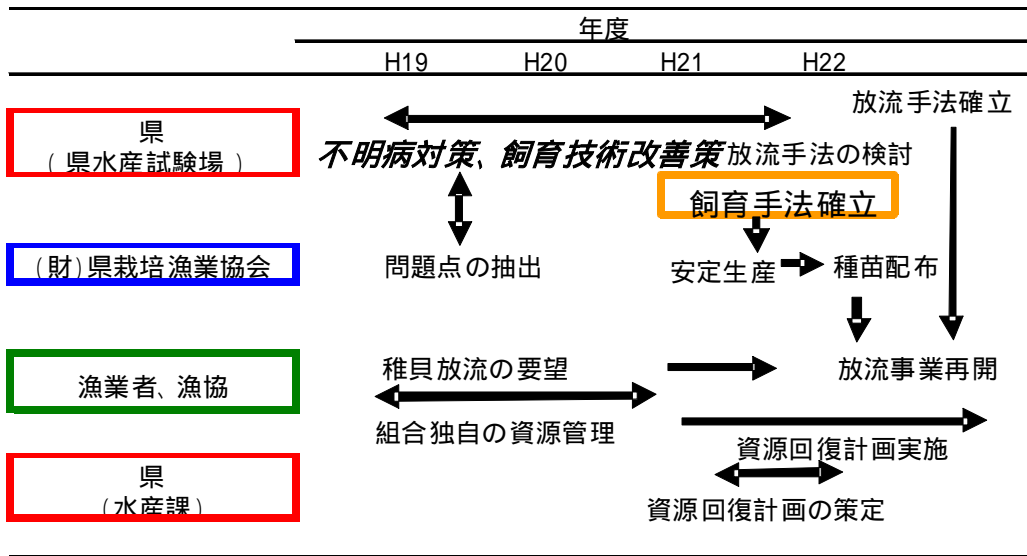


## 2. 栽培漁業実用化対象種拡充試験（パイ）

- (1) 担当：福本 一彦・丹下 菜穂子（生産技術室）
- (2) 実施期間：平成20～21年度（平成21年度予算額：2,851千円）
- (3) 目的・意義・目標設定：(財) 県栽培漁業協会と連携して、パイの殻脱ぎ症状等不明病の発生原因を究明し、飼育技術の改善を図り、効率的なパイ種苗生産技術を確立する。
- (4) 事業展開フロー



### (5) 成果の概要

#### 【小課題 - 1】：不明病（殻脱ぎ症状等）の原因究明

##### (1) 目的

パイの殻脱ぎ症状等不明病の原因を究明する。

##### (2) 方法

採卵用成貝および稚貝の飼育状況を把握し、殻脱ぎ症状および大量斃死等が確認された場合は、菌分離等を行うとともに、(独)水産総合研究センター養殖研究所に不明病診断依頼を行う。

##### (3) 結果

パイの飼育中、殻脱ぎ症状は確認されなかった。

ただし、採卵用に2水槽で飼育していた成貝(平均殻高±S.D: 71.6±5.8mm)は2009年7月初旬から死亡率が増加し、7月16日までの累積死亡率は13.6%および15.4%であった(図1, 図2)。

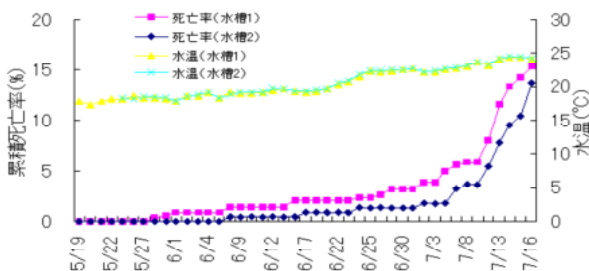


図1. パイ成貝の累積死亡率および水温の推移



図2. 衰弱したパイ成貝

この症例について養殖研究所へ不明病診断を依頼したところ、病理組織学的観察およびDNAチップによる検査結果から、フランシセラ属ないしその近縁の細菌による感染症であると診断された。

