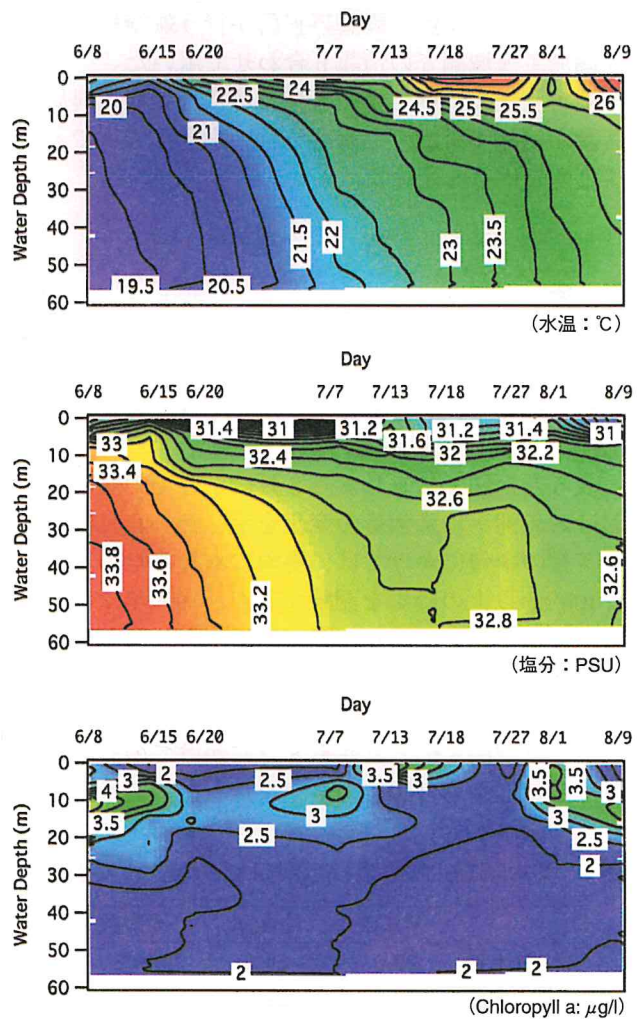


図6 St.1における水温、塩分およびChlorophyll aの経時変化(6/8~8/9)

栄養塩の鉛直的变化

図7に定点1の6月8日から8月9日にかけてのDIN, NH₄-N, NO₂-NおよびNO₃-Nの鉛直的变化を示

した。表層DINは、観測当初から珪藻を主体とするプランクトンの増殖に伴い減少し、強固な水温躍層が発達したことで、底層から表層への栄養塩供給が絶たれたため、期間中常に枯渇していた。底層では表層と比較して常に濃度が高く、 $4 \mu\text{g-at/L}$ 前後で推移し、7月18日に最高値 ($6 \mu\text{g-at/L}$) になった。底層 $\text{NH}_4\text{-N}$ は、ほぼ1ヶ月周期で増減を繰り返し、6月8日、7月7日および8月9日に濃度が高くなった。底層 $\text{NO}_2\text{-N}$ についても1ヶ月周期の増減が観察

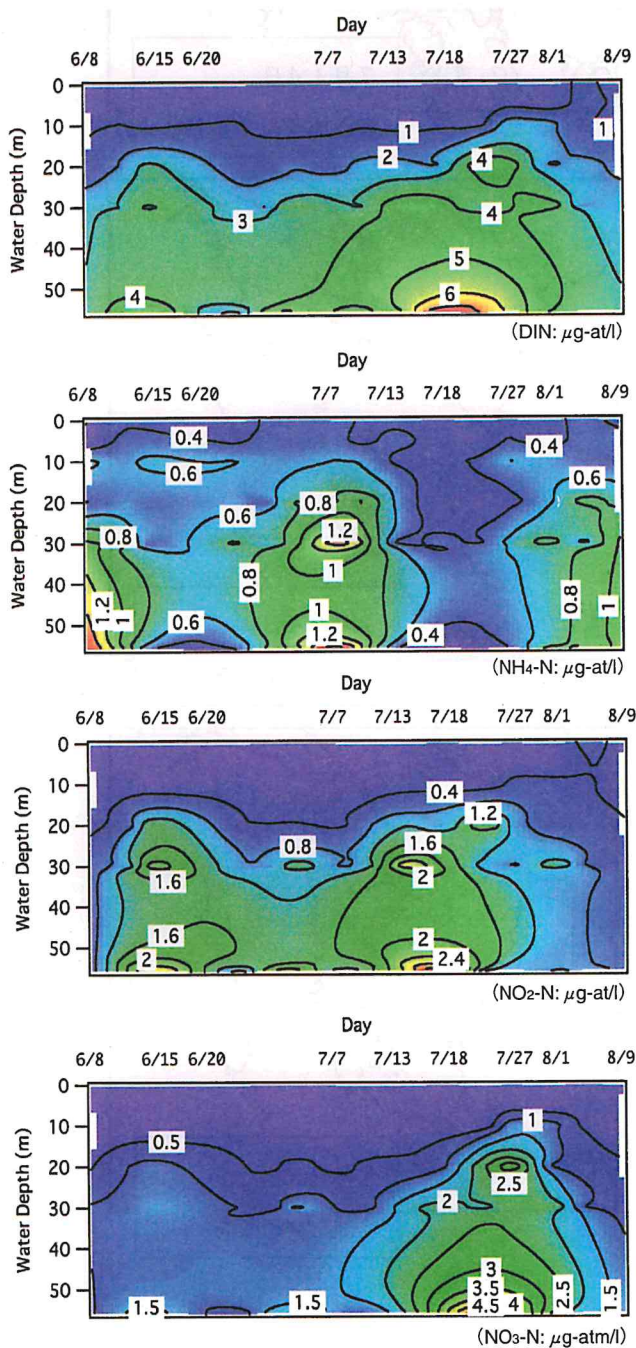


図7 St.1におけるDIN, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ および $\text{NO}_3\text{-N}$ の経時変化 (6/8~8/9)

