（2）親貝の養成と採卵技術の開発

①　タイラギ親貝の養成と採卵技術の開発

国立研究開発法人水産研究・教育機構　水産技術研究所
松本　才絵・舩山　翔平・淡路　雅彦
小島　大輔・前田　雪・山田　充哉

1)　親貝養成

【目的】

種苗生産、中間育成を経て、低水温に耐久性のあるサイズのタイラギ稚貝を母貝場に移植するには、天然の産卵期より早期（5 月）に採卵する必要がある。これまでに早期採卵のための親貝養成は、天然海域での垂下飼育後に陸上水槽で給餌飼育して行ってきたが、昨年度は天然海域での垂下飼育のみで養成することができた。今年度は天然海域での垂下飼育のみによる親貝養成手法の再現性を確認する。

【研究方法】

瀬戸内海産と有明海産のタイラギを親貝として養成した。

香川県高松市沖で採集され屋島湾で垂下飼育した個体（以降、高松産天然貝と呼ぶ）を、2020年1月から採卵直前の2020年5月まで三重県五ヶ所湾で垂下飼育によって養成した。

有明海産親貝は、2019 年 12 月に佐賀県沖で採集された 50 個体（以降、2019 年佐賀県産天然貝と呼ぶ)、2020 年 1 月に福岡県沖で採集された 25 個体（以降、福岡県産天然貝と呼ぶ)、2020 年 3 月に佐賀県沖で採集採取された 50 個体（以降、2020 年佐賀県産天然貝と呼ぶ）であり、それぞれ採集後から採卵直前の 2020 年 5 月まで三重県五ヶ所湾で垂下飼育によって養成した。

垂下飼育中は水温やクロロフィル値を取得し、5 月中旬には雌雄を判別するとともに、一部個体をサンプリングして生殖腺指数（以下 IOV）や生殖巣の発達状況を組織学的に調べた。

【研究成果の概要】

高松産天然貝は、生殖腺の発達状況を確認するため 5 月 12 日に雌雄 2 個体ずつをサンプリングしたところ、IOV が 20～31 で、いずれも成熟期にあると考えられた。さらに垂下飼育を継続し、メス 13、オス 4 個体を 5 月 20 日に水産技術研究所百島庁舎へ送付し、翌 21 日に採卵した。

2019 年佐賀県産天然貝 50 個体、福岡県産天然貝 25 個体、2020 年佐賀県産天然貝 50 個体は、それぞれ 2019 年 12 月 28 日、2020 年 1 月 16 日、3 月 6 日に五ヶ所湾での垂下飼育を開始した（表 1)。雌雄判別時（5 月 12 日、14 日）にはそれぞれ 38、16、48 個体が生存していた。生殖腺の発達状況を確認するため 5 月 14 日に雌雄 2 個体ずつをサンプリングしたところ、IOV が 23～39 で、いずれも成熟期にあり、生殖腺が十分に発達していると考え

られたので、5 月中に採卵することにした。さらに垂下飼育を継続し、採卵用に送付するため 5 月 25 日に確認したところ、2019 年佐賀県産天然貝は雌雄判別からの約 10 日間で 21 個体が死亡したのに対し、福岡県産天然貝、2020 年佐賀県産天然貝ではこのような大量死はみられなかったことから、採卵用には 2020 年 1 月からと 3 月から垂下飼育の福岡県産天然貝 15 個体と佐賀県産天然貝 30 個体の合計 45 個体（メス 20 個体、オス 25 個体）を供した。これらの個体は 5 月 26 日に百島庁舎へ送付し翌 27 日に採卵した。

【次年度に向けた提言】

タイラギを三重県五ヶ所湾で垂下飼育すると、水温は 3～5 月に 15～20℃に上昇し、その間生殖腺が成長初期から成熟期を示すまでに発達し、IOV が上昇することが以前の調査から明らかになっていた。しかし近年の黒潮大蛇行の影響で、五ヶ所湾においても貧栄養、高水温の状態が続いている。五ヶ所湾は冬期も海水温が 10℃以下にならない温暖な海域であったが、黒潮の影響で、2018 年の冬以降最低水温が 15℃前後の高水温の状態が続いている。このため成熟の進行は早めで、一方貧栄養のため生殖腺重量増加の進みは遅い。このように、生殖腺の発達状況が以前とは異なる可能性を考慮して親貝を養成する必要がある。

