

令和4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5年3月

目 次

はじめに	1
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
② ハマグリ親貝の養成と採卵技術の開発 - 1	20
- 2	29
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	35
② ハマグリ人工種苗生産技術の開発 - 1	41
- 2	45
- 3	50
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	57
② 瀬戸内海西部海域におけるタイラギ育成技術の開発	67
③ 東京湾におけるハマグリ育成技術の開発	73
④ 伊勢湾におけるハマグリ育成技術の開発	78
⑤ 餌料源分析を通じたハマグリ育成技術の開発	87
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	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	105
③ 三河湾におけるハマグリ母貝団地造成技術の開発	111
④ 伊勢湾におけるハマグリ母貝団地造成技術の開発	122
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	129
オ. 優良人工種苗作出のための親貝選抜技術の開発	137
カ. 検討会の開催	
① 検討会の開催	152
② 現地検討会の開催	156

別添資料（DVD：会議資料および発表プレゼン）

第1回検討会および第2回検討会

現地検討会（貝種別検討会タイラギグループ・ハマグリグループ）

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2mm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）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 による種判別技術を開発する。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。また、タイラギについて、人工種苗の遺伝的多様性損失リスクの有無に関する知見を蓄積するために、種苗の生残・成長に関する家系間（親間）の差異を検討する。

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、三重県水産振興事業団

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、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 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. 優良人工種苗作出のための親貝選抜技術の開発

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

【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に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。産卵誘発剤の投与による採卵方法を検討する。また、親貝の卵巣や卵の状態と、人工受精で得られる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、三重県水産振興事業団

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、給餌量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、三重県水産振興事業団

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1cm程度の稚貝を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

得られた人工種苗を、陸上水槽でのブラウンウォーター（クルマエビの飼育水等、植物プランクトンが豊富に含まれる海水）給餌等による飼育や、天然海域における垂下飼育等により、放流サイズまで育成する飼育技術を開発する。

⑤ 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．優良人工種苗作出のための親貝選抜技術の開発

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

タイラギの優良人工種苗作出に資するため、一塩基多型解析によるタイラギの親子判別技術を確立し、生残・成長等の重要形質について、人工種苗の家系間の差異を調べる。

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

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・船山 翔平

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。産卵誘発剤の投与による採卵方法を検討した。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。早期に採卵するために親貝を瀬戸内海よりも水温の高い三重県五ヶ所湾で養成し、採卵可能になる積算水温について検討することを目的とする。

【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、2022年3月から採卵直前の2022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、2022年に熊本県で採集採取された個体（以降、有明海産天然貝と呼ぶ）を2022年4月から採卵直前の2022年6月まで五ヶ所湾で垂下飼育によって養成した。

垂下飼育中の水温を測定し、4～5月には雌雄を判別した。

【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し4月末に雌雄判別した（メス18オス15雌雄同体1）。5月23日以降五ヶ所湾の水温が上昇したため5月30日に水産技術研究所百島庁舎へ送付し、6月1日に採卵した。採卵日までの積算温度は2169℃・日であった。

有明海産天然貝は、生殖腺の発達状況を確認し5月に雌雄判別した（メス19オス20雌雄同体1）。6月6日に百島庁舎へ送付し（メス17オス18雌雄同体1、雌雄2個体ずつ死亡）6月8日に採卵した。採卵日までの積算温度は2236℃・日であった。

【次年度に向けた提言】

今年度の高松産天然貝と有明海産天然貝の採卵結果から、概ね積算温度 2200℃・日が早期採卵の目安になりうると考えられた。今年度高松産天然貝の採卵を 2200℃・日よりやや手前で行ったのは、5 月 23 日に 21℃であった五ヶ所湾の水温が 25 日に 23℃まで上昇し、26 日の大雨の後 27 日以降は晴天予報であり、垂下飼育中に自然産卵が起こることを危惧したためである。

