

# 応用技術研究部



# 種苗生産技術開発試験Ⅰ（<sup>単</sup>県平成8年度～）

## （ナマコ種苗生産技術の開発）

### 1 緒言

マナマコは本県沿岸域に広く棲息し、沿岸域の重要な漁業対象種であるが、近年漁獲量が減少しており、人工種苗放流を望む声がある。このため本県の生態・環境に適した種苗生産技術の開発を行う。

### 2 方法

(1) 担当者 木村武志、深浦雄一、倉田清典

(2) 試験方法

#### ア 親ナマコの養成

平成11年2月中旬に本渡市漁業協同組合より60個体（体重250～500g）を購入して、Y社製の水温調節活魚水槽に収容した。3月から14℃に加温しながら、乾燥ワカメ1kgを2回/週与え、微通気、100%/日の換水で飼育した。底が糞、残餌で汚れた際に適時底掃除を行った。

#### イ 採卵

飼育水温の14℃から、5℃程加温した紫外線照射装置を通過させたろ過海水を用いて採卵刺激を行った。

#### ウ 浮遊幼生飼育

500ℓ水槽をウォーターバス方式により19℃に保ち、給餌は表1に示す給餌表に従い、浮遊珪藻（*Cheateoceros calcitrans*）を給餌した。換水は2日に1度、100μmのネットを張った換水枠を用いて行い、同時に底掃除を行った。浮遊珪藻は、 $500 \times 10^4$  cells/mlを培養密度の上限として、PES-II及び珪酸Naを用い、25℃の恒温室にて通気培養を行った。

表1 浮遊珪藻の給餌目安

日 令	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
飼育水槽内の珪藻数 ( $10^4$ cells/ml)	0.5	0.5	0.8	0.8	1.0	1.0	1.5	1.5	2.0	2.0	3.0	4.0	5.0

（日令13以降は $5 \times 10^4$  cells/mlを維持）

#### エ 付着幼生飼育

着底後の飼育は、10枚を1セットとしあらかじめ付着珪藻を繁茂させた付着板（65mm×45mmの波板）をそれぞれ8セット収容した2ℓ水槽と、6セット収容した1ℓ水槽の2面で行った。浮遊幼生の移送時には急激な温度変化を抑えるために電気ヒータにより19℃まで加温を行い、付着や自然水温の状況にあわせ、適時低下させた。

(3) 結果及び考察

#### ア 採卵

4月6日の旧暦の大潮前の中潮時に、10個体を用いて午前10:00から採卵刺激を行ったが、採卵がみられず、7日に同じ個体に同様の刺激を行ったところ、午後3時に1尾ずつ放卵、放精した。受精卵は200μmと、50μmのプランクトンネットを張ったタモ網を2重にし、卵洗浄を行い1,348,000粒を30ℓ水槽2基に22.4個/mlの密度で収容し、ウォーターバスにより19℃を維持してふ化させた。

#### イ 浮遊幼生飼育

平成11年4月7日に浮上したふ化幼生900,000個体を500ℓ飼育水槽2基へ1個体/mlの密度で収容した。飼育期間中は大きな減耗も発生せず、底掃除による目減り分を含めると約40%の生残率で2水槽合わせて約340,000個体の *Doliolaria* 及び *Auricularia* 幼生が得られ、着底飼育へ移行した。期間中の変態及び歩留について表2に示した。

ウ 付着板飼育

平成 11 年 4 月 22 日の午後 1:00 に *Auricularia* 幼生の比率が 25% を越えた時点で移送を行った。

4 月 25 日にはほぼ浮遊幼生が見られなくなったため波板流水飼育を開始し、4 月 30 日（付着後 8 日目）で全長 551  $\mu\text{m}$  の稚ナマコ約 56,000 個が得られた。5 月 10 日（付着後 18 日目）に平均全長が約 764  $\mu\text{m}$  に成長した時点で飼育水槽内に *Tigriopus* が大量発生し両水槽とも付着珪藻が消失したため稚ナマコを刷毛で剥離して 1 水槽での平面飼育へ移行した。剥離稚ナマコの飼育はワカメ粉末餌料 5 g を海水に懸濁して毎日給餌したが、刷毛剥離による稚ナマコへの損傷が激しかったせいか、5 月末までに殆どが減耗した。

今回の飼育で、本県における親ナマコ養成、採卵、浮遊幼生飼育、付着幼生飼育といった各段階における飼育技術の一環した条件設定は行えたが、付着幼生飼育時の *Tigriopus* の除去のために行った刷毛剥離によるダメージにより 10 mm 程度の大きさの稚ナマコを得ることはできなかった。この解決方法として既報によれば *Tigriopus* 除去には昆虫駆除剤の使用が、また剥離については KCl による剥離が稚ナマコに損傷を与えず有効とされる。

表 2 浮遊幼生飼育結果

ふ化後日数	幼生の変態状況	幼生数	飼育管理の内容	
1	原腸かん入個体 100%	900,000 (2 水槽合計)		
2	<i>Auricularia</i> 幼生 100%			
4	<i>Auricularia</i> 幼生 100%		底掃除 30 l 廃棄	換水 50%
6	<i>Auricularia</i> 幼生 100%		底掃除 30 l 廃棄	換水 50%
8	<i>Auricularia</i> 幼生 100%		底掃除 30 l 廃棄	換水 50%
10		No.1 水槽 225,000	底掃除 30 l 廃棄	換水 50%
		No.2 水槽 225,000	底掃除 30 l 廃棄	換水 50%
14	<i>Auricularia</i> 幼生 87.9%			
	<i>Doliolaria</i> 幼生 12.1%			
15	午前			
	No.1 水槽 <i>Auricularia</i> 幼生 82.0%	<i>Doliolaria</i> 幼生 18.0%		
	No.2 水槽 <i>Auricularia</i> 幼生 75.5%	<i>Doliolaria</i> 幼生 24.5%		
	午後			
	No.1 水槽 <i>Auricularia</i> 幼生 70.3%	<i>Doliolaria</i> 幼生 29.7%	133,800 個体	
	No.2 水槽 <i>Auricularia</i> 幼生 73.4%	<i>Doliolaria</i> 幼生 26.6%	211,200 個体	

# 種苗生産技術開発試験Ⅱ (県<sup>単</sup>平成8年度~)

(コウライアカシタビラメ)

## 1 緒言

コウライアカシタビラメ *Cynoglossus abbreviatus* (Gray) は、有明海、不知火海の中央部から湾奥部にかけて分布し刺網等で漁獲されており、特に熊本有明海地区においては漁業上重要な魚種である。そこで栽培対象魚種としての可能性を検討するため、平成8年度から種苗生産を試みている。

## 2 方法

(1) 担当者 深浦雄一、木村武志、倉田清典

(2) 試験方法

ア 採卵

採卵用親魚として前年から養成していた雌1尾と平成11年2月下旬漁獲された雄5尾を使用した。当初は自然水温で飼育し、4月16日からは水温19℃に加温した。4月22日に産卵誘発ホルモン(ゴナトロピン250IU)を筋肉内に打注して採卵を試みた。

イ 飼育方法

(ア) 飼育水槽及び飼育水: 2kl丸型FRP水槽を使用し、砂ろ過海水を19℃に加温して使用した。

(イ) 餌料: 給餌は1日3回(9:00、13:00、16:00)行い、s型ワムシ給餌時には飢餓ワムシ対策としてナンノクロブシスを9:00と13:00に飼育水に添加した。日令18日から配合飼料とアルテミアを給餌した。

## 3 結果及び考察

産卵状況を表1に示した。自然水温時や加温時に十分な産卵が見られなかったため、産卵誘発ホルモンによる刺激を行った結果、2日後(4月24日)に58,500個の卵(うち浮上卵56,500個)を得た。得られた浮上卵の平均卵径は1.12mm、ふ化仔魚の平均全長は2.73mmで、何れも自然産卵(4月8日)による値より小さかった。

10.6千尾(ふ化率19.0%)のふ化仔魚から種苗生産を行ったが、大半はワムシを摂餌できず、日令13日にはワムシへの摂餌が見られた360尾が生残したのみであった。日令26日に140尾生残となった。変態は日令29日に1尾見られたが、その後変態が進まず日令36日までに変態した個体(2尾)も含めて全滅した。

ふ化仔魚がワムシを摂餌出来なかったのは元々ふ化仔魚が小さく弱かったためと考えられ、産卵誘発ホルモンの使用による産卵誘発について検討を考えると考えられた。

表1 平成11年度コウライアカシタビラメ産卵結果

採卵日	水温	浮上卵		沈下卵	計		浮上卵 ふ化率 %	ふ化仔魚 全長 mm	備 考
		数 量 個	サイズ mm	数 量 個	産卵量 個	浮上卵率 %			
4月8日	15.1℃	1,628	1.23	10,878	12,506	13.0	31.8	3.36	自然水温、2kl水槽
18日	19.5℃	4,400	—	不明	(4,400)	—	—	—	16日から加温、400ℓ水槽
24日	19.1℃	56,500	1.12	2,000	58,500	96.6	19.0	2.73	22日ゴナトロピン250単位筋肉内注射、400ℓ水槽

\*使用親魚: ♀1(前年から養成)、♂5(H11.2月下旬漁獲)

# 種苗生産技術開発試験Ⅲ (県単) (平成11年～)

(ブリの早期採卵技術の開発)

## 1 緒言

新たな養殖用の人工種苗としてブリ種苗の供給を図るため、(社)日本栽培漁業協会が実施している親魚養成、早期採卵、種苗生産の各技術導入を検討し、本県の環境条件に適した生産技術の確立を目的とする。人工種苗を供給するについては、産卵期を天然より人為的に早めることが、養殖期間の短縮や、養殖場で発生する各種の疾病に対する抵抗力を高め、ブリ養殖の効率化に寄与できると考えられることから、本年度は天然では4～5月とされる産卵期を1～2月へ早める早期産卵技術の検討を行った。

## 2 方法

(1) 担当者 木村武志、深浦雄一、倉田清典

(2) 試験方法

ア 供試魚

平成11年5月14日に牛深市の養殖業者によって養成されたブリ(平均体重約5kg)の腹部を圧迫し、精液を出した個体20尾を雄として背鰭にアンカータグを装着し、出さなかった個体を雌として20尾選出し合計40尾を(財)熊本県栽培漁業協会の海面4m角形生け簀に収容した。

