

令和3年度

さけ・ます等栽培対象資源対策事業
新規栽培対象種技術開発（二枚貝）

調査報告書

さけ・ます等栽培対象資源対策共同研究機関
新規栽培対象種技術開発（二枚貝）グループ

令和4年3月

目 次

はじめに	1-7
ア. 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	8-17
② ハマグリ親貝の養成と採卵技術の開発	18-24
イ. 人工種苗生産技術の開発	
① タイラギ人工種苗生産技術の開発	25-28
② ハマグリ人工種苗生産技術の開発	29-52
ウ. 人工種苗から成貝までの育成技術の開発	
① 瀬戸内海東部海域におけるタイラギ育成技術の開発	53-60
② 瀬戸内海西部海域におけるタイラギ育成技術の開発	61-67
③ 東京湾におけるハマグリ 育成技術の開発	68-71
④ 伊勢湾におけるハマグリ 育成技術の開発	72-77
⑤ 有明海におけるハマグリ 育成技術の開発	78-82
⑥ 餌料源分析を通じたハマグリ 育成技術の開発	83-85
エ. 母貝団地造成技術の開発	
① 瀬戸内海西部海域におけるタイラギの母貝団地造成技術の開発	86-93
② 大分県北部海域におけるタイラギの母貝団地造成技術の開発	94-100
③ 三河湾におけるハマグリ の母貝団地造成技術の開発	101-108
④ 伊勢湾におけるハマグリ の母貝団地造成技術の開発	109-113
⑤ 餌料源分析を通じたハマグリ の母貝団地造成技術の開発	114-120
オ. DNA 標識技術の開発	
① 有明海におけるタイラギの DNA 標識技術の開発	121-128
カ. 検討会の開催	
① 検討会の開催	129-132
② 現地検討会の開催	133-136

は じ め に

国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

伊藤 篤

【研究開発の目的】

近年、ホタテ、カキを除く二枚貝は、全国的に漁獲量が低迷し、これまでのピークに比べ、タイラギは1/50、アサリは1/20、ハマグリは1/16にまで減少している。二枚貝に係る増殖等の取り組みは、漁協の単位などで行われてはいるものの、資源を回復させるまでには至らず、このままでは国内の二枚貝資源の安定供給に支障を来すことが懸念されている。特に有明海では、ハマグリとタイラギはアサリと並んで象徴的な二枚貝であり、周辺各地では古くから無くてはならない重要食材として親しまれてきた。有明海はかつて国内有数のタイラギ生産海域で盛期には2万9千トンの漁獲があり、タイラギ漁は地域経済を支える重要な産業でもあったが、タイラギの資源量が激減したことで、現在は休漁に追い込まれている。ハマグリ類は1965年には13,700トンあった漁獲が、1980年に2,000トン、2006年には867トン（うち有明海106トン）と低迷し、往時の16分の1に減少している。現在環境省では絶滅危惧種としてレッドリストに掲載されている状況である。

このような国内資源状態の中で需要に対応するために、両種は中国、台湾、韓国等からの輸入に依存するようになっており、ハマグリは国内流通量の90%以上、タイラギは約80%が輸入されている。しかし、輸入の不安定性、貝毒や農薬の検出等による食の安全・安心の毀損、産地偽装や不当表示、輸入活貝に混在して国内に侵入する有害寄生生物や外敵生物による在来二枚貝への悪影響や遺伝的攪乱など、さまざまな問題が懸念されている。こうした水産業のみならず社会問題を背景として、両種の資源回復のための抜本的な方策が、漁業者や消費者から強く望まれている。

そこで、技術的課題の多いハマグリおよびタイラギの安定的な人工種苗生産技術の開発に取り組むとともに、親貝集団を造成するための稚貝育成技術を開発することで資源回復に向けた手法を開発することを目的とする。本事業は主要な産地である東京湾、三河湾、伊勢湾、瀬戸内海および有明海を中心として研究開発に取り組み、ハマグリおよびタイラギ資源の減少が著しい各海域へ広く成果を普及することを最終目標として、関係機関が有機的に連携した態勢で実施する。

【目標設定の妥当性】

タイラギの浮遊幼生は、D型幼生への変態直後から個体同士が凝集し、気泡や水面、飼育水槽の壁面および底面等に付着して死亡するものが多い。このため、アサリ・マガキ等の一般的な二枚貝類幼生飼育に用いられる飼育方法ではわずかに数日しか飼育できず、人工種苗生産ができなかった。この原因として幼生による粘液分泌、殻の物理化学的性状などが考え

られているが、明確な結論は得られていない。このような状況の中で国立研究開発法人水産研究・教育機構では、平成 23～27 年にかけて、タイラギ浮遊幼生の飼育装置の改良等に取り組み、平成 25 年に浮遊幼生から変態した稚貝（着底稚貝）の生産に初めて成功し、従来の生産記録（平成 18 年に長崎県総合水産試験場が生産した稚貝 1,500 個体）を大幅に更新する着底稚貝 7 万個体の生産を達成した。また、平成 27 年には 190 万個体を生産するなど、大量種苗生産技術は徐々に向上しつつある。しかしながら、親貝の養成と採卵技術はいまだに不安定であり、人工種苗を用いた増養殖技術への展開に必要な、脆弱な稚貝から小型サイズまでの中間育成技術、母貝団地造成技術および再生産への寄与を把握するための DNA 標識技術については未開発の状態である。タイラギは古くから水産物として利用されているにもかかわらず、その生態や生理特性には不明な点が多く、着底稚貝以降の好適な飼育・餌料環境については十分に把握されていない。成貝までの育成技術の不安定さと、成貝の適正環境等の知見の少なさが母貝団地造成の隘路となっており、その技術開発が喫緊の課題となっている。