され、6月15日および7月13日に濃度が高くなった。底層 $\text{NO}_3\text{-N}$ は、7月18日から27日にかけて濃度が高くなった。

図8に定点1の6月8日から8月9日にかけての $\text{PO}_4\text{-P}$ および N/P 比の鉛直的变化を示した。無機窒素化合物と同様に、表層で低く、底層で高い状態が続き、7月18日に濃度が上昇した。表層の N/P 比は、観測当初は比較的値が高い状態で推移したが、7月7日以降低くなった。

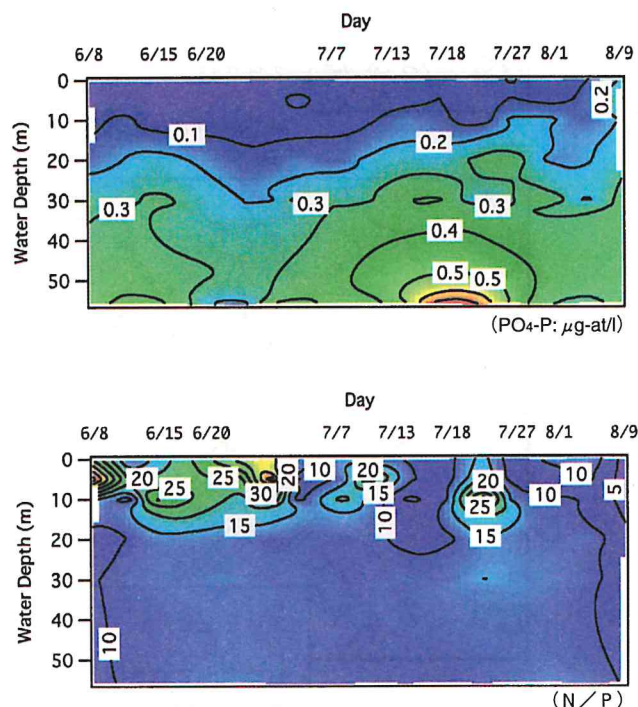


図8 St.1における $\text{PO}_4\text{-P}$ および N/P 比の経時変化 (6/8~8/9)

発生海域

図9及び表7に発生海域と細胞数の変化を示した。八代海の芦北郡津奈木町地先から天草郡御所浦島周辺を中心とした海域で6月29日からコックロディニウムの栄養体細胞が確認され始め、7月7日に津奈木町沖で赤潮化した状態が確認された。12日から17日にかけて御所浦島周辺を中心に発生海域は拡大し、19日の水産庁九州漁業調整事務所が実施した飛行観測によると八代海の御所浦島以北のほぼ全域で着色が見られた。この時期に御所浦町を中心に最も被害が拡大した。21日には本渡市の楠浦湾内まで着色域が拡大し、24日には牛深市久玉湾内までさらに拡大した。26日になると御所浦町、牛深市では沈静化した。天草郡大矢野町維和島周辺での濃密な赤潮状態が観察された。その後8月2日に赤潮化は終息したが、細胞は8月16日まで各調査定点で確認された。

