

新技術開発共同研究促進事業

事務局：企画開発推進室

大学や研究機関等との共同研究や連携の強化により、高度かつ多面的な視点からの研究を行い、試験研究機能の強化を図るとともに、漁業者や水産関係団体等ニーズに即応した重要課題への対応強化を行うことを目的に実施している。(平成9～13年度は「技術開発のための共同研究推進事業」で実施、平成14年度からは本事業により実施している)

平成17年度は、次の12課題を選定し、大学等関係機関との共同研究を行ったので、その概要を報告する。

(担当：伊東)

共同研究課題名	担当科	関係機関
1. 付着機能を有する卵を持つ浮魚類の産卵・加入評価に関する研究	海洋資源科	九州大学
2. 長崎県近海における流況解析	海洋資源科	長崎大学
3. ホシガレイ体色異常防除に関する研究	魚類科	京都大学
4. 長崎県沿岸域における暖海性ホンダワラ類の分布と再生産	介藻類科	北海道大学
5. 魚介類の高度品質保持技術開発試験	加工科	長崎大学
6. アコヤガイ残滓からの有用成分の抽出	加工科	中央水研、北海道大学、滋賀大学等
7. 細菌性疾病に対する免疫機構の基礎研究	養殖技術科	長崎大学
8. マハタのウイルス性神経壊死症(VNN)の防除対策	養殖技術科	北海道大学、近畿大学
9. トラフグのヤセ病防除対策	養殖技術科	東京大学
10. トラフグロ白症防除対策	養殖技術科	北海道大学
11. 環境負荷低減飼料開発に関する研究	養殖技術科	東京海洋大学
12. アサリ呼吸生理に関する研究	養殖技術科	学習院女子大学、長崎大学

1. 付着機能を有する卵を持つ浮魚類の産卵・加入評価に関する研究

一丸 俊雄・中園 明信^{*1}

資源量変動の大きい浮魚類の漁況予測や資源評価のために、産卵や稚仔魚加入の実態把握は重要な要素となる。本県で資源評価を行っている主要浮魚類のうちアジ・サバ・イワシ類といった魚種は分離浮性卵といった特質を持ち、卵稚仔が広範囲に浮遊していることからノルパックネット等による調査が実施されている。

しかしながら、トビウオ類については、産卵実態についてもまだ十分に解明されておらず、卵は沈性卵で付着のための特殊な構造を有していることから、ノルパックネット等による調査は不可能であり、現時点では産卵や加入に関する評価が実施できる状況下にはない。

そこで、これらの魚種の繁殖生態を明らかにすると共に、産卵・加入に関わる量的な評価手法を開発するため本共同研究を実施した。

I. ホソアオトビの産卵実態調査

長崎県に來遊するトビウオ類未成魚主要3種のうちツクシトビウオとホソトビウオについては、初夏に親魚が岸近くに來遊し産卵することが明らかとなっているが、ホソアオトビについては産卵時期や産卵場所の実態が明らかにされていない。そこで、ホソアオトビの卵や親魚を採集し、産卵期や産卵場を推定することを目的として研究を行った。

方 法

平成17年4～8月に、長崎県五島列島周辺海域において流れ藻等を採集し、魚卵の付着の有無を調べた。卵が付着していたものは、その卵の一部を藻に付着したまま状態で切り取り、10%ホルマリン溶液で保存して、その形態について顕微鏡下で観察した。

また、平成17年7月に2そう船曳網により五島西沖でトビウオ類親魚採集のための試験操業を実施した。

結 果

流れ藻はそのほとんどがアカモクであった。7月には卵の付着が認められる流れ藻が採集され、顕微鏡下で卵を観察したところ、ホソアオトビの卵であることが確認された。

五島西沖で2そう船曳網で採集したトビウオ類の中にはホソアオトビの親魚が含まれており、そのうちのメスの個体には成熟した卵巣を持つ個体も認められた。卵巣の組織学的観察を行ったところ、今後発達すると考えられる卵群の分離が見られる個体において排卵後濾胞細胞を有する個体も見られた。

ま と め

卵の出現時期はこれまでと同様に五島列島周辺海域では7月に見られた。更に、同じ7月にホソアオトビの親魚が採集され、卵巣の組織学的観察により排卵後濾胞細胞が認められたことから、同海域において確かに産卵を行っていることが確認され、1産卵期中に少なくとも2回以上産卵を行っていると考えられた。

II. トビウオ類親魚及び未成魚の分布調査

長崎県周辺海域においてトビウオ類親魚の漁獲は定置網によるものがほとんどであるが、ホソアオトビはまったく漁獲されていないことから、長崎県に來遊するトビウオ類未成魚に対応する親魚量の評価としては、定置網の漁獲統計のみではデータに不足を生じることになる。一方、未成魚においても漁場は長崎県北松海域や五島海域のうちのごく地先に限られており、沖における分布の実態が把握されていない。そこで、漁獲統計に依らずに、親魚來遊量あるいは未成魚來遊量の評価手法を検討することを目的としてトビウオ類の飛翔目視によるライトランセクト調査を実施した。

* 1 九州大学大学院農学研究院

方 法

平成17年4～10月に、調査船ゆめとびまたは漁船により五島西沖を航行し、その間船上からの目視によりトビウオ類の飛翔尾数を確認した。同様に、長崎と五島福江間、佐世保と五島有川間、佐賀県呼子と壱岐印通寺間、壱岐郷ノ浦と対馬巖原間、対馬比田勝と博多港間に運行するフェリー上からも目視調査を実施した。

結 果

飛翔目視観察により調査期間中のすべての月にトビウオ類が確認され、岸近くのみならず沖にも多数分布していた。親魚は7月に最も多く観察され、未成魚は9月に最も多く観察された。

ま と め

目視調査により、沖の海域においてもトビウオ類の飛翔が観察されたことから、この手法により本県近海に來遊するトビウオ類の親魚及び未成魚の來遊量を評価できるものと考えられる。

ツクシトビウオやホソトビウオの親魚の定置網による漁獲量は例年6月にピークが見られるが、沖合域における親魚來遊のピークは岸とは状況が異なっていることが明らかとなった。

Ⅲ. ホソアオトビの耳石に見られる微細輪紋

昨年度の研究により、ホソアオトビの耳石に見られる微細輪紋は日周輪であることが明らかとなった。そ

こで、ホソアオトビの稚魚および未成魚を採集し日齢査定を行った。

方 法

長崎県北松海域において2005年夏～秋季にホソアオトビの稚魚をすくい網で採集し、船曳網の漁獲物より未成魚を採集した。これらの標本について体長を測定した後耳石(Sagitta, Asteriscus, Lapillus)を摘出した。耳石は洗浄して乾燥させた後エナメル樹脂中に封入し、サンドペーパー、ラッピングフィルムで研磨して、光学顕微鏡下で観察した。

結 果

ホソアオトビの耳石半径と体長の間には正の相関が認められ、輪紋半径からその個体の成長履歴が把握できると考えられた。成長履歴を解析して得られた日齢と体長の関係から、稚魚期から未成魚期にかけてより成長の速い稚魚が選択的に生き残って未成魚群を形成したと推察された。標本の採集日と日齢から逆算して、長崎県沿岸に來遊するホソアオトビの孵化は7月にピークを迎えることが明らかとなった。

ま と め

長崎県沿岸に來遊するホソアオトビ未成魚の耳石日輪解析結果から推定される孵化時期は7月にピークがみられ、長崎県周辺海域で卵が確認された時期とほぼ一致した。

2. 長崎県近海における流況解析

高木 信夫・中田 英昭*¹

長崎県沿岸域における流況は、潮汐流が卓越していることから、物質輸送や環境変動に重要な役割を担う平均的な流況（残差流の分布）を把握することは重要な課題である。このため、本研究では、五島灘南部及び野母崎-天草間において残差流の分布を把握するため、長崎大学と共同で調査を行った。

方 法

調査は、五島灘南調査ラインと野母崎-天草間調査ラインの2調査ラインを設定し、潮流から潮汐の影響を除去することを目的とした25時間往復調査を行なった。潮流は、各船舶に設置された ADCP（ドップラー超音波速計：RDINSTRUMENTS 社製300KHz）により測流し、潮流から残差流を算出した。（図1）

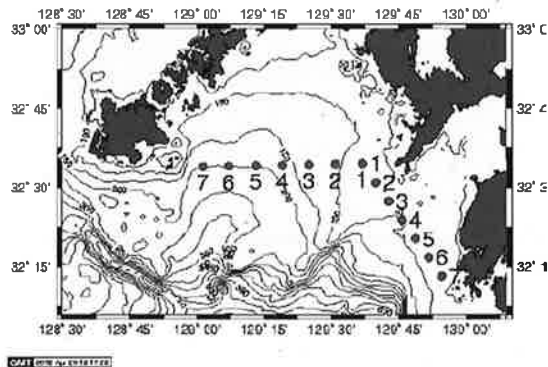


図1 五島灘南及び野母崎-天草間の調査ライン

なお、五島灘南調査ライン東端と野母崎-天草間調査ライン北西端は同じ点とした。

総合水産試験場は、調査船鶴丸を用いて、野母崎-天草間調査ラインを平成17年5月（2回）・7月・8月・11月（2回）・平成18年1月（2回）に8回、また、長崎大学は、練習船鶴洋丸を用いて平成17年7月・9月に2回、合計10回実施した。

また、平成17年5月17日には、長崎県総合水産試験場が野母崎-天草間調査ラインを調査した日と同じ日

に、長崎大学でも五島灘南で25時間往復調査を実施し、同様に残差流を算出し相互に比較した。なお、各調査時にはクロロテック（アレック電子社製）若しくは、CTDにより、水温・塩分を観測した。

結 果

野母崎-天草間調査ラインにおける残差流は、北西流又は南東流が卓越し、調査10回のうち8回は北西流が卓越し、7月に調査した2回のみ南東流が卓越していた。また、9月調査時においては、野母崎側で、他定点の海況と比べて高水温・高塩分を示す北東方向への流れが観測された。

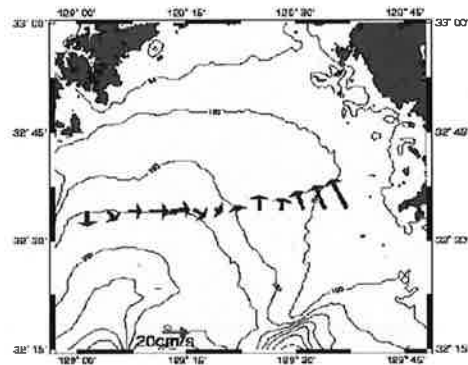


図2 五島灘南における残差流（水深11m）

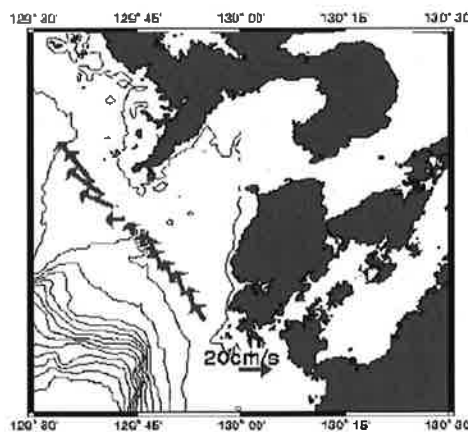


図3 野母崎-天草間における残差流（水深11m）

* 1 長崎大学水産学部

2つの調査ラインを同日に観測した5月の五島灘南調査ラインにおける残差流は東側で反時計回り、西側で時計回りの流れを示した。(図2)

また、野母崎-天草ラインでは北東流が卓越し、五島灘南調査ラインの東端の残差流と、野母崎-天草間調査ライン北西端の残差流(図3)はほぼ一致した。

ま と め

今回の調査において、野母崎-天草間調査ラインの

残差流は北西流の出現頻度が高かった。

また、野母崎-天草間調査ラインにおいて高水温・高塩分の海水の北上が認められた時や、五島灘南部調査ライン西側において、時計回りの流れが示された時に、人工衛星表面水温画像より九州西方海域へ西方からの暖水流入が認められた。このことは黒潮系暖水の流入が当該海域における残差流変動要因の一つであることを示唆するものと考えられた。

3. ホシガレイ体色異常防除に関する研究

－ ホシガレイ体色異常発症メカニズムの解明 －

山田 敏之・田川 正朋*

当水試では、ホシガレイの種苗量産技術開発に取り組んでおり、これまでに10万尾レベルの種苗の安定的生産が可能となっていた。しかし、体色異常個体（有眼側白化）の出現率が高く種苗性に大きな問題を残していた。近年、量産レベルにおいても体色異常防除に関するさまざまな取り組みを行っており大幅な改善が見られている。本共同研究においては、体色異常発症の機構について明らかにすることを目的に実施している。