前述の成貝由来の稚貝群(8.2±1.3mm)では、9月6日以降摂餌しない個体や、衰弱個体が見られるようになり、数日後には死亡個体数が増加した。このため再度不明病診断を依頼したところ、成貝と同じくフランシセラ属細菌による感染症と診断された。

(4) 残された問題点及び課題

- ・ 殻脱ぎ症状の原因菌の特定および発生メカニズムの解明
- ・ 病貝からのフランシセラ属細菌の分離培養お

よび病原性の確認

- ・ フランシセラ属細菌の垂直感染の確認，成貝および卵囊の保菌状況調査

【小課題 - 2】: 飼育技術改善策の検討

1 バイ種苗生産過程で増殖する繊毛虫類がバイ卵の発生に与える影響

(1) 目的

バイ種苗生産過程で増殖し，悪影響を及ぼすとされている繊毛虫類がバイの卵の発生に与える影響について検討する。

(2) 方法

繊毛虫類は死卵を含んだ卵囊内で増殖する．そこで，死卵を含んだ卵囊と死卵を含まない卵囊を用いてバイ卵のふ化率を比較した．

(3) 結果

死卵を含んだ卵囊では，死卵を含まない卵囊に比べてふ化率が低かった．

(4) 考察

対策として，正常な卵囊の確保や死卵の除去が

必要であると考えられた．

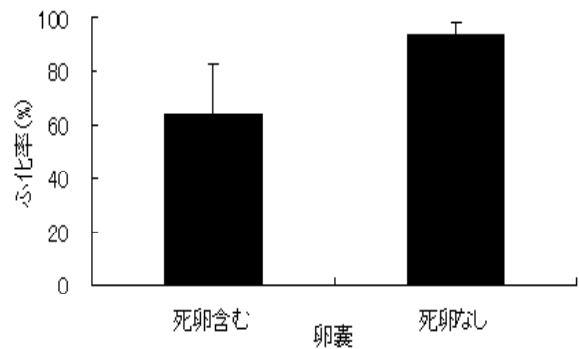


図3. 死卵を含む卵囊と死卵を含まない卵囊のふ化率

2 バイ種苗生産過程で増殖する繊毛虫類やコペポータの駆虫方法の検討

(1) 目的

バイ種苗生産に悪影響を及ぼすとされている繊毛虫類やコペポータの駆虫方法について検討する。

(2) 方法

試験区はA. 過酸化水素（以下H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と示す：0.03%）水，B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水（0.01%），C. 水道水，D. カテキン（0.1%），E. カテキン（0.05%），F. 無処理（対照）の6区について各区2区ずつ設定した．実験容器には24穴細胞培養用プレートを用いた．各試験区に繊毛虫およびコペポータが増殖した卵囊を1-2個収容し20分間浸漬後，実体顕微鏡下で卵囊内外の繊毛虫類およびコペポータの活動状況を観察した．その後，各試験区内の卵囊をUV照射る過海水の入った細胞培養プレートに移し，全く動かない個体を死亡，動きが止まっていたが再び動きが確認された個体，および絶えず動いている個体を生残とみなした．

(3) 結果及び考察

本実験結果を表1に示した．C区では，卵囊外側の繊毛虫類は全滅した．一方，卵囊内面ではコペポータは全滅し，繊毛虫類は幼生の軟体部内で生残しているものを除き，動きが止まっていたが，海水中に卵囊を戻すと活力が回復する様子が観察

された．

A区では，浸漬直後は卵囊外側で繊毛虫類の約90%が活動停止したが，海水中に戻すと再び動き始めた．一方，卵囊内側では，繊毛虫の活動停止が観察されたのは約30-40%であった．

B区では，卵囊外側では繊毛虫類は約60%が活動停止したが，内側ではコペポータ及び繊毛虫類は生残していた．

表1. 繊毛虫類およびコペポータの駆虫試験結果

試験区	卵囊外側		卵囊内側		判定
	繊毛虫類	コペポータ	繊毛虫類	コペポータ	
A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 水(0.03%)	-	×	-	×	×
B H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 水(0.01%)	-	×	×	×	×
C 水道水	-				一部は軟体部内で生残
D カテキン(0.1%)	×		×	×	×
E カテキン(0.05%)	×	×	×	×	×
F 対照	×	×	×	×	×