一方、ハマグリ種の種苗生産研究は 1950～80 年代にかけて取り組まれていたが、受精卵から稚貝までの生残率が低く、稚貝からの成長が遅く放流効果も低かったことから、ほとんどの機関で技術開発の取り組みを中止していた。近年、千葉県水産総合研究センターによって浮遊幼生期及び初期稚貝の飼育・餌料条件が見直され、1,000 万個体以上の着底直前幼生（フルグロウン期）の飼育が可能となったが、未だに着底期前後に原因不明の大減耗を引き起こすことが問題となっている。また、初夏に採卵、育成した稚貝は秋季には殻長 2 mm 程度に成長するが、秋～冬季はカゴ等により保護育成しても生残が低く、成長も停滞するなど、育成は困難であるのが現状である。本種の人工種苗を活用した母貝場造成を行うためには、これらの問題を解決していく必要がある。

本研究開発では、これらの問題を解決するためにタイラギとハマグリの飼育研究に実績のある複数の機関が連携し、従来の飼育手法の検証と改良を行うとともに、他貝種で開発された飼育手法や機器類などを導入することで、両種の種苗生産技術の開発を迅速かつ確実に遂行する計画となっている。さらに、母貝団地を造成するために適した環境条件を調査し、母貝場として適正と判断された海域に人工種苗を放流し、その母貝場における放流個体の成長と生残、成熟と産卵の調査（タイラギ、ハマグリ）や DNA 標識技術に基づく再生産効果の調査（タイラギ）を行うことで、天然資源への加入量の底上げに貢献することを目標としている。

以上の理由から研究目標は「栽培漁業総合推進委託事業（新たな栽培対象種の技術開発促進）」の目的を達成するために妥当であると考ええる。

【研究開発の内容】

（１） 全体計画

本研究開発では、タイラギとハマグリについて、親貝の養成と採卵技術、人工種苗

生産技術、人工種苗から成貝までの育成技術、母貝団地造成技術および DNA 標識技術を開発する。親貝の養成と採卵技術では、天然採苗が難しいハマグリとタイラギについて、飼育環境下での良質な親貝の養成と、対象種に応じた産卵誘発等の採卵技術を開発する。人工種苗生産技術では、タイラギ、ハマグリについて、飼育環境における水温、栄養条件、餌料密度、飼育密度等を変化させ、大量死亡時期等の把握から、幼生飼育で回避すべき条件の検討および着底までの飼育方法の検討等を行う。人工種苗から成貝までの育成技術では、タイラギ、ハマグリについて、種苗生産された稚貝が移植可能と考えられる殻長サイズまでの飼育試験を行い、効率的・効果的に成貝まで育成する手法を検討する。母貝団地造成技術では、タイラギ、ハマグリについて、人工種苗を天然海域に移植し、成長、生残、成熟の調査を行い、母貝団地の造成手法を検討する。DNA 標識技術では、タイラギについて、母貝団地に用いた人工種苗の再生産への寄与を把握し、効果的な母貝団地の造成を図るため、遺伝子型を分析し、DNA 標識技術を開発する。

なお、本事業では、実施計画及び実施結果について意見を求めるため、種苗生産・放流技術に精通した外部有識者を招聘し、検討会を各 1 回開催する。また、構成機関の連携強化を図り、技術開発を迅速かつ的確に推進するために、必要に応じて貝種ごとの現地検討会を開催する。

具体的な研究開発課題と担当機関は以下のとおりである。

(2) 研究開発課題と担当機関

ア. 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

② ハマグリ親貝の養成と採卵技術の開発：

熊本県水産研究センター、国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

イ. 人工種苗生産技術の開発

① タイラギ人工種苗生産技術の開発：

国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

② ハマグリ人工種苗生産技術の開発：

千葉県水産総合研究センター、愛知県水産試験場、熊本県水産研究センター、三重県水産振興事業団

ウ. 人工種苗から成貝までの育成技術の開発

① 瀬戸内海東部海域におけるタイラギ育成技術の開発：

香川県水産試験場

- ② 瀬戸内海西部海域におけるタイラギ育成技術の開発：
山口県水産研究センター
- ③ 東京湾におけるハマグリ育成技術の開発：
千葉県水産総合研究センター
- ④ 伊勢湾におけるハマグリ育成技術の開発：
三重県水産研究所
- ⑤ 有明海におけるハマグリ育成技術の開発：
熊本県水産研究センター
- ⑥ 餌料源分析を通じたハマグリ育成技術の開発：
国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

エ. 母貝団地造成技術の開発

- ① 瀬戸内海西部海域におけるタイラギの母貝団地造成技術：
山口県水産研究センター
- ② 大分県北部海域におけるタイラギの母貝団地造成技術：
大分県農林水産研究指導センター 水産研究部
- ③ 三河湾におけるハマグリ母貝団地造成技術の開発：
愛知県水産試験場
- ④ 伊勢湾におけるハマグリ母貝団地造成技術の開発：
三重県水産研究所
- ⑤ 餌料源分析を通じたハマグリ母貝団地造成技術の開発：
国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

オ. DNA 標識技術の開発

- ① 有明海におけるタイラギの DNA 標識技術の開発：
国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産資源研究所

カ. 検討会の開催

- ① 研究推進会議の開催：
国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所
- ② 現地検討会の開催：
国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所（タイラギ）
千葉県水産総合研究センター（ハマグリ）

【研究内容と方法】

ア. 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

担当機関：国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

瀬戸内海および有明海産のタイラギ親貝を、三重県五ヶ所湾に位置する南勢庁舎地先筏および香川県屋島湾に位置する屋島庁舎地先筏から垂下して養成飼育する。生殖巣が十分発達した時期に産卵誘発を行い、課題イ-①へ受精卵を提供する。また、親貝の卵巣や卵の状態と、人工受精で得られる D 型幼生の正常発生率との関係を調べて、卵質の評価指標となる要素について検討する。

② ハマグリ親貝の養成と採卵技術の開発

担当機関：熊本県水産研究センター、国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

有明海産の天然親貝を確保し、肥満度・成熟・水温等の経時変化を把握しデータを蓄積することで、産卵可能時期を把握し、親貝養成・採卵時期を検討する。さらに、千葉県水産総合研究センターで実施している産卵誘発手法を活用して安定採卵手法の検証に取り組む。

