

1 海面増養殖技術試験

(1) 海産生物増養殖試験

海産動物増養殖試験

黒田伸郎・岩崎貞郎・松村貴晴

キーワード；トリガイ、浮遊幼生、モノクローナル抗体、漁獲調査

目 的

トリガイは小型底びき網漁業の重要な漁獲対象種であるが、漁獲量の経年変動が大きく、この豊不漁が経営に及ぼす影響は大きい。本種資源の増大、安定化を図るためには、漁場形成機構を明らかにしなければならないが、その基礎的知見となる幼生の発生場所と発生量、稚貝の着底場所やその後の生残条件等のトリガイの生態はほとんど明らかにされていない。そこでこれらの基礎的知見を得るため、浮遊幼生の調査法の検討、漁場における成貝の生息状況調査を行った。

材料及び方法

(1) トリガイ特異的モノクローナル抗体の有効性の検討

平成11年6月16日、10月21日に三河湾内の10定点において、海水を採取した（図1）。6月の一部の試料については間接蛍光抗体法のみにより、6月の残りの試料と10月の全試料については間接蛍光抗体法と形態法によって、トリガイ浮遊幼生の同定・計数を行い結果を比較した。トリガイ特異的モノクローナル抗体は、昨年度に作成し、トリガイに対する特異性が最も高かったT1 4-5-3株を用いた。



図1 浮遊幼生調査地点

(2) トリガイ生息状況調査

東幡豆および大浜漁協において関係者への聞き取り調

査を実施し、トリガイ発生状況を調査した。

また、西三河地区の共同漁業権92号漁場内において平成10年9月21日、12月9日、2月3日、3月23日に水流噴射式桁網（袋網の目合：7.5節）による漁獲調査を実施し、トリガイの生息状況、成長等を調査した。

結果及び考察

(1) トリガイ特異的モノクローナル抗体の有効性の検討

表1に形態法と蛍光抗体法による計数値を示した。表中の計数値で無印のものは、両方法で分析した試料であり、抗体で反応したもののうち、形態的にトリガイと同一とされた個体数のみを示している。＊を付したものは、蛍光抗体法のみで分析した試料であるため、トリガイ以外の種も含まれている。

表1 形態法と蛍光抗体法によるトリガイ浮遊幼生計数値

平成11年6月16日

St.	depth(m)	inds./m ³
5	4	26 *
	16	10 *
6	13	8
7	0	16
	2	8
	6	8
	10	0
	14	0 *
12	4	0 *
14	0	8
	4	12
	7	0
18	0	0
	4	32
	6	0 *
	2	192
23	0	32
	2	96
	4	154 *
	6	56
	8	84
	10	64 *

25	0	24
	4	230 *
	6	90 *
29	0	0
	4	66 *
	16	48 *

平成11年10月21日

St.	depth(m)	inds./m ³
5	4	123
6	4	25
7	4	37
12	4	49
14	4	0
18	4	0
22	2	12
23	4	0
25	4	12
29	4	12

＊：蛍光抗体法
無印：形態法

両方法で分析した試料では、形態法でトリガイ幼生と同

定された個体は、全てモノクローナル抗体にも反応した。逆に本抗体に反応した個体のうち、形態法でトリガイ以外の種であると特定された個体は、0～50%であった。これらの個体のうち約50%は形態的に明らかにトリガイとは異なっており、蛍光顕微鏡下でも容易に除外できると考えられた。残りは形態的に容易にトリガイと区別できないが、交装の形態の詳細な観察からは明らかにトリガイ幼生とは異なっており、種名は不明であるものの、三河湾に普遍的に出現する種ではないと考えられた（柳橋、私信）。

これらのことから、本抗体に反応する二枚貝浮遊幼生のうち、形態的に明らかにトリガイと異なるものを除外して計数することにより、少なくとも67%以上の精度でトリガイ浮遊幼生の特定・計数を行うことができると考えられた。

本年度の2回の観測結果をみると、6月16日には知多湾海域にあるSt.22,23,25,29でトリガイ浮遊幼生の比較的高い密度が観測されたのに対し、10月21日には渥美湾のSt.5,6,7,12で比較的多く出現しており、両海域の独立性が示唆され興味深い。本年度の研究により本抗体の、現場への適用の目処がたったので、今後本抗体を用いた間接蛍光抗体法により、大規模な浮遊幼生調査を行うことにより、トリガイの産卵生態が明らかになることが期待される。

(2) トリガイ生息状況調査

漁業関係者からの聞き取り調査によると、本年度は昨年度より出漁日数は増加したものの資源量は少なく、漁獲は春季に、漁場は三河湾奥部、東部海域及び知多湾の一部に限られた。また、漁獲物は小型のトリガイが主であった。

水流噴射式桁網による漁獲調査の結果を表2に、殻長組成を図2に示した。

9月に実施した共同漁業権92号内での漁獲調査で、殻長28～40mmを主群とするトリガイが1.2～65.2個体/100m²、平均24.9個体/100m²の高い密度で生息が確認されたが、12月の調査時では0.1～1.7個体/100m²、平均0.8個体/100m²と減少していた。また、トリガイが1.7個体/100m²生息していた場所では、ツメタガイの生息密度が8.3個体/100m²とトリガイより高かった。

2月の調査時も生息密度は0～2.8個体/100m²と低かったが、主群は44～60mmと成長が認められた。3月23日の調査時の生息密度は0～4.2個体/100m²と大きな変化はなく、また、成長も認められなかった。

9月に高密度で生息していたトリガイが3月には平均1.9個体/100m²まで減少した。また、9月調査時に確認された殻長50mm以上の個体の、その後の生育を確認できなかった。

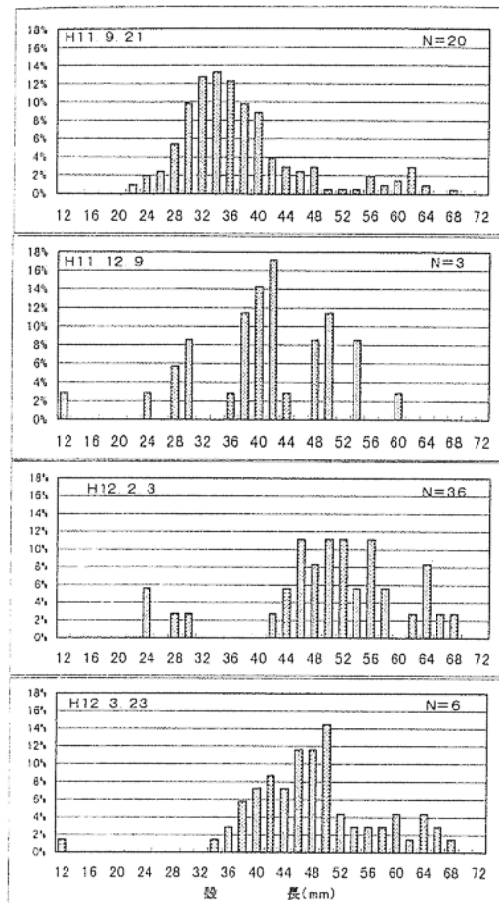


図2 トリガイ殻長組成

個体数の減少の原因として、生息環境の悪化、食害生物による捕食、漁労活動による損傷等が考えられる。今後、減耗の原因を究明することができ、対処手段を見つけることにより、9月時点で20～30mmの個体は、12月には50mm程度に成長することから、翌春には大型個体としての漁獲につながるものと推測できる。

表2 トリガイ漁獲調査結果

調査月日	H11.9.21				H11.12.9				H12.2.3				H12.3.23			
調査回次	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
曳網時間(分)	5	5	5	5	5	5	5	10	5	5	4	3	5	5	5	5
曳網面積(m ²)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	2000	1000	1000	800	600	1000	1000	1000	1000
漁獲個体数(個体)	12	476	104	652	14(5)*	1	1	34(9)*	2	28(3)*	10(1)*	0	23	42(6)*	0	11
生息密度(個体/100m ²)	1.2	47.6	10.4	65.2	1.4	0.1	0.1	1.7	0.2	2.8	1.0	0	2.3	4.2	0	1.1

* () 内の数値は漁獲個体数に含まれる破損個体数

海産植物増養殖試験

盛田 信・伏屋 満・二ノ方圭介・植村宗彦

キーワード；ノリ，育種，種苗，特性評価，選抜，交雑

目 的

ノリ養殖には様々な種苗が普及しているが，近年の育苗期における高水温や，病害による製品の劣化等の問題が起きており，このような状況の中，ノリ養殖業者からは，耐病性や高水温耐性に優れた特性を持つ種苗の開発が望まれている。当事業では，耐病性や環境適応性のある種苗を開発するため，ノリ種苗の系統を収集・保存するとともに，その特性について，室内及び養殖漁場で評価した。さらに，優良系統の選抜やあかぐされ病耐性種苗を目標とした交雑試験を行った。