イ 採卵試験

牛深市の沿岸水温が19℃に低下した平成11年11月16日に、活魚トラックにより、水産研究センターの100klコンクリート製回遊水槽に輸送した。

水槽収容時にハダムシ(*Benedenia seriolae*)を駆除するため淡水浴を行い、雌魚の背筋部に1mg/尾のLHRH(Leutenizing hormone-Releasing hormone:黄体形成ホルモン放出ホルモン)コレステロールペレットを埋め込んだ。

11月24日から蛍光灯による22時までの長日処理を行い、平成12年1月12日から0時まで電照を延長した。

給餌は1日1回、表1に示す内容で水産研究センターで作成したモイストペレットを凍結した状態で飽食するまで与え、土、日は無給餌とした。

水温は加温を行い、19℃を維持した。注水は別に加温水槽を設け、4回転/日程度の砂濾過海水の注水と、ポンプと砂濾過装置をつないで循環濾過を併用した。また循環水の注水口にY社製の酸素濃縮器を設置し、溶存酸素の低下に対応した。給餌後に半量を換水し、2日置きに底掃除を実施した。また産卵開始後は、循環を止め、新たに設けた30kl水槽で19℃に加温した濾過海水を換水後に注水した。

魚体測定は1ヶ月毎に実施し、体重、尾叉長、カニューレによる卵径を測定した。また、水温、pH、DO、給餌量については毎日測定を行った。

表1 水産研究センター作成のモイストペレットの内容

冷凍魚介類	割合(%)
アミ	19.7
アジ	26.3
イワシ	26.3
市販配合飼料	26.3
フィードオイル	0.7
総合ビタミン剤	0.7

### 3 結果

#### (1) 供試魚の状況

(財) 熊本県栽培漁業協会にて網生け簀に収容した後、ドライペレットにより飼育を開始したが摂餌が急激に低下したため、水産研究センターよりモイストペレットを輸送して飼育を行った。ハダムシの寄生が激しく飼育中に雌5尾、雄2尾がへい死した。平成11年11月16日(水産研究センター搬送時)、12月20日、平成12年1月17日の魚体測定結果について表2に示した。産卵に適した肥満度である20以上を目標として飼育を行った結果、産卵水槽に収容した時に平均で17であった肥満度が1月17日までに平均で20.1と増加し、約2ヶ月間の飼育で、十分な肥満度向上を図ることができた。試験期間中の摂餌量の変化を図1に示した。

水槽内で体表を水槽底に擦り付ける行動が頻繁に見られたので、12月20日の魚体測定時に淡水浴によるハダムシ駆除を実施したが、殆ど寄生は確認できず、ブリの生態的な行動と考えられた。

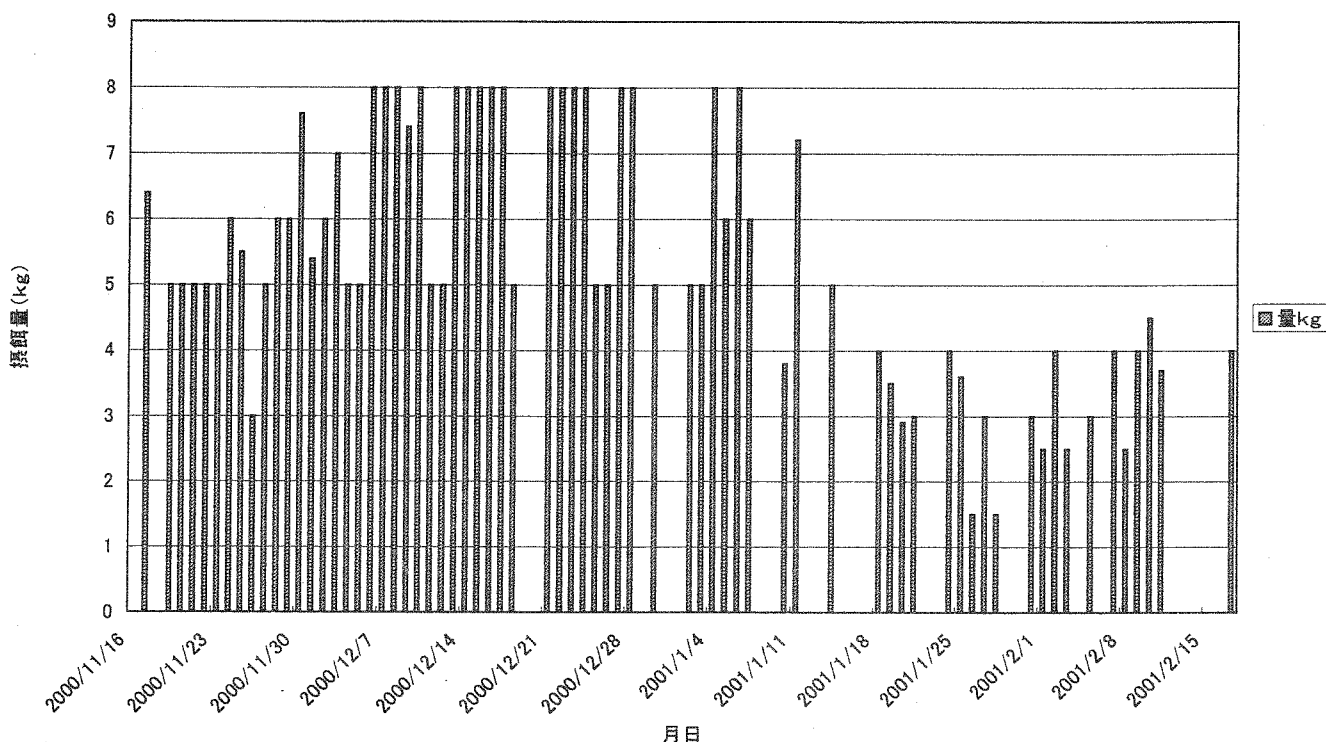


図1 摂餌量の変化

表2 魚体測定結果

項目/測定月日	11月16日	12月20日	1月17日
雌 尾数	15	15	15
平均尾叉長 (cm)	69.8	70.5	71.0
平均体重 (g)	5,763	6,671	7,206
平均肥満度	16.9	19.0	20.1
雄 尾数	18	18	18
平均尾叉長 (cm)	68.6	69.1	70.0
平均体重 (g)	6,550	7,241	6,925
平均肥満度	17.2	22.3	20.1

#### (2) 成熟状況

平成11年12月20日のカニューレによる成熟度調査では92~118 $\mu$ mであった卵径が、平成12年1月17日には470~660 $\mu$ mと成熟が進み、採卵可能な状態となった。また図1に示すように、1月10日以降に摂餌量が8kg(給餌率約3.4%)から約半量の4kg(給餌率1.7%)へ低下し、産卵へ向けた成熟が進んだことが確認された。

### (3) 産卵刺激

平成12年1月17日から18日にかけて飼育水槽の加温を停止し、翌日午前9:00まで15℃の状況を継続させた後、再び午後4時まで19℃に上昇させ、以後19℃を維持した(図2参照)。

### (4) 産卵状況

平成12年1月25日から、水槽内に設置しておいたゴミ取り用のネットに受精卵が確認されたので、採卵用の給排水体制に切り替え、採卵ネットを設置したところ、26日に浮上卵36,000粒、沈下卵20,000粒が得られた。27日には卵は得られなかったが、28日~31日にかけて浮上卵520,000粒、沈下卵390,000粒が得られた。

その後、産卵期間を人為的に調整する目的で2月1日から飼育水温を15℃に低下させたが、2月4日に浮上卵480,000粒、沈下卵290,000粒が自然産卵し、以降は産卵が見られなかったことから、産卵が開始した場合には人為的に調整することは困難と考えられた。また15℃管理下で得られた受精卵はふ化には至らなかった。

今回の産卵は1月25日から2月4日までの10日間で、既報により2週間程度とされている産卵期間とほぼ同様と考えられ、得られた卵は浮上卵1,036,000粒、沈下卵700,000粒であった。

### (5) 受精卵の状況

本実験で得られた受精卵は平均で卵径が1.12mm、油球1個で受精率は100%であったが、1月31日の受精卵が、ふ化率は50%程度、ふ化仔魚の無給餌生残指数(S.A.I.)は10.5と低調であった。ブリ受精卵は胚胎形成後期に比重が増加し、ふ化槽内で沈降し、さらにふ化後開鰓までにさらに仔魚が沈降することが観察され、ふ化率を向上させるため、またS.A.I.を算出するためにはこれらの卵の性質に対応した適切な卵管理方法を取ることが必要と考えられた。

今回の試験で、ブリの水槽内早期自然産卵が可能となり、これまで報告のある搾出法に比較し、良質卵の入手、参加親魚数の増加及び採卵操作の簡略化などに優位な点が伺われた。今後は受精卵が水槽内にいつまでも貯留するのを防ぐような注水操作の検討と、それに伴う卵受け水槽の改良が必要と考えられる。