イ. 人工種苗生産技術の開発

① タイラギ人工種苗生産技術の開発

担当機関：国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

タイラギの浮遊幼生を飼育するために、水産研究・教育機構において開発した連結式飼育装置等を用いて、飼育密度の違いが浮遊幼生の成長や生残に与える影響を調べて、人工種苗生産技術の安定化を検討する。

② ハマグリ人工種苗生産技術の開発

担当機関：千葉県水産総合研究センター、愛知県水産試験場、熊本県水産研究センター

千葉県水産総合研究センターの研究成果を活用して D 型幼生から着底稚貝まで飼育し、特に、一番課題となっている着底期～初期着底稚貝期の大量減耗に対処するため、着底前後の飼育水の好適塩分濃度等を検証する。

ウ. 人工種苗から成貝までの育成技術の開発

① 瀬戸内海東部海域におけるタイラギ育成技術の開発

担当機関：香川県水産試験場

着底直後の脆弱な殻長 1 cm 程度の稚貝を、飼育容器の干潟への設置や小割生簀への垂下によって飼育し、地先海域を利用したコストパフォーマンスの高いタイラギの飼育方法を検討する。

② 瀬戸内海西部海域におけるタイラギ育成技術の開発

担当機関：山口県水産研究センター

垂下カゴ等を用いて効率的な放流種苗の育成技術を開発する。種苗の収容密度と成長、生残との関係等、最適な条件を検討する。

③ 東京湾におけるハマグリ育成技術の開発

担当機関：千葉県水産総合研究センター

得られた着底稚貝を幼生飼育と同様の飼育装置（ダウンウェリング方式による飼育装置）を活用して、干潟への放流サイズまで育成するための飼育技術を開発する。さらに、春季から干潟域で被覆網を活用した保護育成試験を実施する。

④ 伊勢湾におけるハマグリ育成技術の開発

担当機関：三重県水産研究所

伊勢湾におけるハマグリの主産地である桑名地区において、人工種苗をかご等に収容して野外飼育し、成貝まで低コストで飼育する技術を開発する。野外飼育する適地・環境条件は、後述する天然ハマグリの分布中心における水質等の調査結果にもとづいて決定する。

⑤ 有明海におけるハマグリ育成技術の開発

担当機関：熊本県水産研究センター

種苗生産した着底稚貝を、陸上水槽（ダウンウェリング）による、ブラウンウォーター給餌等の手法で干潟への放流サイズまで育成する飼育技術を開発する。

⑥ 餌料源分析を通じたハマグリ育成技術の開発

担当機関：国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

被覆網を活用した稚貝保護育成試験において、炭素・窒素安定同位体比等を用いたハマグリの餌料源分析を実施する。餌料源と肥満度等の生体情報を用いて、干潟域での適正な保護育成条件を検討する。

エ．母貝団地造成技術の開発

① 瀬戸内海西部海域におけるタイラギの母貝団地造成技術の開発

担当機関：山口県水産研究センター

好適な環境条件を解明し、放流条件（放流サイズ等）と放流手法（網の設置等）を組み合わせた効果的な母貝団地の造成方法を検討する。

② 大分県北部海域におけるタイラギの母貝団地造成技術の開発

担当機関：大分県農林水産研究指導センター水産研究部

大分県北部海域において、海底移植による増殖試験を実施し、成長や成熟等を調査することにより、人工種苗等を用いたタイラギ母貝団地造成の技術開発に取り組む。

③ 三河湾におけるハマグリの母貝団地造成技術の開発

担当機関：愛知県水産試験場

生産した種苗を効果的に母貝資源として添加するため、天然ハマグリの分布生態と好適な環境条件を把握するとともに、放流条件（放流サイズ・放流場所等）や手法（既存の貝類増殖場の活用事例等）を組み合わせた育成技術の開発に取り組む。

④ 伊勢湾におけるハマグリの母貝団地造成技術の開発

担当機関：三重県水産研究所

種苗の放流適地を明らかにするため、伊勢湾における天然ハマグリの主産地である桑名地区等において、天然ハマグリ分布調査を実施する。また、分布中心の水質等の環境条件を確認する。選定した放流適地に種苗を放流し、かぶせ網等による母貝団地の造成技術を開発する。

⑤ 餌料源分析を通じたハマグリ母貝団地造成技術の開発

担当機関：国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

ハマグリ干潟内における移動が成長に伴う餌料源の変化に起因する可能性を検証するため、干潟上での飼育試験を通じて得られたハマグリについて、炭素・窒素安定同位体比等を用いた餌料源分析を実施する。

オ. DNA 標識技術の開発

① 有明海におけるタイラギの DNA 標識技術の開発

担当機関：国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産資源研究所

有明海産タイラギにおける一塩基多型 (SNP) サイトの情報をもとに、質量分析に基づく遺伝子型決定に用いる領域特異的 PCR プライマーおよび一塩基伸長プローブを設計し、血縁解析のための SNP マーカーを開発する。

カ. 検討会の開催

① 検討会の開催

担当機関：国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

外部有識者を招聘し、年度ごとの研究計画と成果の取り纏め等を検討するための検討会を年 2 回開催する。

② 現地検討会の開催

担当機関：国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所 (タイラギ)、
千葉県水産総合研究センター 東京湾漁業研究所 (ハマグリ)

構成機関の連携強化を図り、技術開発を迅速かつ的確に推進するために、必要に応じて現地検討会を開催する。

ア. 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

前田 雪・山田 充哉

瀬戸内海および有明海産のタイラギ親貝を、三重県五ヶ所湾に位置する南勢庁舎地先筏および香川県屋島湾に位置する屋島庁舎地先筏から垂下して養成飼育した。生殖巣が十分発達した時期に産卵誘発を行い、課題イ-①へ受精卵を提供した。人工受精法の開発ではレチノイン酸処理濃度を低減できるか検討した。また、親貝の卵巣や卵の状態と、人工受精で得られる D 型幼生の正常発生率との関係を調べて、卵質の評価指標となる要素について検討した。