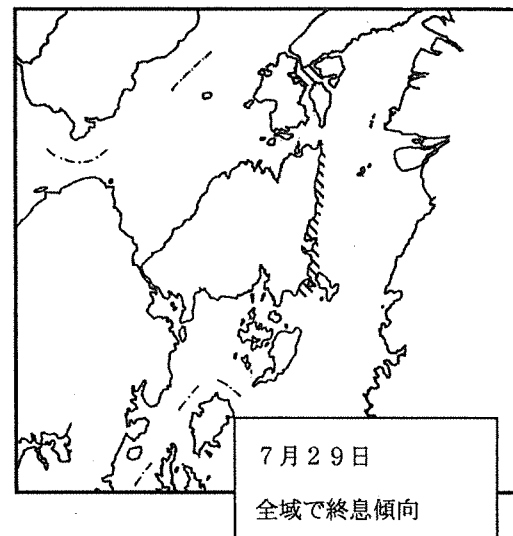
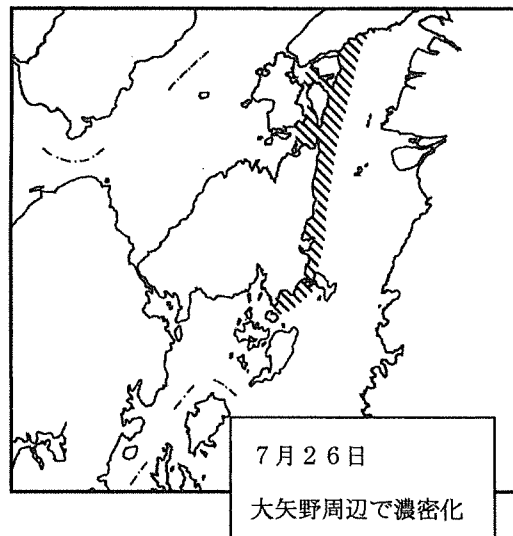
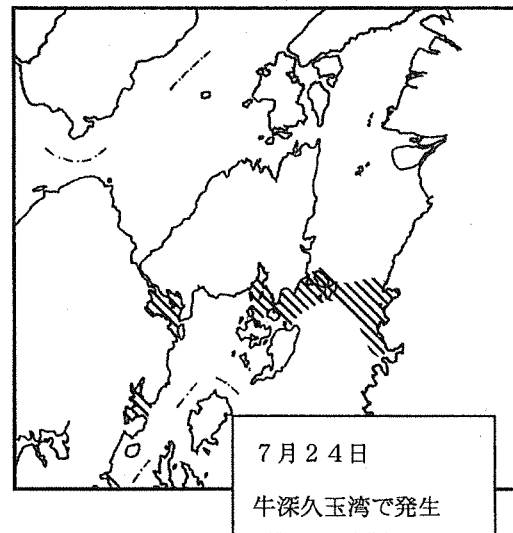
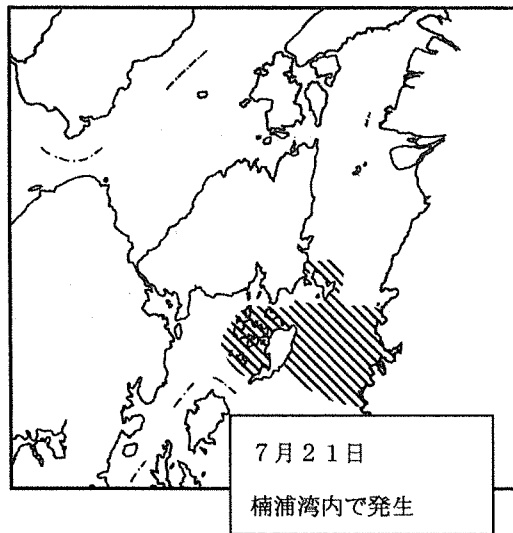
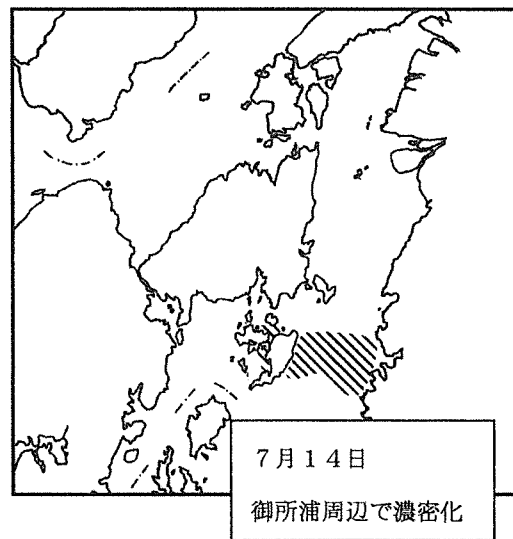
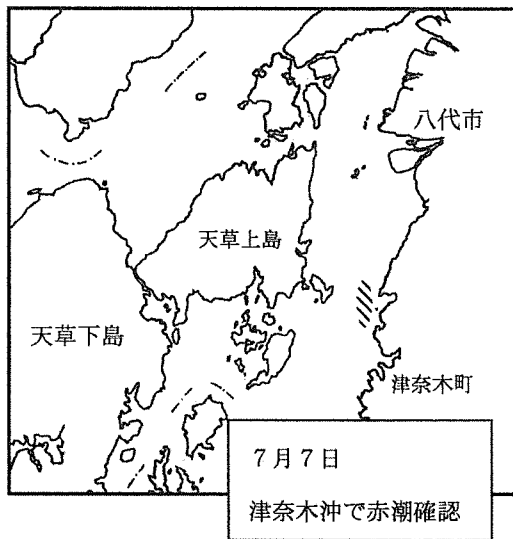


図9 赤潮発生の推移（水産研究センター調査による）

表7 赤潮発生の推移

月日	状況
6月26日	八代海南部で1細胞/mlの細胞を確認
6月29日	芦北沖で4細胞/mlの細胞を確認
7月7日	津奈木沖で1,000細胞/ml程度の赤潮状態を確認
7月13日	津奈木沖から御所浦島東側にかけて500細胞/ml程度の赤潮状態を確認 九州漁業調整事務所赤潮飛行調査でパッチ状で八代市二見沖、田浦町～津奈木沖、栢本沖、姫戸町牟田沖で発生を確認
7月14日	御所浦島周辺から樋島沖に向け、最高で1,800細胞/mlの赤潮を確認
7月17日	調査で、御所浦周辺でさらに濃密化し、津奈木沖から八代海中央部全域にかけて拡大を確認。樋島沖で28,250細胞/mlを確認
7月19日	九州漁業調整事務所赤潮飛行調査で八代海全域で着色域を確認
7月21日	楠浦湾まで赤潮の拡大を確認
7月24日	新和町中田湾から牛深市久玉湾まで赤潮の拡大を確認
7月26日	大矢野島東側、樋の島周辺で濃密化、御所浦、河浦、牛深周辺は沈静化
7月27日	九州漁業調整事務所赤潮飛行調査で御所浦東側沿岸、天草上島東側沿岸、大矢野島東側沿岸で着色域を確認
8月1日	熊本県海域で赤潮状態の終息を確認