○：死亡，△：約60-90%活動一時停止，×：生残

D区，E区では卵囊内部では繊毛虫類，コペポータともに生残しており活力も高かった．一方，D区では卵囊外側でコペポータは死亡していたが，

繊毛虫類は生残していた。また、E区ではコペポーダ、繊毛虫類ともに生残していた。

以上の結果から、今回実験した方法の中では、

### 3 20分間の水道水浴がパイの発生に与える影響

#### (1) 目的

駆虫効果が高いと考えられた20分間の水道水浴がパイの発生に与える影響について把握する。

#### (2) 方法

卵囊3 - 4個を細胞培養用プレートに収容し、水道水浴を20分間行った後、UV照射ろ過海水に再度収容し、無処理(対照)区とのふ化率を比較した。

#### (3) 結果

水道水浴区では、卵は途中で全て死亡した(図4)。

このことから、駆虫効果が高いと考えられる20分間の水道水浴でも卵囊内部に繊毛虫類がいた場

一時的ではあるものの、水道水による駆虫効果が高いと考えられた。

合、完全に駆虫できないだけでなく、パイの発生に与える影響が大きいことが明らかになった。

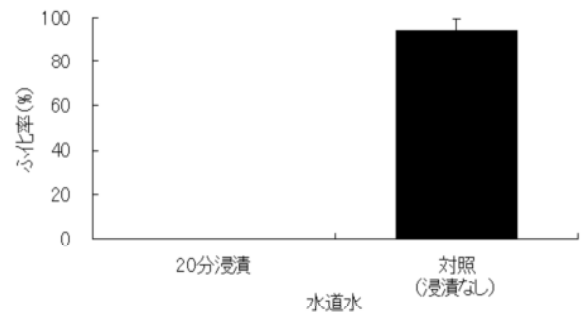


図4. 水道水浴20分間浸漬区と無処理区におけるパイ卵のふ化率

### 4 水道水浴の時間がパイの発生に与える影響

#### (1) 目的

パイの発生に影響を及ぼさない水道水浴の時間について把握する。

#### (2) 方法

試験区は水道水浴の時間を1分、2分、3分、5分、10分および無処理(対照)とし、各区2区ずつ設定した。その他の方法は実験3に準じた。

#### (3) 結果及び考察

各試験区の平均ふ化率は対照(94.6%) > 1分(93.9%) > 2分(89.0%) > 3分(87.8%) > 5分(73.5%) > 10分(16.5%)となった(図5)。以上の結果から、水道水浴の時間が短いほどパイのふ化に与える影響は少ないと考えられた。

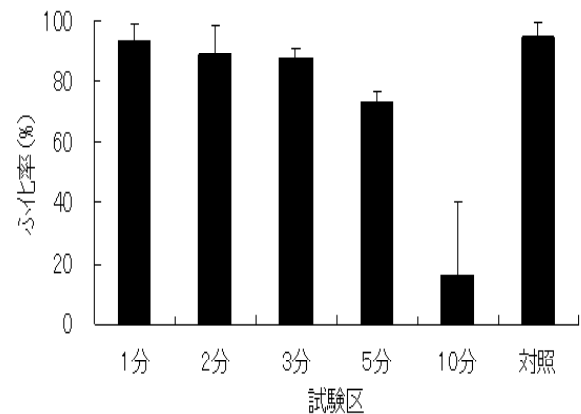


図5. 異なる水道水浴時間によるパイ卵のふ化率

### 5 飼育水中の繊毛虫がパイ稚貝に与える影響

#### (1) 目的

種苗生産過程で増殖する繊毛虫や近年当試験場内で検出されている魚類のスクーチカ症原因種 *Miamiensis avidus*(以下Maと示す)がパイ稚貝に与える影響について検討する。