1) 親貝養成

【目的】

種苗生産、中間育成を経て、低水温に耐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、一昨年度、天然海域での垂下飼育のみで養成できることを明らかにした。今年度は昨年と同様に垂下飼育のみで養成するとともに、瀬戸内海産親貝について早期採卵の目安となる積算温度を検討した。

【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、2021 年 2 月から採卵直前の 2021 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、2020 年採卵用に養成した群（2019、2020 年に佐賀県で採集採取された個体、以降 2020 年天然貝と呼ぶ）の残り、2021 年に佐賀県で採集採取された個体（以降 2021 年天然貝と呼ぶ）と 2018 年産人工種苗であり、2020 年天然貝は 2021 年 5 月まで、2021 年天然貝と人工種苗は 2021 年 4 月から採卵直前の 2021 年 6 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 a 量をモニタリングし、4～5 月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】

高松産天然貝の生殖腺の発達状況を確認するため4～5月にサンプリングしたところ、IOVが上昇する傾向が認められ、成熟期にあると考えられた。5月26日に水産技術研究所百島庁舎へ送付し、翌27日に採卵した。2019年以降は垂下飼育のみで早期採卵しており、2019、2020、2021年における採卵日までの積算温度は、それぞれ2349、2275、2295℃・日であった。

有明海産タイラギにおいて、2021年5月11日の時点で生存していた4個体（メス3オス1）の2020年天然貝を百島庁舎へ送付した。2021年天然貝12個体（垂下飼育開始時）は、雌雄判別時（5月6日）には7個体になり、6月9日の百島庁舎への送付時に生存していたのは3個体だった。人工種苗39個体（メス11オス28）も同じく6月9日に百島庁舎へ送付した。有明海産親貝は個体数が少ないため解剖のためのサンプリングはしなかった。

【次年度に向けた提言】

三重県五ヶ所湾の水温は3～5月に15～20℃に上昇し、この時期に三重県五ヶ所湾でタイラギを垂下養成すると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、これまでの調査から明らかになっている。2019年以降の3年間の採卵結果より、五ヶ所湾で垂下飼育により親貝養成した場合、早期採卵の目安となる積算温度は2200℃・日程度と考えられた。

2019年から有明海の干潟で採取された天然貝を三重県五ヶ所湾において養成しているが、飼育開始時と採卵時に生存していた個体数は2019、2020、2021年にそれぞれ77と16個体、125と78個体、12と3個体であり、垂下養成中に多数の個体が死亡した。一方、今年度、飼育した人工種苗個体は、雌雄判別ができた47個体中、採卵時には39個体が生存しており、大量斃死はみられなかった。ほぼ同じ場所に垂下している由来の異なる群で死亡率が異なっていたことから、垂下飼育中の死亡は垂下飼育開始前の生息環境の違いによるものかもしれない。

2) 採卵

【目的】

タイラギ人工種苗生産の開発課題（イ. ①）に供試するため、精巣破砕物の懸濁液（以下、精巣破砕液）を用いた人工産卵誘発によって瀬戸内海産と有明海産のタイラギの採卵を行い、ふ化幼生を得る。

【研究方法】

瀬戸内海産タイラギへの人工産卵誘発は、2021年5月27日と8月27日の計2回、水産技術研究所百島庁舎にて実施した。採卵用親貝には、香川県高松市沖で漁獲された野生個体（以下、瀬戸内産天然貝）と、高松産天然貝を親として生産した人工種苗を数年間育成した個体（以下、瀬戸内産人工貝）を識別せずに混合して用いた。5月26日に水産技術研究所

南勢庁舎の筏から取り上げた 43 個体を宅配便で百島庁舎に移送した。翌 27 日、到着時の箱内水温は 18.8℃であり、15 分程かけて、たわしで殻表面の付着物を除去した。精巣破砕液作成用にオス 1 個体を選択し、殻および軟体部の各部位を測定した後に解剖して精巣塊を摘出した。中腸線を除去した精巣湿重量は 28.6g であった。解剖鉢で精巣を細かく裁断し、目合い 17 μ m のプランクトンネットに包んで 1L の砂ろ過海水中で揉んで懸濁させ精巣破砕液を作成した。0.2 μ m 中空糸膜フィルターでろ過して 25℃に調温した海水（以下、清浄海水）200L をポリカーボネート製 500L アルテミアふ化水槽に入れ、供試個体 29 個体（オス 9 個体、メス 20 個体）を浸漬した後に精巣破砕液を投入した。30 分後、清浄海水 300 L を追加し、さらに 30 分後、供試個体を清浄海水 500L を入れた別の 500L アルテミア水槽に移した。さらに 1 時間後、供試個体を再度別の 500L アルテミア水槽に移した。このとき各個体が放精・放卵を開始し、約 1 時間後に供試個体を再度別の 500L アルテミア水槽に移して放精・放卵を継続させた。受精卵は目合い 105 μ m と 17 μ m のプランクトンネットを用いて回収し、卵数を計数した後、清浄海水 1,500 L を入れたふ化用の角形水槽 FRP2 基に各 5,000 万粒を収容した。ふ化用水槽には受精卵収容後に *Pavlova lutheri* を 5,000 細胞/ml になるように添加した。産卵誘発後は砂ろ過海水を掛け流した 1,000L 角形水槽に供試個体を収容し、18～20℃を維持しながら *Pavlova lutheri* または *Isochrysis* sp. (Tahiti) を給餌して 12 月まで飼育した。