材料及び方法

1 遺伝資源収集保存

既存の保存系統については引続き保存培養を行い，また，各地の養殖ノリ系統や昨年度東北地方で収集したアマノリからは，1～数枚の葉体を選抜して定法により新たな系統の作出を行った。なお，他の藻類の汚染が著しい場合は，小貝片に移植・培養後，有効塩素1000ppm添加海水に1時間浸漬して除藻し，培地中に再成長してきたフリー糸状体を採取した。

2 特性評価試験

(1) 培養試験

保存系統のうち，「融合(保存系統No.502)」及び「ユノウラ(120)」等52系統について，定法により糸状体及び葉体の培養を行った。葉体培養については，識別のための着色を施したクレモナ単糸に採苗し，水温18℃及び22℃で28日間混合通気培養を行った。また，一部の系統については，水温18℃において個別通気培養を行った。これらの培養において，7日毎に形態等を測定し，28日後にはあかぐされ病菌を感染させ，その罹病度を測定した。

(2) 野外養殖試験

10月の初旬に「MS(426)」，「ユノウラ(292)」及び「融合(504)」を用いて陸上採苗を行い，当日冷凍(-20℃)し，早出し網として「MS(426)」及び「融合(504)」を10月15日に，通常網は10月22日に漁業生産研究所地先の浮上筏に張り込んだ。約4週間の育苗期間中，概ね7日毎に葉長，基部長及び二次芽数等を測定した。

通常網は11月11日入庫し，12月8から翌年2月2日までの間，漁業生産研究所地先の浮流し施設に張り込んだ。12月24日から概ね10日間隔で5回摘採及び酸処理(グローゲン100倍×5分)を行い，その都度葉長，厚さ，病害及び色素成分等について測定した。

3 選抜育種試験

2(1)の特性評価培養試験からあかぐされ病耐性系統を4株，高成長系統を3株選定し，それぞれの組合せをフラスコ内で混合通気培養した。各系統の葉体は未成熟部分を用い，7日毎の換水でおおよそ2ヶ月間通気培養を行った。葉体の成熟が進んだ時点の培養液を用いて貝殻に果胞子付けを行った。

結果及び考察

1 遺伝資源収集保存

平成11年度当初における既存の保存種苗は459系統であった。これに東北の自生ノリから6種46系統とその他養殖種苗11系統を加え，計516系統とした。

2 特性評価試験

(1) 培養試験

主な系統の試験結果について表1に示す。

常温において成長が良かったのは，「兵庫選抜(518)」，「シゲカズ(496)」及び「ハガクレ(510)」であった。高水温耐性に優れていたのは，「小豆島(69・418)」，「融合(508)」及び「ハガクレ2(526)」であった。また，あかぐされ病耐性に優れていたのは「兵庫選抜(518)」及び「佐賀5号(498)」等であった。なお，高水温及びあかぐされ病双方に比較的耐性のある系統は「小豆島(69)」であった。

(2) 野外養殖試験

育苗期における基部長を図1に示す。早出し網の育苗期間は水温が24～20℃と高く推移した。その影響として，早出し網は「MS(426)」，「融合(504)」とも通常網に比べ，基部長が未発達であり，多層化個体は両系統とも10%程度あった。両系統とも育苗初期には成長があまりよくなかったが，後期は高成長だった。両系統のうち，「融合(504)」が成長・基部形成とも良く，「MS(426)」より高温耐性に優れていた。2次芽の放出は「MS(426)」

のほうが早かった。これらは室内培養の成績と類似していた。

通常網では、「MS(426)」、「融合(504)」及び「ユノウラ(292)」のうち、「ユノウラ(292)」の成長がもっとも良く、また、多層化個体の割合は系統間の差はなかった。基部長は通常網では全ての系統において発達が充分であり、成長と比例していた。2次芽の放出は「MS(426)」が早く、量も多かった。「融合(504)」は量が多く、「ユノウラ(292)」はやや少なかった。

12月8日に張り込んだ冷蔵網の摘採毎の収量を図2に示す。初回摘採では「MS(426)」が最も収量が多かったが、2回以降は「融合(504)」が多かった。「MS(426)」は育苗初期から多くの2次芽を出し、初回は収量が多いが、病害に弱いため、収量が少なくなっていったと考えられる。それに対し「融合(504)」は成長も良く、また、病害に強かったことから、収量が最も多かったと考えられる。なお、「ユノウラ(292)」も成長が良く、病害に強かったが、2次芽の放出量が「融合(504)」より少なかったため、「融合(504)」より収量が少なかったと推察される。

る。

クロロフィル含有量は、養殖初期において「ユノウラ(292)」が最も含有量が多かったが、摘採が進むにつれ他系統よりその含有量が少なくなっていった。

また、葉厚は養殖期間を通して「MS(426)」の葉体が最も薄く、なおかつ、柔らかかった。

遊離アミノ酸含有量等その他の項目については、系統間の差は認められなかった。

野外養殖試験では各系統について以下のことが確認された。「MS(426)」は2次芽の放出が早く、多い。また、養殖期間を通して葉体が薄く、柔らかい。「融合(504)」は育苗期において比較的高温耐性があり、多収性にも優れている。また、「ユノウラ(292)」は育苗期及び養殖期を通して成長が良いが、生産後期に色落ちしやすい。

3 選抜育種試験

選抜株の各組合わせから12種の糸状体が得られた。次年度、今回作出した貝殻糸状体から葉体を培養し、交雑個体から優良部位を選抜する予定である。

表1 主な系統の特性評価試験結果

品種名	系統番号	常温			アカサレ 病耐性	高温		
		成長	奇形率(2w)	成熟		成長	多層化	基部長
MS	426	やや良	11.1	早	並	やや劣	多	やや強
ユノウラ	292	劣	17.2	やや早	やや弱	並	やや多	並
融合	504	やや劣	47.7	遅	やや弱	やや劣	やや少	弱
融合	508	並	4.1	並	やや弱	やや良	やや少	やや強
小豆島	69	並	13.0	遅	やや強	やや良	並	並
小豆島	418	劣	10.0	遅	並	やや良	やや少	並
兵庫選抜	518	良	21.7	やや早	強	やや劣	並	並
シゲカズ	496	やや良	6.3	遅	やや弱	並	多	強
佐賀5号	498	並	45.9	早	強	並	多	やや強
ハガクレ	510	良	40.7	早	並	並	並	弱
ハガクレ2	526	並	3.7	早	並	やや良	やや少	強

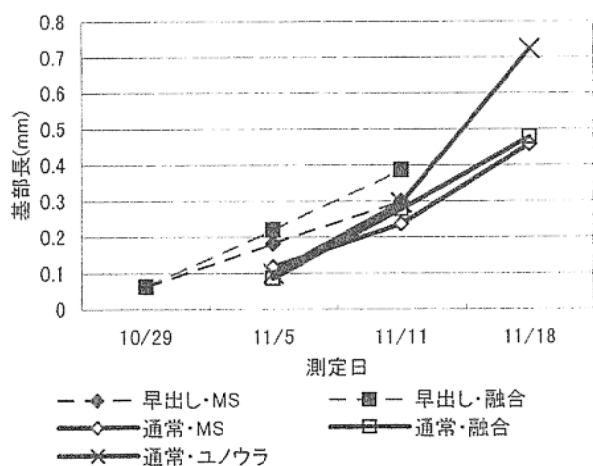


図1 育苗期における基部長

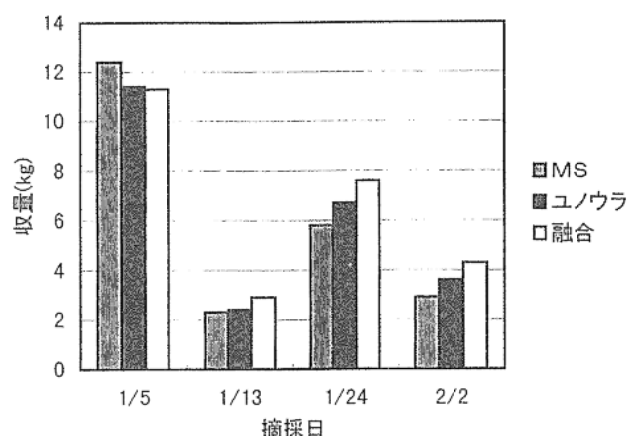


図2 冷蔵網 摘採毎の収量

(2) 海産生物病害対策試験

病害発生状況調査

阿知波英明・岩崎貞郎・黒田伸郎

高須雄二・松村貴晴

キーワード；アサリ，パーキンサス，寄生虫，感染症

目 的

近年，海面漁業の主要な海産生物に様々な病傷害が発生し，増殖等に大きな損害を与えていると考えられるため，その状況を把握し，予防・防疫などを進める必要が求められている。