昨年度は有明海産の親貝が養成中に大量に死んだため、今年度は垂下飼育開始後定期的に生存を確認した。5 月の雌雄判別時まで大量死はみられなかったが、5 月 15 日から 25 日の間に 2019 年 12 月から垂下飼育した群で 38 個体中 21 個体が死んだ。この群は他の群よりも垂下飼育開始が早く最も成熟が進んでおり、成熟が進んだ状態での雌雄判別作業が大量死の原因になったと考えられる。大量死を避けるために、垂下飼育開始時期を遅らせること、雌雄判別を早めに実施することに留意する必要がある。

表 1 五ヶ所湾で垂下飼育した有明海由来タイラギ個体数の推移

	佐賀県産	佐賀県産	福岡県産
南勢へ送付	50個体	50個体	25個体
垂下時期 （五ヶ所湾）	2019年12月	2020年3月	2020年1月
雌雄判別時	38個体	48個体	16個体
採卵用送付時	17個体	46個体	15個体
百島へ送付		30個体	15個体
2021年1月	4個体	4個体	

2）採卵

【目的】

有明海各県のタイラギ種苗生産のバックアップとして、有明海産タイラギから採卵して孵化幼生を得る。瀬戸内海各県が実施する増殖技術開発試験のため、瀬戸内海産タイラギから採卵して孵化幼生を得る。

【研究方法】

有明海産タイラギの採卵では、親貝として佐賀県および福岡県産天然貝を用いた。各個体の外套膜の粘液を採取して QuickGene DNA 組織キット S（富士フィルム和光純薬株式会社）で DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA の COI 領域を LAMP（loop-mediated isothermal amplification）法で増幅して種判別を行った。LAMP 法による種判別は Hashimoto et al., (2018)の方法で行い、有鱗型に相当する L2 型と判別された個体のみを採卵に用いた（102 個体中 95 個体が L2 型)。

2020 年 5 月 25 日、南勢庁舎の筏から供試貝を陸揚げして陸上水槽で馴致した。5 月 26 日、メス 20 個体オス 20 個体を百島庁舎へ宅配便で発送した。5 月 27 日、到着時の水温は 19.7℃で約 20 分間干出した。オス 1 個体を解剖して精子懸濁海水を作製し(精巣 21.5g/200L、水温 25℃)、全個体を浸漬した。30 分後、海水 300L を追加した。浸漬から約 1 時間後に放精と放卵が観察され、約 2 時間後までにメス 7 個体オス 14 個体が反応した。卵を含む海水を 105μm 目合いのポリエチレンネットに通してゴミを除き、17μm ネットで卵を回収した。卵は 25℃の精密濾過海水で洗浄・計数して、水槽底面積あたり 4500 個/cm^2 を目安に孵化水槽に収容して水温 25℃、微通気で孵化させた。5 月 28 日、ふ化幼生数を計数して、幼生飼育水槽に移送した。

5 月 27 日に採卵した親貝を水温 20℃で給餌飼育して、6 月 25 日に 2 回目の採卵を行った。約 20 分間干出した後に精子懸濁海水（精巣 20.7g/200L、水温 25℃）にメス 14 個体オス 17 個体を浸漬した。約 30 分後に放精、約 1 時間後に放卵が観察された。約 3 時間後までにメス 8 個体オス 10 個体が反応した。卵の回収、洗卵、孵化管理は 1 回目の採卵と同様に行った。