有明海産タイラギへの人工産卵誘発は、2021 年 6 月 10 日、14 日、17 日、8 月 31 日の計 4 回、水産技術研究所百島庁舎にて実施した。採卵用親貝には、2021 年に佐賀県沖で採取された野生個体と 2020 年度採卵に使用した福岡県および佐賀県産の野生個体（以下、有明産天然貝）、2018 年に有明海産の野生個体を親として生産した人工種苗を育成した個体（以下、有明産人工貝）を混合して使用した。有明産人工貝の使用は、2021 年度の産卵誘発に供試可能な有明産天然貝が極めて少数であったことによる。有明海のタイラギ野生集団には Lineage 1（以下、L1 系統：無鱗型、ズベタイラギに相当）と Lineage 2（以下、L2 系統：有鱗型、リシケタイラギに相当）が混在し、L2 系統が優占することが知られている（Hashimoto et al., 2021）。今回は可能な限り L2 系統の個体から採卵するため、事前に Hashimoto et al. (2018)に従って LAMP（loop-mediate isothermal amplification）法による種判別を行い、L2 系統と判別された個体のみを産卵誘発に供試した。2020 年度採卵に使用した有明産天然貝（オス 1 個体、メス 3 個体）を 5 月 11 日、2021 年度に採取された有明産天然貝（メス 3 個体）および有明産人工貝を 6 月 9 日にそれぞれ水産技術研究所南勢庁舎の筏から取り上げ、宅配便で百島庁舎に移送した。百島庁舎では瀬戸内海産タイラギと同条件で 12 月まで給餌飼育し、人工産卵誘発に供した。種苗生産では遺伝的多様性確保の観点から天然貝を使用することが望ましいが、今年度は有明産天然貝のオスが 1 個体のみであったことから、6 月 10 日の産卵誘発は有明産人工貝のオス 4 個体を加えて実施した。しかし、放精・放卵が生じなかったため、オスの人工貝を順次追加し、6 月 14 日と 17 日の産卵誘発にはそれぞれ 14 個体および 23 個体を供試した。また、6 月 17 日にはメスの人工貝 10 個体も併せて供試した。

6月10日の産卵誘発では精巣破碎液作成のために有明産人工貝2個体分の生鮮精巣24.4g(9.8g、14.6g)を使用した。有明海産タイラギの供試個体数を減らしてしまう懸念から、6月14日と17日の産卵誘発では瀬戸内産天然貝の生鮮精巣をそれぞれ1個体分使用した(6月14日19.3g、6月17日28.2g)。また、8月31日の産卵誘発では給餌飼育中に死亡した有明産人工貝から摘出し-80℃で凍結保存していた3個体分の精巣20.4gを使用した。精巣破碎液を用いた産卵誘発および受精卵回収とふ化水槽への収容は瀬戸内海産タイラギと同様の手順で行った。

【成果の概要】

産卵誘発の結果を表1および表2に示した。瀬戸内海産タイラギでは1回目の産卵誘発で受精卵を得られたが、有明海産タイラギでは人工貝を順次増やして3回目の産卵誘発で受精卵を得ることができた。3回目の産卵誘発における有明産天然貝の放精・放卵個体数は人工貝のそれに比べると極めて少なかった。産卵誘発に供した有明産天然貝は、水産技術研究所南勢庁舎の筏(三重県五ヶ所湾)で1年前から2021年5月まで垂下飼育されていた個体と、2021年1月に佐賀県沖で採集された個体を含み、後者は2月から4月4日まで広島県尾道市向島町地先で垂下飼育した後に成熟促進のため6月9日まで南勢庁舎の筏に移されたものである。垂下飼育開始時に前者は8個体、後者は15個体であったが、垂下飼育中に死亡が多発し、産卵誘発の段階ではそれぞれ4個体と3個体に減耗していた。一方、人工貝は2020年1月頃から2020年4月5日まで百島庁舎の実験池で垂下飼育した後に成熟促進のため6月9日まで南勢庁舎の筏に移されたもので、2021年1月以降の垂下飼育では死亡はほぼ発生しなかった。これらの状況から、今年度の産卵誘発に用いた有明産天然貝は2021年初頭の段階で衰弱状態にある個体が多かったと考えられ、春から初夏にかけての性成熟に投資する十分なエネルギー蓄積が成されていなかった可能性がある。

放精は、瀬戸内海産タイラギ、有明海産タイラギのどちらにおいても精巣破碎液への浸漬開始約1時間後に始まった。オスの放精開始後30分から1時間ほどでメスが放卵を開始した。5月および6月に実施した産卵誘発では、瀬戸内海産タイラギから約2億粒、有明海産タイラギから約2.5億粒の卵を得た。ふ化用水槽で観察したふ化率(正常発生胚の出現率)に基づくと正常発生胚がそれぞれ約1.54億個体、約1.83億個体得られたことになり、種苗生産に用いる卵としては充分量であると言える。

8月末に実施した産卵誘発には、5月および6月の産卵誘発後に陸上水槽で給餌飼育した個体を供試した。陸上水槽での飼育日数は、瀬戸内海産タイラギが89日、有明産天然貝の一部が109日、有明産天然貝の残り一部と人工貝が81日であった。瀬戸内海産タイラギでは一部のメスが放卵したが、オスの放精は見られず、受精卵を得られなかった。有明海産タイラギでは、人工貝のオス全個体が放精し、天然貝と人工貝のメス各1個体が放卵した。8月31日に放精・放卵した人工貝は6月17日の産卵誘発でも放精・放卵した個体であったが、天然貝のメスは6月17日に放卵していない個体であった。また、この時得られた浮遊

幼生を飼育した結果、8,688 個体の着底稚貝が得られた。これらの結果から、産卵誘発によって一度放精・放卵させた個体であっても、18～20℃を維持して給餌飼育することで最大 2 ヶ月程度は採卵可能な状態を維持できるものと考えられた。しかし、給餌飼育中の生残率が低い点、有明海産、瀬戸内海産ともに天然貝の放精・放卵率が著しく低下する点については課題が残った。

【次年度に向けた提言】

今年度、有明海産タイラギにおいては、成熟促進時の生残や産卵誘発時の放精・放卵率、給餌飼育後の産卵誘発成功率は、天然貝よりも人工貝の方が高い傾向が見られた。それぞれの個体で由来や飼育履歴が異なるため原因の特定は不可能であるが、人工貝は 2018 年度の群採卵によって生産され、全個体が同じ飼育環境を経験していることから、各個体が同様に充分量のエネルギーを蓄えており、それによって 6 月および 8 月の放精・放卵をすることができたものと推察される。タイラギ類の性成熟期前後における蓄積エネルギー量と生残および生殖腺発達の関係、また放精・放卵発生率との関連性は不明なことが多い。塚本ら（2005）はタイラギの閉殻筋のグリコーゲン含量が生殖腺の発達と密接に関係することから、産卵誘発による受精卵獲得技術の安定化を図るためには、閉殻筋に着目した蓄積エネルギー量のモニタリング手法等を検討する必要がある。