表8 八代海におけるコックロディニウム赤潮による漁業被害状況

1999年8月23日 熊本県水産振興課とりまとめ

市町	漁協	魚種	年齢	尾数	被害金額 (千円)	被害経営体数	
芦北町	芦北	トラフグ	1	6,000	1,050		
		マダイ	3	150	146		
市町計				6,150	1,196	2	
津奈木町	津奈木	トラフグ	1	86,000	15,050		
			2	44,300	67,004		
			3	5,000	17,188		
		マダイ	2	150	49		
			3	55,750	35,541		
			4	41,580	54,574		
			4	41,580	54,574		
		カンパチ	3	100	620		
		ブリ	3	120	761		
		マアジ	2	1,000	300		
ヒラメ	1	190,000	123,500				
2	5,000	12,500					
市町計				429,000	327,085	8	
大矢野町	大矢野町	トラフグ	1	8,400	1,470		
市町計				2,3	6,200	13,640	3
松島町	松島	カンパチ	3	80	310		
			3	40	60		
		マアジ	3	150	30		
			3	10	47		
市町計				280	447	3	
龍ヶ岳町	龍ヶ岳町	トラフグ	1	150,000	26,250		
			2	70,000	134,750		
		マダイ	1	10,000	1,250		
			2	48,000	17,400		
			3	39,000	26,325		
			4	16,000	18,000		
			5	7,000	10,500		
		ブリ	2	4,900	9,555		
			3	100	390		
		クロダイ		500	285		
				2,000	2,400		
				1,500	2,550		
		イシダイ		1,200	4,860		
		アジ等		90,000	10,000		
漁協計				440,200	264,515	5	

大	道	トラフグ	1	101,500	17,763			
			2	18,750	36,094			
		マダイ	2	15,000	5,438			
			3	3,120	2,106			
			4	650	731			
	5	30	45					
	ブリ	1	18,000	2,700				
		2	4,000	7,800				
		2	7,000	23,888				
	3	3,560	19,091					
	カンパチ	1	7,000	2,800				
	シマアジ	1	5,000	1,250				
	2	4,500	6,750					
	カサゴ	1	6,000	240				
漁協計			194,110	126,694	9			
樋島	トラフグ	1	5,600	980				
		2	2,000	3,850				
	漁協計		7,600	4,830	1			
市町計			641,910	396,039	15			
御所浦町	御所浦	トラフグ	1	170,100	29,788			
			2	63,200	104,280			
		マダイ	1	2,000	250			
			2	30,500	11,056			
			3	15,500	13,950			
			4	4,700	7,050			
		ブリ	1	109,000	16,350			
			2	230,500	561,844			
			3	38,609	207,041			
		カンパチ	1	275,300	110,120			
			2	325,000	1,259,375			
			3	33,000	204,600			
		シマアジ	1	20,000	5,000			
			2	7,500	11,250			
			3	9,650	17,370			
		マサバ	1	13,000	3,900			
			2	14,200	7,100			
		漁協計			1,361,759	2,570,303	41	
		嵐口	嵐口	トラフグ	1	67,100	11,743	
					2	9,700	16,005	
ブリ	1			3,000	450			
	2			18,100	44,119			
カンパチ	1			6,000	2,400			
	2			8,300	32,163			
シマアジ	1			3,000	750			
	2			5,000	7,500			
	3			4,200	7,560			
マサバ	2			1,000	500			
漁協計					125,400	123,189	6	
御所浦町	御所浦町			トラフグ	1	1,000	175	
					2	500	825	
漁協計					1,500	1,000	1	
市町計			1,488,659	2,694,492	48			
倉岳町	倉岳町	トラフグ	1	100	18			
			2	100	138			
		マダイ	1	2,000	250			
			2	170	373			
		ブリ	2	150	366			
			2	100	171			
		カンパチ	3	1,500	5,813			
		ヒラマサ	2	2,300	3,565			
		3	1,900	6,099				
		シマアジ		500	413			
マサバ		350	140					
市町計			9,170	19,343	5			
本渡市	本渡市	トラフグ	1	20,000	3,500			
			2	5,000	8,250			
		マダイ	3	2,100	1,575			
			1	80,900	12,135			
			2	120,400	293,475			
		3	27,500	147,469				
		カンパチ	1	13,200	5,280			
		2	11,000	28,985				
		シマアジ	1	3,500	875			
		2	8,000	8,400				
		3	13,000	17,550				
		イサキ	2	7,000	1,634			
市町計			311,600	529,128	7			
新和町	新和町				0			
合計			2,901,369	3,982,839	91			

被害状況

表8に市町別、魚種別の被害状況を示した。

被害はブリ、カンパチ、ヒラマサ、シマアジが合わせて1,434千尾、3,096,878千円、トラフグが840千尾、509,788千円、マダイが293千尾、206,236千円、ヒラメが195千尾、136,000千円、その他が137千尾、33,939千円、合計で91経営体で被害が発生し合計へい死尾数2,902,369尾、被害額3,982,839千円とこれまでで最大となった。ヒラメは陸上施設で養殖されていたが、濃密な赤潮海水を給水したことで被害が発生した。