瀬戸内海産タイラギの採卵には、高松産天然貝を用いた。2020 年 5 月 19 日、南勢庁舎の筏から供試貝を陸揚げして陸上水槽で馴致した。5 月 20 日、メス 13 個体オス 4 個体を百島庁舎へ宅配便で発送した。5 月 21 日、到着時の水温は 17.3℃で、全個体をたわしで洗浄した（約 10 分間)。オス 1 個体を解剖して精子懸濁海水を作製して（精巣 28g/200L、水温 25.2℃)、全個体を浸漬した。30 分後、海水 300L を追加した。浸漬から約 2 時間後に放精、約 3 時間後に放卵が観察された。約 6 時間後までにメス 6 個体オス 2 個体が反応した。卵の回収、洗卵、孵化管理は有明海由来のタイラギと同様に行った。

【研究成果の概要】

採卵結果を表 2 に示した。有明海産タイラギからは 1 回目に約 1 億粒、2 回目に約 2.2 億粒の卵が得られ、瀬戸内海産タイラギからは約 2.1 億粒の卵が得られた。これらの卵数は孵化率を考慮しても種苗生産するのに充分な数である。放卵放精はオスから始まり、放卵率は 35 から 57%、放精率は 59 から 74%とオスの方が高い傾向であった。孵化率は 50 から 96%で、同一採卵日でもふ化水槽によって大きな差がみられた。受精卵に関与した親貝の違い、洗卵

のタイミング、孵化幼生のサンプリングの偏り等が影響している可能性が考えられ、今後対策が必要である。今回は同じ親貝から約 1 か月の間隔を空けて 2 回の採卵に成功した。タイラギの幼生飼育は未だ不安定なので、常に採卵できるよう 20℃に冷却して給餌飼育を行った。その結果、採卵可能な状態を約 1 か月間維持できた。近年天然貝の入手が難しいため、少数の親から安定的に採卵する技術として重要と考える。有明海産の親貝については、採卵に用いた全個体の閉殻筋を冷凍保存して、「DNA 標識技術の開発」課題へ提供した。

【次年度に向けた提言】

二枚貝類から採卵した卵の状態を評価する方法として、卵径、受精率、孵化率、D 型変態率等が知られているが、タイラギの場合、放卵放精の時間差や幼生の付着特性の問題から、採卵作業と並行して正確な調査を行うことは難しい。現行の調査方法による孵化率は、ばらつきが大きく信頼性が低いため、卵の状態を評価するには不十分である。卵の状態を把握することは、浮遊幼生の飼育成績を評価する上でも重要であるため、より簡便で正確な調査方法を開発する必要がある。

【参考文献】

Hashimoto Kazumasa, Yamada, Katsumasa, Nagae, Akira, Matsuyama Yukihiko (2018). Lineage specific detection of the scaly form of the pen shell Atrina spp. by a loop-mediated isothermal amplification method. Fisheries Science 84. 10.1007/s12562-018-1231-4.

表 2　有明海と瀬戸内海由来の親貝からの採卵結果

		採卵誘発個体数		放卵･放精率（%）		採卵数	ふ化率（%）	
		メス	オス	メス	オス	(万粒)		
有明海	5月27日	20	19	35.0	73.7	9,880	50.1	56.9*1
	6月25日	14	17	57.1	58.8	22,200	65.3	97.7*2
瀬戸内海	5月21日	13	3	46.2	66.7	21,297	66.9	96.2

*1：同一時刻に異なる孵化水槽から採取

*2：異なる時刻に同一の孵化水槽から採取

3)　人工受精

【目的】

これまでにタイラギ卵巣片からコラゲナーゼ消化して単離卵を得て、それをレチノイン酸処理することで卵成熟を誘起して、人工受精できることを明らかにした。この方法による受

精卵から孵化した幼生を給餌飼育することで稚貝が得られ、人工受精により種苗生産できることを確認したことから、本技術の普及を目指し種苗生産事例をさらに増やすことを目的とした。

【研究方法】

2020 年 7 月 8 日に香川県水産試験場において、試験場筏で垂下飼育していた天然採集個体を親貝として人工受精を行った。翌 9 日には幼生が得られ給餌飼育を行った。