これまでに、本共同研究により変態時に大量に分泌されることが知られているコルチゾルが、正常な有眼側の体色を特徴付ける小型の成体型黒色素胞の発現を促進することが示唆されていた。本年度は、この再現試験とともに、仔魚の発育ステージごとにコルチゾルがどのような効果を及ぼすのか検討した。

方 法

ホシガレイふ化仔魚を、ふ化から日令16まで2klアルテミアふ化槽で予備飼育した後、100ℓ透明パンライト水槽に収容し実験に供した。

実験1) 再現試験：試験区は、対象区（溶媒を含む）、コルチゾル浸漬区、メチラポン浸漬区、blankとした。浸漬期間はE～Gステージ。

実験2) ステージ試験：試験区は、対象区、コルチゾル浸漬区（①Dステージ、②E-Fステージ、③Gステージ、④Hステージ）とした。

結 果

実験1) コルチゾル浸漬により無眼側にまで成体型黒色素胞が、広範に発現し有眼側と同様の体色を呈した。

実験2) コルチゾルが成体型黒色素胞の発現を促進したのは、E-Fステージにコルチゾルに浸漬した区のみであった。

ま と め

- 1) コルチゾルは、成体型黒色素胞の発現を促進することが再現された。
- 2) コルチゾルが成体型黒色素胞の発現を促進するステージはE-Fステージであったが、これは、ホシガレイが自らコルチゾルを分泌する時期と一致していた。

(担当：山田)

* 京都大学農学部

4. 長崎県沿岸域における暖海性ホンダワラ類の分布と再生産

桐山 隆哉・吉田 忠生*¹

四井 敏雄*²・藤井 明彦

本事業は、本県の暖海性ホンダワラ類の分布と再生産を明らかにし、藻場造成における増殖対象種としての利用を図るために、平成15年度からの実施である。平成17年度は「高水温対応型藻類増養殖技術開発研究事業」の一環として行った。

これまでの調査^{1, 2)}で、確認された暖海性ホンダワラ類は、キレバモク、フタエモク、マジリモク、ウスバモクの4種と、これら4種とは形態的な特徴が異なり別種と考えられた不明種数種(マジリモク類)であった。暖海性ホンダワラ類の分布域は、大村湾、有明海、伊万里湾を除く県下各地に及んでいる。以下に17年度の調査結果について報告する。

方 法

長崎県内における暖海性ホンダワラ類の分布状況を把握するため、(独)水産総合研究センター西海区水産研究所、(社)水産土木建設技術センター、潜水会社((有)崎陽潜水、(株)ベントス)、県下の水産業普及指導センターなどに聞き取りを行うと共に標本の提供を受けた。平成18年3月には、SCUBA潜水による標本採集を対馬鰐浦、厳原町阿連、厳原町安神地先で行った。

また、今年度は、6月下旬に長崎漁港内に大量の流れ藻がみられたので(図1)、(独)西海区水産研究所(吉村室長、清本主任研究官)との共同で、流れ藻の一部を採集し構成種、成熟の有無などを調べた。

結 果

分布状況 平成17年度に新たに種が同定された暖海性ホンダワラ類はなかったが、ウスバモクとマジリモクでは、新たな分布情報が得られた。ウスバモクでは、上五島若松、壱岐郷ノ浦町大島で、マジリモクでは平戸市度島でそれぞれ標本が採集され、これらの種の分布域の北限が更新された。

対馬鰐浦、阿連、安神地先での平成18年3月15～17日の潜水調査では、暖海性ホンダワラ類の生育は確認できなかった。

長崎漁港内での流れ藻調査 長崎漁港内で、6月24日に採集した流れ藻の藻(草)体数および重量は、それぞれ592個体、29.6kgで、その内訳は、アマモ1種を除くと他は全てホンダワラ類であった。採集した流れ藻を暖海性種、その他ホンダワラ類、アマモの3種類に分け、それぞれの藻(草)体数と重量との割合を調べた。暖海性種とその他ホンダワラ類の藻(草)体数と重量の割合は、それぞれ共に約40%と60%であった。暖海性種では、キレバモク、フタエモク、マジリモク、ウスバモクの4種と不明種数種がみられ、その主体は不明種であった。その他ホンダワラ類では、アカモク、イソモク、ウミトラノオ、ヒジキ、ヤツマタモク、マメタワラの6種が認められ、その主体はマメタワラであった。成熟は、ウスバモクとキレバモクの一部を除く全てのホンダワラ類の標本で生殖器官が認められた。今回観察された流れ藻の構成種は、現在長崎県沿岸域でみられる種類とほぼ一致し、成熟状態にも相違は認められなかった。



図1 長崎漁港内にみられた大量の流れ藻
(平成17年6月23日)

* 1 北海道大学名誉教授

* 2 前長崎県総合水産試験場長

ま と め

- 1) ウ斯巴モクとマジリモクでは新たな分布情報が得られ、それぞれ上五島若松、壱岐郷ノ浦町大島、および平戸市度島で標本が採集された。
- 2) 平成17年6月下旬に長崎漁港内に大量の流れ藻がみられ、その一部を採集した結果、暖海性ホンダワラ類が本数、重量とも全体の約40%を占めた。

文 献

- 1) 桐山隆哉・大橋智志・藤井明彦・吉村 拓：藻場に対する食害実態調査 Ⅲ．暖海性大型褐藻類の分布調査，長崎水試事報告，101-103（2004）．
- 2) 桐山隆哉・大橋智志・藤井明彦・吉村 拓：藻場に対する食害実態調査 Ⅲ．暖海性大型褐藻類の分布調査，長崎水試事報告，107-108（2005）．

（担当：桐山）

5. 魚介類の高度品質保持技術開発試験

岡本 昭・橋 勝康*

ブリ類の「身やけ」の原因究明と防止対策

昨年度は養殖ブリのヤケ肉に伴う筋肉の変化とヤケ肉発生条件について調査し、飼育水温30℃では脊椎破壊してヤケ肉が発生することが明らかになった。(図1) そこで本研究では、養殖ブリを30℃で飼育し、苦悶死させることによって人為的にヤケ肉を発生させ、ヤケ肉に伴う筋肉の性状変化について調べた。



対 照



ヤケ肉モデル

図1 身やけしたブリ筋肉

試料および方法

試料魚 試料魚は養殖ブリ2年魚(平均体重 2,600g ±900g, 平均体長 53.2cm ±7.0cm)を用いた。対照区として水温約18℃で7～10日間陸上水槽中で飼育した

養殖ブリを、ヤケ肉モデル魚として、水温30℃で7～10日間陸上恒温水槽を用いて飼育した養殖ブリを約30分間空中暴露して苦悶死したものを用いた。餌料はペレットを1日あたり魚体重の約1%を投餌した。検体数は対照6尾、ヤケ肉モデル4尾であった。対照魚、ヤケ肉モデル魚ともに延脊椎刺殺及び脊椎をピアノ線で破壊した後にエラを切って脱血した。それらをラウンド状態でポリエチレン袋に入れ、30℃の恒温水槽中に保存して経時的に背部普通筋を採取し、測定に供した。

方 法 感覚色度, 圧出水分量, 破断強度, ATP 関連化合物, 乳酸, グリコーゲン量, pHの測定は昨年度と同様の測定条件で行った。

結 果

感覚色度 L*値, a*値及び b*値の経時変化 L*値, a*値及び b*値とも対照区では致死直後から保存4時間目まで緩やかに上昇したのに比較してヤケ肉モデルでは致死直後から保存4時間目まで急激に上昇し、対照よりも常に高い値を示した。(図2～4)

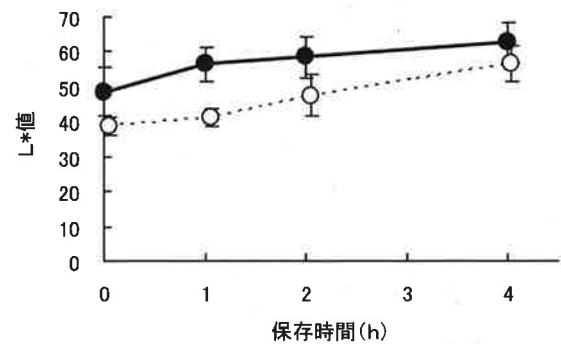


図2 L*値の経時変化
●;モデル区 ○;対照区

* 長崎大学水産学部

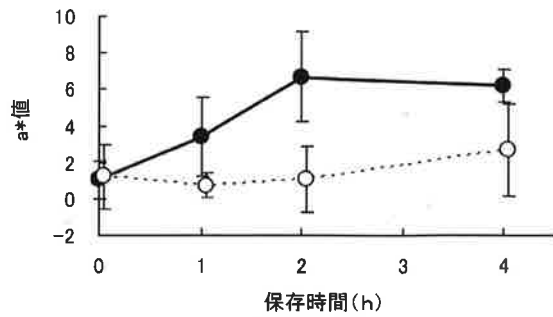


図3 a*値の経時変化
●;モデル区 ○;対照区

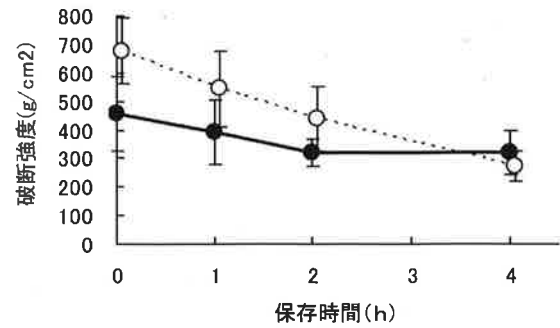


図6 破断強度の経時変化
●;モデル区 ○;対照区

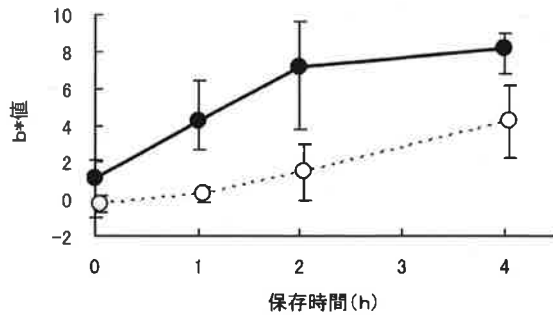


図4 b*値の経時変化
●;モデル区 ○;対照区

圧出水分量の経時変化 対照では、致死直後で約10%であり、保存4時間目まで緩やかに増加した。一方、ヤケ肉モデルでは、致死直後で約40%と高い値を示し、保存1時間目では約50%まで増加し、その後あまり変化はなかった。(図5)

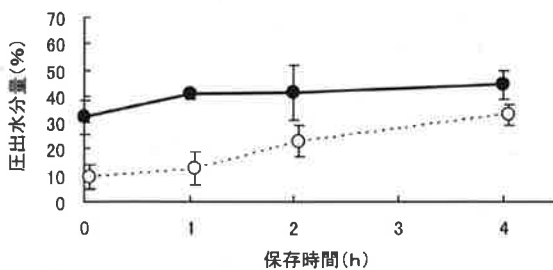


図5 圧出水分量の経時変化
●;モデル区 ○;対照区

破断強度の経時変化 対照は致死直後約700g/cm²であり、保存4時間目約300g/cm²まで緩やかに減少した。ヤケ肉モデルでは致死直後約500g/cm²と対照よりも低い値を示し、保存2時間目で約300g/cm²に減少してその後一定を保った。対照と比較してヤケ肉モデルでは致死直後から筋肉の軟化が著しかった。(図6)

ATP量の経時変化 対照では、致死直後で約7 μmol/gであり、保存2時間目までに約2 μmol/gに減少し、保存4時間目で検出限界以下となった。ヤケ肉モデルでは、致死直後から対照区に比較して少なく保存1時間目には消失した。(図7)

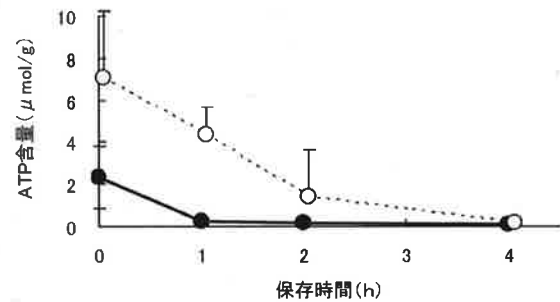


図7 ATP含量の経時変化
●;モデル区 ○;対照区

グリコーゲン量の経時変化 対照と比較してヤケ肉モデルの方が致死直後から少なく、その消費が早かった。(図8)