考 察

これまでの本県におけるコックロディニウム赤潮の発生は8月中下旬に見られ、8月下旬から9月上旬の台風襲来で終息するという1週間から10日程度の発生パターンであったが、今回の赤潮は7月上旬に発生し、好適な気象・海況環境に支えられ長期発生したものと考えられる。

現場海域では、6月上旬においては、珪藻が優占して増殖していたが、それらが増殖するに従い、表層の栄養塩が消費され、降雨による供給も無かったことから次第に細胞数が減少し、非常にプランクトンの乏しい海域となった。底層は底泥からの溶出により栄養塩が豊富に存在するが、強固な水温躍層が存在することで、表層への栄養塩の移行が困難となり、遊泳力を保持しない珪藻類の増殖は、表層水温が25℃を超えていたこともあり、抑制されたと考えられ、コックロディニウムの増殖に好適な条件が形成された。

コックロディニウムの初期発生については、7月初旬の定点1の底層におけるアンモニア態窒素濃度の上昇による刺激が、大きく関与していると考えられる。前述のように、現場海域では、アンモニア態窒素は、ほぼ1ヶ月周期の増減を繰り返し、その大部分が底泥からの溶出によるものであると考えられ、このような周期的変化は、現場海域に存在する生物の生理機構に少なからず影響を及ぼすと推察される。コックロディニウムをはじめとする渦鞭毛藻は、生活史の一部にシストを形成するものが多く、底泥の中で長期間過ごし、物理化学的な刺激により再び発芽するものが多い²⁾ことからアンモニアの刺激によるシスト発芽が、発生初期段階として考えられるが、本種については、未だシストの存在が知られておらず、この点については未解明のままである。

本種による赤潮は長期間に及んだが、この間、表層は常に貧栄養状態であり、無機態の窒素およびリンを利用する独立栄養生物にとって、非常に過酷な

条件であった。しかし、本種は昼間は表層で光合成を行い、夜間は底層で栄養塩を吸収するという日周鉛直運動を行うことによって増殖を可能にしている³⁾。このことは本種が、水温躍層の発達により、海水の上下混合がほとんどない、鉛直方向に非常に安定した水塊構造が形成され、表層で珪藻が増殖できない条件下（表層高水温、低栄養塩濃度）に適応した種であると言える。また、渦鞭毛藻類の増殖は、海水の攪乱に弱いとも言われている⁴⁾。今回の赤潮も7月末の台風接近による降雨により表層水温が低下し、一時的に水温躍層が崩壊したことにより、赤潮は消滅したと考えられる。また、この水温低下と海水の上下混合に伴う栄養塩の供給により、珪藻の増殖が再び起こり、優占種となったことも赤潮消滅の一つの要因と考えられる。

前述したように本種のシストの存在は、未だ確認されていない。今後、発生海域の底泥からの発芽実験等で、その存在の確認を急がなければならない。また、培養株も得られていないことから、早急に分離培養を行い、室内実験による増殖因子の検索、現場で起こる現象の検証、さらには細胞内の生理変化を観察することで増殖及び休眠へのシグナルを見出せれば、赤潮発生及び終息の予測に向けて精度を大きく向上させることが考えられる。

また *Gymnodinium mikimotoi* が魚類をへい死させる機構として、細胞が産生する活性酸素が、魚の鰓に付着した際に、血中に脂質過酸化物の生成を誘導し、鰓の細胞組織を破壊する機構が報告されている⁵⁾が、コックロディニウムにおいても培養細胞を用いたこれら斃死機構解明に向けた取り組みが被害の軽減対策の上で重要と考えられる。

コックロディニウム赤潮に対しては粘土（入来モンモリ）散布が有効な対応策として、水産庁及び鹿児島県との共同研究によりマニュアル化され⁶⁾一部漁場で実施されている。しかし大量、長期の粘土散布は環境への影響、費用対効果の問題等、実施に当たっては十分な検討が必要で、餌止め、筏移動、緊急出荷等の他の対策と合わせた対応が必要と考えられる。

要 約

1. コックロディニウムは、八代海の津奈木町地先から御所浦島周辺を中心とした海域で6月29日から確認され始め、8月16日まで確認された。赤潮状態は7月7日に発生し、8月1日に終息が確認された。
2. 梅雨時期の少雨とその後の高気温に伴い、現場海域では強固な水温躍層が形成され、表層への栄

- 養塩供給が絶たれたため、珪藻の増殖が抑制され、コックロディニウムの増殖に有利な条件が整った。
3. コックロディニウムの赤潮化を示す表層クロロフィルa 濃度のピークは、強固な水温躍層が形成され、底層水のアンモニア態窒素濃度が上昇した後に出現した。
 4. コックロディニウム赤潮の発生については
 - ・初期発生は水温躍層の発達に伴う底泥からのアンモニア態窒素などの溶出による底層水での栄養塩濃度の上昇が誘引となっていること。
 - ・赤潮化は表層水の栄養塩枯渇に伴う珪藻等の競合生物の減少により、増殖に有利な環境が整うことが誘引となっていることが示唆された。
 5. 培養株の確立による室内実験での増殖因子の検索と、細胞内の生理変化を観察することで、赤潮化の予兆となるシグナルの検出を行なうことが必要である。
 6. 発生海域の底質に含まれるシストの確認と発芽条件の検討による初期発生条件の更なる検討が必要である。