【研究成果の概要】

香川県水産試験場筏で垂下飼育していたタイラギを雌雄 4 個体ずつ解剖した。雌雄判別でオスと判定されていた 4 個体のうち 1 個体は雌雄同体、1 個体はメスであったので、オス 2（IOV34 と 36)、メス 4（IOV25-37）個体を人工受精に使用した。使用した貝の生殖腺の発達度は、組織観察より成熟期と放出期を示していた。メス個体毎の採取卵数は、11.3～25.0 万/卵巣 1g であり、これまで行ってきた人工受精の結果と同程度であった。得られた受精卵は一部を受精率、孵化率算出用にメス個体毎に 5L ビーカーに収容し、残りはまとめて 500L 孵化水槽に収容した。翌日得られた孵化幼生は、香川県水産試験場で給餌飼育されたが 18 日目に全滅した。

【次年度に向けた提言】

人工受精に垂下飼育親貝を用いた場合、産卵期には生殖腺が発達し十分量の卵を採取することができ、孵化率は概ね 30%以上であることがわかっている。香川県水産試験場筏で垂下飼育したタイラギの産卵期については以前の調査より 7 月下旬～8 月と考えられたが、2019 年は 7 月 23 日には既に産卵してしまった個体が多く認められた。このため、まだ産卵していない個体を使用できるように 2020 年は 7 月 8 日に人工受精を行った。卵巣 1g 当たりの採取卵数はこれまで行ってきた人工受精の結果と同程度であったが、水槽に収容できた卵数は昨年度よりも少なめであった。メス 1 個体から採取できる卵数が少ない場合は、人工受精に使用するメス個体数を増やすことで、水槽への収容卵数を増やせる可能性がある。

4）関連技術開発

4-1）産卵誘発刺激における精巣懸濁液の適正濃度の検討

【目的】

二枚貝類に対する産卵誘発刺激は、セロトニンや過酸化水素などの化学的刺激、生殖巣の懸濁液や微細藻類などの生物学的刺激、水温や塩分などの物理的刺激がある。百島庁舎ではこれらを元にタイラギ親貝に適した産卵誘発刺激を探索し、現在では 30 分以内の干出、5℃以上の水温上昇、精巣懸濁液の添加による刺激を与えている。この中で特に重要な刺激と考

えられる精巣懸濁液を作製するには、成熟したオスを解剖する必要がある。タイラギは準絶滅危惧種に指定されており入手自体が難しいため、解剖する個体数は少ないほど望ましい。そこで本研究では、経験的に目安としている精巣懸濁液濃度 0.1g/L よりも低濃度における産卵誘発効果を調べることで、解剖個体数低減の可能性について検討した。

【研究方法】

本試験を実施するにあたり産卵誘発刺激に反応する時期を把握する必要があるため、時期による誘発に対する反応率の違い、誘発に反応して産卵する個体としない個体の成熟状況を調べた。使用したタイラギは、百島庁舎の実験池、百島庁舎の陸上水槽、広島県尾道市沿岸、香川県屋島湾の 4 か所で垂下養成した。各養成群の産卵誘発刺激に対する放卵放精率および成熟指標として内臓指数を比較し、本試験で使用する群と時期を決定した。

産卵誘発試験は、試験例数を増やすために昨年度開発した個別産卵誘発法を活用した。20℃で飼育したタイラギを約 20 分間干出して、25℃の精巣懸濁海水の入った 10 L バケツに個別に収容した。百島庁舎における産卵誘発処理は、200 L の水量に対して 20 個体程度の親貝を浸漬するため、1 個体あたり 10 L の水量に設定した。精巣懸濁液濃度は、経験的に採用としている 0.1g/L を基準として、0.01g/L、0.001g/L の 3 段階とした。その後 1 時間おきに新しい 25℃の海水に入れ替えた。放卵放精の観察は、精巣懸濁海水に浸漬後 3 時間まで行った。試験は 2020 年 7 月 6 日から 28 日の間に 12 回実施した。