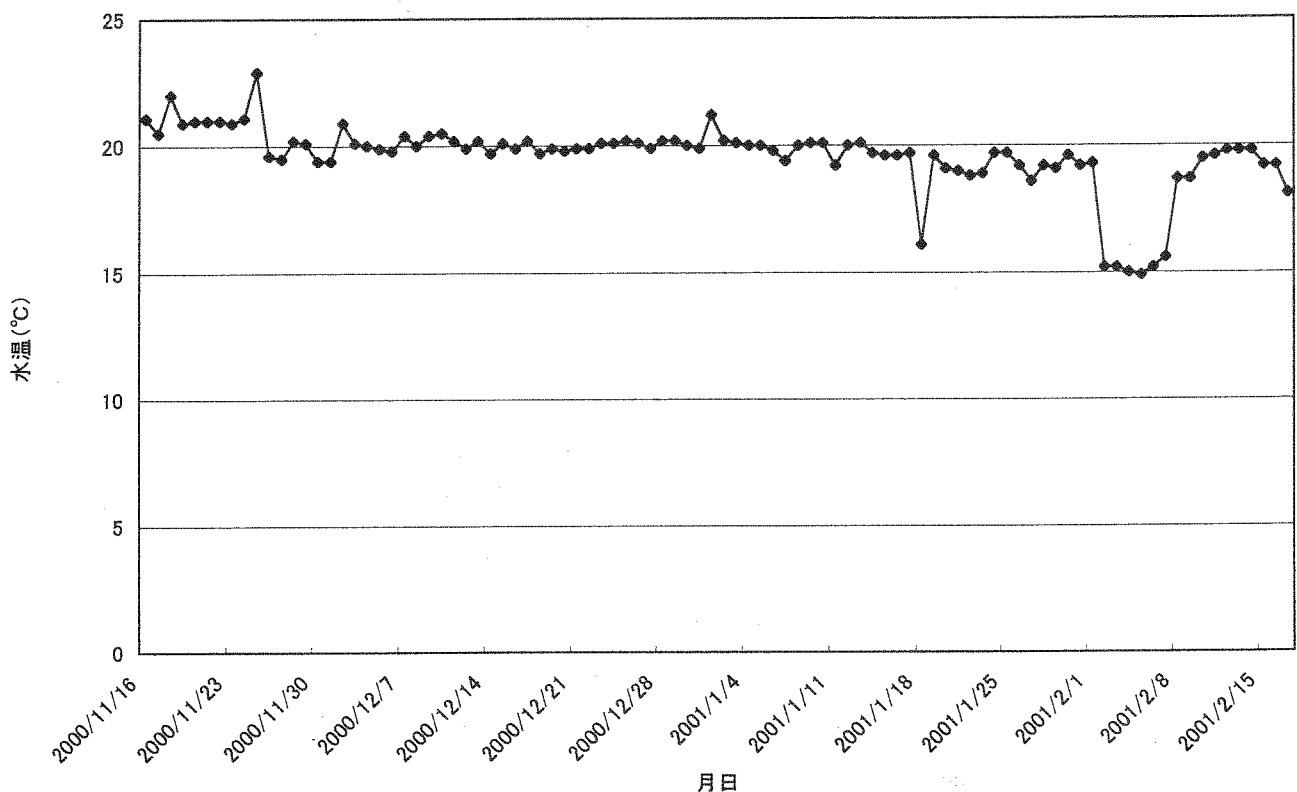


図2 飼育水温の変化



# 品種改良効率化基礎技術開発研究Ⅰ（国庫委託） （平成9年～）

（アコヤガイのストレス耐性系統作出技術開発）

## 1 緒言

真珠養殖においては、貝柱の赤変化を伴う母貝の異常死が、業界存続の危機を招いている。この疾病は感染症が原因とされているが、その病原体究明には至っていない。そこで対策として高水温期以降にへい死が発生していることから「高水温ストレスに強いアコヤガイ系統」を作出する選抜技術の開発を行いへい死率の低減を図ることを目的とした。また本研究においては「高水温選抜+血リンパ中高蛋白質貝」を選抜育種形質として実験を続けており、今年度は、継続的に選抜育種を行っているアコヤ貝から第3世代を種苗生産し、その特質を明らかにすることを中心に試験を実施した。

## 2 方法

(1) 担当者 木村武志、深浦雄一、倉田清典、

(2) 試験方法

ア 高水温耐性第3世代の作出

本事業の前事業である「新品種作出基礎技術開発研究」から継続的に「高水温耐性」を選抜形質に、群選抜育種を行っているアコヤ貝を用いて第3世代（以後「HW3」という）を作出し、継代選抜が目標形質の固定化、優良化に及ぼす影響を検討した。平成9年度に作出し、平成10年度に高水温選抜をおこなった第2世代の雌20、雄16個体を用いて5月上旬から飼育水温を20℃に保ち成熟養成を行い、1時間の干出、及び25℃に昇温した紫外線滅菌海水による水温刺激を用いて5月27日に自然産卵による採卵を行った。

イ 新たな高水温耐性系統の作出

新たな選抜群の作出と、第3世代との形質比較に用いるため、平成9年度産の愛媛県産天然、高知県産天然の貝を平成10年度に高水温選抜して水産研究センターの海面筏で養成した貝を親貝に用いて第1世代を作出した（以後愛媛県産第1世代を「愛1」、高知県産第1世代を「高1」という）。HW3の作出と同様に6月7日に愛媛群24個体、高知群36個体より採卵を行った。

ウ HW3の高水温耐性試験

HW3の高水温耐性形質の状態を検討するため、愛1を対照貝として平均殻番長32~33mmの大きさを各100個ずつを用い、高水温耐性試験を11月9日から実施した。自然水温の20℃から1℃/日ずつ上昇させ15日目に35℃まで上昇させ、再び自然水温にもどした後の7日目までを試験期間とし、期間中の22日間のへい死状況を比較した。

エ 血リンパ中蛋白質濃度と血球数及び血リンパ中の遊離アミノ酸組成の関係について

血リンパ中蛋白質量は身入度状態を示す指標となることや、血リンパ中蛋白質量の多い個体は酵素活性についても高い値を示すことが報告されている。このことから、血リンパ中蛋白質量の多い個体は、高水温耐性のみならず各種ストレス耐性を示す可能性があり、選抜形質として有効と考えられる。しかし血リンパ中蛋白質を構成する要素としてはガラクトース親和性レクチン、フィブロネクチン様蛋白質が報告されているがそれ以外の性状は不明の状態であることから、まず、血リンパ中蛋白質量を左右している要素について、熊本県牛深産の天然アコヤ貝を用いて顆粒血球数及び遊離アミノ酸組成との関係について検討を行った。血リンパ中蛋白質量についてはLowly法による検出を、血球数についてはTomaの血球計算盤を用いて計数を行い、遊離アミノ酸組成についてはHPLCによる解析を行った。

## 3 結果及び考察

(1) 高水温耐性第3世代の作出

産卵刺激に対して、雌20個体のうち7個体が、雄16個体のうち4個体が反応し、2,500万粒の受精卵が得られた。ふ化率は91%でこのうち約1,300万個体を、*Pavurova lutheri*を餌料に用いて飼育したが、浮遊幼生時及び

付着幼生への変態時に大量減耗を起こし、平成11年11月の時点で蝶番長32.8mmで400個を得るに至った。

(2) 新たな高水温耐性系統の作出

産卵刺激に対して、愛媛県産は雌7個、雄6個が反応し、約1,900万粒の受精卵が得られた。また高知県産は雌6個、雄7個が反応し、約1,400万粒の受精卵が得られた。この生産においても、浮遊幼生時及び付着幼生への変態時に大量減耗を起こし、平成11年11月の時点で愛1が蝶番長33.8mmで400個、高1が28.0mmで200個を得るに至った。

(3) HW3の高水温耐性試験

HW3と、愛1を用いて高水温耐性試験を行ったところ、いずれも生残率は38%と差が見られなかった。このことは継代を重ねることでさらに形質の固定化が図れるかという問題点を残した。よって更に継代を重ね、高水温耐性形質について継代回数の少ない系統との比較を行い、より効果的な選抜育種方法について検討する必要があると考えられた。

(4) 血リンパ中蛋白質濃度と血球数及び血リンパ中の遊離アミノ酸組成の関係について

ローリー法で測定した血リンパ中蛋白質濃度は表1及び2に示すように、血球数及び血リンパ中の遊離アミノ酸濃度に左右されていなかった。このことから「高水温選抜+血リンパ中蛋白質濃度」選抜の効果を検討するためにはアコヤ貝における活力の目安となる炭酸脱水素酵素等の酵素活性の高低との関係について検討する必要があると考えられる。

表1 遊離アミノ酸分析結果

アミノ酸種類	供試員(単位: $\mu\text{M}$ )		
	1	2	3
O-Phosphoserine	0	0	0
Taurine	44.7	133.9	484.4
Aspartic Acid	0	15.1	46.9
Threonine	27.6	54.3	36.9
Serine	46.7	50.5	62.7
Glutamic Acid	12.3	22.2	49.1
Sarcosine	0	0	0
Proline	47.6	57.3	44
Glycine	46.4	87.9	105.4
Alanine	119.7	110.1	150.3
Citrulline	0	0	0
$\alpha$ -amino-n-butyric acid	0	0	8.1
Valine	35.8	41.7	86.8
Cystine	0	0	28.4
Methionine	13.9	22	46.7
L-Cystathionone	0	0	0
Isoleucine	17.5	21.8	57.3
Leucine	17.3	24.3	58
Tyrosine	9.2	16.5	17.6
Phenylalanine	0	10.2	16.4
$\beta$ -alanine	0	0	0
$\beta$ -Amino-iso-Butyric Acid	43.4	212.7	0
$\gamma$ -Aminobutyric Acid	0	0	0
Ethanolamine	0	0	0
Ammonium Chlorid	0	0	0
Omithine	74.7	95.2	128.7
Lysine	50.6	95.5	130
Histidine	0	0	0
3-Methylhisitidine	0	0	0
Arginine	0	50.5	78.1
血リンパ蛋白質濃度 ( $\text{mg}/\text{ml}$ )	0.924	0.548	0.419

測定は平成11年12月に実施

表2 血リンパ中蛋白質濃度と血球数

供試員	血球数 $\times 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$	蛋白質濃度 ( $\text{mg}/\text{ml}$ )
1	107.0	1.587
2	410.5	1.266
3	174.5	1.633
4	304.5	1.275
5	121.0	1.560
6	192.0	1.064
7	253.2	1.422
8	104.5	1.679
9	206.5	1.505
10	137.5	1.972

測定は平成11年12月に実施

# 品種改良効率化基礎技術開発研究Ⅱ (国庫委託) (平成9年度～11年度)

(マダイのイリドウイルス感染症耐性系統作出技術の開発)

## 1 緒言

マダイの養殖は、海産養殖魚の中でも重要な位置を占め、また、親魚養成から種苗生産まで一貫した養殖技術が初めて開発された海産魚でもある。このため、早くから養殖用高成長魚の選抜育種が行われ成果を上げているが、耐病性については十分な成果が出ていない。現在、養殖現場でマダイのへい死原因として最も高い割合を占めるイリドウイルスに対する耐性マダイの作出を育種対象群を用いて検討する。

## 2 方法

(1) 担当者 北野 健、深浦雄一、木村武志、倉田清典

(2) 試験方法

ア イリドウイルス感染による選抜

平成11年5月に、イリドウイルス選抜群と天然F1群からそれぞれ次世代を作出し、これら作出群を用いて8月にイリドウイルス感染試験を行った。イリドウイルス感染の有無は、PCR及び抗体により調べた<sup>1)</sup>。