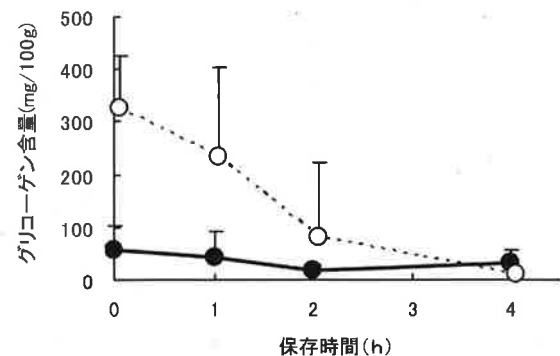


図8 グリコーゲン含量の経時変化
●;モデル区 ○;対照区

乳酸量の経時変化 対照では致死直後から保存4時間目まで緩やかに上昇した。ヤケ肉モデルでは致死直後は対照よりも高く、保存1時間目でピークに達し、その後減少傾向を示した。(図9)

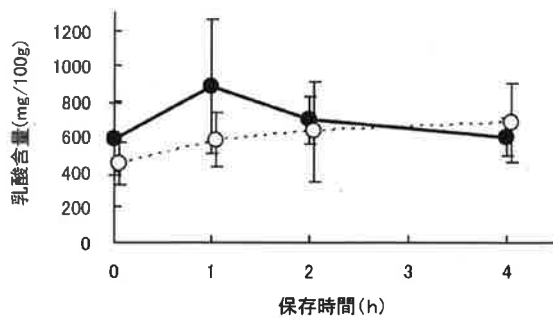


図9 乳酸含量の経時変化
●;モデル区 ○;対照区

pHの経時変化 対照では致死直後から保存4時間目まで緩やかに減少した。ヤケ肉モデルでは致死直後から対象に比較して低く、保存1時間目でpH5.6と最低pHを示し、その後大きな変化はみられなかった。(図10)

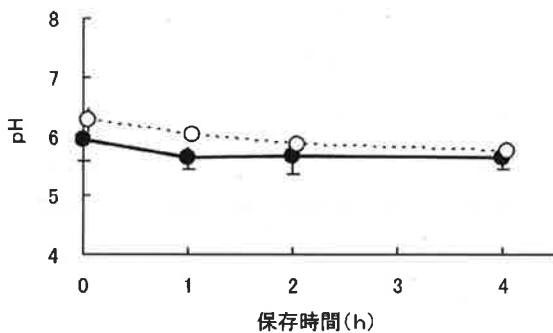


図10 pHの経時変化
●;モデル区 ○;対照区

まとめ

1. 肉眼的にみたヤケ肉モデルは透明感を失い、煮えたような白さが観察された。対照では保存中の筋肉の白濁傾向はみられたが、ヤケ肉モデルのそれと若干の異なる様相を示した。
2. 感覚色度、圧出水分量、破断強度の結果よりヤケ肉モデルでは保存1時間目までにヤケ肉が発生したと判定した。
3. 苦悶死させたヤケ肉モデルのATP量の低下、グリコーゲン分解及び乳酸量の増加は対照に比べて速かった。魚体温の上昇とこれらの結果によりヤケ肉が発生したと考えられた。
4. pHの低下についてもヤケ肉モデルは対照よりも速く、筋肉のpHは乳酸含量の増加に伴って低下することが確認された。

(担当：岡本)

6. アコヤガイ残滓からの有用成分の抽出

大迫 一史・桑原 浩一・齋藤 洋昭*

研究課題「アコヤガイ等二枚貝廃棄物からのセラミドアミノエチルホスホン酸の効率的抽出」において、長崎県のアコヤガイ廃棄物（界面活性剤使用素材）からの餌料製造及び栄養試験、また、小規模実証レベルでのセラミドアミノエチルホスホン酸の効率的回収技術の検討を行う。

I. 長崎県のアコヤガイ廃棄物（界面活性剤使用素材）からの餌料製造及び栄養試験

実験方法および結果

図1のとおりマダイ幼魚用餌料原料を調製した。次に、これをもとに、図2のとおり、粗脂肪分を添加し、ペレット状の餌料を調製した。また、対照としてカゼインを用いた。以上のようにして調製したマダイ用餌料の一般成分、重金属類および乾燥アコヤ肉とカゼインの遊離アミノ酸を含むタンパク質構成アミノ酸の比較を表1、2および3に示した。粗タンパク質含量が、アコヤガイ肉および対照のカゼインとで同程度になるように試料の調製を行なったが、表1に見られるように、カゼイン区の粗タンパク質濃度が若干高い結果となった。また、乾燥アコヤ肉には若干量の重金属が認められ、中でもカドミウムの含量は高い値を示したが、このことが流通上の問題となる可能性が示唆された。

次に、これらの餌料を実際に用いてマダイの飼育試験を行なった。供試マダイは、魚体重 1.9 ± 0.3 g、全長 50.2 ± 3.0 g、肥満度 6.8 ± 0.6 のものを用いた。飼育は、500Lの円筒状の水槽を用い、1L/分の流水中で、20日間行った。20尾ずつのマダイを2区に分け、一方にアコヤガイ残滓を主原料とした餌料を、もう一方にカゼインを主原料とした餌料を、1水槽あたり10g/Lで毎日与えた。結果を図3-5に示した。図に

示したとおり、増重および体長のいずれに対してもそれらの増大効果は、アコヤガイ残滓を用いた餌料の方が、カゼインを用いたものよりも勝った。また、アコヤガイ残滓餌料区の斃死尾数は2/19尾、カゼイン区のそれは3/20尾で大差無かった。

II. 小規模実証レベルでのセラミドアミノエチルホスホン酸の効率的回収技術の検討

実験方法および結果

加工残滓として排出されたアコヤガイ肉（0.5%のフジフレッシュを含む）11, 44.6, 48.6kgを用いて、CAEPを含む溶媒の抽出を行った。（以下、それぞれ、ケースA, BおよびCとする）。これらの処理により得られた減圧濃縮後の粗抽出物中の粗脂肪含量をFolchらの方法で求め、次いで、オープンカラム（ $\phi 3$ cm \times 50cm）に充填したシリカゲル（Merk社製、Silica-gel 60, 70-230mesh）で、表4に示した溶媒を順次流して分画した。得られた画分を、40℃の恒温水浴中でエバポレーターを用いて減圧蒸留し、残留した脂質を精秤して全量に対する割合を求めた。また、得られた脂質クラスはTLCプレート上で目的物質が得られていることを確認した。以上の結果より、1回目の抽出においてエタノール中で一晩放置する方が、一晩放置しないものに比較して抽出効率が良いことが明らかになった。

粗抽出物中の収量、粗抽出物中の粗脂量およびCAEP量を表5に示した。

表6に、3回の抽出試験において得られた粗脂肪の脂質クラスを示した。この結果より、連続的に3回抽出した場合（ケースB）では、極性脂質が十分に抽出できていないことが示唆された。

* (独)水産総合研究センター 中央水産研究所

表7に、ケースBおよびCで得られた各画分の脂肪酸組成を示した。各画分ともに、高レベルのDHAが認められた。タウリンが高濃度で検出され、脂溶性の栄養成分以外の有用物質として、エタノール抽出物中にはこれが多く存在することが明らかになった。

表8にエタノール抽出物中の遊離アミノ酸を示した。

表9に、エタノール抽出物および二次残滓（乾燥物）中の重金属組成を示した。若干量のカドミウムが抽出物および二次残滓中に認められた。また、抽出物中に若干量のヒ素が認められた。

まとめ

(担当：大迫)

①アコヤガイのエタノール処理後の二次残滓は、マダいの養殖用餌料として有用であることが明らかになった。

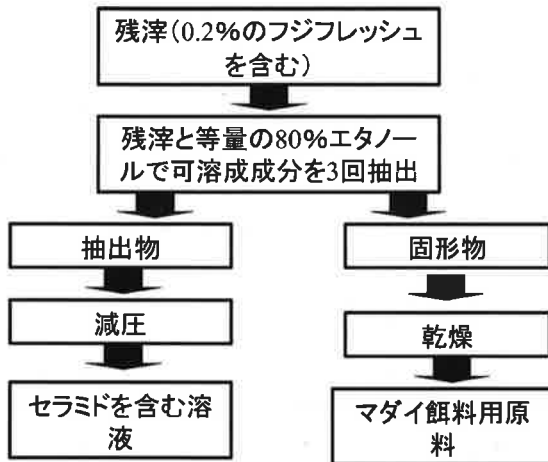


図1 アコヤガイ残滓からのセラミド抽出およびマダイ用餌料の調製

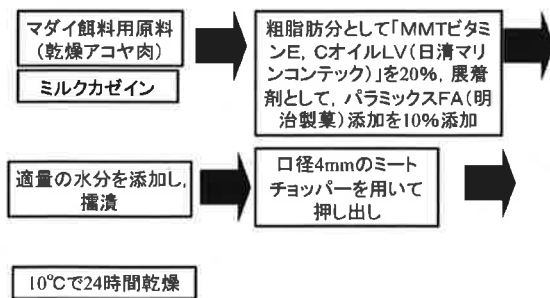


図2 マダイ用餌料の調製

②ただし、二次残滓は、若干量のカドミウムを含むためこれについては留意する必要がある。

③アコヤガイ残滓から、エタノール処理により残滓の0.04%のCAEPが得られることが明らかになった。

④アコヤガイ残滓からのエタノール抽出物中の粗脂肪には、CAEP以外の画分にも高レベルのDHAが含まれることが明らかになった。

⑤アコヤガイ残滓からのエタノール抽出物中には、脂溶性栄養成分以外にも高レベルのタウリンが含まれることが明らかになった。

表1 マダイ養殖用餌料および乾燥アコヤ肉の一般成分 (%)

	粗蛋白	粗脂肪	水分	炭水化物	灰分
アコヤ残滓餌料	55.5	20.9	10.4	9.0	4.2
カゼイン餌料	60.3	17.7	10.3	9.8	1.9
乾燥アコヤ肉	68.7	6.2	12.2	7.6	5.3

表2 乾燥アコヤ肉に含まれる重金属 (mg/kg)

金属	含量
カドミウム	7.4
総水銀	0.1
ヒ素	0.47
鉛	0.4mg/kg以下

表3 乾燥アコヤ肉とカゼインの、遊離アミノ酸を含むタンパク質構成アミノ酸の比較 (%)

	乾燥アコヤ肉	カゼイン	乾燥アコヤ肉とカゼインの差 (乾燥アコヤ肉 - カゼイン)
タウリン	0.8	0.0	0.8
アスパラギン酸	10.9	6.8	4.0
スレオニン	4.9	3.9	1.0
セリン	4.8	5.3	-0.5
グルタミン酸	16.2	23.2	-7.0
プロリン	5.1	10.5	-5.5
グリシン	8.1	3.0	5.1
アラニン	6.0	3.3	2.8
シスチン	0.7	0.1	0.6
バリン	4.7	5.9	-1.2
メチオニン	2.0	2.1	-0.1
イソロイシン	4.2	4.6	-0.5
ロイシン	7.4	8.9	-1.5
チロシン	3.1	4.6	-1.5
フェニルアラニン	4.8	4.6	0.2
ヒスチジン	2.1	2.7	-0.7
リジン	6.8	6.9	0.0
アルギニン	7.4	3.5	3.9

表4 粗脂肪の分画に用いた抽出溶媒

Fraction	Solvent	Ratio (vol/vol)	Volume (ml)	Lipid class
1	Dichloro-methane : Methanol	= 1 : 1	400	NL, FFA, PE
2	Dichloro-methane : Methanol	= 1 : 5	300	CAEP
3	Dichloro-methane : Methanol	= 1 : 20	315	PC

NL, neutral lipids; FFA, free fatty acids; PE, phosphatidylethanolamine; CAEP, ceramide amide ethyl phosphonate; PC, phosphatidylcholine