本県で最も重要な漁獲対象物の1つであるアサリにおいても，カキ等の貝類に重大な被害をもたらす原生動物寄生虫 *Perkinsus*（以下パーキンサスとする）に感染していることが示された。^{1,2} そこで，県内漁場においてアサリの感染状況を調査した。

材料及び方法

三河湾及び伊勢湾の主要アサリ漁場において，9月と2月に，また中国から輸入され漁場に移植される前のアサリについて，チオグリコレート培地による培養法（RFTM法）で検査した。

RFTM培地（表1）が10ml入った試験管をオートクレーブして保存しておき，検査直前にペニシリンGカリウム及び硫酸ストレプトマイシンが培地1ml当たりそれぞれ500単位，500 μ gになるよう添加した。約5mm四方の大きさに切り取ったアサリの外とう膜と鰓，又は鰓のみを培地に入れ，20℃で5～6日間暗所で培養した原虫をルゴール液で染色し，検鏡した。なお，検査は各地区とも各20～30サンプルずつ行った。

表1 RFTMの組成

FLUID THIOGLYCOLATE MEDIUM	29.8 g
NaCl	20.0 g
DW	1,000ml

結果及び考察

三河湾で採取されたアサリはパーキンサス感染率が高く，伊勢湾側（小鈴谷及び鬼崎地区）では感染が認められなかった（表2）。また，感染率は同じ漁場でも調査時期により違いが見られた一方で，調査時期の違いによる感染率の差は見られなかった。浜口ら² による平成10

年度の調査結果では，本県の原虫保有率は20～30%であったとしており，今回の結果からそれより高い地区がいくつか見られた。さらに，中国から輸入されたアサリは，九州で蓄養中（期間は不明）に感染が拡大した可能性があるものの，検査した全てのアサリから原虫が見つかり（表2），浜口ら² の中国，韓国からの輸入アサリの感染率は80%以上という結果と一致した。

一方，パーキンサス感染のアサリへの影響をみるため，肥満度を比較した（表2）が，感染個体と非感染個体に差は認められなかった。

以上，三河湾にパーキンサス原虫が広く分布することが示されたが，この原虫のアサリに対する成熟や生理に及ぼす影響が検討されていないことから，今後もモニタリング調査を継続する必要がある。

表2 アサリへのパーキンサス原虫の感染状況

調査アサリの採集				感染率	肥 満 度	
年月日	地 区	方 法		(%)	感 染	非感染
平成11年						
9. 7	渥 美	手掘り		16	15.4	17.6
〃	衣 崎	腰マンガ		60	14.2	14.8
9.14	鬼 崎	桁 網		0	—	17.1
9.17	美浜町	〃		25	16.2	16.7
平成12年						
2. 6*	—	—		100	18.1	—
2. 7	渥 美	手掘り		60	20.5	18.3
2. 8	田 原	腰マンガ		55	21.2	23.2
2.22	小鈴谷	桁 網		0	—	9.6
2.23	美浜町	〃		5	11.0	10.7

*:中国から輸入され九州で蓄養された後愛知県へ運ばれた

参考文献

- 1) 鈴木伸洋・浜口昌巳・薄浩則・石岡宏子（1998）アサリにおける *Perkinsus* 感染症の病理組織学的検討，平成10年度日本魚病学会春季大会講演要旨，p.14.
- 2) 浜口昌巳・鈴木伸洋・薄浩則・石岡宏子（1998）我が国におけるアサリの *Perkinsus* 感染症，平成10年度日本魚病学会春季大会講演要旨，p.14.

ウイルス病診断技術開発試験

PAV検査におけるPCR診断に関する手法などの研究

松村貴晴・黒田伸郎・阿知波英明

キーワード；クルマエビ，PAV，DNA抽出，PCR

目 的

平成5年，西日本の養殖施設で発生したクルマエビ急性ウイルス血症 (PAV) は，瞬く間に各地に広まり，クルマエビ養殖業，栽培漁業事業に大きな被害を与えている。¹⁾ このPAVの原因ウイルスはPRDVと名付けられ，²⁾ その感染の診断はPCR法によるPRDVの検出により行われている。

このPCR検査法は，検体中に約100個程度のウイルスが有れば検出が可能だと報告されているが，³⁾ 実際の生産現場では高い検査感度はもちろんであるが，確実にPRDVが検出される技術が求められ，また，多検体処理のためにはより簡便な方法であることが望まれる。そこで本研究室では，高感度，高検出率かつ簡便で短時間に行える検査法の確立を目指し，PCR検査法の改良を行ってきた。

昨年度までに，DNA抽出法の検討として，ISOGENを用いたフェノール抽出法とQIAamp Blood Kitを用いたスピナラム法の比較試験を行い，血リンパから抽出した場合，スピナラム法で高い感度，検出率が得られることを示した。今年度は，稚エビから抽出した場合の，両法による検出率の比較を行った。

また最近，いくつかの研究機関から，時間短縮をはかった増幅プログラムが発表されており，^{4, 5)} これらの有効性を検証するために，感度を比較検討した。

材料及び方法

稚エビ検出率比較試験

試験には，A-F 6カ所の中間育成場の水槽から採集した飼育中の稚エビを用いた。採集した稚エビは，20L水槽中で12時間以上餌止め飼育した後回収し，海水でよく洗ってから-20℃で保存した。解凍後，頭胸部を採取し，1.5mlチューブにブールした。1ロットの尾数は表2に記した。中間育成水槽毎に10ロット (Dは8ロット) ずつ試料を作成し，半分をISOGEN (ニッポンジーン社) で，残り半分をQIAamp Blood Kit (QIAGEN社) でDNAを抽出した (以降前者をISOGEN法，後者をカラム法と呼ぶ)。抽

出法は「PAVのPCR検査」⁵⁾ に従った。抽出DNAは福岡県方式 (後述) で増幅し，電気泳動で増幅結果を判定した。増幅プログラム比較試験

PRDV特異的配列の増幅は「PCRによるPRDV (RV-PJ) の検出法」⁶⁾ に準じて行った。増幅装置はGene Amp PCR System9600 (Perkin Elmer社) を使用し，反応液量は25μlとした。比較に用いた増幅プログラムを表1に記載した。これらのプログラムを，それぞれ開発した研究機関の名前から養殖研方式，日裁協方式，福岡県方式，愛知県方式と呼ぶことにした。増幅酵素は，養殖研方式，日裁協方式ではTaKaRa Ex Taq (宝酒造社)，福岡県方式，愛知県方式ではAmpliTag Gold (Perkin Elmer社) を使用した。血リンパから抽出したDNA溶液 (PRDV陽性を確認済み) をTris-EDTA buffer (TE) で希釈して10倍希釈系列を作成し，各希釈段階で5検体ずつそれぞれの方式で増幅させ，電気泳動で増幅産物を確認した。

表1 増幅プログラム一覧

開発研究機関	養殖研		日裁協		福岡県		愛知県	
	TaKaRa	Taq	TaKaRa	Ex Taq	AmpliTag	Gold	AmpliTag	Gold
増幅酵素	P1,P2,P3,P4		P1,P2,P3,P4		P3,P4		P3,P4	
プライマー								
Nested PCR*	○		○		-		-	
シヤトルPCR*	-		○		-		○	
熱変性	93℃ 5min		95℃ 5min		95℃ 10min		95℃ 10min	
サイクル	93℃ 60sec		95℃ 30sec		94℃ 30sec		95℃ 30sec	
熱変性	57℃ 90sec		57℃ 30sec		57℃ 60sec		57℃ 30sec	
アニーリング	72℃ 60sec				72℃ 60sec			
伸長	72℃ 5min		72℃ 5min		72℃ 5min		72℃ 5min	
サイクル数**	30×2		30×2		45		60	

*Nested PCR およびシヤトル PCR を採用した場合は○、採用しなかった場合は-を表記した。

**サイクル数の×2はNested PCRを行ったことを表す。

結果及び考察

稚エビ検出率比較試験

中間育成中の稚エビを用いた場合のISOGEN法とカラム法の検出率比較試験の結果を表2に示した。カラム法が62%に対し，ISOGEN法は0%で，カラム法が高い検出率を示した。しかし，9年度に行った，へい死した稚エビを用いた感度比較試験においては，感度はほぼ同等であった。⁷⁾ ISOGEN法では，稚エビから抽出したDNA溶液に，PCRを阻害する物質が混入していることが報告さ