イ イリドウイルス感染による選抜個体のイリドウイルスDNA量変化調査

今年度選抜した個体を継続飼育し、平成11年9月にそれぞれ4尾の脾臓からISOGEN(N社)を用いてDNAを抽出してPCRを行い<sup>2)</sup>、イリドウイルスDNAの有無を調べた。

## 3 結果及び考察

(1) イリドウイルス感染による選抜

選抜群(イリドウイルス選抜F1)と対照群(天然F2)を用いてイリドウイルス感染試験を行った結果、最終生残率は、選抜群が14.2、11.4%と、対照群の4.2、6.8%に比べて高く、選抜による生残率の上昇が示された(図1)。

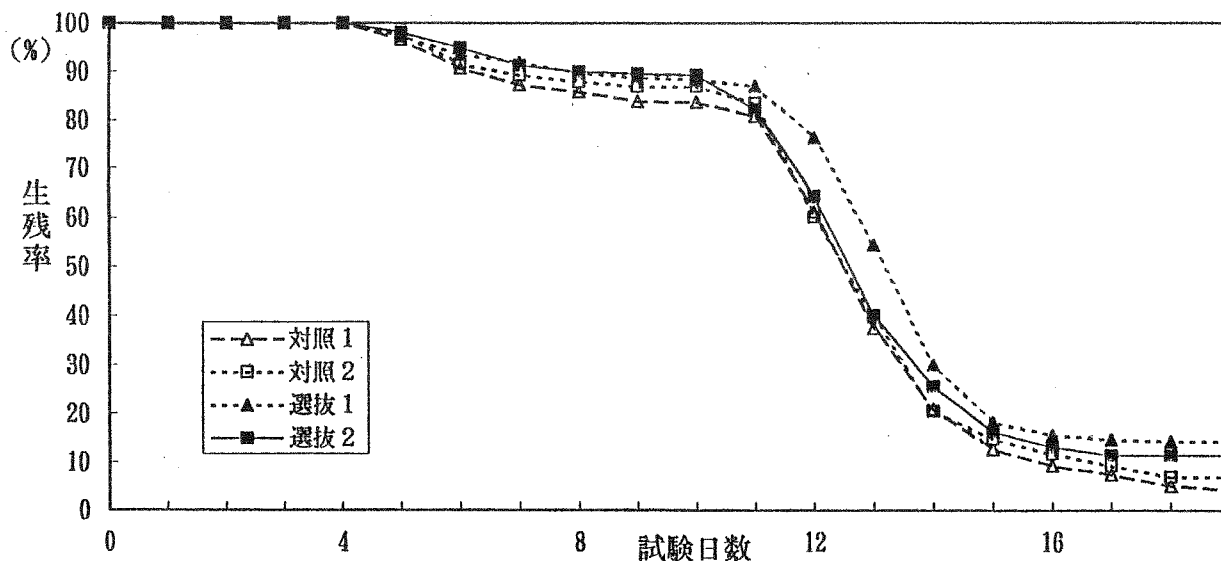


図1 生残率の推移

(2) イリドウイルス感染による選抜個体のイリドウイルスDNA量変化調査

今年度選抜した選抜群及び対照群についてイリドウイルスDNAの有無を調べた結果、Nested PCRにより全ての個体でイリドウイルスが検出された(表1)。

表1 選抜個体のPCRによるイリドウイルスの検出結果

感染試験直後 (H11.9)	個体数	1st	Nested
対照群 1	4	-	+
対照群 2	4	-	+
選抜群 1	4	-	+
選抜群 2	4	-	+

+ : すべての個体で検出、- : すべての個体で検出されず

#### 4 参考文献

- 1) Kurita J, Nakajima K, Hirono I and Aoki T (1998) : Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, 33, 17-23.

# アサリ総合対策試験（<sup>単</sup> 平成8年度～）

## （種苗生産試験）

### 1 緒言

アサリ増殖試験の一環としてアサリ種苗生産技術の確立を目的に研究を行った。本年度は、アサリ種苗生産の簡素化のため、冷凍パブロバがアサリの初期餌料として適するかどうかを明らかにすることを目的に試験を行った。

### 2 方法

(1) 担当者 北野 健、深浦雄一、木村武志

(2) 冷凍パブロバのアサリD型幼生餌料としての有効性

平成11年9月27日に、大矢野町漁業協同組合から購入したアサリ10kgを用いて採卵を行った。9月28日に孵化したD型幼生を3t水槽3面にそれぞれ約300万個収容し、餌料として1日に2回10,000-30,000 cells/mlになるようにパブロバ (*Paulova lutheri*) 投与した区、パブロバ+冷凍パブロバ (O社製) を投与した区、冷凍パブロバを投与した区を設けて試験を行い、沈着までの生残状況を調べた。

(3) 冷凍パブロバのアサリ沈着稚貝餌料としての有効性

平成11年10月8日に、沈着した稚貝を3t水槽2面にそれぞれ約15万個収容し、餌料として1日に2回30,000-120,000 cells/mlになるようにパブロバを投与した区、冷凍パブロバを投与した区を設けて試験を行い、平成12年3月16日に成長及び生残個数を調べた。

### 3 結果及び考察

(1) 冷凍パブロバのアサリD型幼生餌料としての有効性

パブロバ投与区とパブロバ+冷凍パブロバ投与区の幼生は、餌の捕食が確認されたが、冷凍パブロバ投与区では全く確認されなかった。また、パブロバ投与区では孵化12日目に約30万個の沈着稚貝が確認できたが、冷凍パブロバ投与区では孵化5日目に、パブロバ+冷凍パブロバ投与区では孵化7日目に全滅した。これは、冷凍パブロバの投与による水質の悪化が原因ではないかと思われる。これらのことから、冷凍パブロバはアサリD型幼生の餌料としては適していないのではないかと考えられた。

(2) 冷凍パブロバのアサリ沈着稚貝餌料としての有効性

平成12年3月16日に調べた結果、パブロバ投与区では平均全長4.52mmの幼生が2,030個確認されたが、冷凍パブロバ投与区では幼生が全く確認されなかった。このことから、冷凍パブロバはアサリ沈着稚貝の餌料としても適していないことが示唆され、今後授与するためには別の投与方法を検討する必要があると考えられた。

# 地域先端技術共同研究開発促進事業（国庫補助） （平成8年度～）

## （染色体操作によるマダイ・ヒラメの優良種苗の生産技術）

### 1 緒言

この事業は昭和61年度～平成7年度まで実施された地域バイオテクノロジー研究開発促進事業で開発された染色体操作による養殖用優良種苗の生産技術を、実用化に向けて研究を行うものである。対象魚種としてはマダイとヒラメで、マダイについてはクローン魚の作出、ヒラメについては雌性化魚の実用化について試験を行った。

なお詳細は「平成11年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書、マダイ・ヒラメの優良形質固定化技術等の高度化 平成12年3月 熊本県」で報告した。

### 2 方法

(1) 担当者 北野 健、深浦雄一、木村武志、倉田清典

(2) 試験方法

ア マダイ

(ア) 卵割阻止型雌性発生群の作出

平成11年4月に、卵割阻止型雌性発生群の作出を試みた。卵割阻止条件は、受精45分後にフレンチプレスで650kgf/cm<sup>2</sup>の圧力を5分間かける方法で行った。

イ ヒラメ

(ア) 全雌生産種苗の養殖特性評価

100t水槽に、平成7年または平成9年に作出した通常雌20尾と性転換雄50尾を収容し、早期自然採卵による全雌生産試験を行った。飼育は自然水温で行い、人工照明（16時間/日）による長日処理（10/25～）により自然採卵の早期化を図った。また、採卵した受精卵約100万粒を用いて種苗生産を行い、その種苗の一部を養殖業者に飼育してもらい、平成11年12月に性比および成長を調査した。

(イ) 高水温処理期間による性転換雄の割合

平成11年1月に作出した遺伝的全雌群を用いて、日齢30-100、70-100、100-130に高水温（27℃）した区および対照区（18℃）の4試験区を設け、平成11年12月に性比を調べた。

(ウ) エストロゲン受容体阻害による性転換の可能性

平成11年1月に作出した遺伝的全雌群を用いて、日齢30-100にエストロゲンレセプターのアンタゴニストであるタモキシフェン（W社）を1、10、100μg/g dietの濃度で投与する区、タモキシフェン（100μg/g diet）とエストラジオール-17β（1μg/g diet）の混合投与区（TAM+E2）、タモキシフェン（100μg/g diet）と17α-メチルテストステロン（10μg/g diet）の混合投与区（TAM+MT）、高水温（27℃）飼育下でエストラジオール-17β（1μg/g diet）を投与した区（HT+E2）、高水温飼育区（HT）および対照区（C）の8試験区を設け、平成11年12月にそれぞれの区の性比を調べた。

### 3 結果及び考察

(1) マダイ

ア 卵割阻止型雌性発生群の作出

今年度は、1群の卵割阻止型雌性発生群を作出した。孵化率は、0.02%（対照区：97.5%）であり、現在飼育中である。

(2) ヒラメ

ア 全雌生産種苗の養殖特性評価

全雌生産種苗の養殖特性を調べた結果、今年度調査した2業者とも雌の割合は100%であったにもかかわらず、

平成7年度に行った飼育試験に比べて平均全長および体重が劣っていた(表1)。このことに関しては、今後検討する必要があると思われる。

イ 高水温処理期間による性転換雄の割合

各試験区における性転換雄の割合を調べた結果、日齢30-100日間処理した区では100%であったのに対して、100日前後のみ約30日間処理した区では16.7-23.5%と低い値を示し、100日前後での性転換能力の低下が伺われた(表2)。

ウ エストロゲン受容体阻害による性転換の可能性

性転換雄の出現割合を図1に示した。雄の割合は、対照区が2.2%であったのに対して、TAMを投与した1、10、100 $\mu\text{g/g}$  diet区では、それぞれ14.6、25.0、54.1%と濃度に伴って増加し、エストロゲン受容体阻害による雄化現象が観察された。また、TAM+E2区、TAM+MT区では、それぞれ0%、100%あった。一方、高水温飼育区における性転換雄の割合は100%であったのに対して、高水温飼育下でE2を投与した区では0%であったことから、高水温飼育による性転換は、エストロゲンレセプターの異常によるものではなく、エストロゲン量の減少によるものと考えられた。