2019 年から有明海産の天然貝を養成しているが、2019、2020、2021 年の飼育開始時と採卵時に生存していた個体数は、それぞれ 77 と 16 個体、125 と 78 個体、12 と 3 個体であり、毎年飼育中に大量に死んでいる。一方今年度垂下飼育した天然貝では、飼育開始時の 40 個体から採卵時まで 4 個体の死亡があったのみで大量死はみられなかった。昨年度飼育した人工種苗個体では雌雄判別時に雌雄を確認できた 47 個体中、採卵時に 39 個体が生存しており、大量死はみられなかったことから五ヶ所湾での垂下飼育開始前の生息環境の違いによるのかもしれないことが示唆された。今年度の有明産天然貝は 2019～2021 年の貝とは採集場所が異なっていたことから、好適な生息環境であった可能性がある。

2) 採卵

【目的】

瀬戸内海産タイラギと有明海産タイラギを用いて、精巣破砕物の懸濁液（以下、精巣破砕液）および産卵誘発剤の投与による人工産卵誘発を行い、それぞれの誘発刺激に対するオスとメスの反応率（放精・放卵）や採卵数、ふ化率などを調べて、それぞれの産卵誘発方法の有効性について検討することを目的とする。

【方法】

Hashimoto et al. (2021)は、有明海のタイラギ類にはミトコンドリア DNA によって異なる 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）が含まれており、瀬戸内海の備讃瀬戸海域ではそれらに加えて Lineage 6（以下、L6 系統：俗に「蒲江タイラギ」と称する）が検出されることを報告した。本事業における技術開発はリシケタイラギを材料として進められてきたことから、今年度の採卵に用いた親貝も南勢庁舎での養成飼育開始前 LAMP (loop-mediate isothermal amplification) 法によるミトコンドリア系統判別を行い (Hashimoto et al. 2018)、L2 系統と判別された個体をリシケタイラギ、L1 系統と判別された個体をズベタイラギとして扱った。現在、LAMP 法による L6 系統の検出はできないため、L6 系統の判別は行わなかった。

瀬戸内海産タイラギに対する人工産卵誘発は、日時と誘発方法を変えて計 6 回、水産技術研究所百島庁舎にて実施した（表 1）。採卵用親貝には、2022 年 1 月 25 日に香川県丸亀市沖（手島北部海域）で漁獲されたリシケタイラギ（有鱗型）とズベタイラギ（無鱗型）

を用いた。ズベタイラギはリシケタイラギ用に開発された産卵誘発ペプチド (Funayama et al., 2022) の有効性を確認するために使用した。リシケタイラギ 33 個体 (輸送時の性: オス 14 個体、メス 18 個体、雌雄同体 1 個体) は 5 月 30 日に水産技術研究所南勢庁舎の筏から取り上げて宅配便で百島庁舎に移送した。5 月 31 日、到着時の箱内水温は 20.0℃であった。オス 2 個体とメス 4 個体が輸送中に放精・放卵していたため、それらは砂ろ過海水をかけ流した水槽で 5 時間程静置して放精・放卵が継続していないことを確認後、他の 28 個体とともに 18℃に設定した親貝飼育水槽 (1,500 L 角型 FRP 水槽) に収容した。ズベタイラギ 13 個体 (オス 5 個体、メス 8 個体) は香川県水産試験場の小割筏で垂下飼育していたものを 7 月 4 日から 5 日にかけて百島庁舎に移送し、リシケタイラギを飼育している親貝水槽に収容した。