れている。⁸⁾ 両方法による抽出液の紫外線260nmおよび280nmの吸光度を測定しその比を求めた (OD260/280) とところ、ISOGEN法では1.34, カラム法では1.75であった。OD260/280値は1.8付近が最もDNA純度が高いとされていることから、今回の抽出液でもカラム法に比べISOGEN法には不純物の混入が多いことが確認された。へい死稚エビでは両法の感度に差がなかったことから、今回用いた稚エビのようにウイルス量が少ない試料では、ISOGEN法の抽出液に含まれる不純物によるPCR阻害作用が強く表れることを示していると考えられた。抽出にかかった時間については、稚エビ頭胸部を採取し終えた段階から抽出完了までの時間を計測した。ISOGEN法が3時間30分に対し、カラム法が2時間15分で、カラム法が1時間15分短かった。

以上から、稚エビからDNAを抽出する場合においても、血リンパと同様、カラム法が有効である、と考えられた。

表2 ISOGEN法とカラム法の検出率比較試験 (稚エビ)

池	ロット数	尾数/ロット	ISOGEN法	カラム法
A	10	30	0/5*	5/5
B	10	20	0/5	5/5
C	10	10	0/5	5/5
D	8	30	0/4	2/4
E	10	30	0/5	1/5
F	10	30	0/5	0/5
計			0/29 0%	18/29 62%

* 分数は PRDV 陽性検体数/全検体数を表す。

増幅プログラム比較試験

増幅プログラムによる感度比較試験の結果を図1に示した。いずれもほぼ同等の感度を示した。増幅にかかる時間については、養殖研方式の5.2時間に対し、日裁協方式が2.6時間、福岡県方式が3時間、愛知県方式が2.4時間でいずれも約半分の時間で増幅を行うことができた。

今回用いた改良プログラムは以下の特徴がある。日裁協方式は、シャトルPCR法を採用することで、増幅サイクル中の伸長反応の時間を省略し、時間短縮が可能になった。福岡県方式は、増幅酵素に熱耐性の高いAmpli Taq Goldを採用することで、サイクル数を増加させ、Nested PCRの省略を可能にした。これにより、時間の短縮と手間の省略、試薬代の半減が可能になった。愛知県方式は両方式を取り入れたため、時間の短縮と手間の省略、試薬代の半減が可能であった。従って、今回の試験結果からは愛知県方式が最良であると考えられる。しかし、異なるメーカーのプライマーや増幅装置を用いた場合に、感度に相違が見られた例も報告されている。増幅装置とプライマーの関係によっては、最大の感度を与える方式が異なる可能性がある。従って、新たなプログラムの導

入にあたってはそれぞれの検査施設において事前に十分に感度の検討を行うべきである。

なお、本試験は(社)日本水産資源保護協会委託研究により実施し、その詳細については「平成11年度魚病対策技術開発研究成果報告書」に記載した。

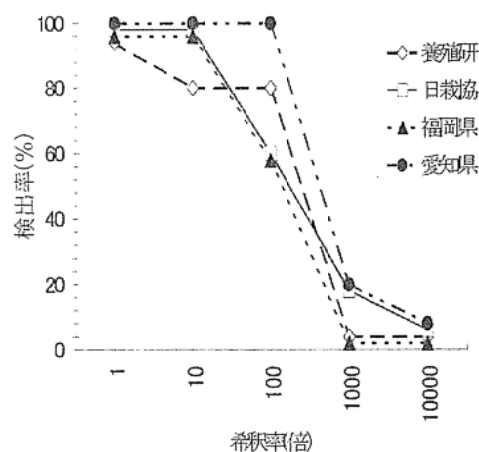


図1 増幅プログラム感度比較試験

検出率は各希釈段階での (PRDV 陽性検体数 / 全検体数 × 100)

参考文献

- 1) 中野平二・川邊 博・梅沢 敏・桃山和夫・平岡三登里・井上 潔・大迫典久 (1994) 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死：発生状況および感染実験。魚病研究, 29 (2), 135-139.
- 2) Inoue, K., K.Yamano, N.Ikeda, T.Kimura, K.Momoyama, H.Nakano, J.Kobayashi and S.Miyajima (1996) The Penaeid Rod-shaped Nuclear Virus (PRDV) which Causes Penaeid Acute Viremia (PAV). Fish Pathol. 31 (1), 39-45.
- 3) 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 (2), 93-98
- 4) 水産庁養殖研究所病理部 (1998) PAVのPCR検査
- 5) 日本栽培漁業協会上浦事業所 (1998) PAV連絡協議会資料
- 6) 水産庁養殖研究所病理部・熊本県水産研究センター (1996) PCRによるPRDV (RV-PJ) の検出法
- 7) 岡本俊治・三宅佳亮・松村貴晴 (1998) PAV検査におけるPCR診断に関する手法等の改良。平成9年度愛知水試業務報告, 52-53.
- 8) 野中里左・Claudia Venegas・西澤豊彦・室賀清邦 (1998) PRDV検出用のPCRの核酸抽出法。魚病研究, 33 (3), 115-121.

スミノリ症発生機構解明試験

伏屋 満・盛田 信・植村 宗彦・二ノ方圭介

キーワード；海藻類，ノリ，スミノリ症，原形質吐出，残留塩素，クロラミン

目 的

平成3年度以降，知多半島常滑地区等でしばしばスミノリ症が発生した。原因として細菌性及び生理障害性の両面が疑われるものの，¹⁾その発生機構が十分解明されていないため，有効な対策が取られていない。このため，平成11年12月から12年1月に，常滑市の鬼崎・大野両漁業協同組合の協力により，両漁業協同組合のノリ養殖漁場で調査を実施するとともに，冬～春期にかけて室内でスミノリ症の発症試験を行った。

材料及び方法

1 漁場調査

鬼崎漁業協同組合浮流し漁場の2カ所（図1）で，平成11年12月23ないし24日に張り込まれた冷蔵網を調査網として，12月25日から翌年1月22日まで，ノリ葉体の原形質吐出率等とその地点の残留塩素等の水質を1～2日間隔で調査した。また，24日以降支柱柵の秋芽網を含め大野，鬼崎の漁場全域でスミノリ症が発生したため，適宜他地点の養殖網や水質の調査を行った。なお，原形質吐出率は，淡水10分浸漬後の葉先の原形質吐出細胞率（％）とし，残留塩素は，ろ過後DPD法による発色を，クロラミン水溶液（塩化アンモニウムと次亜塩素酸ナトリウ

ム水溶液を，窒素5gに対して有効塩素1gの割合で混和し，数時間以上放置）の海水希釈液で得た検量線に当てはめて求めた。これらの測定は現地漁業協同組合で実施した。

また，大野・鬼崎両漁業協同組合の養殖者19名に対して，冷蔵網初摘採の状況についてアンケート調査を実施した。

2 室内試験

(1) 残留塩素影響試験

ノリ葉体に及ぼす残留塩素の影響を見るため，漁業生産研究所地先で育苗した冷蔵網を予め2日間培養した後，遊離型及び結合型の残留塩素に濃度（2.5～80 $\mu\text{gCl}/\text{l}$ ）と時間（6～96時間）を変えて浸漬し，成長や吐出率等を調べた。浸漬方法は残留塩素原液を定量ポンプで添加する流水培養とした。海水は漁業生産研究所地先から採水後砂ろ過し，毎分33lを，断面が台形の白色雨樋に流した（流速21cm/s）。また栄養塩として $\text{NH}_4\text{-N}$ を100 $\mu\text{g}/\text{l}$ ， $\text{PO}_4\text{-P}$ を10 $\mu\text{g}/\text{l}$ となるように定量ポンプで添加した。残留塩素原液は有効濃度を5～20mg/lとし，塩素が遊離型の場合は次亜塩素酸ナトリウムを海水で希釈し，結合型の場合はクロラミン水溶液を海水で10倍に希釈して数時間以上放置した。原液の残留塩素濃度は徐々に低下するため，毎日1～2回ヨウ素滴定で濃度を求め，その都度流水路が設定濃度になるよう添加量を調整したため，浸漬濃度は設定の78～100%を保った。また，水中に固定した供試網の直上から毎日12時間白色蛍光灯を当てた。試験期間中の水温は8.5～18.9℃，塩分は30.7～32.7だった。

次に，種苗による差を見るため，漁業生産研究所地先や鬼崎漁場で育苗した5種類の冷蔵網をクロラミン添加海水5 $\mu\text{gCl}/\text{l}$ で48時間流水培養し（以下「クロラミン処理」という），吐出率を比較した。

(2) スミノリ症関係細菌の分離と影響試験

① スミノリ症関係細菌の分離

12月27日に採取した大野・鬼崎漁場のスミノリ症葉体からプラスチック内でスミノリ症が感染したので，これらの葉体を細断し，ZoBell 2216E 平板培地に塗抹・培養して細菌を分離した。この中から一部の細菌コロニーを