表1 養殖業者に飼育依頼した全雌生産種苗の調査結果

養殖業者	A	B	A	C
採卵年月	平成11年1月		平成7年1月	
測定年月	平成11年12月		平成7年12月	
測定尾数	23	20	41	45
平均全長(mm)	250.5	280.6	376.0	315.6
平均体重(g)	190.6	270.8	699.8	355.7
雌の割合(%)	100	100	100	100

表2 各試験区における性比調査結果

試験区	1	2	3	4
高水温処理期間(日齢)	-	70-100	100-130	30-100
調査尾数	45	17	12	23
平均全長(mm)	256.5	277.3	243.6	277.1
平均体重(g)	218.4	249.6	193.8	222.6
性転換雄の割合(%)	2.2	23.5	16.7	100.0

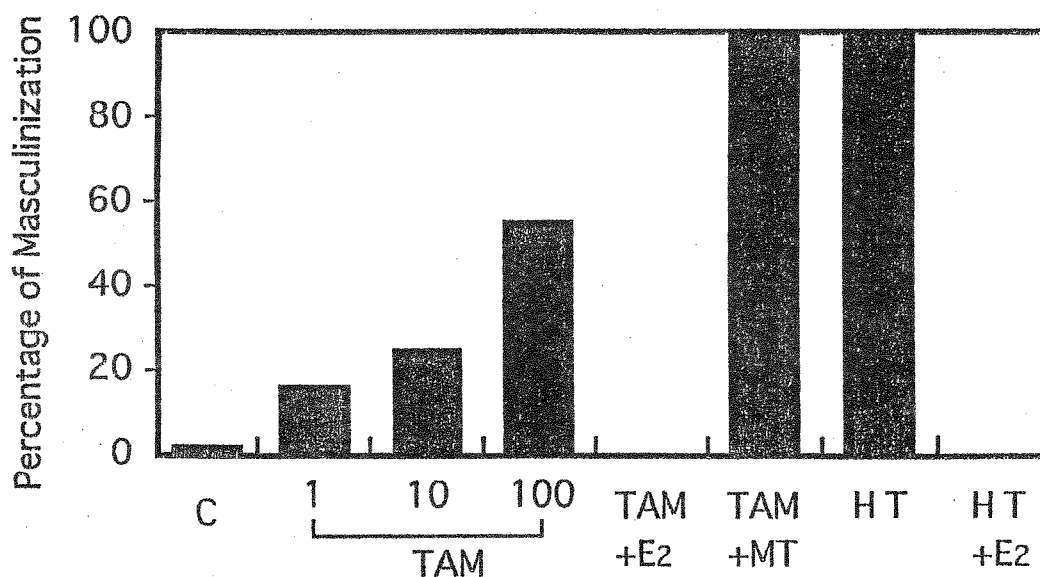


図1 各試験区における性転換雄の割合

# 遺伝子利用技術開発試験（単 県平成8年度～）

## （病原体の遺伝子を利用した魚病対策技術開発）

### 1 緒言

魚介類養殖においては、寄生虫、細菌及びウイルスを病原体とする疾病が多発し、養殖漁家の経営に重大な影響を与えている。寄生虫については顕微鏡を用いた寄生虫の確認、細菌については選択培地による分離培養と抗血清による確認で診断及び対策を行っている。しかしウイルス性疾病については罹病個体から分離細菌がなく、既報の症状を呈した場合をもって当該ウイルス病と判断している。また確実な判断には感受性を維持する培養細胞を用いて分離培養を行い、さらに中和試験の実施、電子顕微鏡による確認等非常に特殊な技術、経費及び時間を要し、感受性を持つ培養細胞が無い場合にはこれらの手法が用いられない状況となる。さらに近年は化学療法の発達により水産研究センターにおける魚病診断は寄生虫や細菌性の疾病からウイルス性疾病へ移行している現状である。このことから魚病ウイルスに特有の遺伝子を増幅して検出する PCR (Polymerase chain reaction) 法による魚病診断がその簡易性、迅速性において有効性を発揮することが期待されており、実際にクルマエビの急性ウイルス血症においてはその高感受性を生かして、発病個体のみならずキャリア個体の感染確認にも用いられている。今年度はウイルス病に限らずこれまで大学及び国立の研究所等で報告された魚病診断に用いられる複数の PCR 法を導入して、本県における PCR 魚病診断法の確立を行った。

### 2 方法

(1) 担当者 木村武志、深浦雄一、北野 健

(2) 試験方法

#### ア 遺伝子の分離手法

ウイルスは遺伝情報として RNA 及び DNA を保有する種類がある。このため同一試薬で RNA、DNA が分離精製できる日本ジーン社製の ISOGEN を用い、分離・精製を行った。なお RNA ウイルスを PCR にて検出する場合には、RNA から DNA に転換する操作を含む RT-PCR をパーキンエルマー社製の RNA-PCR キットを用いて行った。

#### イ 導入した PCR 法について

表 1 に導入した PCR 反応条件及びプライマーを示した。PCR はパーキンエルマー社製の Ampl. Taq. Gold を用いて実施した。

(3) 結果及び考察

平成 11 年 4 月から平成 12 年 3 月まで、約 300 件の PCR 診断を行った。このうち PAV (クルマエビの急性ウイルス血症) に関する検査が全体の 9 割と殆どを占めた。その他のイリドウイルス、冷水病、VNN、ビルナウイルス、クドア症、ペコ病についても診断を行い手法の確立を行った。

本県においては PCR の反応が成立する条件としてサンプルの代わりに滅菌蒸留水を用いたものをブランクコントロールとし、既に疾病が明らかになった個体から得られた遺伝子を用いたものをポジティブコントロールとして反応を行い、電気泳動時にブランクにバンド無く、ポジティブに予想される大きさのバンドが確認された場合のみにおいて PCR 反応の成立とした。

今回の検査の中で、外国から輸入されたヒラメ卵を用いて種苗生産を行った業者で大量死が発生し、その種苗から SJNNV 遺伝子が検出され、診断を依頼した業者には廃棄処分を通知した。このように生産効率を上げるため外国産の卵、種苗を輸入する状況は今後とも増加することが予想され、これに伴う既知及び未知の疾病が蔓延する危険性が考えられる。この輸入種苗及び卵の迅速な検査体制の確立のためにも高感受かつ迅速性をもつ PCR 検査手法は欠くことができないと考えられ、「持続的養殖生産確保法」が施行されたことも併せ、検出できる病原体種類の一層の充実と技術の安定化が必要と考えられる。



表1 導入した PCR 反応条件とプライマーの配列

疾病名	原因病原体名	反応条件	プライマー配列
PAV (クルマエビの急性ウイルス血症)	PRDV	95 °C 1min.	1th upper curent 5' ATCATGGCTGCTTCACAGAC 3'
Penaid aqute viremia (DNA Virus)	Penaid Rodshaped DNA virus	57°C 1min.30sec.	1th under current 5' GGCTGGAGAGGACAAGACAT 3'
		72 °C 1min.	2th upper current 5' TCTTCATCAGATGCTACTGC 3'
		(35cycles)	2th under current 5' TAACGCTATCCAGTATCACG 3'
ビルナウイルス病 (RNA Virus)	MABV Marine Birna Virus	95 °C 1min.	1th upper curent 5' AGAGATCACTGACTTCACAAGTGAC 3'
		48 °C 1min.	1th under current 5' TGTGCACCACAGGAAAGATGACTC 3'
		72 °C 1min.	2th upper current 5'CAACACTCTTCCCCATG 3'
		(30cycles)	2th under current 5' AGAACCTCCAGTGTCT 3'
VNN (ウイルス性神経線壊死症)	SJNNV	95 °C 40sec.	upper curent 5' CGTGTACATCATGTGTCGCT 3'
Viral nervous necrosis striped jack nervous necrosis virus		55 °C 40sec.	under current 5' CGAGTCAACACGGGTGAAGA 3'
		72 °C 40sec.	
		(25cycles)	
イリドウイルス病 (DNA virus)	RSIV Red Sea Bream Iridovirus	94 °C 30sec.	1th upper curent 5' CTCAAACACTCTGGCTCATC 3'
		58 °C 1min.	1th under current 5' GCGTTAAAGTAGTGAGGGCA 3'
		72 °C 1min.	2th upper current 5' TACAACATGCTCCGCCAAGA 3'
		(30cycles)	2th under current 5' GCACCAACACATCTCCTATC 3'
冷水病	Flavobacterium psychrophilum	94 °C 30sec.	1th upper curent 5' AGAGTTTGATC(AQ) TGGCTCAG 3'
		51 °C 90sec.	1th under current 5' GGTTACCTTGTACGACTT 3'
		72 °C 120sec.	2th upper current 5' GTTGGCATCAACACACT 3'
		(30cycles)	2th under current 5' CGATCCTACTGCGTAG 3'
クドア症	Kudoa amamiensis	94 °C 1min..	1th upper curent 5' CTATCAACTAGTTGGTGA 3'
		53 °C 1min.	1th under current 5' CAATGTCCTGGACCTGGTG 3'
		72 °C 2min.	
		(35cycles)	
ペコ病	Microsporidium seriolae	95 °C 30sec.	1th upper curent 5' CACCTGTCTGCAATGCGGG 3'
		43 °C 30sec.	1th under current 5' GGTGTGTTGGCCGTACGGGG 3'
		72 °C 1min.	2th upper current 5' GGTGCGCAGCAGGAGCTTTC 3'
		(30cycles)	2th under current 5' CTTCCGGCGTATCTTTAGTC 3'

# 海外悪性伝染病影響評価シミュレーションモデル作成事業（委平成9年度～11年度 託）

## 1 緒言

PAV (Penaid Aqute Viremia : クルマエビの急性ウイルス血症) が本県クルマエビ養殖場に定着した経緯について疫学的見地から明らかにし、新疾病が発生した場合の感染の拡大等、影響評価(シミュレーションモデル作成)の資料にすることを目的とする。

今年度は有明海で漁獲される天然クルマエビの PRDV 感染状況について、クルマエビ養殖池における PAV 発生と収容密度の関係について及び PRDV 発病耐化クルマエビの再感染実験について実施した。

## 2 有明海で漁獲される天然クルマエビの PRDV 感染状況について

### (1) 目的

PRDV は、表1に示すように発病したクルマエビ養殖池に棲息する他の甲殻類に感染すること、種苗生産用の採卵用の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、表2に示すように漁獲される天然のクルマエビや他のエビにも感染が見られることなどが報告されている。