文 献

- 1) 水産庁 (昭和63年3月) 昭和62年度九州海域赤潮調査報告書 (西海ブロック) 117
- 2) Dale, B. (1982) : Survival Strategies of the Algae, Cambridge University Press, 69-136
- 3) 水産庁 (昭和57年3月) 昭和56年度九州海域赤潮予察調査報告書 (西海ブロック) 140
- 4) Pollinger, U. and E. Zemel (1981) : In situ and experimental evidence of the influence of turbulence on cell division processes of *Peridinium cinctum* forma *westii* (Lemm.) Lefever Br. Phycol. J., 16, 281-287
- 5) K. Tanaka, S. Yoshimatsu and M. Shimada : "Generation of superoxide anions by *Chattonella antiqua* : Possible causes for fish death caused by red tide *Experientia*, Vol. 48, pp. 888-890 (1992)
- 6) 水産庁・鹿児島県 (昭和57年3月) 赤潮対策技術開発試験成果集 (3) 粘土散布による赤潮被害防止マニュアル

有明海で漁獲されたクルマエビからのPCRを用いたPRDV遺伝子の検出

木村武志・宮崎孝弘

Detection of penaeid rod-shaped DNA Virus (PRDV) of wild caught Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) in Ariake sea with polymerase chain reaction (PCR).

Takeshi Kimura, Takahiro Miyazaki

キーワード：クルマエビ；PRDV；PCR

1993年に中国から輸入されたクルマエビに感染していたクルマエビ類の急性ウイルス血症（以下「PAV」という）の原因ウイルス PRDV はこれまでの報告により、発病した養殖池の表1に示す甲殻類に感染すること^{1), 2)}、種苗生産用の採卵親クルマエビが感染していた場合に種苗に感染し発病すること^{3), 4)}、漁獲される天然のクルマエビや、表2に示すような近縁の数種の小型エビに感染が見られること^{5), 6), 7)}などが明らかになっている。

これらのことは一度海外から侵入した新たな病原体の定着のためには発病箇所周辺に水平感染可能な生物の存在の有無、垂直感染の成立の可否及び天然海域への伝搬・感染の成立の可否が重要な課題であることを示している。

そこで、本県の主要なクルマエビ漁場である有明海において、PAVの感染状況をPCRを用いて調査したので報告する。

表1 PAV発症養殖池でPRDV遺伝子が検出された生物

和名	学名
スジエビ類	<i>Palaemon spp</i>
ヨシエビ	<i>Metapenaeus ensis</i>
イソガニ	<i>Hemigrapsus sanguineus</i>
ニホンスナモグリ	<i>Callinassa japonica</i>
アシハラガニ	<i>Helica tridens</i>
テッポウエビ	<i>Alpheus brevicristatus</i>
クマエビ	<i>Penaeus semisulcatus</i>
スナガニ	<i>Ocypode stimpsoni</i>
ガザミ	<i>Portunus trituberculatus</i>
アナジャコ	<i>Upogebia major</i>

表2 天然で漁獲されPRDV遺伝子が検出されたクルマエビ以外のエビ類

和名	学名
キシエビ	<i>Metapenaeopsis dalei</i>
トラエビ	<i>Metapenaeopsis accitvits</i>
アカエビ	<i>Metapenaeopsis barbata</i>

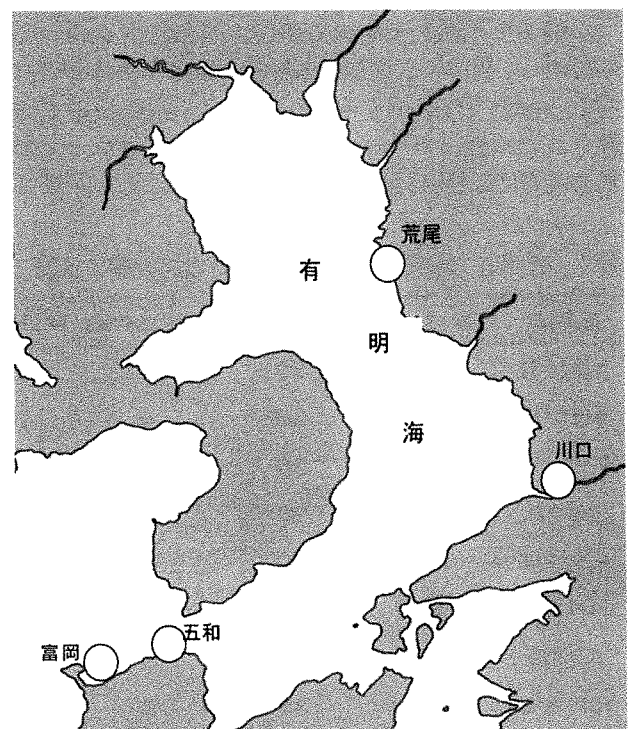


図1 クルマエビの水揚げ場の位置

材料および方法

1999年6月～10月にかけて、図1に示す本県の有明海に面する4漁業協同組合で水揚げされたクルマエビを氷蔵して水産研究センターに運搬し、30個体を個別に解剖し胃上皮組織を取り出して1.5mlマイクロチューブに収容した。DNAを抽出するまでは-80℃で凍結保存し、木村ら⁸⁾の手法によるISOGEN(ニッポンジーン製)を用いた方法でDNAを抽出し、PCRを行うまでTE(pH8.0)に溶解して-20℃で凍結保存し、PCRは、Ampli Taq Gold(Perkin Elmer社 Applied Biosystem製)を用い、PRDV遺伝子の570bpを増幅するP3・P4プライマーによる45サイクルの反応を行った。