【研究成果の概要】

各養成群の放卵放精率と平均内臓指数を表 3 に示した。百島実験池区と百島陸上水槽区の個体は放卵放精が殆ど観察されず、内臓指数は 16 と 13 であった。一方、尾道沿岸区と屋島湾区は放卵と放精が観察され、内臓指数は 24 から 41 であった。両区とも産卵誘発日が遅くなるほど内臓指数が低下する傾向がみられた。時期による誘発に対する反応率の違いに明確な差は見いだせなかったが、放卵放精する集団は内臓指数が 24 以上であった。以上の結果から、本試験では尾道沿岸区および屋島湾区のタイラギを使用することとした。

各濃度試験区の反応率、放卵率、放精率を図 2 に示した。雌雄合計とオスの反応率は、最高濃度の 0.1g/L 区が 0.01g/L 区よりも有意に高かった（Tukey 法、$P < 0.05$）。メスの反応率は、0.1g/L 区が最も高かったものの他試験区との有意差がなかった（$P \geq 0.05$）。3 試験区中で 0.1g/L 区が最も放精促進効果が高かったことから、0.1g/L よりも低濃度では産卵誘発による反応率が低下する可能性が示された。したがって、解剖個体数の低減は難しく、1 回の採卵に対して 20 g の精巣を準備する必要があると考えられた。

【次年度に向けた提言】

精巣懸濁液が濃いほど高い産卵誘発効果を示す可能性が示されたが、近年タイラギの入手は困難になっており、解剖する個体を増やすことは難しい。冷凍した精巣でも産卵誘発効

果があれば、親貝に余裕がある時に保存することで貴重な親貝を節約できる。冷凍した精巣懸濁液の誘発効果およびその保存条件等を調べる必要がある。

表 3　各養成群の採卵日、使用個体数、放卵・放精率、内臓指数

試験区	採卵日	個体数	放卵率(%)	放精率(%)	内臓指数 (平均値±SD)
百島実験池	7/2	25	4.0	0.0	16.1 ± 3.06^{ac}
	7/3	19	0.0	0.0	
	7/16	6	0.0	0.0	
	7/17	6	0.0	0.0	
百島陸上水槽	6/17	21	0.0	0.0	13.4 ± 2.30^{a}
	6/18	16	0.0	0.0	
	7/16	4	0.0	0.0	
	7/17	4	0.0	0.0	
尾道沿岸	6/30	36	8.9	0.0	33.4 ± 10.99^{b}
	7/1	35	0.0	25.7	
	7/14	12	0.0	0.0	23.6 ± 8.40^{abc}
	7/15	11	0.0	36.4	
屋島湾	6/24	36	44.4	66.7	40.7 ± 1.78^{b}
	7/6	12	33.3	33.3	30.7 ± 13.98^{bc}
	7/9	8	0.0	60.0	

表中の異なるアルファベットは統計的有意差を示す（一元配置分散分析後 Tukey 法で多重比較、$P < 0.05$）

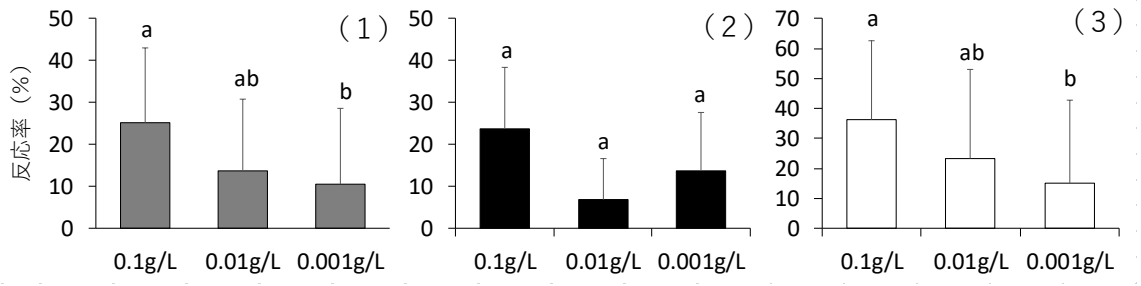

図 1　産卵誘発刺激によるタイラギの反応率

(1)は雌雄合計(n =12)、(2)はメス（n =5)、(3)はオス（n = 12）の結果を示す。縦軸は放卵あるいは放精した割合、横軸は精巣懸濁液の濃度、図中の異なるアルファベットは統計的有意差を示す（Kruskal-Wallis 後 Tukey 法で多重比較、$P < 0.05$）