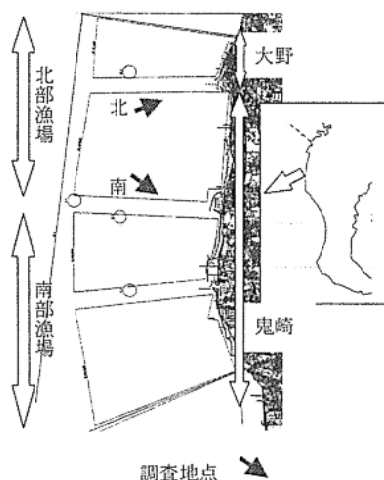


図1 調査漁場図

200mlの滅菌培養海水に入れ、クロラミン処理葉体を数枚入れて10℃で振とう、または12℃で通気培養し、その後の吐出状態からスミノリ症に関係する菌を選抜した。

② 出庫後日数、クロラミン処理後日数の感染への影響

スミノリ関係菌の感染に対して、冷凍保存やクロラミン処理のストレスがどれだけ影響し、どれだけの期間影響力が残るのかを見るため、冷蔵網の出庫後、クロラミン処理をするまでの流水培養日数を0、1、6日間、またクロラミン処理後から感染試験をするまでの流水培養日数を0～9日間に変えた3×4=12組合せで、フラスコ培養における感染後の吐出率等の違いを比較した。

(3) 葉体付着細菌数の推移

残留塩素がノリ葉体の付着細菌に及ぼす影響を見るため、冷蔵網をクロラミン処理後酸処理し、引き続き流水培養した葉体の付着細菌数について、処理開始時から2日毎に計数した。

結 果

1 漁場調査

年末の調査地点の残留塩素濃度は27日と30～31日に5 $\mu\text{gCl/l}$ 以上となり、1月以降は全く検出されなかった(図2)。また、漁場内のその他地点では27日に最高8 $\mu\text{gCl/l}$ あったのが28日には日中の4回の測定でいずれも検出できず、31日には広範囲で検出され、漁場北西端では最高値28 $\mu\text{gCl/l}$ だった。この海水を0.45 μm 目合いでろ過し、定量ポンプで換水しながら培養種網を通気培養したところ、酸化力は翌日消失したにもかかわらず、ノリ細胞は丸く細胞間隙が拡大し、枯死細胞が発生

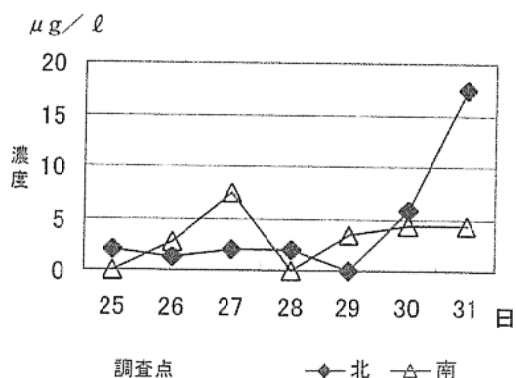


図2 調査点の残留塩素

した。なお、調査期間中その他の水質調査項目には、ノリ養殖に支障がある値はなかった(表2)。

2カ所の調査網については、12月24日張り込みの南の網は調査期間中ずっと吐出が低く、23日張り込みの北の網は1月中旬に吐出率が高まった(図3)。付着細菌数は南張り込みの種網で 5.8×10^7 個/g乾重で、赤～褐色が多かったが、養殖における酸処理とともに両調査網とも菌数は低下し、白色の菌が主体となった。

表2 調査期間中の水質

項目	範囲
期間	H11.12.25～H12.1.22
水温	9.7～13.6℃
塩分	29.8～32.8
pH	8.1～8.3
NH ₄ -N	56～297 $\mu\text{g/l}$
NO ₃ -N	45～126 $\mu\text{g/l}$
NO ₂ -N	6～33 $\mu\text{g/l}$
PO ₄ -P	13～39 $\mu\text{g/l}$

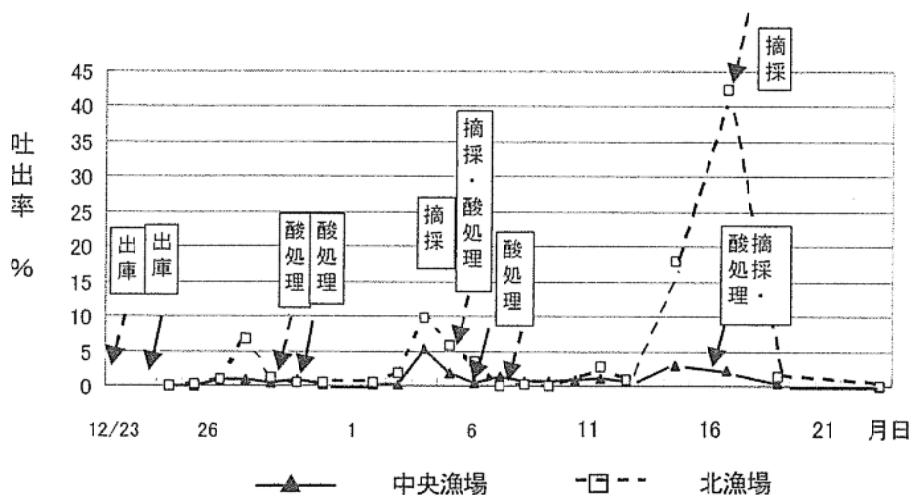


図3 調査網の原形質吐出率の推移

一方、27日のノリ葉体調査では、細胞は丸みを帯び、巨細胞や枯死細胞が見られた。吐出率が50%以上のサンプルも多く、この時漁場で生産された乾のりにはスミノリが多発していた。付着細菌数は $2.0 \times 10^5 \sim 4.2 \times 10^7$ 個/g乾重で、吐出率の高い方が菌数が少なく、黄色菌の比率が高かった。23日以降出庫された多くの冷蔵網は1月に入ってから初～2回摘みの中旬までスミノリ症が続いたが、年明け後張り込んだ網ではスミノリ症は発生しなかった。年明け後の葉体付着細菌数は、網の出庫時期・原形質吐出状況にかかわらず、いずれも $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 個/g乾重台で、全て白色の菌が主体であった。

アンケート調査では、84ケース中51ケースでスミノリ程度が「中」以上とひどく、スミノリがないのは15ケースであった。張り込みの日ごとに整理すると、23、26、27日でスミノリが多く、張り込み場所では25日までは北部漁場、26日以降は全域で多発していた（図4）。

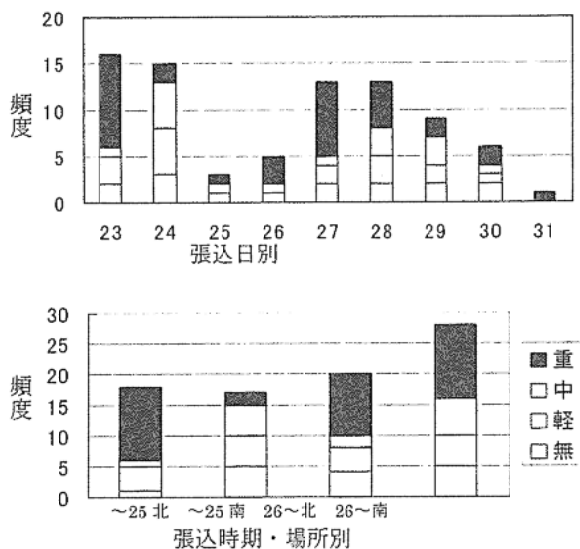


図4 冷蔵網初摘採のスミノリ程度

2 室内試験

(1) 残留塩素添加培養

冷凍種網を2日間培養後、遊離残留塩素として次亜塩素酸ナトリウムを5, 20, 80 $\mu\text{gCl/l}$ 浸漬した場合、80 $\mu\text{gCl/l}$ の48時間以上浸漬区でだけ死細胞が現われ、原形質吐出は全区で少なかった。一方、残留塩素がクロラミンの場合、2.5 $\mu\text{gCl/l}$ では異常が認められなかったが、5 $\mu\text{gCl/l}$ では72時間、20 $\mu\text{gCl/l}$ では24時間以上で吐出率が高まり、死細胞も出現した。しかし、浸漬を解除すると吐出率は急速に低下し、浸漬を継続した場合でも、吐出率は低下した。5 $\mu\text{gCl/l}$ 以上

の浸漬で認められた他の現象としては、①成長劣化、②細胞の変化（丸化、間隙大化、サイズの不均一化）、③形態の変化（縁辺部の巻きこみ、フカ状、細胞多層化）、④付着珪藻の増加、があった。また20 $\mu\text{gCl/l}$ 以上では枯死に至った（図5）。