反応産物をアガロース上で電気泳動し、エチジウムブロマイドによりDNA染色後、紫外線を照射して観察した。

結果および考察

表3に示すように、検査に用いた個体数は240個体で、そのうちPRDV遺伝子が検出された陽性個体は31検体であった。最も陽性個体が多かったのは9月2日に水揚げされた個体で、30尾中、13尾が陽性個体で43.3%の陽性率となった。また検査に用いた個体にPAVの特徴である外骨格に白斑を有する個体は観察されなかった。また尾枝カット痕跡の有無によって放流個体を識別したが、混獲率と感染率に相関は見られなかった。

これまで天然クルマエビのPAV感染状況については虫明ら、岡本ら、及びMaedaらの報告があるが、虫明らの報告では、PCRを用いた九州西部沿岸で漁獲された天然クルマエビのPAV感染が10.2%、九州東部沿岸で4.2%の感染率を示し、夏期に漁獲される

クルマエビの感染率が高まる傾向にあるとしている。

有明海を対象にした今回の調査でも、同様に夏期に保有率が高まる傾向を示した。本県におけるクルマエビの種苗生産は、早期には九州東岸で水揚げされるエビを用いているが、8月以降にはこの有明海

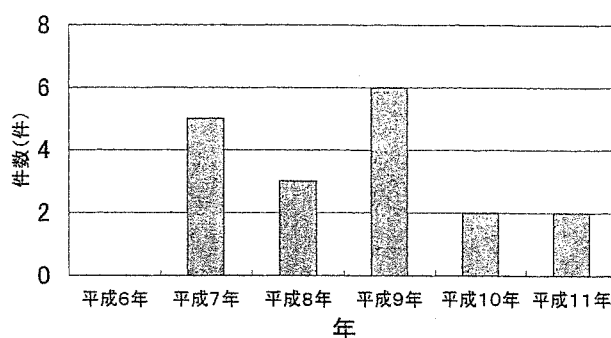


図2 公的種苗生産機関におけるPAV発生状況
(社)日本栽培漁業協会アンケート調査結果より)

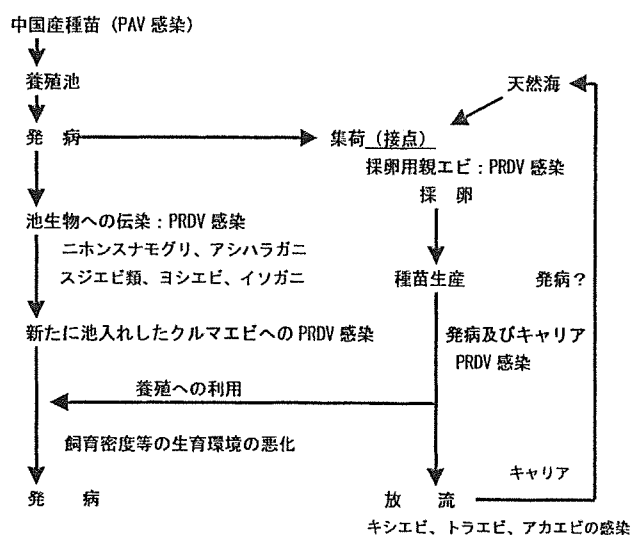


図3 養殖池及び天然海のPRDV感染環の成立

表3 有明海で漁獲されたクルマエビのPAV感染状況

漁獲日	水揚げ場	検査個体数	陽性個体数	陽性率(%)	平均体長(mm)	平均体重(g)	放流エビの混獲率(%)
6月10日	川口	30	0	0.0	126.0	24.0	0
6月14日	五和	30	4	13.3	163.7	52.1	1.1
7月12日	荒尾	30	0	0.0	126.0	24.7	1.3
8月6日	富岡	30	9	30.0	159.0	46.1	0.5
8月29日	川口	30	1	3.3	110.4	15.8	0.4
9月3日	荒尾	30	13	43.3	114.7	16.7	1.3
9月6日	富岡	30	2	6.7	170.7	62.0	0
10月28日	川口	30	2	6.7	137.1	27.5	0.7
計		240	31	12.9			

湾口域で漁獲される個体を用いることが多い。

図2に示すように、1993年に養殖場で初めてPAVが発生して2年後の1995年に公的種苗生産機関においてPAVが発病したため、公社を含む公的な生産機関ではPCRを用いた親エビの選別や、種苗の検査を行い、陽性個体を放流しないこと等を申し合わせた。またPCRを用いた親エビの選別による種苗生産期のPAVの発症防除技術が報告されている⁹⁾。しかし、民間で生産されたエビについて、生産におけるPAV感染状況の全てを掌握することは困難であり、また陽性反応が出現した場合にも強制的に廃棄するような指導は行えない状態である。

今回の調査でPAVがどのような感染経路をたどっているのか、明らかではないが、岡本らは浜名湖における天然クルマエビのPAV保有が天然親エビからの垂直感染を主要因であるとしている。図3に示すように採卵親エビを天然エビに依存した種苗生産を行っている限りは、検査の検出限界があることも含め、天然におけるPAVの感染サイクルを切断することは困難と推察される。よってこのように新たな病原体が侵入・発病した場合には、