このことから、PRDV が国内に定着した経緯として、図1に示すように、発病箇所周辺に感染可能なクルマエビ以外の生物の有無、クルマエビ及びその他の生物での水平及び垂直感染の可否、天然海域への伝搬の有無等が考えられる。

そこで、今年度は本県の主要なクルマエビ漁場である有明海において、PRDV の感染状況を PCR を用いて調査した。

### (2) 方法

ア 担当者 木村武志、深浦雄一、宮崎孝弘(資源研究部)

#### イ 調査方法

平成11年6月～10月にかけて、本県の有明海に面する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、適時 ISOGEN を用いて DNA を抽出し、PCR を行うまで TE (pH 8.0) に溶解して-20℃で凍結保存した。PCR は Perkin Elmer 社の Amp Taq Gold 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。

### (3) 結果及び考察

表3に示すように、検査に用いた個体数は240検体で、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日に水揚げされた検体で、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。

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 monoceros</i>
イソガニ	<i>Hemigrapsus saguineus</i>
ニホンスナモグリ	<i>Callinasa japonica</i>
アシハラガニ	<i>Helica tridens</i>
テッポウエビ	<i>Alpheus brevirostratus</i>
クルマエビ	<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>

参考文献 1), 2), 3)

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 acclivis</i>
アカエビ	<i>Metapenaeopsis barbata</i>

参考文献 8)

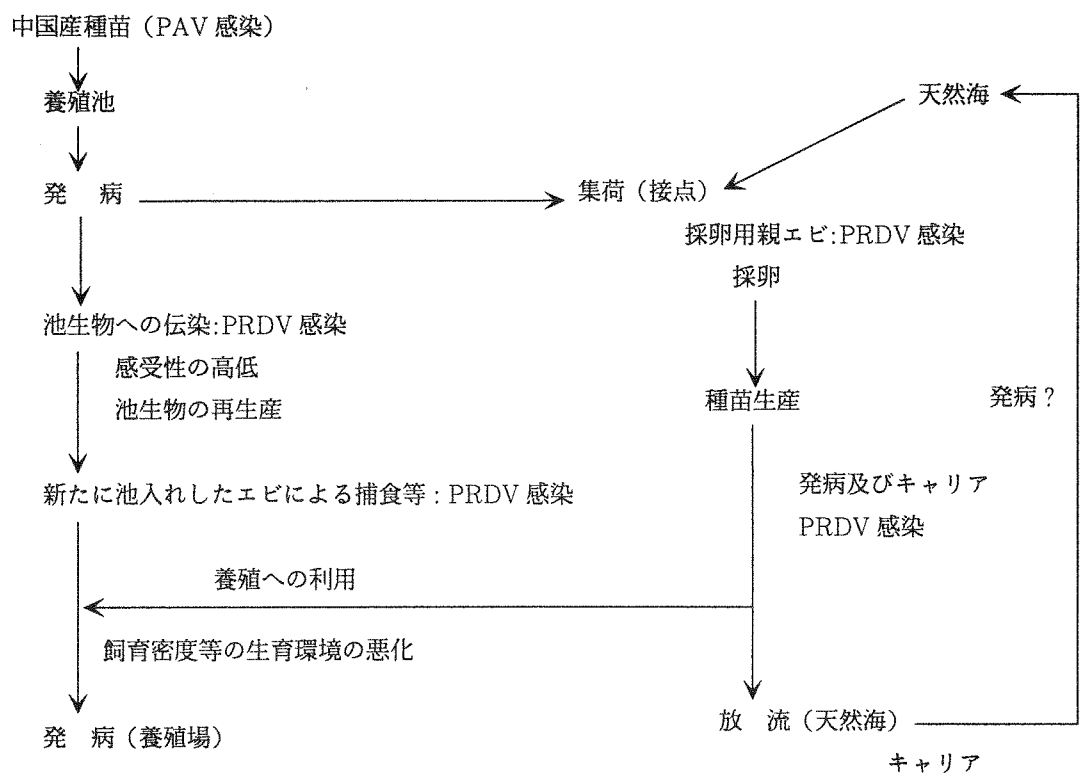


図1 PRDV感染環の成立

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 4) 5) 7)、岡本ら 6)、及び Maedal) 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保有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湾口域で漁獲される個体を用いることが多い。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が申し合わされている。しかし、民間で生産されたエビについてはその生産における 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、PAV の感染サイクルを切断することは困難であると推察される。

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。

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	陽性個体率 (%)	平均全長 (mm)	平均体重 (g)
6 月 10 日	中 部	0.0	125.9	24.0
6 月 14 日	湾 口 部	13.3	163.7	52.1
7 月 12 日	中 部	0.0	126.0	24.7
8 月 5 日	湾 口 部	30.0	159.0	46.1
8 月 23 日	中 部	3.3	110.4	15.8
9 月 2 日	中 部	43.3	114.7	16.7
9 月 6 日	湾 口 部	6.7	170.7	61.9
10 月 27 日	中 部	6.7	137.2	27.5

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 感染生物を用いて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。

ことが必要と考えられ、病原体の定着及び拡大を防疫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。

#### (4) 参考文献

- 1) 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
- 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) 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
- 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) 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
- 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) 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 Spawnd Broodstock Fish Pathology, 34 203-207
- 8) 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

### 3 クルマエビ養殖池における PAV 発生と収容密度について

#### (1) 目的

平成 6 年から 8 年に本県の半築堤式クルマエビ養殖場での PAV 発生状況調査から、飼育密度を 150g/㎡になるようにこまめに間引き等の管理を行った養殖場では発生が無い、発生してもへい死率を低く抑えることで、生産に結びついた事例があった。このことから本県においては半築堤式養殖場の飼育密度を 150g/㎡になるように指導している。この収容密度と発病の関連を検討するため、平成 11 年度において天草水産産業指導所と共同で水産研究センター周辺の養殖場の協力を得、収容密度と発病の関連について調査した。

#### (2) 方法

ア 担当者 木村武志、深浦雄一、中野平二 (天草水産産業指導所)

#### イ 調査方法

養殖開始前の池生物及び導入種苗を PCR により検査を行い、養殖開始後 1 週間から 2 週間間隔で定期的に PCR 検査と飼育密度調査 (坪狩り調査) を行った。調査の結果 150g/㎡を上回っていた場合は間引きを行った。

#### (3) 結果及び考察

養殖開始前の池生物 (イソガニ類) 及び導入種苗の PCR 検査では、PRDV 遺伝子は検出されなかった。表 4 に示すように N 及び Y 養殖場において 9 月以降に PAV の発生が見られ、Y 養殖場ではほぼ全滅の状態であったが、N 養殖場では 10 % 程度の死亡で出荷が可能であった。

N 養殖場では、9 月の発生時の収容密度は 161g/㎡であったが、Y 養殖場ではエビの急激な成長に間引き作業が追いつかず、186g/㎡と、基準とする 150g/㎡を上回っていたことが観察された。

このようにわずかに約 30g/㎡の密度差が発病に大きく関係してくる要因について、「侵入と伝播の数理生態学」125~130 頁に示される環境収容密度に着目し、検討を行った。なお本検討は自然界における伝搬について検証した内容を、クルマエビ養殖場という閉鎖空間に当てはめて検討した。

表4 ウイルス検査結果と収容密度の変化（上段PCR検査結果、下段収容密度：g/m<sup>2</sup>）

養殖池/検査月日	8/11	8/19	8/27	9/2	9/8	10/1
N 大量死発生せず	陰性 48	— 52	— 54	陰性 110	陽性 130	— 161
Y 大量死発生		陰性 50	陰性 100	陰性	陽性 115	陽性 189

図2に、クルマエビ養殖場におけるPAVの感染過程の流れ図を、表5にクルマエビ養殖場での生態とPAVに関するパラメータの値を示した。各値は平成9、10年度の本事業による同居感染実験の結果から得られた数値をあてはめた。出生率は0、自然死亡率は無感染対照区の死亡率20%、感染率は感染が成立した最低値の4%（全収容尾数の4%に人為感染させた）、発病率は試験区の平均死亡率の84%、発病による死亡率は100%とした。

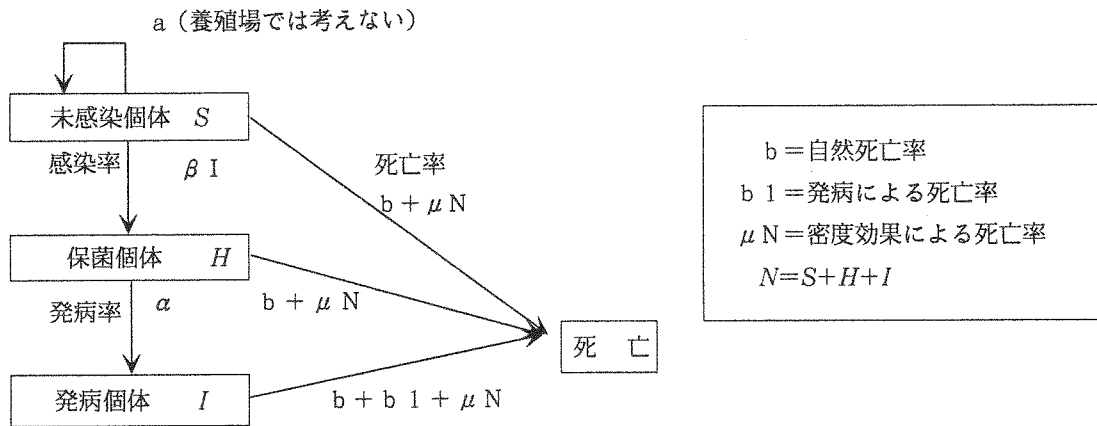


図2 クルマエビ養殖場におけるPAVの感染過程の流れ図

ここで少数の感染個体が養殖場に侵入すると、これが養殖場内に広がるか否かの判定条件は次の式で求められる。

$$K \text{ (初期密度)} > K_t \text{ (侵入の臨界寄主密度)} \equiv \{(a + b_1)(a + \sigma)\} / \beta \sigma$$

この式で、PAVが侵入に成功するためには、KがK<sub>t</sub>を越えていなければならない。ここで表5の数値をこの式に代入すると、実験を行った3.4gのエビの場合、25.0尾/m<sup>2</sup>となる。