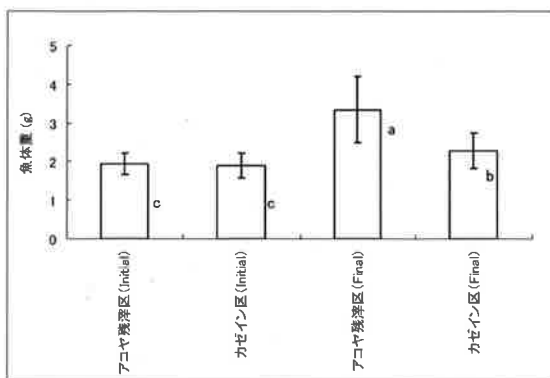


図3 マダイ稚魚の増重量に及ぼすアコヤ貝二次残滓の影響
a, b, c, の異なる記号は統計的有意差を示す。

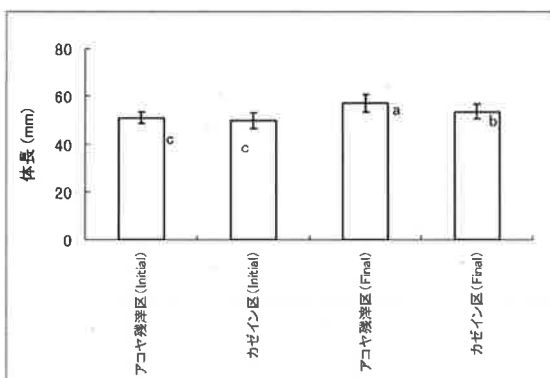


図4 マダイ稚魚の成長量に及ぼすアコヤ貝二次残滓の影響

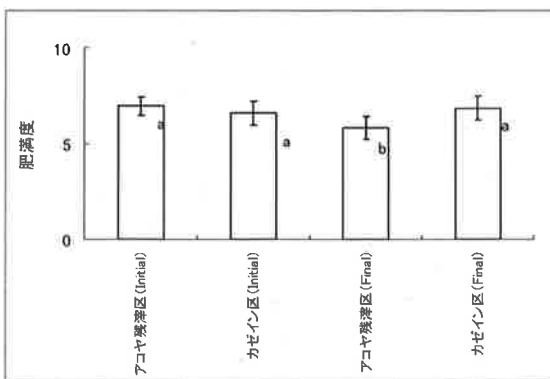


図5 マダイ稚魚の肥満度に及ぼすアコヤ貝二次残滓の影響

表5 アコヤガイ残滓からのエタノール抽出物回収試験

	ケースA	ケースB	ケースC
加工残滓量 (kg)	11.0	44.6	48.6
減圧濃縮後の粗抽出物量 (kg)	2.78	0.95	3.08
(加工残滓から%)	25.27	2.13	6.34
粗脂肪量 (g)	17.1	68.8	155.0
(加工残滓から%)	0.16	0.15	0.32
セラミド量 (g)	4.0	7.8	21.0
(加工残滓から%)	0.04	0.02	0.04

表6 アコヤガイ抽出物中の粗脂肪の脂質クラス (%)

	ケースA	ケースB	ケースC
NL, FFA, PE	67.6	75.9	66.8
CAEP	23.6	12.3	13.6
PC	8.8	11.9	19.5

NL, FFA, PE, CAEP, および PC は、それぞれ、中性脂質、遊離脂肪酸、ホスファチジルエタノールアミン、セラミドアミノホスホン酸、およびホスファチジルコリンを示す。

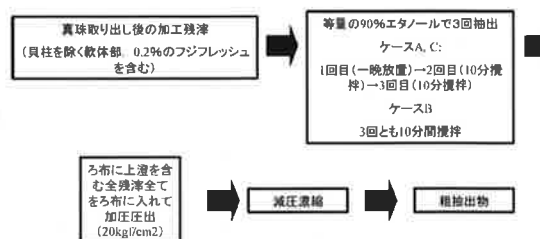


図6 セラミド粗抽出物を得るための処理工程

表7 アコヤ貝脂質クラス別の脂肪酸組成 (%)

Free fatty acids	ケースB			ケースC		
	NL, FFA, PE	CAEP	PC	NL, FFA, PE	CAEP	PC
Total Saturated	14.7	20.9	28.0	17.3	23.0	30.0
C14:0	3.6	0.6	1.0	3.5	0.6	1.1
C16:0	8.8	17.3	24.2	10.7	19.1	26.1
C18:0	2.3	3.1	2.8	3.0	3.3	2.7
Total Monoenoic	12.0	4.3	5.3	11.8	4.4	5.8
C16:1n7	4.0	0.7	1.1	3.7	0.6	1.4
C18:1n9	3.1	1.5	1.9	3.0	1.5	2.0
C18:1n7	3.6	1.7	2.0	3.6	1.8	2.2
C20:1n9	1.3	0.4	0.3	1.5	0.5	0.2
Total Polyenoic	51.0	50.9	50.8	51.8	52.8	47.8
C18:2n6	1.6	0.7	1.4	1.5	0.7	1.5
C20:4n6	7.5	6.2	5.9	8.4	6.9	5.8
C18:4n3	2.6	0.6	1.1	2.4	0.6	1.2
C20:5n3	12.6	7.3	8.0	12.8	7.2	7.3
C22:5n3	1.2	1.3	1.3	1.2	1.0	1.2
C22:6n3	25.5	34.8	33.1	25.5	36.3	30.8

それぞれ、3回分析の平均値

表8 エタノール抽出物中の遊離アミノ酸組成

	ケースB			ケースC		
	抽出物中 (mg/100g)	残滓100gから得られた量 (換算値)	組成比 (%)	抽出物中 (mg/100g)	残滓100gから得られた量 (換算値)	組成比 (%)
Taurine	7,879	168	63.3	205,415	423	65.1
Aspartic acid	426	9	3.4	10,105	21	3.2
Threonine	243	5	2.0	5,977	12	1.9
Serine	173	4	1.4	4,125	8	1.3
Glutamic acid	792	17	6.4	18,365	38	5.8
Proline	156	3	1.3	3,778	8	1.2
Glycine	663	14	5.3	16,323	34	5.2
Alanine	493	10	4.0	12,267	25	3.9
Cystine	0	0	0.0	0	0	0.0
Valine	153	3	1.2	3,543	7	1.1
Methionine	123	3	1.0	2,400	5	0.8
Isoleucine	83	2	0.7	2,701	6	0.9
Leucine	121	3	1.0	3,798	8	1.2
Tyrosine	0	0	0.0	0	0	0.0
Phenylalanine	353	8	2.8	9,034	19	2.9
Histidine	90	2	0.7	1,797	4	0.6
Lysine	177	4	1.4	4,327	9	1.4
Arginine	532	11	4.3	11,544	24	3.7
Total	12,459	265	100.1	315,498	649	100.0

表9. アコヤガイ残滓からのエタノール抽出物および二次残滓乾燥物中の重金属 (mg/kg)

	抽出物	二次残滓乾燥物
カドミウム	5.1	12.9
ヒ素	32.4	0.6
鉛	<0.4	<0.4
総水銀	ND	0.03

抽出物および乾燥物はケースBのもの。

7. 細菌性疾病に対する免疫機構の基礎研究

高見 生雄・金井 欣也*1

予防策が無く、被害も多い疾病については、ワクチン等の開発が必要と考えられる。そして、ワクチン開発のためには基礎的な免疫機構について解明を行なっておく必要がある。

本課題では、ワクチンの技術開発に向けての基礎資料とするために、ブリのノカルジア症、類結節症とヒラメのレンサ球菌症、エドワジェラ症を対象疾病として免疫機構の基礎的な把握を行った。

1. ブリの類結節症に関する研究

類結節症原因菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*P.p.*) の菌体外魚毒性物質の性質を調べることを目的とした。

方法

P. p. NUF89の BHI ブイオン培養液から、硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによって魚毒性物質を部分精製し、試料をブリ稚魚(100尾)に腹腔内接種して魚毒性を調べた。

結果

イオン交換クロマトグラフィーでは主要なタンパクピークが4つ出現し、そのうち①と③のピークに魚毒性が認められた。

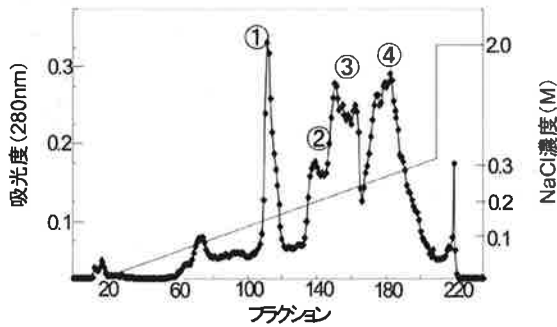


図1 DEAE-Sepharose の溶出パターン

それらを別々にゲルろ過クロマトグラフィーにかけたところ、①のピークではA、③のピークではDとEに魚毒性が認められた(図2)。A、D、Eのフラクションには卵黄反応が認められた(図3)ことから、これらがホスホリパーゼである可能性が示唆された。

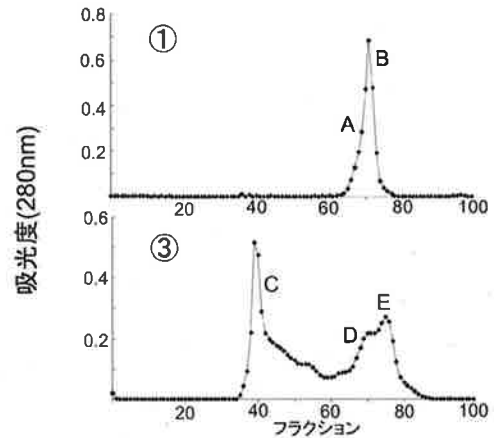


図2 ①, ③分画のゲル濾過の溶出パターン

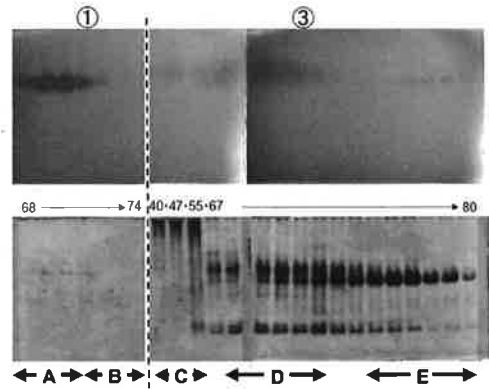


図3 ゲル濾過フラクションのホスホリパーゼ活性(上)と銀染色(下) (ノーマル PAGE)

2. ブリのノカルジア症試作ワクチンの有効性

実験

1) 実験1

ノカルジア症の原因菌である *Nocardia seriolae* (*N. s.*) ホルマリン死菌 (FKC) のワクチンとしての有効性

* 1 長崎大学水産学部

について検討した。

方 法

N. s. NUF27を0.2% Tween80添加 BHI ブイヨン、27℃で4日間振とう培養し、その後ホルマリンを0.5%添加し室温で2日間不活化してワクチンとし、各種アジュバントを添加して次の試験区を設定した。

- 1) セピック社アジュバント No. 1 添加 (4 試験区)
 - ① Tween80 添加 BHI ブイヨン 培養 FKC
 - ② Tween80 非添加 BHI ブイヨン 培養 FKC
 - ③ Tween80 添加 BHI ブイヨン 培養 FKC 超音波破壊
 - ④ Tween80 添加 BHI ブイヨン 培養 FKC 超音波破壊 + 菌体外産物
- 2) FIA アジュバント 添加 (1 試験区)
 - ⑤ Tween80 添加 BHI ブイヨン 培養 FKC
- 3) アジュバント 非添加 (1 試験区)
 - ⑥ Tween80 添加 BHI ブイヨン 培養 FKC
- 4) 対照区 (2 試験区)
 - ⑦ 非免疫
 - ⑧ セピック社アジュバントのみ

これらの1試験区あたり25尾のブリ(平均魚体重110g)に接種した。

ワクチン接種2週間後に NUF27 株により菌浴 (1.2×10^5 CFU/ml) 攻撃を行い、非免疫区(対照区)が全て死亡するまで観察(47日間)した。

結 果

攻撃後の水温は22℃~28℃であった。

どの免疫区も対照区に比べて生残率が高くなくワクチンの有効性は認められなかった(図4)。

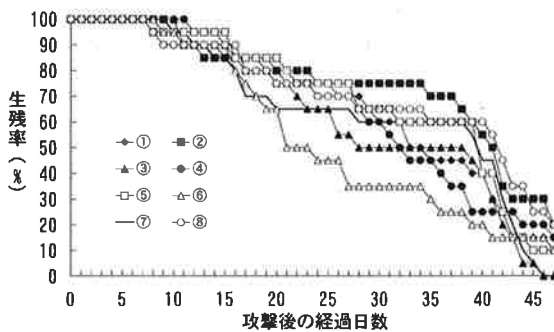


図4 注射ワクチンで免疫したブリの菌浴後の生存率の推移

2) 実験2

ワクチン菌浴処理の有効性について検討した。

方 法

ワクチンを懸濁液としたものに供試魚(50尾)を15分間浸漬してワクチン処理をし、2週間後に攻撃菌数 10^1 CFU/ml 以下で菌浴攻撃し、水温26℃から22℃で飼育して52日間観察した。

結 果

図5に浸漬ワクチンで免疫したブリの菌浴後の生残率の推移を示した。ワクチン区の生残率は対照区よりやや高い結果となったが、ワクチンの有効率は27%と低かった。

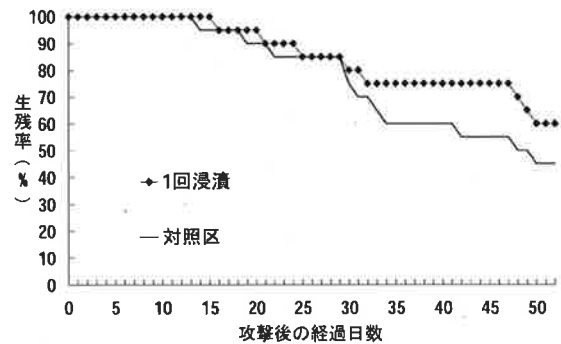


図5 浸漬ワクチンで免疫したブリの菌浴後の生存率の推移

3) 実験3

市販の薬剤の治療効果について検討した。

方 法

供試魚180尾に対して菌浴による攻撃の後、市販薬剤Aを投与して、死亡尾数、発病状況を飼育観察した。

結 果

試験結果については、水産用医薬品開発試験にかかる機密保持のため、報告はできない。

3. ヒラメのエドワジエラ症試作ワクチンの有効性試験

Edwardsiella tarda (*E. tarda*) が有する菌体内タンパク毒素がFKCに残存しており、その毒性がワクチンの有効性に影響を及ぼしている可能性がある。そこで毒素非産生株を用いて免疫試験を行った。