#### (2) 方法

25cm<sup>2</sup> 組織培養用フラスコ1個あたりパイ稚貝(平均殻高: 2.9 ± 0.7mm, 淡水浴1分処理)を10個体ずつ収容し、表2のとおり供試繊毛虫を添加し、密栓して25℃で3日間(2009年8月11-14日)飼育した。飼育水はUV照射ろ過海水を用い、試験区は各区2区ずつ設定した。実体顕微鏡下で軟体部

を観察し、目視により生死を判定した。

各試験区と対照区の累積死亡率の差の検討は、Fisherの正確確率計算法により行った。

表2. 試験区の設定

試験区	供試繊毛虫	実験容器への添加量
1	Ma (10 <sup>5</sup> 虫体/ml)	10 <sup>4</sup> 虫体
2	Ma (10 <sup>5</sup> 虫体/ml)	10 <sup>3</sup> 虫体
3	繊毛虫A (TL80 μm) *	適量
4	繊毛虫B (TL20 μm) *	適量
対照区	なし	なし

\*飼育水 100ml に EPC 分散液を 3ml 加え、25℃で7日間培養したもの。

### (3) 結果及び考察

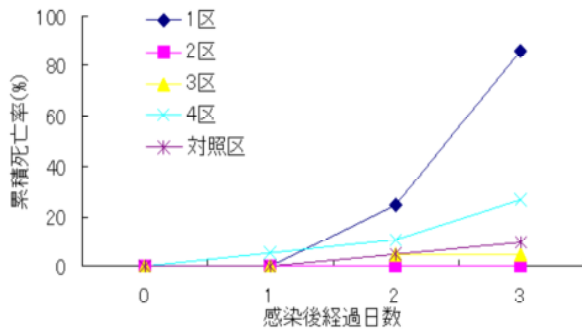


図6. バイ稚貝の累積死亡率の推移

1区および2区では、稚貝収容直後から活力が低下したが、2区では感染後1-2日目にかけて活力が回復した。

3区および4区では、繊毛虫がバイ稚貝の殻や軟体部表面および粘液中に多数みられたが、活力低下は認められなかった。

## 6 種苗生産過程で増殖する繊毛虫類を抑制しつつ、バイの生残率向上を図る方法の検討

### (1) 目的

バイ種苗生産過程で増殖する繊毛虫類を抑制しつつ、バイの生残率向上を図る方法について検討する。

### (2) 方法

試験区は1分間の淡水浴を実験開始日から3日、5日、7日間隔で行う区と、淡水浴を行わない対照区を設定した。淡水浴がバイへ与える影響を考慮し、浸漬時間は1分とした。淡水浴には井戸水と水道水の2種類を用いた。2009年7月14、15日に実験容器にバイのふ化幼生を6,000個体ずつ収容し、7月18日にはほぼ全ての個体が稚貝に移行した。実験は7月19日から8月27日までの40日間行った。給餌は7月19日から行い、給餌開始後12日間はウナギ用配合飼料のみを、13日目から実験終了まではウナギ用配合飼料とアメエビを飽食量与えた。実験終了時に各区の稚貝を計数し、生残率を求めた。また、死貝を回収して殻高を測定した。

### (3) 結果及び考察

井戸水浴を行った各区の生残率は対照区(47.2%) > 1回/7日区(34.8%) > 1回/3日区(15.9%) > 1回/5日区(12.4%)の順に高く、淡水浴頻度が低いほど生残率が高くなる傾向にあった(図7)。

一方、水道水浴を行った各区では、1回/5日区(40.2%) > 1回/3日区(30.8%) > 対照区(28.1%) > 1回/7日区(10.6%)の順に高く、井戸水浴の結果とは異なる傾向を示した(図8)。

累積死亡率は1区が86%で最も高く、4区27%、対照区9.5%、3区5%、2区0%であった(図6)。1区の累積死亡率は対照区に比べて有意に高かったが( $p < 0.01$ )、1区以外の区と対照区との間に有意差はなかった( $p > 0.05$ )。

以上の結果から、飼育水中にMaが高密度に存在した場合、稚貝の活力低下や大量斃死につながる可能性が示唆された。今後はMaのバイ稚貝に対する病原性について検討する必要がある。