養殖場で最もPAVが発生しやすい夏場にはクルマエビの魚体重は4g～6gに成長している。表6に収容密度が150、200、250g/m<sup>2</sup>の場合で魚体重が4～6gの場合の尾数の計算値を示したが、150g/m<sup>2</sup>の尾数が前述したK<sub>t</sub>値の25.0尾/m<sup>2</sup>に近似する傾向が伺え、150g/m<sup>2</sup>の有効性が推察された。

表5 クルマエビ養殖場での生態とPAVに関するパラメータの値

記号	観測値
a	出生率 0
b	自然死亡率 20
$K = (a - b) / \mu$	環境収容密度 不定
β	感染率 4
σ	発病率 84
b <sub>1</sub>	発病による死亡率 100

表6 クルマエビの収容密度と尾数の関係

収容密度 (g/m <sup>2</sup> ) / 魚体重 (g)	4	5	6	K <sub>t</sub> 値
150	37.5	30	25	25.0 尾
200	50	40	33.3	
250	62.5	50	41.7	

(4) 参考文献

重定南奈子、1992。「侵入と伝播の数理生態学」東京大学出版会、東京

## 4 PRDV 発病耐化クルマエビの再感染実験

### (1) 目的

実験2で調査を行ったN養殖場のクルマエビは、平成12年1月のPCR検査でも陽性を示し、PRDV遺伝子を保持していた。また養殖場及び実験的にPRDVに感染・発病させ生残したクルマエビがPRDVに対して疑似免疫反応を示すことが報告された。このことは収容密度等、養殖場の飼育環境を健全に管理することで、PRDVに感染・発病しても低い死亡率で抑えられ、再感染による発病も防御できる、いわゆる「ウイルスとうまく付き合う養殖方法」のあり方を示している。よって養殖場で発病履歴の無いクルマエビと発病履歴のあるクルマエビを用いて、疑似免疫反応の有無について検証した。

### (2) 方法

ア 担当者 木村武志、深浦雄一

#### イ 実験方法

発病履歴のあるN養殖場のクルマエビ(平均体重22g)、発病履歴のないO養殖場のクルマエビ(平均体重20g)及び対照区として水産研究センターで育成中のクルマエビ(平均体重20g)の各5尾から、あらかじめPBS(-)を150 $\mu$ l採取した注射器で150 $\mu$ lずつ採血し、転倒混和し、3,000r.p.mで10分間遠心分離して上清を得た。総量900 $\mu$ lの上清に山口県水産試験場で作成されたPRDV感染液を10,000倍に希釈して100 $\mu$ l加え20 $^{\circ}$ Cで4時間処理し、最終希釈倍率を10<sup>-5</sup>とした感染液100 $\mu$ lずつを水産研究センターで育成した健康なクルマエビ10尾の腹節部に打注し、横75 $\times$ 縦90 $\times$ 深さ19cm水槽で、換水率200%、21 $^{\circ}$ Cの条件で給餌を行い7日間飼育した。

### (3) 結果及び考察

表7に飼育期間中のへい死状況を示した。死亡したエビにはPAVに特徴的な頭胸甲部の白斑、体色の赤化が観察され、飼育期間中の死亡率はN養殖場のエビを用いて作成した感染液で攻撃を行った区は60%、O養殖場の区は90%、対照区は60%の値を示した。発病対照区が発病履歴のあるN区と同様の値を示したため、明らかな疑似免疫反応を確認するには至らなかった。

表7 感染実験のへい死状況

区/経過日	1	2	3	4	5	6	7	合計	死亡率
N養殖場(発病履歴有り)	0	1	0	0	3	1	1	6	60%
O養殖場(発病履歴無し)	1	0	2	1	2	3	0	9	90%
対照区	0	0	1	2	0	1	2	6	60%

### (4) 参考文献

C.A. Venegas, L.Nonaka, Musiake, T.Nishizawa, and K.Muroga, (1999) A Quasi-immune response in kuruma prawn against PRDV : 平成11年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, 41

# 環境ホルモン対策技術開発試験 (単年度平成11年度)

## 1 緒言

環境ホルモン物質が与える魚類への影響を明らかにするための一環として、今年度は、環境ホルモンが蓄積しやすい底質で生息しているヒラメへのトリブチルスズ (TBT) の影響、特に性分化への影響を明らかにすることを目的に研究を行った。一方、魚体内に蓄積された TBT の排泄方法を開発するため、人体内でのダイオキシンや PCB に対する排泄促進効果があるセラミックが、TBT の排世にも促進効果があるかどうかを調べた。

## 2 方法

(1) 担当者 北野 健、深浦雄一、木村武志、倉田清典

(2) 共同研究者 九州大学農学部水産学科 大島雄治助手

九州大学大学院農学研究科博士課程 島崎洋平

(3) TBT が与えるヒラメの性分化への影響

供試魚として、平成 11 年 1 月に人工採卵により作出した全雌ヒラメ群を用い、性分化時期を含む日齢 35-100 日間、Bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) (T 社製) を 0、0.1、1mg/g 飼料の割合で毎日投与した。飼育水温は、日齢 100 までは 18 度、それ以降は自然水温で飼育した。性の判定は、日齢 300 日における生殖腺の外部形態及び組織観察により行った。

(4) セラミック投与による TBT 排泄促進効果調査

供試魚として、平成 11 年 1 月に熊本県栽培漁業協会で作出された通常ヒラメを用いた。日齢約 200 日目のヒラメ (平均体重約 30g) に、Bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) (T 社製) を体重当たり 5mg/g となるように腹腔内に注射投与し、投与翌日よりセラミック (O 社製) 3% 添加飼料とセラミック無添加飼料を飽食量投与して 81 日間飼育した。TBT の濃度及び成長を調べるため、投餌開始 0、13、27、41、61、81 日目に 6 匹ずつ取り出して -30℃ で保存した。TBT 濃度の測定は、定法により GC-FPD で行い、Mann Whitney U 検定によりセラミック投与区と対照区に有意差があるかどうかを調べた。

## 3 結果及び考察

(1) TBT が与えるヒラメの性分化への影響

性転換雄の出現割合は、0.1mg/g 投与区で 23.1%、1mg/g 投与区で 31.1% であり、対照区の 2.2% に比べて高い値を示した。また、生殖腺の組織像を観察した結果、精巣及び卵巣の組織異常は認められなかった。このことから、TBT はヒラメの性分化に影響を与え、遺伝的雌の雄化を誘導することが明らかになった。

(2) セラミック投与による TBT 排泄促進効果調査

魚体重当たりの TBT 濃度変化を図 1 に示した。投与後 13 日目及び 27 日目では、統計的に有意ではないものの、セラミック投与区が対照区よりも TBT 濃度が低い傾向にあった。しかし、その後はほとんど差が認められなくなった。このことから、セラミックは、体内の TBT 濃度が高いうちは排泄促進効果がある可能性が示唆された。

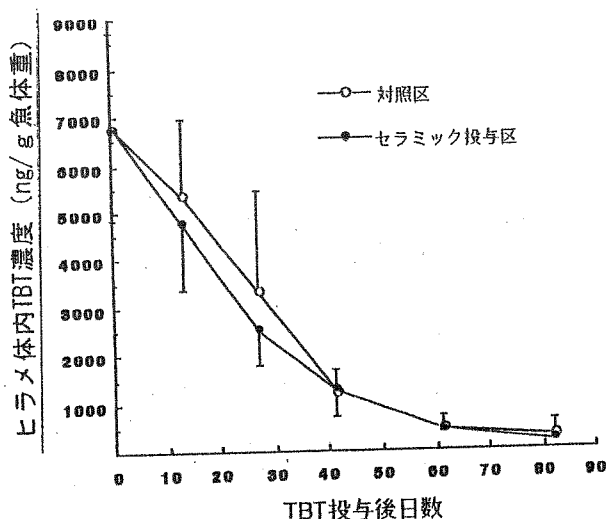


図1 ヒラメにおける TBT 濃度の変化

# 高品質アコヤガイ育成促進事業 (国庫補助)

(アコヤガイ大量死対策試験)

## 1 緒言

真珠養殖においては、貝柱の赤変化を伴う母貝の大量死が、業界存続の危機を招いている。この疾病は感染症が原因とされているが、その病原体の究明には至っていない。

この大量死対策として冬季に最低水温が13℃以下になる低水温漁場で越冬管理したアコヤガイのへい死が少ないことが報告されている。よって本県の漁場における低水温越冬管理法の有効性を検討し、大量死対策の一助とするために冬季に低水温で越冬管理したアコヤガイを県内の漁場に移動して死亡率等の比較を行った。また人為的に陸上水槽で期間を変えて低水温で越冬させたアコヤガイを県内の漁場に移動して死亡率等の比較を併せて行った。

## 2 方法

(1) 担当者 木村武志、深浦雄一、倉田清典

(2) 方法

### ア 漁場移動試験

#### 1) 供試貝及び試験の内容

平成10年度産愛媛天然貝と平成10年度に(財)熊本県栽培漁業協会が生産した人工貝の2品種を用いて実施した。冬季低水温漁場として図1に示す天草郡大矢野町のS真珠の作業筏を用い、平成11年1月13日～4月19日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である天草郡松島町のA真珠養殖の漁場に移動する群(以下「北北群」という)と、南部漁場である牛深市久玉町のA真珠養殖の漁場に移動する群(以下「北南群」という)に分割して配置した。また対照区として同様の2品種を通年牛深市久玉町のA真珠養殖の漁場で管理した群(以下「南南群」という)を用いた。各区とも50個収容した提灯籠を2段つり下げたものを4組用い、1組を死亡率調査用とし、別の1組を毎月の赤変化及び貝測定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、調査毎に死亡貝を取り除き、残りの2組から随時追加して収容個数を一定とした。調査は月1回実施し、死亡貝数及び、貝の湿重量、外形、閉殻筋の赤変化度、乾燥貝殻重量を10個を用いて測定し、平均を求めた。調査期間は平成11年11月までとした。水温については試験開始時から米国O社製の小形水温記録計を供試貝を入れた提灯籠に設置して測定を行った。

#### イ 低水温処理試験

##### 1) 供試貝及び試験の内容

平成10年度に(財)熊本県栽培漁業協会が生産した人工貝を用いて、平成11年1月26日から12～13℃の海水を入れた陸上30kL水槽で1, 2, 4, 8週間の4期間に