方 法

毒素産生株であるヒラメ由来 *E. tarda* NUF251、NUF251から作出した毒素非産生変異株、毒素非産生

野外分離株 NUF447, マダイ由来 NUF10を用いた。各菌株のFKCを体重約120gのヒラメに1尾あたり3mg腹腔内接種し, 2週間後に *E. tarda* NUF806で菌浴攻撃した。

結 果

攻撃後の死亡経過を図6に示した。調べた中ではNUF251FKCの生残率が最も高く, 毒素非産生株FKCの生残率はそれと大差なかった。マダイ由来NUF10の有効性はこれらと比べて低かった。

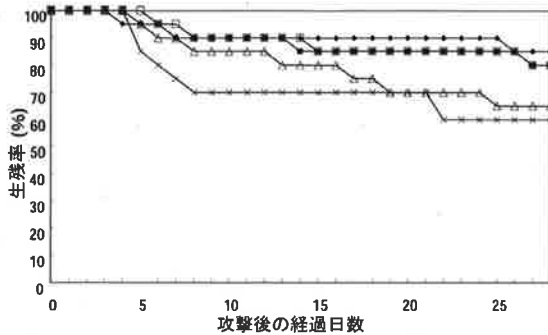


図6 *E. tarda* FKCで免疫したヒラメの攻撃の死亡経過
◆ NUF251 (ヒラメ由来株)、■ NUF251毒素非産生変異株、
□ NUF447 (ヒラメ由来毒素非産生株) △ NUF10 (マダイ由来株)、
× 対照区

4. ヒラメのレンサ球菌症に関する研究

平成17年からヒラメの原因菌β溶血性レンサ球菌症不活化ワクチンが実用化されたために *Streptococcus iniae* を原因とするレンサ球菌症が減少することが予想される。一方, 近年 *S. parauberis* (*S. p.*) を原因とするレンサ球菌症が増加傾向にある。そこで *S. p.* 感染症に対する予防ワクチンの可能性について検討した。

方 法

S. p. 5菌株のホルマリン死菌をそれぞれ体重約100gのヒラメに1尾あたり10mg腹腔内接種し, 2週間後に代表株による腹腔内接種攻撃を行った。

結 果

使用したホルマリン死菌の有効率 (RPS) はいずれも90%以上と高い値であり, ワクチンの実用化の可能性が示唆された (図7)。

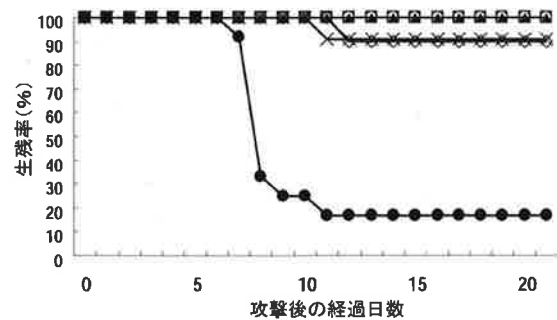


図7 *S. parauberis* FKCで免疫したヒラメの攻撃後の死亡経過
○ 菌株1, □ 菌株2, ▲ 菌株3, ◇ 菌株4, × 菌株5, ● 対照区

ま と め

- 1) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* NUF89の菌体外毒性物質の性状を明らかにするため, 培養ろ液から毒性物質を部分精製した。その結果, 複数の毒性物質が分離され, それらが卵黄反応陽性を示したことから, ホスホリパーゼである可能性が示唆された。
- 2) *Nocardia seriolae* のアジュバント添加各種注射ワクチンの有効性を調べたが, いずれの免疫効果も低かった。
- 3) *N. seriolae* FKCを用いた浸漬ワクチンでは対照区に比べると生残率が高くなったが, ワクチンの有効率は27%と低かった。
- 4) ヒラメの *Streptococcus parauberis* 感染症に対する *S. parauberis* FKCの予防免疫効果を調べた結果, 使用した5菌株すべてに高い効果が認められた。

(担当: 高見)

8. マハタのウイルス性神経壊死症 (VNN) の防除対策

高見 生雄・横山 文彦
吉水 守^{*1}・家戸敬太郎^{*2}

マハタのVNNは、種苗期のみならず、育成期にも発生し多大な被害をもたらす疾病であるが、育成期の有効な対策は確立されていない。

対策としてはワクチンが考えられるが、注射ワクチンではワクチン接種を行える魚体の大きさが限定されており、種苗時期の魚体へのワクチン接種には経口ワクチンが有利である。このため経口ワクチンのマハタのVNNに対する有効性を検討した。

1. 攻撃用ウイルス液の調整

マハタVNNの治療薬やワクチン等の対策についての有効性を確認するためには、攻撃試験が必須である。マハタのVNNウイルスはE-11細胞で増殖が可能であり大量に培養することができるが、一般的にはin vitroで培養された病原体の毒性は低下する傾向にあるため、魚体で増殖したウイルスを攻撃試験用として調整した。

方 法

一次攻撃用ウイルス

H15年とH16年に魚病検査に持ち込まれRT-PCRでVNNウイルスが確認された病魚の脳から広島大学から分与されたE-11細胞を用いて分離されたウイルスを均等に混ぜて一次攻撃用のウイルス液とした。なお、一次攻撃用ウイルス液の力価測定は実施しなかった。

攻撃用ウイルス液の調整

平成16年度に当水産試験場において種苗生産され陸上で飼育されたマハタ(400g程度)6尾に対して、平成17年7月29日に一次攻撃用ウイルス液を1尾当たり0.2ml接種し、同年8月5日に死亡した5尾と瀕死の1尾から採取した眼と脳を用いて次の手順でウイルス液を調整した。

- ① 眼と脳に9倍量のHanks'BSSを加えてPOLYTRONを用いて磨砕する
- ② 磨砕液を3,000rpm×30分間遠心分離する
- ③ 上清を再度5,000rpm×10分間遠心分離する
- ④ 上清を開口0.45μmのミリポアフィルターでろ過する。

供試魚

供試魚には魚類科が平成17年度に種苗生産したマハタの種苗60尾(平均魚体重8.4g)を用いた。

試験期間

2005年8月30日から9月5日までの7日間

水温

25.1~26.8°C(自然水温)

試験区

試験区は攻撃用ウイルス液をPBS(-)溶液で10倍に階段希釈した液を注射により1尾当たり0.05ml接種する5試験区10-1区、10-2区、10-3区、10-4区、10-5区とPBS(-)を接種する対照区の6試験区とした。供試魚は各試験区とも10尾とし、飼育は40L角型水槽で砂ろ過海水を36回転/日の流水で飼育した。

観察項目

観察項目は、水温、日間の死亡尾数、死亡魚のウイルス検査とした。なお、ウイルス検査はRT-PCR法でVNNウイルスの遺伝子の存在を確認する方法を用いた。

結 果

飼育期間中の水温と死亡尾数を記録した飼育記録(日間死亡数と水温)を表1に示した。

対照区以外の全ての試験区でウイルス液を接種した4日後から死亡が認められるようになり、7日後には全ての試験区で全数が死亡した。

この結果からウイルス液のマハタに対する感染価は

* 1 北海道大学大学院水産科学研究科

* 2 近畿大学水産研究所

表1 飼育記録(日間死亡尾数と水温)

月日	水温(℃)	10-1区	10-2区	10-3区	10-4区	10-5区	対照区
8月30日	25.9	0	0	0	0	0	0
8月31日	25.9	0	0	0	0	0	0
9月1日	26.0	0	0	0	0	0	0
9月2日	26.3	0	0	0	0	0	0
9月3日	26.8	5	4	8	7	5	0
9月4日	26.2	4	5	2	3	4	0
9月5日	25.1	1	1	0	0	0	0
9月6日	23.4	0	0	0	0	1	0
合計	-	10	10	10	10	10	0

半数致死量として $10^5 \text{LD}_{50} / 0.05 \text{ml} / 8.4 \text{g}$ 以上であることが推察された。また、このウイルス液を攻撃用の標準ウイルス液(NS05RG-01)とすることにした。

2. ワクチンの有効性試験1

キジハタのVNNウイルス遺伝子を内部に発現させた酵母のマハタVNNに対するワクチン効果を確認するためにマハタに経口投与し、攻撃用ウイルス液による浸漬攻撃試験、攻撃用ウイルス液を接種した個体を同居させる同居攻撃試験、自然発病を待つ自然攻撃試験を実施した。

方 法

供試魚

供試魚には魚類科が平成17年度に種苗生産したマハタの種苗1,060尾を用い、平成17年8月1日から8月15日まで3t円形水槽でUV照射を用水として1日10回転の給水条件で予備飼育をした後、試験に供した。予備飼育期間中の日間給餌率は魚体重の5~6%とした。種苗の平均魚体重は2gであったものが4.9gに増加した。

ワクチン

北海道大学が解析したキジハタのVNNウイルス遺伝子情報を近畿大が酵母に導入して培養し、不活化したものをワクチンとした。

試験区

試験区は「対照区」、ワクチンを給餌量の0.1%添加した「0.1%区」、0.5%添加した「0.5%区」、ウイルス遺伝子情報を導入していない酵母を添加した「酵母区」、浸漬する方法でワクチン処理をした「浸漬区」、ウイルス遺伝子を導入していない酵母で浸漬処理した「酵

母浸漬区」の6つの試験区とし、供試魚尾数は各試験区ともに浸漬攻撃試験と同居攻撃試験では60尾とし、自然攻撃試験では140尾とした。

ワクチン処理

ドライペレット(日清おとひめ2号)にワクチンを吸着させて魚体重に対する日間給餌率が5%になるように平成17年8月24日から9月2日までの10日間給餌した。浸漬法では平成17年8月24日と9月2日にワクチンが $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調整した海水200Lを500Lポリカーボネート水槽に入れて、酸素を供給しながら20分間の浸漬をした。

攻撃

攻撃は、ワクチン処理が終了した日から2週間後の9月16日に浸漬攻撃、同居攻撃、自然攻撃をおこなった。

① 浸漬攻撃

海水1tが入った3tキャンパス水槽に直径約60cmのカゴを試験区分(6個)入れ、これに供試魚を60尾ずつ入れてウイルス液(NS05RG-01)を10ml投入し、1日10回転の給水を行った。

② 同居攻撃

3tキャンパス水槽に直径約60cmのカゴを試験区分(6個)入れ、カゴの外にウイルス液(0.1ml/尾)を接種した平均体重約70gのマハタ8尾を同居させた。

③ 自然攻撃

一昨年、昨年と養殖試験中のマハタにVNNが発症した総合水産試験場の棧橋筏で2m角生簀で飼育する方法で行った。

記録項目とVNNの確認

水温と日間死亡尾数を記録した。また、RT-PCR検査法を用いて、へい死魚からVNNウイルスの遺伝子を確認した。

結 果

① 浸漬攻撃

へい死魚の脳をRT-PCRで検査した結果、全ての個体からVNNウイルス遺伝子が検出された。実験期間中の水温は $24.8^{\circ}\text{C} \sim 27.3^{\circ}\text{C}$ であった。攻撃後の各試験区の死亡状況を図1に示した。対

照区の累積死亡率は56.7%であり、攻撃試験としては理想的な攻撃強度であったが、0.5%区以外の試験区は全て対照区よりも累積死亡尾数が多くなり、ワクチンの有効性は確認できなかった。また、0.5%区は対照区よりも累積死亡率が少なかったものの、有効率は6.7%でありワクチンが有効とはいえない結果となった。

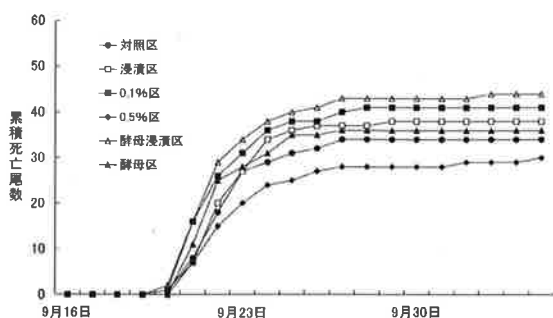


図1 浸漬攻撃による死亡状況

② 同居攻撃

へい死魚の脳を RT-PCR で検査した結果、全ての個体から VNN ウイルス遺伝子が検出された。

実験期間中の水温は25.2℃～27.9℃であった。

攻撃後の各試験区の死亡状況を図2に示した。対照区の累積死亡率は80%であり、攻撃強度がやや強い結果となった。全ての試験区が対照区よりも累積死亡尾数が少なくなったが対照区を除く試験区では0.5%区の累積死亡尾数が最も高くなり、ワクチンの有効性は確認されなかった。