4-2）生体組織採取検査（バイオプシー）方法の確立

【目的】

タイラギ親貝の成熟状態を、個体を生かしたまま確認するには、低温麻酔をかけて目視で生殖巣の発達状態を観察する必要がある。しかし、目視確認による成熟状態の判定は精度が低く、またこの操作自体が産卵誘発の刺激となり得るため、現状は養成飼育した親貝を産卵期に無作為に抽出して産卵誘発や人工受精に用いている。親貝の成熟状態を、個体を生かしたまま把握することができれば、親貝を効率的に選別し、より安定的に受精卵を得ることができる。そこで本研究では、バイオプシーによりタイラギ親貝の卵を採取する方法を検討し、それにより得られた卵を用いてレチノイン酸処理による卵核胞崩壊(GVBD)が誘導される割合(GVBD 率)を求めることで、卵の状態を調べた。

【研究方法】

上述の「2)採卵」の項目で説明された手順で養成した高松産天然貝、および有明海産天然個体から生産した人工種苗を水産研究・教育機構 屋島庁舎の筏で 1 年以上養成した個体、合計 20 個体に対してバイオプシーを行い、その後の産卵誘発処理に対する反応率と生残率、および得られた卵の GVBD 率を調べた。

バイオプシー操作は次の通り行った。まず、タイラギの殻を開口器で開き、100 μl の海水を含んだ 18G の注射器を挿入して卵巣に突き刺した。シリンジを引いて注射器内にピンク色の生体試料が採取されたことを確認して、卵巣からシリンジを抜いた。シリンジ内の生体試料を、精密ろ過海水を 1 ml 入れた 1.5 ml チューブに出し、2 回遠心分離と精密ろ過海水の添加を行なって洗浄して、卵を得た。バイオプシー操作後、産卵誘発処理を上述の「4-1) 産卵誘発刺激における精巣懸濁液の適正濃度の検討」の項目で説明された手順で実施し、反応率を調べた。また、バイオプシー操作後、2 週間以上の飼育を行って、7 月 31 日時点での生残率を調べた。

GVBD 率は次の通り行った。バイオプシー操作で得られた卵に対して、1 μM レチノイン酸/精密ろ過海水を添加して 25℃ 30 分インキュベートすることでレチノイン酸処理を行い、反応終了時に卵をエタノール固定した。DAPI 染色により核を可視化し、核の状態を観察して GVBD 率を算出した。

【研究成果の概要】

バイオプシー実施日、バイオプシー実施後に産卵誘発処理に反応した日、および死亡が確認された日を表 3 に示した。バイオプシー操作を実施した 20 個体中、産卵誘発に反応したのは 5 個体で、その反応率は 25%であった。また、7 月 31 日時点での生残個体は 15 個体で、生残率は 75%であった。産卵誘発に対する反応率は、「4-1) 産卵誘発刺激における精巣懸濁液の適正濃度の検討」の図 1 に示された産卵誘発刺激に対する反応率と比較して差のない値であり、また大量死が見られなかったことから、本研究で実施したバイオプシー操作は個

体の産卵誘発反応率および生残率に大きな影響を与えないと考えられた。

次に、バイオプシーで得られた卵の GVBD 率と産卵誘発に対する反応の有無を図 2 に示した。産卵誘発に反応した個体と反応しなかった個体で GVBD 率に顕著な違いは見られなかった。一方、各実施日における GVBD 率の平均値は、時期依存的に変化する傾向が見られた。特に、同一個体(#6 および#7)の GVBD 率は、7 月 8 日と 7 月 20 日で後者の方が低い値を示しており、同一個体でも時期依存的に GVBD 率が変化する可能性が示唆された。レチノイン酸による GVBD 誘導は、人工受精を成立させるために必須の反応であり、レチノイン酸によって GVBD が誘導されない卵は、精子と混合しても受精に至らない。本研究で確立したバイオプシー法を用いて、親貝を生かしたまま卵を採取し、その GVBD 率を調べて、高い GVBD 率を示す個体を親貝として人工受精に供することにより、親貝を節約しながら数多くの受精卵を確保する効率的な種苗生産が実施できると期待される。