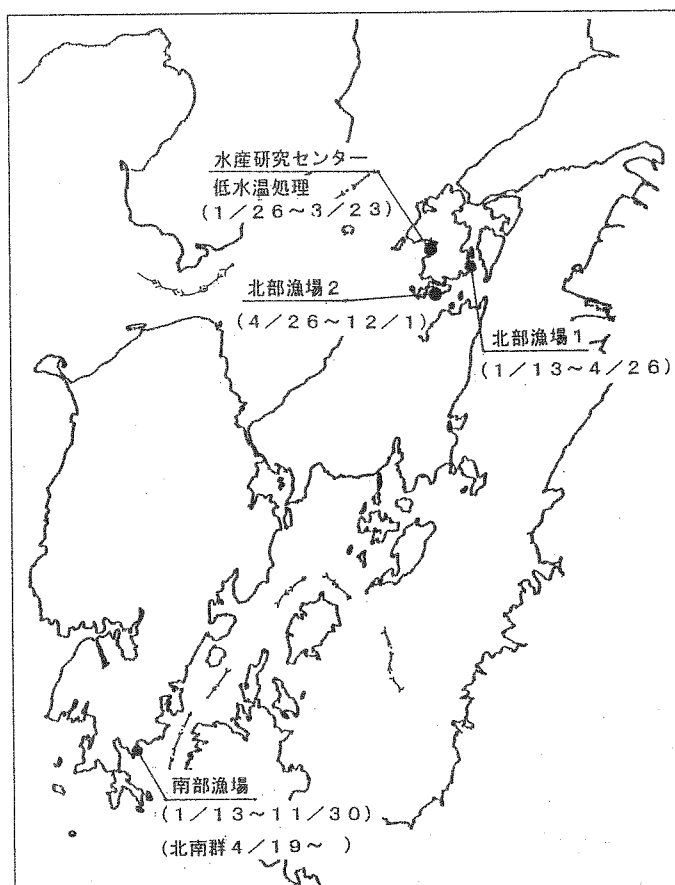


図1 試験漁場の位置



分けて平成 11 年 3 月 23 日まで低水温処理を行った。処理期間中は水温が 12℃以下にならないように加温を行いながら管理した。処理終了後、南部漁場である牛深市久玉町の A 真珠養殖の漁場に移動し、処理期間が赤変化及び死亡に与える影響について調査した。低水温処理期間中は止水・無給餌とし、適時換水を行った。使用員数及び測定項目、試験期間等はアの漁場移動試験に準じて実施した。

### (3) 結果及び考察

#### ア 漁場移動試験

試験期間中の北部漁場及び南部漁場の水温は図 2 及び 3 に示すように、南部漁場が 2 月下旬に 14℃台に低下した以外は 15℃を下回る期間が無かったのに対し、北部漁場は越冬管理中 15℃を下回ることがなく、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様な水温変化を示した。

試験期間中の死亡状況については、図 4 に示すように、北部漁場で越冬管理終了時に愛媛天然貝が 19%、協会生産貝が 77%の死亡が見られたのに対し、対照区の南南群では死亡は見られなかった。漁場移動後の死亡は 10 月になってから北北群、北南群にわずかに見られ初め、11 月に若干の死亡が見られたのに対し、南南群では 9、10 月に約 30%程度的大量死が発生した。試験期間中の累積の生存率は表 1 に示すように、2 品種の平均で北北群が 75.0%、北南群が 69.5%、南南群が 43.5%と有意な差が見られた。

赤変化については対照区の南南群において死亡が発生する 1 ヶ月前の 8 月から観察され、北南群がこれより 1 ヶ月遅れの 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。このように冬季の越冬管理を低水温漁場で行うことで、赤変化を遅滞させ大量死を防ぐことが本県漁場でも可能なことが明らかになった。しかし、北南群においては赤変化と若干の死亡が発生しており、この漁場移動対策をより効果的にするためには、移動先に前年度大量死の発生した貝を置かないような防疫的措置を組み合わせることが重要と考えられた。

表 1 漁場移動試験の結果

項目 / 群	北北群	北南群	南南群
期間中の累積生残率 (%)			
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
最終赤変化度 *			
愛媛天然貝	2.97	8.39	8.74
協会生産貝	3.07	7.00	11.02
平均	3.00	7.70	9.88

\* 色彩色差計の実測値 (平成 11 年 10 月の 10 個の平均値)

#### イ 低水温処理試験

処理を行った貝は、処理期間の長短に係わらず、9 月から 20~30%の大量死が発生し、表 2 に示すように最終的な累積生残率は、1 週間処理区で 50%、2 週間区で 37%、4 週間区で 46%、8 週間区で 47%であった。また赤変化についても 9 月以降に全ての区で顕著な赤変化が観察された。

このように今回の試験では陸上水槽を用いた低水温処理の効果は得られなかったが、この要因として、漁場移動試験では低水温期間が約 3 ヶ月間であったのに対し、最長でも 8 週間の処理であることから処理期間が不十分であったことが考えられる。今後は、人為的に水温を低下できるような設備を用い、より長期間の処理を検討する必要があるが、養殖現場で陸上水槽を利用した低水温処理は天候等による水温変化が大きい事なども考え合わせると利用が困難と思われる。

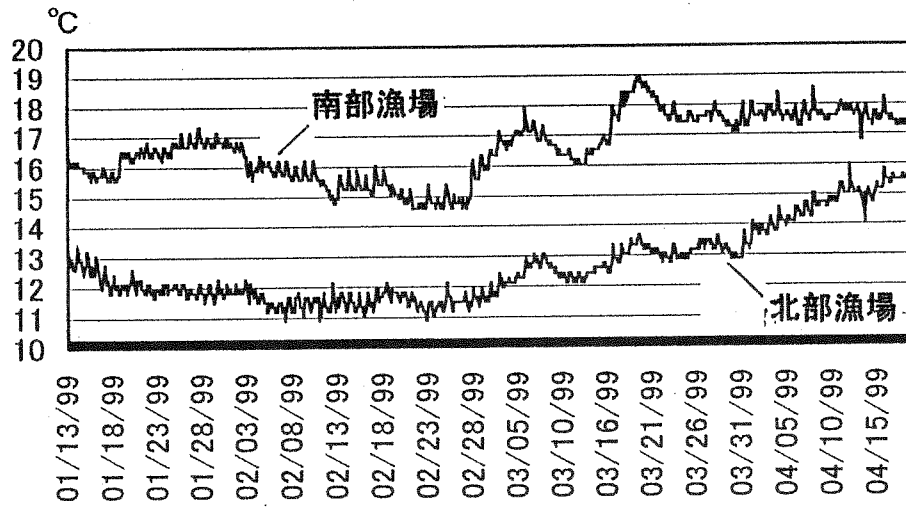


図2 漁場移動試験水温経過 (99. 1. 13~4. 19)

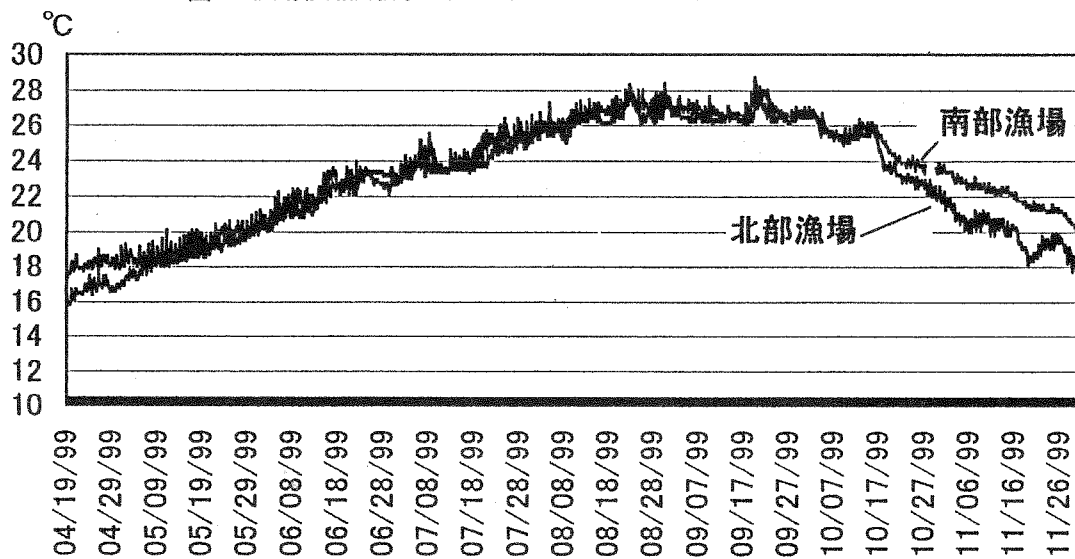


図3 漁場移動試験水温経過 (99. 4. 19~12. 1)

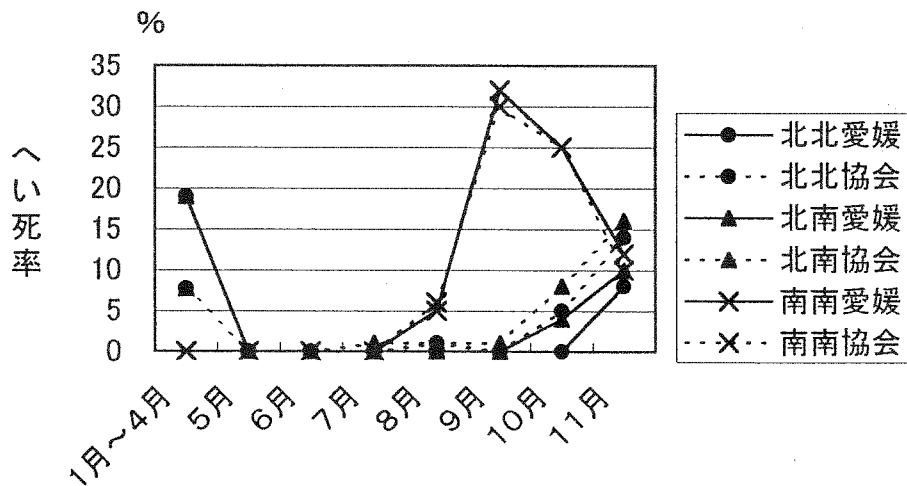


図4 漁場移動試験月別へい死亡率

表2 低水温処理試験の結果

項目/試験区	1週間処理	2週間処理	4週間処理	8週間処理
生残率(%)	50	37	46	47
赤変化	9.09	8.02	10.70	8.85

\* 色彩色差計の実測値 (平成11年10月の10個の平均値)