また、今年度から、本課題の担当者が代わったものの、精巣破碎液を用いた産卵誘発法によって充分量の受精卵を得ることができた。このことから、本手法は採卵技術として安定度の高いものであると思われる。今後、様々な海域で飼育した親貝を用いて本手法による試行を重ねることでタイラギ類の種苗生産における採卵技術としての安定性評価を行い、普及を図るための要点整理を行う必要がある。

【参考文献】

Hashimoto K, Yamada K, Nagae A, Matsuyama Y (2018) Lineage specific detection of the scaly form of the pen shell *Atrina* spp. by a loop-mediated isothermal amplification method. Fisheries Science. 84: 837–848

Hashimoto K, Yamada K, Sekino M, Kobayashi M, Sasaki T, Fujinami Y, Yamamoto M, Choi KS, Henmi Y (2021) Population genetic structure of the pen shell *Atrina pectinata sensu lato* (Bivalvia: Pinnidae) throughout East Asia. Regional Studies in Marine Science. 48 (doi: <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.102024>)

塚本達也・前野幸男・松井繁明・吉岡直樹・渡辺康憲（2005）タイラギの性成熟と各種組織におけるグリコーゲン量との関係．水産増殖． 53 (4): 397–404

【図表】

表 1. 令和 3 年度における瀬戸内海産タイラギを用いた産卵誘発試験結果

産卵誘発日	供試個体数（うち、放精・放卵個体数）		採卵数 (万粒)	ふ化率※ (%)
	オス	メス		
5月27日	9 (4)	20 (11)	19,446	79.1
8月27日	2 (0)	7 (3)	0	-

※ ふ化水槽で浮上した胚のうち、正常発生胚と認めた数に基づく

表 2. 令和 3 年度における有明海産タイラギを用いた産卵誘発試験結果

産卵誘発日	供試個体数（うち、放精・放卵個体数）				採卵数 （万粒）	ふ化率※ （％）
	天然貝		人工貝			
	オス	メス	オス	メス		
6月10日	1 (0)	6 (0)	4 (0)	0 (-)	0	-
6月14日	1 (0)	6 (0)	14 (5)	0 (-)	0	-
6月17日	1 (0)	5 (1)	23 (21)	10 (8)	25,940	70.5
8月31日	0 (-)	2 (1)	5 (5)	3 (1)	7,188	51.2

※ ふ化水槽で浮上した胚のうち、正常発生胚と認めた数に基づく

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（RA）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。人工受精の際の RA 処理濃度は 1 μ M に設定しているが、さらに処理濃度を低減できるかを検討した。

【研究方法】

人工受精には 2018 年 3 月からと 2021 年 3 月から五ヶ所湾で垂下飼育していた香川県産有鱗型タイラギを使用した。人工受精は 2021 年 5 月 19 日、6 月 15 日、7 月 13 日の 3 回行った。各回ともメス 3 個体をサンプリングし、生殖巣の一部を固定して組織観察した。各個体からコラゲナーゼ処理して得られた単離卵を 3 等分し、それぞれ RA 濃度 1、0.1、0.01 μ M で処理後洗卵して媒精した。得られた受精卵は 5L あるいは 500mL ビーカーに収容し、翌朝孵化率を算出した。

【研究成果の概要】

使用した親貝は生殖巣の組織観察から5月19日と6月15日は産卵盛期、7月13日は産卵終期にあると考えられ、IOVはそれぞれ41-61、41-57、20-23であった(図1左)。メス1個体から、3~8gの卵巢片を切り出し4~49万粒の卵をRA処理した。5月19日と6月15日はメス3個体中2個体でRA濃度1 μ Mと0.1 μ Mの孵化率が同程度だったが、残り1個体は0.1 μ Mの孵化率が低かった(図1右)。7月13日はRA濃度1 μ Mと0.1 μ Mの孵化率が同程度なのはメス3個体中1個体だった。産卵盛期の個体を使用することによりRA処理濃度を低減できる可能性がある。

【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。産卵盛期の個体を使用すれば、より低濃度の0.1 μ Mで人工受精を行っても概ね1 μ Mと同等の孵化率が得られることが期待できる。一方で孵化率が低い個体もあり、これはGVBD率の違いに起因すると考えられる。産卵盛期にある個体の中でも、RAに対する反応性の高い親貝を選ぶことによりRA処理濃度を低減できると考えられる。

【図表】

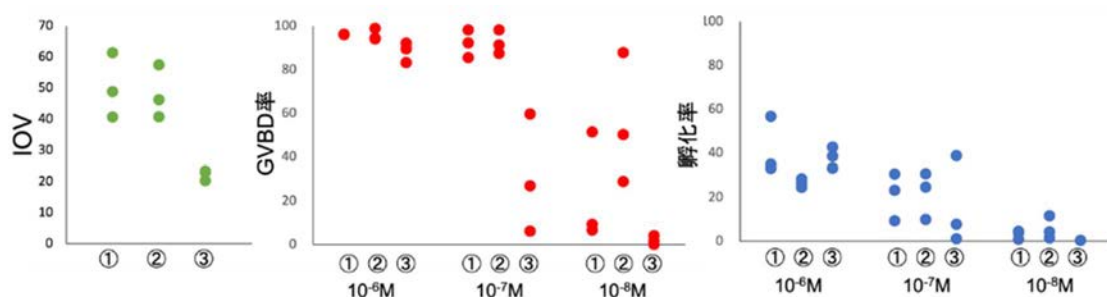


図1. 人工受精におけるRA濃度検討。①2021年5月19日、②6月15日、③7月13日に試験した親貝のIOV(左)、GVBD率(中央)、孵化率(右)