- ①周辺生物への感染状況と病原体の消長について詳細な調査を実施する
- ②感染耐化生物における病原体の消長について把握する。
- ③感染生物が再生産を行った場合に、病原体が感染し、発病するか把握する。

ことが重要と考えられ、病原体の定着及び拡大を防止するためにはこれらを踏まえた対策が必要と考えられる。

要 約

- 1 熊本県沿岸の有明海で漁獲されるクルマエビのPAV感染率をPCRを用いて調査した。
- 2 検査した240尾のうち31尾で陽性反応が見られた。
- 3 陽性反応率は9月2日に水揚げされた個体で43.3%と最も高く、夏場に高い傾向を示した。
- 4 採卵を天然親エビに依存していることと検査精度の限界を考慮すると天然における感染環を切断することは困難と考えられた。

文 献

- 1) 福田 穰(1999)：クルマエビ養殖池に生息するニホンスナモグリからのPRDVの検出 平成11年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, 38
- 2) Kazuo Momoyama, Midori Hiraoka, Claudia A. Venegas (1999) : Pathogenicity of Penaeid Rod-

shaped DNA Virus (PRDV) to Juveniles of six Crustacean Species. Fish Pathology, 34 183-188

- 3) 虫明敬一・有元 操・佐藤 純・森 広一郎(1998)：天然クルマエビ成体からのPRDVの検出 魚病研究, 33, 503-509
- 4) 佐藤 純・虫明敬一・森 広一郎・有元 操・今泉圭之輔・西澤豊彦(1999)：クルマエビの種苗生産過程におけるPAVの発生状況 魚病研究, 34, 33-38
- 5) Minoru Maeda, Toshiaki Itami, Atsushi Furumoto, Oscar Henning (1998) : Dtection of Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) in Wild-caught Shrimp and Other Crustaceans. Fish Pathology, 33 373-380
- 6) 岡本一利・鈴木基生(1999)：浜名湖および遠州灘で採捕されたクルマエビからのクルマエビ急性ウイルス血症の原因ウイルスPenaeid rod-shaped DNA virusの検出 水産増殖, 47, 299-302
- 7) 桃山和夫(1999)：(1) PAVの予防対策技術開発 平成10年度魚病対策技術開発研究成果報告書 129-130
- 8) 木村武志・山野恵祐・中野平二・桃山和夫・平岡三登里・井上 潔(1996)：PCR法によるPRDVの検出 魚病研究, 31, 93-98
- 9) Keiichi Mushiake, Ken Shimizu, Jun Satoh, Koh-ichiro Mori, Misao Arimoto, Shin-ichi Ohsumi, Keinosuke Imaizumi (1999) : Control of Penaeid Acute Viremia (PAV) in *Penaeus japonicus* : Selection of Eggs Based on the PCR Detection of the Causative Virus (PRDV) from Receptaculum Seminis of Spawned Broodstock Fish Pathology, 34 203-207

REPORT OF KUMAMOTO PREFECTURAL FISHERIES RESEARCH CENTER

No.5 MARCH 2002

Koichiro Yoshida	1
Geographical distribution of "Kawanori" (<i>Prasiola japonica</i> Yatabe) in Kumamoto prefecture.	
Takeshi Kitano	7
Studies on P450 aromatase (P450arom) gene expression in sex differentiation in Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>).	
Seiji Matsumoto, Takeshi Kimura, Kiyonori Kurata	25
Studies on the selection breeding of Japanese pearl oyster (<i>Pinctada fucata martensii</i>) with high temperature water.	
Yuichi Fukaura, Rikio Itoyama, Takeshi Kimura, Kiyonori Kurata	31
Studies on the countermeasure for preventing mass mortality of Japanese pearl oyster (<i>Pinctada fucata martensii</i>) by cool culture field in winter.	
Yuichi Fukaura, Rikio Itoyama, Takeshi Kitano, Kiyonori Kurata, Heizi Nakano	35
Effect of the low salinity rearing on the abnormal Japanese pearl oyster (<i>Pinctada fucata martensii</i>) accompanying red-brown adductor muscles.	
Sueyoshi Kiyota	39
Observation of lack of pit organ on the lower jaw for artificial seed produced Ayu.	
Ryuusei Matsuo, Sueyoshi Kiyota	43
Occurrence of bacterial coldwater disease of Ayu (<i>Plecoglossus altivelis</i>) in Kumamoto.	
Yasunari Jinnai, Yasuhumi Kamaga, Norihisa Tobase	47
Studies on the distribution of larval of <i>Ruditapes philippinarum</i> in the estuary, Kikuti river.	
Kazuhiro Nakao, Izumi Hirayama, Yasunari Jinnai, Hirokazu Yamashita, Norihisa Tobase	51
The stocking efficiency for Red sea bream (<i>Pagrus major</i>) off the coast of Kumamoto prefecture.	
Naoaki Yoshimura, Hidenori Andoh, Takeshi Kimura, Nagahisa Oyama	55
Studies on <i>Cochlodinium polykrikoides</i> (Dinophyceae) causing red tide in Yatushiro Sea in July 2000.	
Takeshi Kimura, Takahiro Miyazaki	65
Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) of wild caught Kuruma prawn (<i>Marsupenaeus japonicus</i>) in Ariake sea with polymerase chain reaction (PCR).	