また、バイ飼育水中に常在する繊毛虫が稚貝に与える影響については、繊毛虫の量の多少による影響も否定できず、今後の検討課題である。

なお、特に斃死が認められない状況でのバイ飼育水中の繊毛虫をPCR検査したところ、Maは陰性であった。このことから、特に斃死がみられないバイ飼育槽内でMaが高密度に存在している可能性は低いと考えられた。

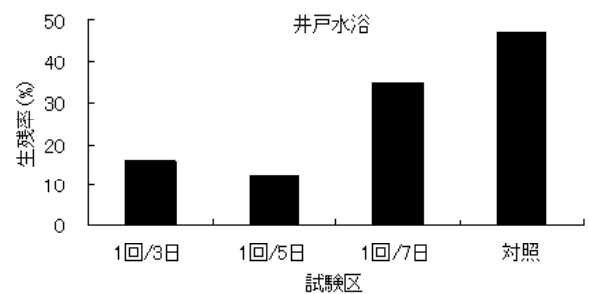


図7. 井戸水浴の頻度の異なる各試験区における実験終了時のバイ生残率

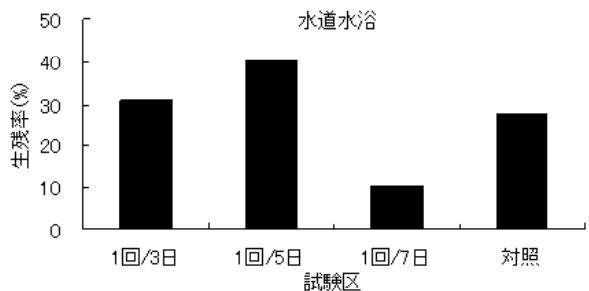


図8. 水道水浴の頻度の異なる各試験区における実験終了時のバイ生残率