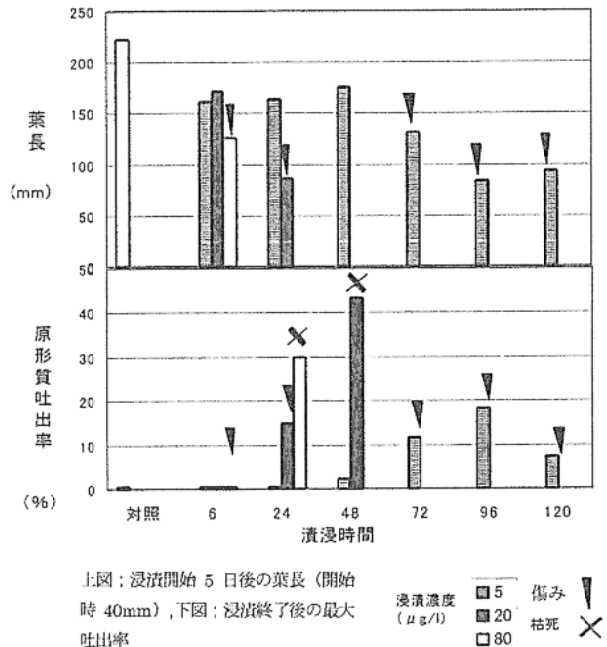


図5 ノリの成長と原形質吐出へのクロラミンの影響

次に各種種苗の冷凍種網を出庫時からクロラミン処理した場合、48時間後には吐出率が高まったが、常滑地区で多用されるT社種苗1が最も高く、スミノリになりにくいとされるT社種苗2が最低で、水産試験場の3系統はその中間と、原形質吐出の程度は種苗により異なった（図6）。

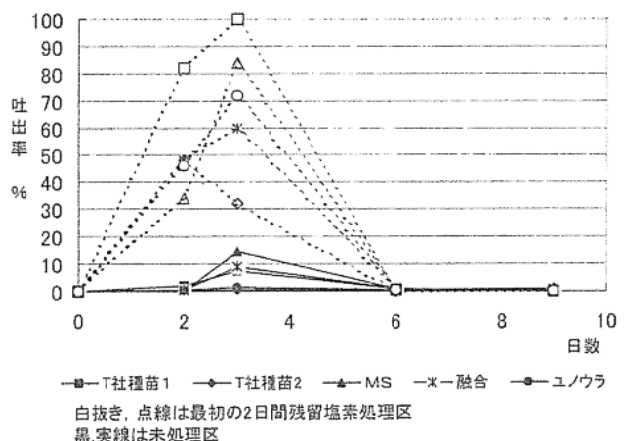


図6 種苗の種類と原形質吐出率

(2) スミノリ症関係細菌の分離と影響試験

① スミノリ症関係細菌の分離

供試したスミノリ葉体は、付着細菌数が秋芽で 2.0×10^5 個/g乾重、冷蔵網で 3.8×10^5 個/g乾重で、黄色い菌がそれぞれ64, 86%を占めた。秋芽網から12株、冷蔵網から10株の細菌コロニーを選んで感染試験を行った結果、それぞれ黄色の1株ずつでは高い吐出率が維持され、しろうされ症様の細胞枯死も認められたため、スミノリ症関係菌として継代、保存した。

② 出庫後日数、クロラミン処理後日数の感染への影響

冷凍出庫後、クロラミン処理及び細菌感染までの間隔が短いほど吐出率は早く再上昇し、葉体も脆く傷んだ。逆にどちらの間隔も長いと、感染後も葉体は健全性を保ち、吐出率の上昇も低かった(図7)。

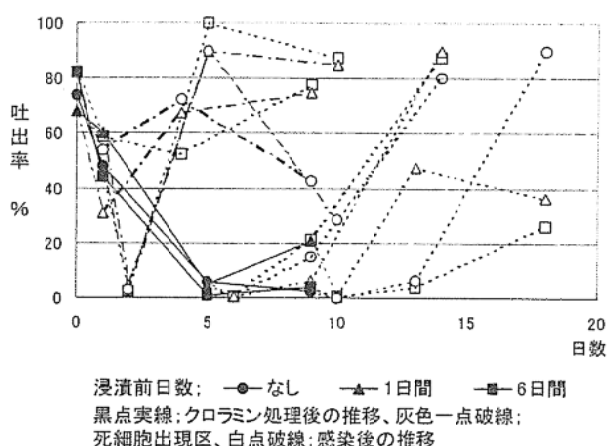


図7 クロラミン処理前及び感染前の培養日数と吐出率

(3) 葉体付着細菌数の推移

クロラミン処理区では、処理中、処理後とも付着細菌数の増加が認められたが、対照区の菌数は安定していた。菌の色別組成は両区で大差はなく、どちらも酸処理により一時的に白い菌が増えたが、その後元の赤色系の優占に戻った(図8)。

考 察

クロラミンは低濃度で養殖ノリの枯死や成長に悪影響を及ぼすとされているが、²⁾ 今回高濃度の残留塩素を流水に連続添加する方法で低濃度を維持し、 $4 \sim 5 \mu\text{gCl/l}$ の48時間浸漬で、養殖ノリ細胞の枯死以外に原形質吐出率の増加等が確認できた。この吐出はしばらくすると元に戻る一過性のものであるが、スミノリ症葉体から分離した特定細菌の感染が重なると吐出が継続し、常滑漁場で発生するスミノリ症と類似した症状が起こった。

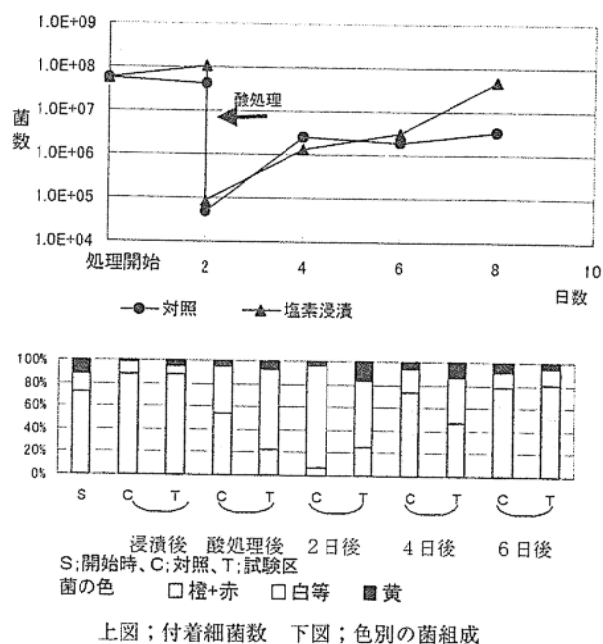


図8 クロラミン処理と付着細菌の変化

一方漁場海水からは残留塩素が検出された。漁場の海水では妨害物質の影響は考えにくく、また海況的に異常がないのに年末だけ検出されたことから、亜硝酸等の海域に元々ある物質ではなく、この時期に陸域から負荷されたものと推定される。この残留塩素の種類としては、遊離型では海水に入るとDPD法での発色が悪く、ノリへの影響も低いことから、淡水中でアンモニアと結合してクロラミンとなった後排出されたものと考えられる。またその発生源は、常滑地区のノリ漁場の海水の流れが潮時・潮候にかかわらず、南向きが卓越しているのに加え、西～北寄りの風が継続した時にこの物質が検出され、東寄りになるとなくなったことから、漁場の6 km真北に位置する名古屋港高潮防波堤口から岸沿いに南下するものと考えられる。また、スミノリ症の発生時期とアンケート調査から見ると、酸化物質の排出された期間は12月20日頃から年末までで、漁場に到達したのは24日以前が常滑北部漁場、26日～31日では28日を除いて全域に広がったと考えられる。

漁場でスミノリ症を起こすのに十分な残留塩素が検出され、その海水を用いた培養試験でノリの細胞異常が認められたことや、クロラミンを添加した培養試験で、濃度、時間、種苗の種類、出庫の時期等による吐出率の差異が、漁場での調査結果とよく一致していることから、クロラミンを起源とする酸化性物質がスミノリ症の第1の発生原因であると推定できる。

次に細菌については、特定の細菌が、クロラミンで発症したスミノリ症を持続させる影響が見られたが、感染がノリ葉体の出庫やクロラミン浸漬後間もない時には、

細胞枯死等の強い障害が現われる一方、日数が経過すれば吐出率の上昇も緩やかで細菌の影響は低下した。養殖漁場でも、残留塩素の検出された12月23～31日に出庫された網で持続型のスミノリ症が発生したのに対し、20日以前の出庫網ではやや発症期間が短く、更に年明け後の出庫網ではスミノリ症は起こらず製品がやや光沢を失うクモリノリで済んだ。これらのことから、最初クロラミン起源の酸化性物質により発生したスミノリ症は、特定の細菌が増加した場合に持続型になるが、そうでなければ軽度に推移したり自然に回復し、また細菌の感染だけではスミノリ症にはなりにくいと考えられる。

更に、過去スミノリ症の発生以後、糸状細菌付着症や付着珪藻の増殖で起こるとたぐされ症等の病害が発生した事例があり、当年度も常滑市の南に位置する支柱欄漁場で、年内出庫した冷蔵網を中心に1月以降橙胞病の被害が発生した。今回クロラミンにより付着細菌の増加が

確認されたことから、今後他の病害研究においても、クロラミンの影響を考慮する必要がある。

スミノリ症の対策としては、①抵抗性種苗の使用、②危険期の冷蔵網出庫の回避、③育苗中の酸処理、④一斉撤去、⑤酸化性物質の流入抑制または中和、等が考えられる。また、前提として、残留塩素等のモニタリングが必要である。

参考文献

- 1) 川村 嘉応 (1992) スミノリ症、のり病症名の統一について。水産庁, 27-37
- 2) Maruyama, T., Ochiai, K., Miura, A. and Yoshida, T. (1988) Effects of chloramine on the growth of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 (10), 1829-1834.