【次年度に向けた提言】

本研究で確立したバイオプシー操作は、親貝の産卵誘発反応率や生残率に大きな影響を与えなかったが、シリンジ吸引により生じる陰圧によって、採取した卵に対して一定の物理的損傷を与えていた可能性がある。バイオプシーに用いる器具を再検討して、卵に対する損傷が小さくなるようにバイオプシー操作を改良する必要がある。また、得られた卵は洗浄後も一部が卵塊の状態であったため、正確な GVBD 率を求めるためにはコラゲナーゼ処理が必須と考えられる。

【参考文献】

Awaji Masahiko, Matsumoto Toshie, Ojima Daisuke, Inoue Shunsuke, Suzuki Michio, Kanematsu Masaei (2018). Oocyte maturation and active motility of spermatozoa are triggered by retinoic acid in pen shell *Atrina pectinata*. Fisheries Science 84. Pp535-551.

表 4 バイオプシーを実施した個体の産卵誘発反応日および死亡日

個体 ID	由来	バイオプシー実施日	バイオプシー後の放卵日	死亡日
1	高松天然	7/1, 7/20	-	-
2	高松天然	7/6, 7/20	-	7/27
3	高松天然	7/6, 7/20	7/20	-
4	高松天然	7/6, 7/20	-	-
5	高松天然	7/8, 7/20	-	-
6	高松天然	7/8, 7/20	-	-
7	高松天然	7/8, 7/20	7/9	7/22
8	高松天然	7/8, 7/20	7/9	-
9	高松天然	7/8, 7/20	7/9	-
10	高松天然	7/8, 7/20	7/9	-
11	高松天然	7/8, 7/20	-	-
12	有明人工	7/13	-	-
13	有明人工	7/13	-	-
14	有明人工	7/13	-	-
15	有明人工	7/13	-	-
16	有明人工	7/13	-	7/13
17	有明人工	7/13	-	7/23
18	有明人工	7/13	-	-
19	有明人工	7/13	-	7/19
20	有明人工	7/13	-	-

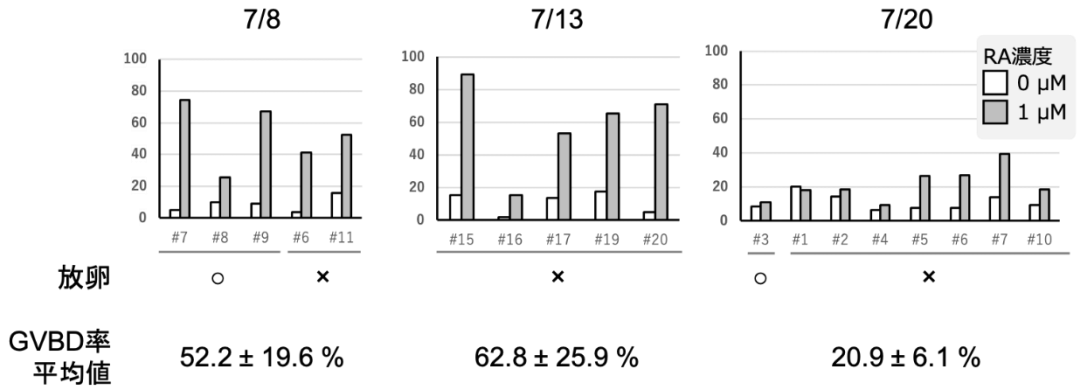

図 2 バイオプシーにより得た卵の GVBD 率と産卵誘発処理に対する反応の有無

○： 産卵誘発により放卵した個体、×： 産卵誘発により放卵しなかった個体