4) 関連技術開発

【目的】

タイラギの受精卵を得る方法は①産卵誘発刺激による採卵と②切開法を用いた人工受精による採卵がある。効率的に採卵を行うには、十分成熟した親貝を用いる必要があるが、現在用いられている成熟指標は、IOVや組織切片観察など、個体を解剖して得られる方法が主である。本課題では、親貝を解剖せずに成熟状態(卵の状態)を判定する指標を探索するため

に、親貝の卵巣や卵の状態と、人工受精で得られる D 型幼生の正常発生率との関係を調べて、卵質の評価指標となる要素について検討した。

【研究方法】

本課題では、高松産天然貝を用いて切開法による人工受精を行い、各メス個体について次の項目を調査した。①個体の生理状態を反映する要素として、貝柱指数、IOV、卵巣の組織切片像を、②卵質を反映する要素として、単離卵の RA 処理(RA 濃度 1、0.1、0.01 μ M)による GVBD 誘起率、幼生のふ化率、幼生の正常発生率を、③卵巣の生体成分として、7 個の遺伝子の発現量をそれぞれ調べた(表 3)。なお、③で対象とした遺伝子は、タイラギ卵巣の RNA-seq データとズベタイラギのゲノム情報(横浜庁舎關野氏提供)を参照し、異なる成熟段階で有意に発現量に差があり、かつ、成熟段階に相関して遺伝子発現量が増加するという条件を満たす遺伝子を選択した。その後、各項目同士の相関係数を求め、幼生のふ化率および正常発生率と相関係数が高い遺伝子について調べた。また、各項目の数値に基づいて階層的クラスタ解析を実施して、サンプルの分類を行ったのち、各クラスタにおける遺伝子発現量の特徴を調べて、卵質の評価指標として有用と考えられる遺伝子について検討した。人工受精は 2021 年 4 月から 8 月までの間に 8 回実施した。

【研究成果の概要】

試験に用いたメス個体の IOV の推移は、最小値が 11.5(8/4)、最大値が 55.1(5/25)、中央値が 31.5(4/21)であった。また、卵巣の組織切片像の観察により、成長初期から退行期までの各成熟段階を示す個体が確認された。当初計画では D 型幼生の正常発生率を調べる予定だったが、D 型幼生に変態する割合が顕著に少なかったため、ふ化幼生の正常発生率を調査項目として採用した。各項目同士の相関係数を図 2 に示した。幼生のふ化率および正常発生率と相関がある遺伝子(相関係数 >0.5 を満たす遺伝子)として、それぞれ ELL1 および RETST、SLC7A4I、ELL1 が該当した。特に、両項目に相関を持つ遺伝子として、ELL1 が共通して該当した。一方、これらの項目を併せて解析に用いることで親貝の状態をより正確に反映できると考え、階層的クラスタ解析を実施したところ、メス個体は 5 つのクラスタ(C1-C5)に分類されることが示唆された(図 3)。このうち、IOV、RA 処理による GVBD 率、ふ化率、および正常発生率の平均値は C2 で最も高く、C2 は卵質の良い卵を持つ親貝が属するクラスタであると考えられた。また、クラスタごとの各遺伝子の発現量を調べたところ、NEK2IX2 以外の 6 個において、C2 で最も高い発現量を示す傾向が見られた(図 4)。特に、NEK2X2 と ELL1 においては、クラスタ間で統計的に有意な差が見られた。しかし、C2 のみで有意に高い発現量を示す遺伝子は見つからなかったため、候補遺伝子の選択条件を変更して、再度検討する必要があると考えられた。

【次年度に向けた提言】

本課題において、卵質の評価指標の候補として 7 個の遺伝子を調べた結果、幼生のふ化率および正常発生率に相関を持ち、卵質の良い卵を持つ親貝において発現量が高い傾向にある遺伝子として、ELL1 が該当した。当該遺伝子の卵質の評価指標としての有用性を確認するために、昨年度の事業成果で確立したバイオペシー操作を用いて、採卵前の親貝から卵を採取して遺伝子測定用の試料を調整し、その後人工受精または産卵誘発刺激により採卵することで、同じ親貝由来の卵における ELL1 の発現量と幼生のふ化率や正常発生率との関係を調べる必要がある。また、複数の遺伝子を実験指標として用いることができれば、より精度の高い評価が可能になると考えられるため、候補となる遺伝子を選択する条件を変更して、評価指標となりうる遺伝子の探索を再度実施する必要がある。

【図表】

表 3. 卵質の評価指標として検討された遺伝子

遺伝子名	アノテーション
NEK2X2	serine/threonine-protein kinase Nek2 isoform X2
RETST	putative all-trans-retinol 13,14-reductase
CYCBX3	G2/mitotic-specific cyclin-B isoform X3
NEK2IX2	serine/threonine-protein kinase Nek2-like isoform X2
SLC7A4I	cationic amino acid transporter 4-like
ELL1	RNA polymerase II elongation factor ELL-like
CDKL1X2	cyclin-dependent kinase-like 1 isoform X2

	IOV	貝柱 指数	GVBD率 (RA0)	GVBD率 (RA10 ⁻⁶)	GVBD率 (RA10 ⁻⁷)	GVBD率 (RA10 ⁻⁸)	ふ化率	正常 幼生率	NEK2X2	RETST	CYCBX3	NEK2IX2	SLC7A4I	ELL1	CDKL1X2
IOV	1.00	0.71	-0.37	0.35	0.42	0.23	-0.02	0.34	0.48	0.64	0.77	0.66	0.66	0.50	0.65
貝柱指数		1.00	-0.27	0.71	0.53	0.47	0.37	0.56	0.62	0.79	0.69	0.76	0.83	0.76	0.77
GVBD率(RA0)			1.00	0.14	-0.05	0.03	-0.14	0.10	-0.23	-0.13	-0.25	-0.31	-0.19	-0.09	-0.33
GVBD率(RA10 ⁻⁶)				1.00	0.76	0.44	0.48	0.67	0.43	0.52	0.34	0.37	0.49	0.56	0.36
GVBD率(RA10 ⁻⁷)					1.00	0.63	0.34	0.50	0.63	0.53	0.49	0.31	0.53	0.60	0.41
GVBD率(RA10 ⁻⁸)						1.00	0.31	0.29	0.48	0.47	0.43	0.24	0.52	0.64	0.51
ふ化率							1.00	0.74	0.29	0.40	0.13	0.13	0.30	0.56	0.45
正常幼生率								1.00	0.38	0.55	0.34	0.37	0.51	0.66	0.50
NEK2X2									1.00	0.78	0.64	0.72	0.70	0.79	0.77
RETST										1.00	0.75	0.84	0.88	0.87	0.85
CYCBX3											1.00	0.70	0.73	0.82	0.72
NEK2IX2												1.00	0.82	0.76	0.79
SLC7A4I													1.00	0.79	0.80
ELL1														1.00	0.83
CDKL1X2															1.00