あかぐされ病モニタリング技術開発試験

二ノ方圭介・伏屋 満・植村宗彦・盛田 信

キーワード；ノリ養殖，あかぐされ病，モノクローナル抗体，遊走子，予察技術

目 的

あかぐされ病は卵菌門ツユカビ目の一種がノリ葉体に寄生することにより発生し、養殖現場における対策としてあかぐされ病発生漁場からのノリ網一斉撤去、酸処理などにより対処がなされているが、あかぐされ病の感染速度が速いため手遅れになる場合が多い。また、漁場における病原菌の有無が確認できないことから、初期感染、再感染などの危険性を予知することが困難とされる。このため、Amano *et al.* によりあかぐされ病原菌の遊走子を特異的に認識するモノクローナル抗体が作成されたことから、この技術を利用し、漁場での病原菌検出方法を検討した。さらに、効果的な感染防除対策を講じるため、病害の発生や拡大を予察する技術の開発を試みた。

今年度は、室内試験で病斑拡大に関与する要因のうち、水温と塩分の影響をみた。また、昨年度に引き続き、漁場を模擬的に設定した大型水槽内で諸要因が感染に及ぼす影響について検討した。漁場調査では昨年度より広範囲の漁場で、あかぐされ病の動向と環境要因の推移との関連をみた。

さらに、これまでの試験から得られた感染と各要因の関係式について漁場データを当てはめて、その妥当性を検証した。

材料及び方法

(1) 病斑拡大に及ぼす水温・塩分の影響

水温は5, 9, 13, 17℃の4水準、塩分は15, 22.5, 30の3水準の4×3=12試験区を設定した。各水温・塩分に設定した100mlの通気フラスコに罹病葉体を入れて、経過時間ごとの病斑径を測定した。

(2) 大型水槽での感染試験による感染に及ぼす遊走子数、水温、塩分、芽付き数及び干出の影響

屋外にある大型水槽に罹病網を張り込み、遊走子を放出させた。次にポンプで流れを作り、流速の異なる場所に健全なノリ網一節を設置し、4時間後の病斑数を求めた。また、干出を与える試験区では、最高4時間の干出を与えた後、病斑数を測定した。試験時の水温、塩分、遊走子数、干出終了後の葉体の乾燥率を測定し、流速、芽付き数と併せて感染への影響を検討した。

(3) 漁場海水中の遊走子数や葉体罹病度と環境変化との関連の検討

昨年度に引き続き、伊勢湾及び三河湾漁場で調査を行い、漁期を通じて海水中の遊走子数の変化と、あかぐされ病発生時の環境や罹病度との関係を検討した。

(4) 昨年度と今年度の漁場調査データを重回帰式に当てはめ、調査時の環境下での病斑数と罹病グレイドを推定した。

結果及び考察

(1) 今回の試験範囲では、高水温で低塩分のときに病斑の拡大が速いことが認められたが、低水温では、塩分の影響は小さかった。

(2) 無干出条件では、海水中の遊走子数、水温、流速を把握することでおおよその病斑数が推定できると考えられた。また、干出条件では、無干出条件で認められた3要因に葉体の乾燥率を加えた4要因で病斑数を推定できると考えられた。

(3) どの漁場でも昨年度と同様にあかぐされ病の発生は例年に比べて約1ヶ月遅く、発生規模も小さく推移した。また、遊走子数は、0~17個/ℓであった。これは病害発生時（H9吉田漁場）に比べ低いレベルであった。

(4) 昨年度、今年度とも、重回帰式による病斑の推定値は少く、これは、発生が小規模であった両年度の状況と矛盾しない結果と考えられた。

なお、この試験は水産庁補助事業により実施し、その詳細は、「平成11年度バイオテク利用養殖システム高度化事業報告書」に記載した。

参考文献

- 1) Amano H., K. Sakaguchi, M. Maegawa and H. Noda (1996) The Use of a Monoclonal Antibody for the Detection of Fungal Parasite, *Pythium* sp., the Causative Organism of Red Rot Disease, in Seawater from *Porphyra* Cultivation Farms. Fish. Sci., 62(4), 556-560.

(3) 海産種苗放流技術開発試験

トラフグ種苗生産試験

阿知波英明・高須雄二・盛田 信

黒田伸郎・松村貴晴・岩崎員郎

キーワード；トラフグ，人工採卵，HCG，SP

目 的

トラフグの種苗生産には産卵期に漁獲された成熟親魚を用いて行われてきたが，入手が困難であることなどの理由により養成した親魚を用いることが多くなり，それらから採卵させるためのホルモン処理の方法などが検討されてきた。

当水試においても，人工養成親魚を用い，卵巣内の卵径をホルモン処理の目安として，4時間ごとに腹部を圧迫し排卵の確認を行うことで，受精率の高い卵を得る技術を開発してきた。しかし，ホルモン処理後から排卵までに要する時間が親魚により依然ばらついており，今後事業規模で種苗生産を行うためには，短期間で良質な卵を得る必要がある。昨年度の結果¹⁾から，ホルモン処理後の飼育水温が排卵の集中に関係すると考え，水温の違いによる排卵の検討を行った。また，天然魚を養成した親魚からの採卵及び一度採卵に使用した雌魚からの再度の採卵について検討した。

材料及び方法

親魚には，天然当歳魚から養成した天然3，4才，当所で生産した種苗から養成した人工3才及び昨年度に採卵試験に使用した人工5才を用いた。なお，天然3，4才については12月から13℃程度に加温して養成した。

ホルモン処理予定の2日前に卵巣からカニューレにより卵を採取し，平均卵径が約900 μ m以上でなるべく大きな個体に，胎盤性生殖腺刺激ホルモン（以下「HCG」とする）単独及びHCGとシロサケ脳下垂体（以下「SP」とする）の両者の2通りのホルモンを投与した。

ホルモン処理後の飼育水温は，昨年度の結果¹⁾から16℃と18℃になるように設定した。ホルモン投与2～3日後から，4時間ごとに腹部を軽く押すことで排卵を確認し，確認されたものについて，腹部を強く圧迫し採卵した。ホルモンの投与方法，受精に用いた雄へのホルモンの投与方法，受精方法や受精率の測定などは昨年度と同じ方法¹⁾で行った。

結果及び考察

HCG単独投与では，12尾中5尾が120～188時間後に排卵したが，そのうち4尾の受精率は0%であった。HCGとSPの投与では12尾中10尾が96～136時間内に排卵し，5尾が70%以上の受精率であった。

一方，両試験から，ホルモン処理後の飼育水温が高くても，排卵までに要する時間が早くなり排卵期間が集中することはなかった（表）。昨年度と今年度の4月の排卵状況を見てみると，ホルモン処理の時期が遅れるほど，排卵までに要する時間が短くなり，排卵も集中する傾向が見られることから，排卵の集中は，水温でなく日照などによる卵成熟の進行に左右される可能性があると考えられた。

ところで，HCG単独投与の試験では，HCGとSPで処理した場合より平均卵径が大きかったにもかかわらず，排卵した親魚の割合が少なく，受精率が極端に悪かった。飼育水温の急変（13.3℃から17.5℃への移動）がもたらすストレスが，受精率低下などをもたらしたとも考えられるが，今回の2回目の試験においても同様の変動（14.0℃から18.4℃へ）があったものの，そのような現象は見られなかったことから，魚体自身や卵質などが原因と考えられた。