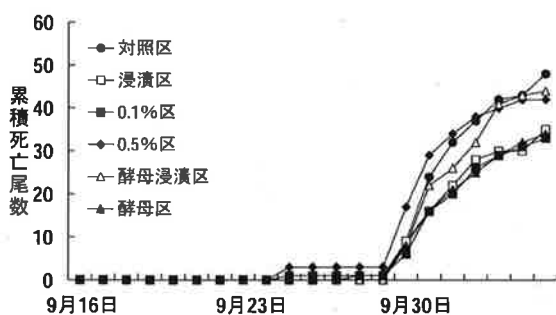


図2 同居攻撃による死亡状況

③ 自然攻撃

へい死魚の脳を RT-PCR で検査した結果、全ての個体から VNN ウイルス遺伝子が検出された。

実験期間中の水温は24.6℃～29.8℃であった。

沖だし後の各試験区の死亡状況を図3に示した。対照区の累積死亡率は12.9%であり、攻撃強度が弱い結果となった。しかし、0.1%区の累積死亡率は70%と高く、ワクチンが有効とはいえない結果となった。

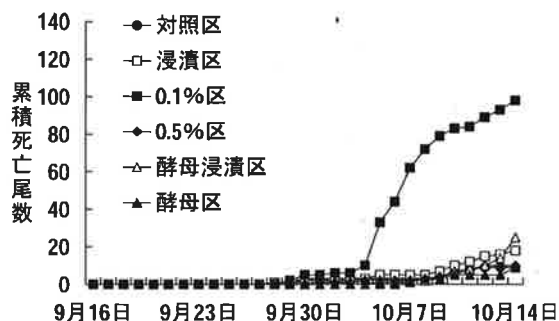


図3 自然攻撃による死亡状況

3. ワクチンの有効性試験2

「ワクチンの有効性試験1」の結果から経口投与と浸漬投与では、ワクチンの有効性は確認されなかった。使用したワクチンが内部発現酵母を不活化したものであったので、経口投与や浸漬投与ではワクチンが魚体内に入っていないことが考えられたので、ワクチンが確実に魚体内に入るように注射で接種する方法で有効性を確認することにした。

方法

供試魚

供試魚には魚類科が平成17年度に種苗生産し、奇形とされたマハタの種苗1,166尾を用い、平成17年10月17日から11月25日まで3t円形水槽でUV照射を用水として1日10回転の給水条件で予備飼育をした。予備飼育期間中の日間給餌率は魚体重の3%以下とした。種苗の平均魚体重は72gであったものが95gに増加した。

ワクチン

有効性試験1と同じものを使用した。

試験区

試験区は「対照区」、ワクチン用酵母を破碎して注射した「破碎注射区」、破碎した酵母を浸漬した「破碎浸漬区」、ワクチン用酵母に浸漬した「浸漬区」、普通の酵母を破碎して注射した「酵母区」の5つの試験区とし、供試魚尾数は各試験区ともに60尾とした。

ワクチン処理

ワクチン処理は平成17年11月11日に行った。ワクチン用酵母及び普通の酵母については、ポジットロンを用いて磨砕した後、1尾当たり100 μ gを注射器で接種した。浸漬法ではワクチンが250 μ g/mlになるように調整した海水100Lを200Lポリカーボネート水槽に入れて、酸素を供給しながら20分間の浸漬をした。

攻撃

攻撃は、ワクチン処理が終了した日から2週間後に次のとおり行った。

海水1tが入った3tキャンバス水槽に直径約60cmのカゴを試験区分(5個)入れ、これに供試魚を60尾ずつ入れてウイルス液(NS05RG-01)を10ml投入し、1日10回転の給水を行った。

記録項目とVNNの確認

水温と日間死亡尾数を記録した。また、RT-PCR検査法を用いて、へい死魚からVNNウイルスの遺伝子を確認した。

結 果

へい死魚の脳をRT-PCRで検査した結果、全ての個体からVNNウイルス遺伝子が検出された。

実験期間中の水温は25.4 $^{\circ}$ C~26.4 $^{\circ}$ Cであった。

攻撃後の各試験区の死亡状況を図4に示した。

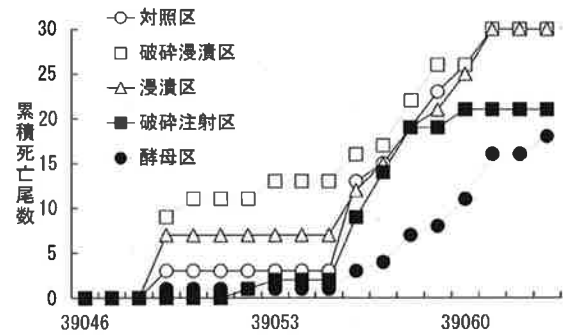


図4 死亡状況

対照区の累積死亡尾数は30尾であり死亡率は50%であった。破砕注射区の死亡率は35%であったが、酵母区は30%であり、ワクチンの有効性は認められなかった。

ま と め

- 1) マハタのVNN攻撃用の標準ウイルス液(NS05RG-01)を作製した。
- 2) ワクチンを経口投与した場合の有効性試験を実施したが、ワクチンの有効性は認められなかった。
- 3) ワクチンを注射器で接種した場合の有効性試験を実施したが、ワクチンの有効性は認められなかった。

(担当：高見)

9. トラフグのヤセ病防除対策

高見 生雄・横山 文彦・柳田 哲矢*1

トラフグのヤセ病は、平成8年頃から西日本各地で見られ始め、治療方法が無く死亡率が高いため大きな被害をもたらす疾病であり、粘液胞子虫 (*Enteromyxum leei* または *Leptotheca fugu*) が腸管へ寄生して腸管組織を著しく崩壊し、脱水症状を呈することで「痩せる」と考えられている。また、一旦、トラフグ養殖漁場に発生すると毎年発生するとされており、低水温期には一時的に症状が回復するが、昨年度までの研究で感染率は必ずしも低下しないことがわかった。粘液胞子虫が漁場内でどのように分布しており、どのようにして伝播していくのかを知ることは防疫対策上重要なことである。ここでは、平成16年度と平成17年度に実施した県下一斉調査と汚染漁場における天然魚の感染状況を調査したので報告する。

1. 県下一斉調査

平成16年9月から11月及び平成17年12月から平成18年1月に県下の斉調査を行った。

方 法

平成16年度は37漁場63経営体を対象に、平成17年度は33漁場57経営体を対象に、総検査尾数はそれぞれ1,228尾と570尾であった。各経営体から1ないしは2生簀を選定し、それぞれ10尾あるいは20尾を採材し、綿棒を用いた供試魚を殺さないPCR検出法によって *E. leei* と *L. fugu* の寄生の有無を調べた。PCRは5個体をあわせて1検体として核酸を抽出して行った。さらに、養殖業者からの聞き取りにより、調査対象群の魚齢、収容尾数、種苗の由来、種苗の導入時期を確認した。

結 果

平成16年度の調査では、*E. leei* が陽性だったのが15漁場21経営体であったのに対し、*L. fugu* は7漁場8

表1 県下一斉調査結果

地区	漁場	経営体 番号	魚 齢		検査尾数		種苗の由来		<i>E. leei</i>		<i>L. fugu</i>	
			H16	H17	H16	H17	H16	H17	H16	H17	H16	H17
A	ア	1	1	1	20	10	い	い	+	-	-	-
		2	0	1	20	10	い	い	+	-	-	-
		3	1	1	20	10	ろ	ろ	-	-	+	+
B	エ	4	2	0	10	10	は	ろ	-	-	+	+
		5	1	0	20	10	に	ほ	-	-	-	-
		6	1	/	20	/	不明	/	-	/	-	/
		7	0	0	20	10	へ	へ	+	-	-	-
		8	1	0	20	10	と	と	-	-	-	-
		9	1	0	20	10	ち	ち	+	-	-	-
C	オ	10	1	/	20	/	/	/	リ	-	/	/
		11	1	/	20	/	/	/	い	-	/	/
		12	/	0	/	10	/	に	/	/	-	-
		13	/	0	/	10	/	と	/	/	-	-
		14	/	0	/	10	/	ち	/	/	-	-
		15	1	/	20	/	/	め	-	/	-	/
		16	1	/	20	/	/	る	+	/	+	/
		17	1	0	20	10	お	と	+	-	-	-
		18	0	0	20	10	お	ほ	+	-	-	-
		19	1	0	20	10	お	お	-	-	-	-
		20	0	0	20	10	と	ほ	+	-	-	-
D	カ	21	1	/	20	/	/	わ	-	/	/	
		22	1	0	20	10	へ	か	+	+	+	
		23	0	0	20	10	お	に	-	+	-	-
		24	1	0	20	10	お	お	-	+	-	-
		25	1	/	20	/	不明	/	-	/	-	/
		26	1	/	20	/	不明	/	-	/	+	/
		27	/	0	/	10	/	お	/	-	/	-
		28	1	0	20	10	よ	よ	-	+	-	-
		29	1	/	20	/	い	/	-	/	-	/
		30	1	0	20	10	ぬ	い	-	-	-	-
E	キ	31	1	/	20	/	/	り	-	/	/	
		32	1	0	10	10	た	よ	-	-	-	-
		33	1	0	20	10	よ	よ	-	+	-	-
		34	1	0	10	10	た	ぬ	-	-	-	-
		35	0	0	20	10	よ	よ	-	-	-	-
		36	0	0	20	10	か	よ	-	-	-	-
		37	0	0	20	10	お	か	-	-	-	-
		38	0	0	20	10	か	か	-	-	-	-
		39	1	0	20	10	か	よ	-	-	-	-
		40	1	0	20	10	お	よ	-	-	-	-
F	ク	41	1	0	20	10	れ	か	-	-	-	-
		42	/	0	/	10	/	/	よ	/	-	/
		43	1	0	20	10	か	い	-	-	-	-
		44	0	0	20	10	よ	よ	-	-	-	-
		45	1	0	20	10	わ	か	-	-	-	-
		46	0	0	20	10	か	か	-	-	-	-
		47	1	0	20	10	い	い	+	-	-	-
		48	0	/	20	/	か	/	+	/	-	/
		49	1	/	20	/	お	/	+	/	-	/
		50	1	0	20	10	い	そ	+	-	-	-
G	ケ	51	1	/	20	/	お	/	+	/	-	/
		52	1	0	20	10	よ	よ	-	-	+	-
		53	1	1	20	10	り	れ	+	-	-	-
		54	1	/	20	/	お	/	+	/	-	/
		55	/	0	/	10	/	お	/	-	/	-
		56	/	0	/	4	/	り	/	-	/	-
		57	/	0	/	10	/	お	/	-	/	-
		58	/	0	/	10	/	お	/	-	/	-
		59	0	0	20	10	わ	わ	-	-	-	-
		60	1	0	20	6	ぬ	ぬ	-	-	-	-
H	コ	61	/	0	/	10	/	お	/	-	/	-
		62	1	0	20	10	よ	よ	-	-	-	-
		63	1	0	20	10	お	お	+	+	-	-
		64	0	0	20	10	か	か	-	-	-	-
		65	/	0	/	10	/	つ	/	-	/	-
		66	/	0	/	10	/	ね	/	+	/	-
		67	1	/	20	/	ろ	/	+	/	+	/
		68	1	/	20	/	お	/	-	/	-	/
		69	/	0	/	10	/	わ	/	+	/	-
		70	1	/	20	/	お	/	-	/	-	/
I	ク	71	1	/	20	/	な	/	-	/	-	
		72	1	1	20	10	ら	ら	+	+	-	+
		73	0	0	20	10	か	り	+	+	-	-
		74	0	0	20	10	い	い	+	+	-	-
		75	1	0	18	10	よ	よ	-	-	-	-
		76	1	/	20	/	ら	/	-	/	-	/

* 1 東京大学大学院水圏生物科学専攻

経営体であった(表1)。また、そのなかで4漁場4経営体では *E. leei* と *L. fugu* の両方に感染していた。

平成17年度は *E. leei* が10漁場11経営体であり *L. fugu* が3漁場4経営体で陽性と平成16年度に比べるといざれも数の上では感染水域が減少した。

また、平成16年度と平成17年度で同一経営体について比較すると、*E. leei* については平成16年度に陽性だった14経営体のうち8経営体が平成17年度に陰性になった。一方、平成16年度には陰性であった4経営体で平成17年度には陽性であった。