死貝の殻高組成についてみると、各試験区ともに死亡個体は1-2mmの個体が大半を占めており、生残率の低い区ではその傾向が他区より顕著に認められた(図9, 10)。

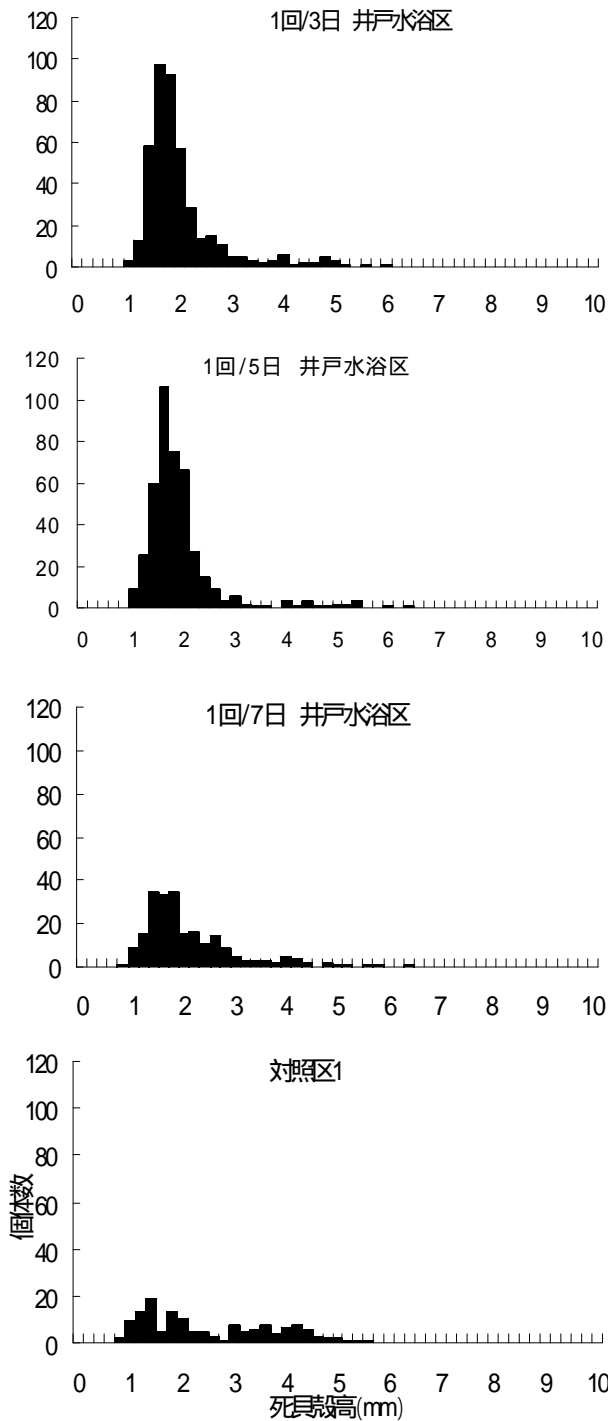


図9. 井戸水浴の頻度の異なる各試験区におけるバイ死貝の殻高組成

今回の実験結果から、生残率の低い区では殻高1-2mm段階での死亡率が特に高いことが明らかになった。

この減耗が淡水浴の影響によるものなのか、繊毛虫類の著しい増殖によるものなのか、今回の実験では明らかにすることはできず、今後の検討課題である。

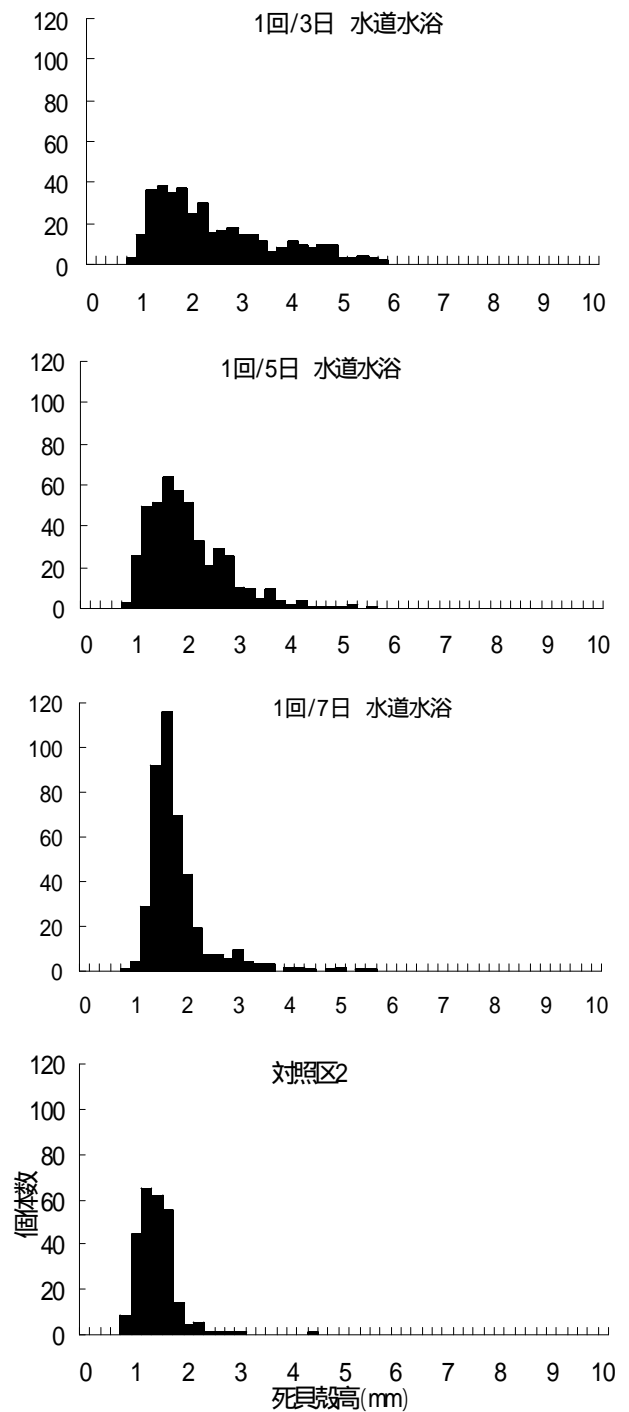


図10. 水道水浴の頻度の異なる各試験区におけるバイ死貝の殻高組成