また，一度採卵に供した個体も次年度に採卵可能なこと，更には，天然魚から養成した親魚からも採卵が可能となり，遺伝子の多様性に考慮した採卵が今後可能となった。

本試験は水産庁補助事業により実施し，詳細については「平成11年度放流技術開発事業報告書愛知県」に記載した。

参考文献

1) 堀木清貴・高須雄二・松村貴晴・岡本俊治・黒田伸郎（1998）トラフグ親魚養成．平成10年度水産試験場業務報告，愛知県．8－9．

表 ホルモン処理による採卵試験

親魚 No.	由 来 *	体 重 ** (kg)	飼育水温 (℃)	排卵にまでに要した 時間(排卵日)	採卵量 (g)	卵 径 (μ m) **		受精率 (%)	ふ化率 (%)
						ホルモン投与時	採卵時		
4月10日にHCGを投与									
1	天然3+	1.750	15.9-16.6	136-140(4/16)	170	1,062	—	0	—
2	"	2.210	"	152-156(4/17)	275	1,048	—	0	—
3	"	1.585	"	— (—)	—	1,006	—	—	—
4	天然4+	2.640	"	160-164(4/17)	630	1,066	—	0	—
5	"	1.850	"	— (—)	—	1,023	—	—	—
6	"	1.965	"	— (—)	—	1,030	—	—	—
7	天然3-	1.960	17.5-18.9	182-188(4/18)	45	1,048	—	0	—
8	"	1.965	"	— (—)	—	1,034	—	—	—
9	"	1.455	"	— (—)	—	1,066	—	—	—
10	天然4+	2.190	"	116-120(4/15)	375	1,064	—	91.7	73
11	"	2.770	"	— (—)	—	1,033	—	—	—
12	"	1.910	"	— (—)	—	1,021	—	—	—
4月17日にHCGとSPを投与									
1	人工3+	1.560	15.5-16.4	100-104(4/21)	260	1,002	1,136	92	68
2	"	1.625	"	— (—)	—	912	—	—	—
3	天然3+	1.465	"	132-136(4/23)	315	1,024	1,213	31	6.5
4	天然4+	1.745	"	92-96(4/21)	45	989	1,192	73	67.5
5	"	1.710	"	124-128(4/22)	370	1,010	1,187	86	55.5
6	人工5+	1.855	"	100-104(4/21)	230	1,059	1,249	80	63
7	人工3+	1.525	17.9-18.4	92-96(4/21)	450	945	1,125	78	76
8	"	1.670	"	— (—)	—	937	—	—	—
9	天然3+	1.475	"	128-132(4/23)	120	1,020	1,135	0	—
10	天然4+	1.760	"	104-108(4/22)	255	1,031	1,194	59	44
11	"	1.925	"	128-132(4/23)	390	1,011	1,187	66	54
12	人工5+	2.760	"	120-124(4/22)	425	1,012	1,219	45	47.5

* : 人工とは当水試で生産し養成した親魚であり、天然とは購入した天然の当才魚から養成した親魚を示す。

** : 体重及びホルモン処理時の卵径は、それぞれ4月7日及び15日に測定した。

トラフグ種苗放流試験

高須雄二・阿知波英明・岩崎員郎
黒田伸郎・松村貴晴

キーワード；トラフグ，大型種苗，標識放流

目 的

これまで、アンカー式のスパゲティータグを用いて標識放流試験を行い、当歳魚の放流初期の移動や分布、更には再捕の状況の把握を行ってきた。しかし、標識放流魚の多くが年内に再捕されてしまうことやタグの脱落、埋没等により1歳魚以上の再捕が少ないため、年明け以降の生態などに不明な点が多く残っている。そこで、今年度は放流時期を例年より遅らせ大きく成長させた人工種苗に、従来使用しているスパゲティータグと比較して脱落や魚体の成長による埋没の少ないと言われる背骨型ピンでディスクタグを装着することで、長期的な再捕を目的とした標識放流を行った。

材料及び方法

当水試で生産、成長させたトラフグに、背骨型ピンに

ディスクタグを背鰭前部に装着して、放流した（表）。

放流場所は、過去の標識放流結果から推定された干潟域から深場への移動経路上とした。

再捕状況は、市場調査時の聞き取りや漁業者からの直接の報告によりとりまとめた。

結果及び考察

再捕率は3月末までの報告で、10月放流分で20%、12月放流分で16%であり、例年7～8月に行った小型魚の標識放流と比較し高い再捕率となっている。再捕場所は、12月までは伊勢湾湾央から三河湾、それ以降は伊勢湾湾口部や遠州灘であった。

なお、本試験は水産庁補助事業により実施し、詳細については「平成11年度放流技術開発事業報告書愛知県」に記載した。

表 体外型標識を装着した人工トラフグの放流と再捕状況

月 日	放 流 場 所	流		魚体の欠損率		再 捕 尾 数							再捕率 (%)
		尾 数 (尾)	平均全長 (mm)	尾	鰭 鼻孔隔皮 (%)	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計	
10/15	野間沖	293	175	48.9	45.1	41	9	5	0	3	0	58	19.8
12/17	豊浜沖	324	207	57.8	52.1			26	11	13	3	53	16.4

平成12年3月末報告分までを集計

(4) 海藻類バイオテクノロジー試験

あまのり類遺伝子判別技術開発試験

植村宗彦・伏屋 満・二ノ方圭介・盛田 信

キーワード；ノリ，DNA，PCR-RFLP法，ITS領域

目 的

養殖ノリは葉体の形態が単純で、環境によって変異が大きくなることから、系統間の差を形態で区別することが難しいとされる。このため、養殖現場では種苗の系統に混乱が生じており、養殖現場で求められる種苗の選定に苦慮している。また、細胞融合法を用いた種間交雑の系統では、融合に使用した親の系統との間で形質発現に差が認められたが不安定で、遺伝的な差も判明していない。こうしたことから、高等植物などで用いられているDNA多型（DNAレベルの変異）の検出手法を導入し、ノリにおける種や系統を判別する技術を開発する。

今年度については、ノリからのDNA抽出法の改良、及びノリのDNAのITS領域（非転写スペーサー領域、Internal Transcribed Spacer Region）におけるDNA多型の検出を検討し、種間、系統間での比較を行った。

材料及び方法

1 ノリからのDNA抽出法の検討

Doyle *et al.*¹⁾の方法を一部改変したCTAB（臭化セチルトリメチルアンモニウム）法によるノリ葉体からのDNA抽出について検討した。対照には、従来法である市販試薬のISOPLANT（ニッポンジーン社製：以下キット）を用いた。さらに、CTAB法にはフェノールによる精製処理が含まれているため、キットに同様のフェノール処理を追加した場合についても検討した。上記の方法でノリ葉体から抽出されたDNAを用いて、PCRによりITS領域を増幅し、その電気泳動像を比較した。

2 DNA多型の検出法の検討

DNA多型の検出法としてPCR-RFLP法を検討した。養殖スサビノリ3系統とマルバアマノリ1系統からDNAを抽出し、PCRによりITS領域を増幅した。これを、7種類の制限酵素（Msp I, Alu I, Rsa I, Sau3A I, Hind III, Hinf I, Dra I）を用いて切断し、電気泳動像により多型の検出が可能であるかを検討した。

3 作出系統・種間の遺伝的な差の検出

平成4年から7年にかけて養殖スサビノリとマルバアマノリについて細胞融合処理を実施し、再生した葉体の系

統（以下：作出系統）、及びその親種である養殖スサビノリ2系統とマルバアマノリ1系統を使用し、これらの葉体からDNAを抽出してPCR-RFLP法によりITS領域のRFLPを比較した。

結果及び考察

1 得られたPCR増幅産物の電気泳動像からITS領域と考えられる位置に明瞭なバンドが確認できたのはCTAB法のみであった。対照としたキットではバンドが不明瞭であり、フェノール処理による精製を追加した場合でもCTAB法より劣っていた。このため、ノリからのDNA抽出にはCTAB法がキットよりも優れていると考えられた。

2 使用した7種類の制限酵素のうち、DNAの完全切断が確認できたのはMsp I, Hind III, Hinf Iであった。この3酵素によりITS領域のRFLPを比較したところ、養殖スサビノリの中では差が認められなかったが、マルバアマノリと養殖スサビノリでは差が認められ、PCR-RFLP法により種間レベルでの多型検出が可能であると思われた。

3 作出系統の葉体は、いずれの系統も親に使用した養殖スサビノリに近い形態を示したが、高水温耐性や栄養繁殖性では養殖スサビノリとは異なっており、一方の親であるマルバアマノリが持つ形質の影響が考えられた。しかし、作出系統に認められたRFLPは、養殖スサビノリの系統と同一となり、マルバアマノリとの間で一致するものはなかった。このため、ITS領域のみのPCR-RFLP法では作出系統の系統判別は困難であり、さらに多くの領域についてPCR-RFLP法を検討する必要があると考えられた。

なお、本試験は水産庁補助事業として実施し、その詳細については、「平成11年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書」に記載した。

参考文献

- 1) Jeff J. Doyle Jane L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus.12,13-15.