L. fugu については、平成16年度に陽性であった4経営体のうち2経営体が平成17年度には陰性になった一方で新たに1経営体で陽性となった。

2. 天然魚の感染状況調査

平成17年度の県下一斉調査と同時に3漁場において、天然魚の調査を行った。

方 法

天然魚の採集は、3つの漁場ネ、エ、ウについて行った。天然魚の採取はカゴで行い、冷凍若しくは水蔵にして、東京大学に送付し、解剖して摘出した腸管からDNAを抽出してPCR検査を行った。

結 果

天然魚については、3漁場で合計60尾(4目15種)を検査したが、*E. leei*、*L. fugu* ともに寄生は確認されなかった(表2)。

表2 天然魚の検査結果

魚種	採材日	採材漁場	<i>E. leei</i>	<i>L. fugu</i>
カワハギ			0/19	0/19
ヨソギ			0/1	0/1
カサゴ			0/2	0/2
カゴカキダイ	2005/12/6	ネ	0/2	0/2
タカノハダイ			0/1	0/1
コモフグ			0/3	0/3
マアナゴ			0/1	0/1
アイゴ			0/1	0/1
スズメダイ			0/7	0/7
ヨソギ			0/2	0/2
クロホシイシモチ	2005/12/7	エ	0/2	0/2
コスジイシモチ			0/5	0/5
ササノハベラ			0/5	0/5
マアナゴ			0/1	0/1
カサゴ			0/1	0/1
ウマヅラハギ	2005/12/7	ウ	0/3	0/3
イソフエフキ			0/2	0/2
クロメジナ			0/2	0/2
4目15種			0/60	0/60

ま と め

- 1) 平成16年度に37漁場63経営体、平成17年度に33漁場57経営体のトラフグについてPCR法によるヤセ病の検査を実施した。
- 2) *E. leei*、*L. fugu* ともに平成16年度よりも平成17年度に感染水域が減少した。
- 3) 3漁場において天然魚を採捕して感染状況を調べた。
- 4) *E. leei*、*L. fugu* ともに天然魚への感染は認められなかった。

(担当：高見)

10. トラフグの口白症防除対策

高見 生雄・吉水 守^{*1}

トラフグの「口白症」特徴は、口吻部に潰瘍患部が形成され、次いで病魚が他の個体に攻撃的な行動を示すようになり、やがて死に至る。本症の名称は病魚の概観的特徴（口吻部の潰瘍患部が軽症の場合には水中で白く見えること）にちなんで漁業者が用いた呼称に由来する。

本症は、1981年頃から西日本各地で発生が知られるようになり、1985年には本症による被害量が総生産量の4.2%と高い被害率を示した。その後、被害率は減少傾向であるが、種苗期に発生した場合には全滅することもあるため、養殖トラフグの安定的生産を左右する大きな要因となっている。

防疫対策の第一歩として確定診断法の開発を目指すものであるが、確定診断を迅速に行うために使用できる臓器を明らかにするために、発病魚の臓器の病原体量を比較した。

方 法

① 攻撃用病原体液の作製

2005年6月3日に長崎県鹿町町で採取した口白症発症個体（TL19.5cm）の脳を用いて定法に従い一次病原体抽出液を作製した。

県下の種苗生産業者から購入して、陸上で飼育管理した5尾（平均全長19.7cm）に0.2ml/尾の一次病原体抽出液を接種して試験魚とした。また2尾に0.2ml/尾のHanks' BSSを接種して対照魚とした。

試験魚と対照魚とをいっしょに500Lパンライト水槽に入れ25℃に加温して流水（20回転/日）で飼育し、外観的に口白症を発症した試験魚から脳を取り出して、定法に従い二次病原体抽出液を作製して口白症標準病原体抽出液（NS05SUD-01）として、半数致死量（LD₅₀）をBEHRENS-KARBERの法を用いて求めた。

② 臓器中の病原体力価測定

2005年8月30日に平戸市で採取した口白症発症個体（TL26.7cm）から脳、腎臓、脾臓を取り出して定法に従って、臓器別に病原体抽出液を作製し、県下の種苗生産業者から購入し、陸上で飼育管理したトラフグ（全長11.6cm）を用いた。

試験区は、3種類の臓器毎に病原体抽出液原液をHanks' BSSで10倍に階段希釈していき10⁻²区~10⁻⁶区とする15試験区として、Hanks' BSSを接種した対照区の計16試験区とした。1試験区当たりトラフグは10尾とし、1尾あたり0.1mlの病原体抽出液を接種し、各試験区ごとに40Lアクリル水槽に入れ25℃以上に加温して流水（48回転/日）で飼育し、水温、行動、死亡等を観察した。死亡率から半数致死量を求めた。

結 果

① 攻撃用病原体液の作製

一次病原体抽出液による攻撃試験で死亡した試験魚の症状を表1に示した。この結果から試験魚は、口白症を発症して死亡したと診断された。また、対象魚は死亡しなかった。

表1 一次病原体抽出液による攻撃試験で死亡した試験魚の症状

死亡月日	体長 (cm)	体重 (g)	体色黒化	口白	肝臓線状出血痕
6月10日	21.4	159.6	+	+	+
6月11日	19.6	230.5	+	+	-
6月11日	18.5	220.8	+	+	-
6月11日	19.6	192.3	+	+	-
6月11日	19.5	233.7	+	+	+

口白症標準病原体抽出液による攻撃試験結果を表2に示した。

この結果から半数致死量（LD₅₀）を求めると、LD₅₀=10^{-3.86}/mlとなった。

* 1 北海道大学大学院水産科学研究科

表2 口白症標準病原体抽出液による攻撃試験結果

試験区	0区	-1区	-2区	-3区	-4区	-5区	対照区
飼育尾数	10	10	10	10	10	10	10
死亡尾数	10	10	10	7	5	3	3

② 臓器中の病原体力価測定

口白症発症魚の臓器抽出液による攻撃試験結果を表3に示した。この結果から半数致死量 (LD₅₀) を求めると、脳は $10^{-3.9}/ml$ 、腎臓は $10^{-3.2}/ml$ 、脾臓は $10^{-2.5}/ml$ となり、力価は脳>腎臓>脾臓の順となることがわかった。

表3 口白症発症魚臓器抽出液による攻撃試験結果

臓器名	-2区	-3区	-4区	-5区	-6区	LD ₅₀ /ml
脳	10	7	1	1	0	$10^{-3.9}$
腎臓	9	3	5	0	2	$10^{-3.2}$
脾臓	8	4	4	0	1	$10^{-2.5}$

ま と め

- 1) 口白症標準病原体抽出液 (NS05SUD-01) を作製した。
- 2) NS05SUD-01の半数致死量 LD₅₀= $10^{-3.86}/ml$ であった。
- 3) 口白症発症魚の脳、腎臓、脾臓の病原体の量は脳>腎臓>脾臓の順に多いことがわかった。

(担当：高見)

11. 環境負荷低減飼料開発に関する研究

宮原 治郎・佐藤 秀一*

海面養殖から環境への汚染負荷を軽減していくため、前年度に引き続き東京海洋大学と共同で、ブリおよびマダイを対象に環境負荷低減飼料開発に関する研究を実施した。

なお、内容の詳細については平成17年度養殖水産物ブランド・ニッポン推進対策委託事業報告書（環境負荷低減型配合飼料開発事業）を参照されたい。

I. ブリ当歳魚およびマダイ 1 歳魚を用いた植物性原料配合飼料におけるリンの消化吸収率を高める添加物試験

ブリ当歳魚およびマダイ 1 歳魚における植物性飼料原料の配合割合とリンの消化吸収率を高める目的でクエン酸を添加し、飼料原料中のリンの消化吸収率および有効リン含量を測定した。

方 法

供試魚 ブリ当歳魚は、(独)水産総合研究センター五島栽培漁業センターで種苗生産された早期採卵ブリを用い、平均体重466gで容量1tの自然採糞装置に10尾収容し、試験飼料で3日間予備飼育して実験に供した。

マダイ 1 歳魚は、長崎市水産センターで種苗生産されたものを用い、平均体重338gで容量1tの自然採糞装置に25尾収容し、試験飼料で3日間予備飼育して実験に供した。

試験飼料 ブリ用試験飼料組成を表1に示した。前年度の試験結果に基づき調製した魚粉を基本とする対照飼料（魚粉対照区）とリン含量の低い大豆油粕およびコーングルテンミールで魚粉の30%を代替し、飼料中のリン含量を約0.3%削減した試験飼料（代替対照区）、これにクエン酸を0.5%添加（クエン酸0.5%区）あるいはクエン酸を1%添加（クエン酸1%区）した試験

飼料とした。

マダイ用試験飼料は、ブリ用試験飼料からサプリメントオイルを除いたもので、魚粉対照区より試験飼料中のリン含量を約0.3%削減した。

なお、両飼料とも内部標準物質として酸化クロムを約0.7%添加した。

表1 ブリ用試験飼料組成

	魚粉対照区	代替対照区	クエン酸0.5%区	クエン酸1%区
アンチローゼール	50	35	35	35
大豆油粕	5	10	10	10
コーングルテンミール	5	14	14	14
小麦粉	8	8	7.5	7
外カカオ粉+小麦粉	15	15	15	15
魚油	10	10	10	10
大豆油	4	5	5	5
ミネラルミックス(リンフリー)	1	1	1	1
ビタミンミックステー	2	2	2	2
クエン酸	0	0	0.5	1
サプリメントオイル(魚油)	5	5	5	5
合計	105	105	105	105

給 餌 給餌は、1日2回（午前、午後）とし、ほぼ飽食量を与えた。

採 糞 午後の給餌30分後より翌朝まで採糞を行なった。その操作を分析に必要な量の糞が採集できるまで継続した。採集した糞は、遠心分離機で海水を取り除いた後、凍結乾燥を行い、分析に供した。

結 果

ブリ当歳魚およびマダイ 1 歳魚における試験飼料のリンの消化吸収率などの結果を表2に示した。

ブリにおけるリンの消化吸収率は、魚粉対照区が34.9%に対し、代替対照区が55.8%、クエン酸0.5%区が63.2%、クエン酸1%区が57.2%といずれも高く、クエン酸0.5%区が最も高かった。有効リン含量は、魚粉対照区が0.45%に対し、代替対照区が0.57%、クエン酸0.5%区が0.63%、クエン酸1%区が0.58%といずれも高く、クエン酸0.5%区が最も高かった。なお、いずれの区もブリ稚魚のリン要求量（0.68%）を満たさなかった。

マダイにおけるリンの消化吸収率は、魚粉対照区が

* 東京海洋大学

59.1%に対し、代替対照区が59.9%、クエン酸0.5%区が63.2%、クエン酸1%区が69.1%といずれも高く、クエン酸1%区が最も高かった。有効リン含量は、魚粉対照区が0.79%に対し、代替対照区が0.63%、クエン酸0.5%区が0.66%、クエン酸1%区が0.73%といずれも低かった。なお、対照区とクエン酸1%区は、マダイ稚魚のリン要求量(0.68%)を満たしていた。

表2 ブリ当歳魚およびマダイ1歳魚における試験飼料のリンの消化吸収率などの結果

	魚粉対照区	代替対照区	クエン酸0.5%区	クエン酸1%区
ブリ				
飼料中のリン含量(%)	1.30	1.02	0.99	1.01
リンの消化吸収率(%)	34.9	55.9	63.2	57.2
有効リン含量(%)	0.45	0.57	0.63	0.58
マダイ				
飼料中のリン含量(%)	1.33	1.05	1.05	1.06
リンの消化吸収率(%)	59.1	59.9	63.2	69.1
有効リン含量(%)	0.79	0.63	0.66	0.73

II. ブリ当歳魚を用いた植物性原料配合飼料におけるクエン酸の添加効果試験

前年度は、大豆油粕を乳酸菌発酵あるいはフィターゼ処理したものを配合して、リンの消化吸収率などを高める効果を検討したが、ブリにおいてはよい結果が得られなかったため、通常の大豆油粕などの配合割合を増加した場合におけるクエン酸の添加効果を検討した。

方 法

供試魚 ブリ当歳魚は、「I」と同じ群のものであり、平均体重約143gのものを平成17年7月19日に3×3×3m小割生簀へ200尾収容し、平成17年7月20日から給餌し、10月12日まで海面飼育した。

試験飼料 ブリ用試験飼料組成を表3に示した。魚粉(アンチョビーミール)50%の対照区に対し、魚粉35%にクエン酸を1%添加した飼料区{(A35+C1)区}、魚粉30%にクエン酸を0.5%添加した飼料区{(A30+C0.5)区}、魚粉30%にクエン酸を1%添加した飼料区{(A30+C1)区}とした。