図 2. 各調査項目同士の相関係数

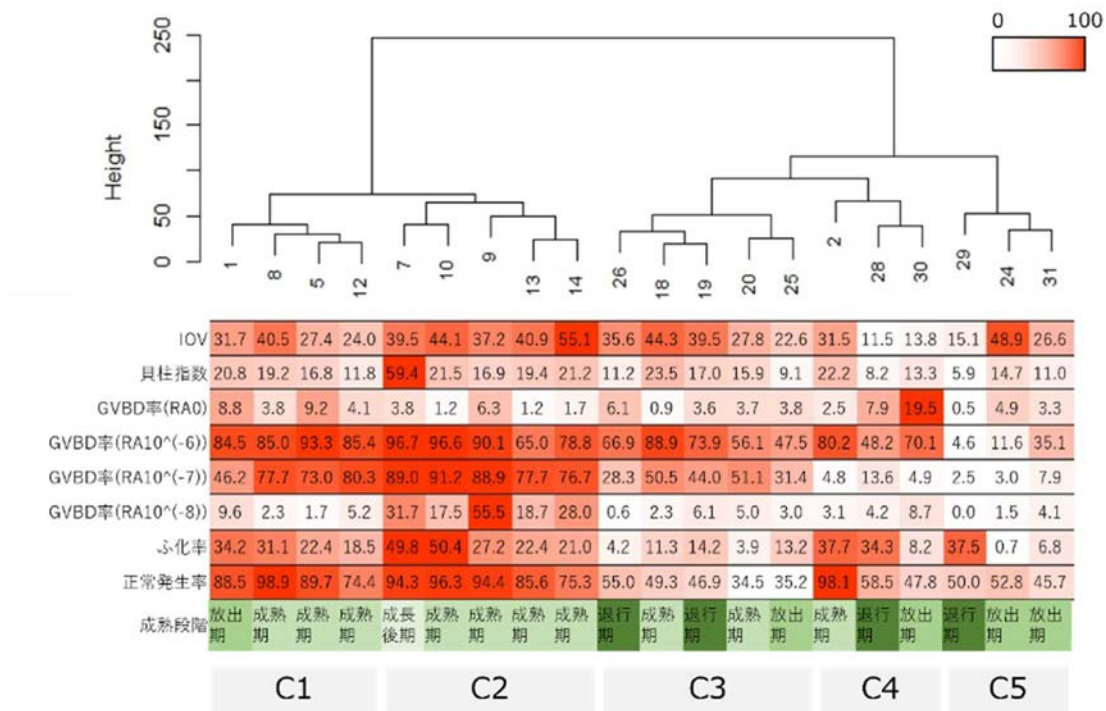


図3. 階層的クラスター解析

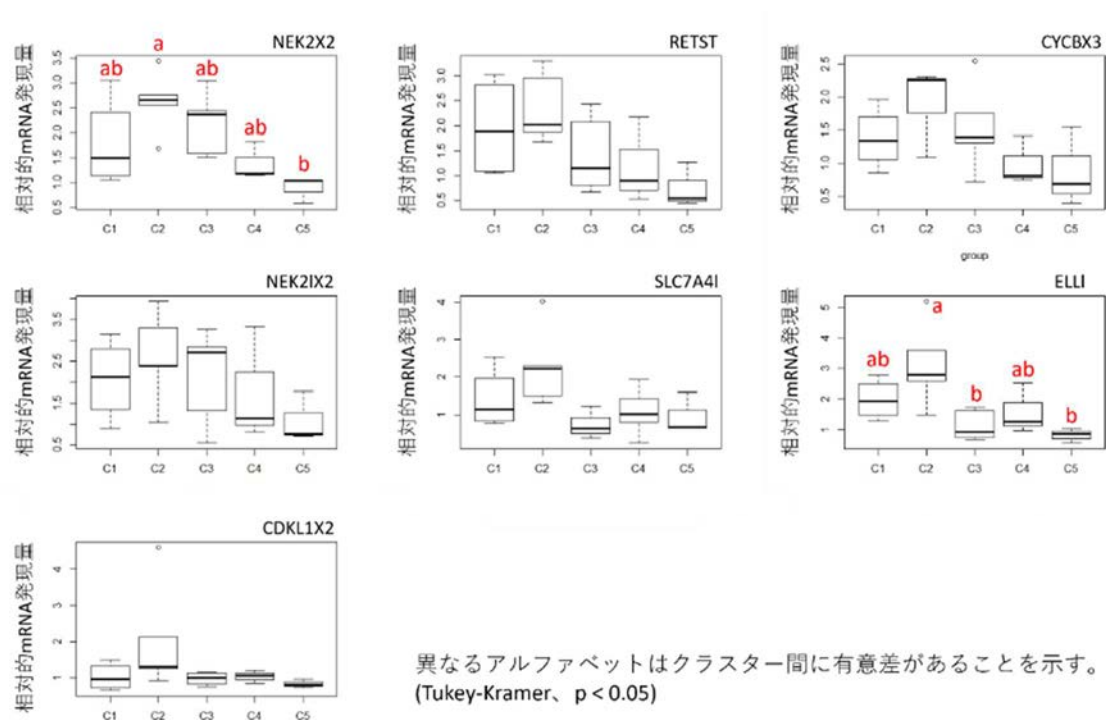


図4. 各クラスターにおける遺伝子発現量の変化