表3 ブリ用試験飼料組成

	対照区	(A35+C1)区	(A30+C0.5)区	(A30+C1)区
アンチョビーミール	50	35	30	30
大豆油粕	5	10	20	20
コーングルテンミール	5	14	14	14
小麦粉	3	7	2.5	2
外オカ澱粉+小麦粉	15	10	10	10
魚油	10	10	10	10
大豆油	9	10	10	10
ミネラルミックス(リンフリー)	1	1	1	1
ビタミンプレミクスチャー	2	2	2	2
クエン酸	0	1	0.5	1
サブリメントオイル(魚油)	5	5	5	5
合計	105	105	105	105

給 餌 給餌は、1日1回とし、ほぼ飽食量を週6日与えた。

結 果

ブリ当歳魚における海面飼育試験結果を表4に示した。

生残率は、いずれも96%以上と良好であった。

成長面では、対照区(日間成長率1.53%、増肉係数1.71)、(A35+C1)区(日間成長率1.39%、増肉係数1.98)、(A30+C0.5)区(日間成長率1.30%、増肉係数2.13)、(A30+C1)区(日間成長率1.26%、増肉係数2.18)の順によく、植物性原料の配合割合の増加に伴い、低くなった。

表4 ブリ当歳魚における海面飼育試験結果

	対照区	(A35+C1)区	(A30+C0.5)区	(A30+C1)区
生残率(%)	99.3	96.5	98.0	96.5
開始体重(g)	143	144	143	144
終了体重(g)	745	642	563	562
日間成長率(%)	1.53	1.39	1.30	1.26
増肉係数	1.71	1.98	2.13	2.18

ブリ当歳魚における魚体への窒素とリンの蓄積率などの海面飼育試験結果を表5に示した。

魚体への窒素の蓄積率は、対照区(30.1%)、(A35+C1)区(26.9%)、(A30+C0.5)区(24.1%)、(A30+C1)区(22.8%)の順に高く、植物性原料の配合割合の増加に伴い、低くなった。

魚体へのリンの蓄積率は、(A30+C0.5)区(31.6%)、(A30+C1)区(29.8%)、(A35+C1)区(28.4%)、対照区(23.8%)の順に高く、植物性原料の配合割合の増加に伴い、高くなった。

環境への窒素の負荷量は、対照区(83.0kg/t生産)、(A35+C1)区(89.0kg/t生産)、(A30+C0.5)区(92.8kg/t生産)、(A30+C1)区(96.8kg/t生産)の順に低く、植物性原料の配合割合の増加に伴い、高くなった。

環境へのリンの負荷量は、(A30+C0.5)区(13.9kg/t生産)、(A30+C1)区(14.6kg/t生産)、(A35+C1)区(15.9kg/t生産)、対照区(18.2kg/t生産)の順に低く、植物性原料の配合割合の増加に伴い、低くなった。

表5 ブリ当歳魚における魚体への窒素とリンの蓄積率などの海面飼育試験結果

	対照区	(A35+C1)区	(A30+C0.5)区	(A30+C1)区
窒素				
魚体への蓄積率(%)	30.1	26.9	24.1	22.8
環境への負荷量(kg/t・生産)	83.0	89.0	92.8	96.8
リン				
魚体への蓄積率(%)	23.8	28.4	31.6	29.8
環境への負荷量(kg/t・生産)	18.2	15.9	13.9	14.8

ま と め

- 1) 養殖漁場の主要な汚染原因物質であるリンの排泄量軽減のため、ブリ当歳魚およびマダイ1歳魚についてリン含量の低い植物性原料の配合割合を増加し、リンの消化吸収率を高める目的でクエン酸を添加したときのリンの消化吸収率および有効リン含量などを測定した。
- 2) 魚粉（アンチョビーミール）の30%を代替し、飼料中のリン含量を約0.3%削減した飼料では、ブリ当歳魚の有効リン含量は、魚粉対照区よりいずれも

高く、クエン酸の0.5%添加が最も高かったが、ブリ稚魚のリン要求量（0.68%）を満たさなかった。マダイ1歳魚の有効リン含量は、魚粉対照区よりいずれも低かったが、クエン酸の1%添加によりマダイ稚魚のリン要求量（0.68%）を満たした。

3) 魚粉（アンチョビーミール）の30%あるいは40%を植物性原料で代替し、クエン酸を0.5%あるいは1%添加した飼料は、成長面と魚体への窒素の蓄積率では対照区よりいずれも劣り、環境への窒素の負荷量も高くなった。一方、クエン酸を0.5%添加した飼料は、魚体へのリンの蓄積率が最もよく、環境へのリンの負荷量も低かった。

4) これらのことから、リン含量の低い植物性原料などで魚粉の30~40%を代替した場合、クエン酸の添加量は、0.5%以下でもよい可能性が示唆された。

（担当：宮原）

12. アサリの呼吸生理に関する研究

松田 正彦 ・日向野純也*¹
品川 明*²・石松 惇*³

諫早湾に面する諫早市小長井町のアサリ養殖漁場では夏季にしばしば大量へい死を生じ、漁業生産上大きな問題点となっているが、へい死原因は明らかになっていなかったが、平成16年夏季の大量へい死時の調査¹⁾により日本各地^{2), 3)}でアサリの夏季へい死原因として報告のある高水温時の貧酸素環境が原因であると示唆された。

今回、どの程度の貧酸素環境がアサリの生残に影響を与え、またへい死対策のための環境改善値を得るための基礎資料として、室内試験により水温、溶存酸素等の環境変化にともなうアサリの代謝の変化および貧酸素時に漁場で発生するとされる硫化水素の影響について試験を行ったので報告する。

I. アサリの酸素消費速度の測定

方 法

アサリを1個体ずつ、内容量約210mlの蓋付きの容器に収容し、Strathklevin社製溶存酸素計で容器内の溶存酸素量(以下DO)をモニターした。容器の側面にはマグネチックスターラーを装着して容器内の海水を攪拌しながら、DOの変化を記録した。実験は水温25℃と30℃で行い、原則としてDOがほぼ0に近づくまで継続した。各水温アサリ6個体を3回ずつ実験した。実験終了後にアサリの殻長等の計測および軟体部乾燥重量(60℃で24時間乾燥)を測定した。

結 果

アサリは外界の酸素を消費する時間帯と消費しない時間帯を交互に発現させて容器内の溶存酸素を節約して使用しているようであったが、個体差が大きく、酸素を消費しない時間帯を計算に入れて酸素消費速度を求めるのが困難であったため、15分毎のDO読み取

り値から、DO低下時についてのみ勾配を求め酸素消費速度を計算した。結果を図1に示す。DOが飽和に近い場合(6mg/l周辺)では軟体部乾重1gあたりの消費速度は25℃で約1mg/h/g、30℃で約2mg/h/gであったが、DOが低下し、1mg/lではそれぞれ0.4、0.5mg/h/g程度であった。今後、別の水温帯での試験を含め検討する必要があるが、水温30℃では25℃と比較し見かけ上2倍程度、酸素消費速度(代謝速度)が大きくなると考えられ、水温30℃を超える高水温時に貧(無)酸素環境となった場合、アサリの呼吸生理に大きな負担となるのではないかと推察された。

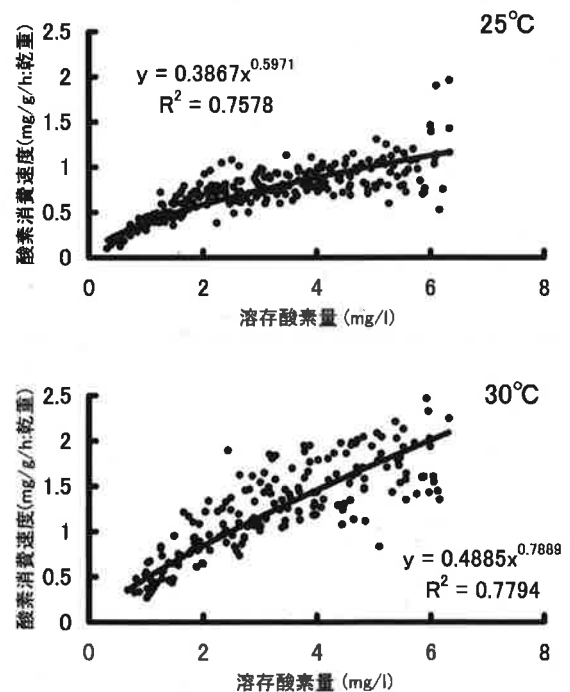


図1 溶存酸素量とアサリの酸素消費速度の関係

* 1 水産総合研究センター 養殖研究所

* 2 学習院女子大学 国際文化交流学部

* 3 長崎大学 環東シナ海海洋環境資源研究センター

II. 硫化水素がアサリの呼吸生理に与える影響

方 法

恒温槽中に濾過海水を満した容器（容量約1ℓと700ml）を浸漬し、アサリをそれぞれ5個体および3個体収容して、Strathklevin社製溶存酸素計で容器内のDOをモニターした。試験区は容器内の濾過海水を窒素で曝気し、無酸素となった段階で密閉した試験区（無酸素区）、無酸素環境ではば10mg-S/ℓとなるようNa₂Sを添加し、容器内のpHをおよそ7とするため炭酸ガスを吹き込み調整し、密閉した試験区（無酸素+H₂S区）、対照として容器内の濾過海水を空气中で曝気して溶存酸素が飽和した状態を維持した試験区（有酸素区）を設定した。容器の側面にはマグネチックスターラーを装着して容器内の海水を攪拌した。実験は水温30℃および25℃で行い、それぞれの試験環境にアサリを13時間および21時間曝露した。実験終了後アサリの外套腔液（殻内の液体）を採取し、後日HPLCで各種有機酸含量を測定した。

結 果

いずれの試験区も実験終了まで死亡したアサリはみられず、刺激に対しての閉殻反応も速やかで外見上の異常は観察できなかった。

25℃および30℃の各試験区の実験終了時アサリ外套腔液中の各種有機酸含量を図2に示す。

25℃では21時間後、無酸素区および無酸素+H₂S区でコハク酸のみ有酸素区に対して有意（ $p < 0.05$ ）に増加した。また、有意差は検出できなかったが、プロピオン酸*含量は無酸素+H₂S区のみ増加がみられた。

30℃では無酸素区および無酸素+H₂S区のコハク酸、酢酸、プロピオン酸含量が有酸素区に対して有意（ $p < 0.05$ ）に増加し、13時間後のプロピオン酸含量は無酸素区、無酸素+H₂S区とも1μmol/ml以上となったが、無酸素区と無酸素+H₂S区の比較ではコハク酸含量以外有意な差がなかった。

以上の結果から、嫌気代謝の進行に対して、硫化水素の影響が大きいことが示唆された。

(*無酸素環境継続時、アサリがへい死する直前に急増する有機酸、へい死の目安は2μmol/ml以上)

ま と め

1) 水温30℃では25℃と比べ、酸素消費速度が大きく、水温30℃を超える高水温時に貧（無）酸素環境となった場合、アサリの呼吸生理に大きな負担となるのではないかと推察された。

2) 無酸素環境下では硫化水素がアサリの嫌気代謝を促進することが示唆された。

文 献

1) 平野慶二・北原茂・山砥稔文・坂口昌生・山元宣征・松田正彦：平成16年度長崎県総合水試事報，146-152(2005)。

2) N. Uzaki, M. Kai, H. Aoyama, T. Suzuki：Fisheries Science, 69, 936-943(2003)。

3) 柿野純：水産土木, 23(1), 41-47(1986)。

(担当：松田)

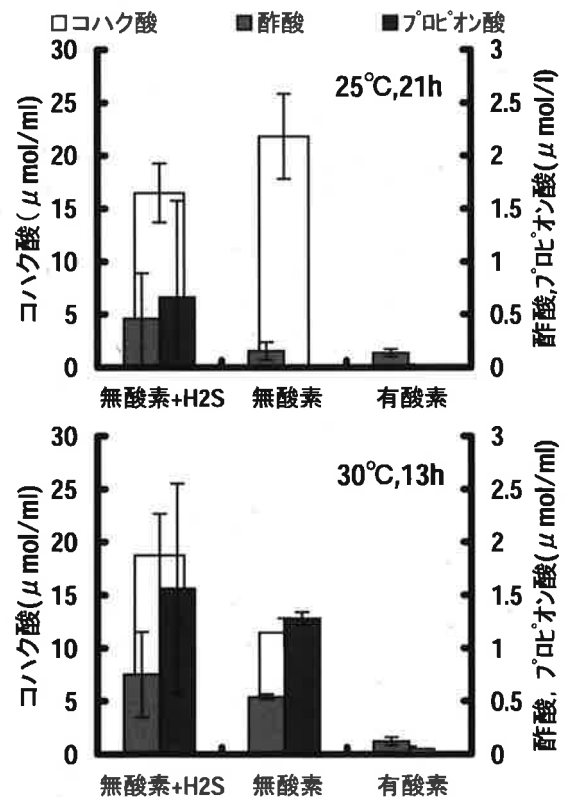


図2 試験終了時の各区アサリ外套腔液有機酸含量