人工産卵誘発は、百島庁舎で従来行われてきた破碎精巢の懸濁水に親貝を浸漬する方法 (以下、精巢破碎法; 松本・小島 (2019)、小島ら (2022)) のほか、一部の供試個体のみに産卵誘発ペプチドを注射して放精させることで精子懸濁海水を作成する方法 (以下、一部注射法)、雌雄の供試個体すべてに産卵誘発ペプチドを注射して放精・放卵させる方法 (以下、全個体注射法) の 3 通り実施した。精巢破碎法では、精巢を採取したオス 1 個体について殻および軟体部の各部位を測定してから精巢塊を摘出し、中腸腺を除去した後解剖鉗で細かく裁断した精巢を目合い 17 μm のプランクトンネットに包んで 1L の砂ろ過海水中で揉むことにより精巢破碎液を作成した。0.2 μm 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) 200 L をポリカーボネート製 500L アルテミアふ化槽に入れ、水槽内に供試個体を設置した後に精巢破碎液を投入して放精・放卵を誘発した。一部注射法では、清浄海水 200 L を入れたポリカーボネート製 500L アルテミアふ化槽に供試個体を設置し、その中のオス 2 ないし 4 個体 (一部の試行ではオスに加えてメス 2 ないし 4 個体: 表 1) の閉殻筋に産卵誘発ペプチドを注射した。放精を確認したら清浄海水 300L を追加して 500 L 中で放精・放卵を継続させた。全個体注射法は全供試個体に産卵誘発ペプチドを注射する点以外、一部注射法と同様の手順で行った。受精卵の回収は 105 μm と 17 μm のプランクトンネットで行い、卵数を計数した後、25℃の清浄海水を入れた 1,500L 角型 FRP 水槽または 500L 黒色ポリカーボネート水槽をふ化用水槽として上限密度 33 個/mL になるように収容した。ふ化用水槽には受精卵収容と同時に *Pavlova lutheri* を 5,000cells/ml になるように添加した。得られた浮遊幼生は課題イ-①に供試した。産卵誘発試験に用いた親貝は砂ろ過海水を掛け流した 1,000L 角形水槽に収容し、18~20℃を維持しながら *Pavlova lutheri*、*Isochrysis* sp. (Tahiti 株)、または *Chaetoceros neogracile* を給餌して 12 月まで飼育した。

なお、6 月 1 日の採卵に使用したリシケタイラギの閉殻筋から血リンパを採取し、課題オに供試した。

有明海産タイラギへの人工産卵誘発は百島庁舎において 2 回行い、2022 年 6 月 8 日は精巢破碎法、7 月 13 日は一部注射法で実施した (表 2)。採卵用親貝には、2022 年 1 月か

ら2月にかけて熊本県荒尾市地先で採集されたリシケタイラギを使用した。34個体（オス17個体、メス17個体）を6月6日から7日にかけて南勢庁舎から百島庁舎に宅急便で移送した。到着時の箱内水温は19.7℃であり、オス1個体が輸送中に放精していた。親貝飼育水槽への収容、産卵誘発およびその後の飼育は瀬戸内海産タイラギと同様の手順で行った。

【研究成果の概要】

産卵誘発の結果を表1および表2に示した。瀬戸内海産、有明海産タイラギともに、6月における産卵誘発は精巣破碎法、7月と8月は一部注射法、9月と10月は全個体注射法で実施した（有明海産タイラギは8月以降実施せず）。

瀬戸内海産および有明海産リシケタイラギを用いて6月と7月に実施した産卵誘発では、供試個体数に対する反応個体の割合が高く、採卵数は1.5億粒以上であった。瀬戸内海産リシケタイラギでは8月から9月にかけて反応個体数が減少し、それに伴って採卵数は3,700万粒、ふ化率は25%まで減少した。7月と8月に一部注射法による産卵誘発を試みたところ、産卵誘発ペプチドを注射したオスは約10分後に放精を開始し、その時点から30分のうちに他のオスが放精を開始した。メスの放卵はペプチド注射したオスの放精開始後概ね1時間のうちに始まった。7月28日と8月3日の産卵誘発ではペプチド注射した個体はすべて放精・放卵したが、8月31日以降は反応する個体の割合が減少し、特にメスにおいて反応個体が減少する傾向が見られた。これらの結果から、6月から7月にかけての採卵では精巣破碎法を一部注射法に置き換えても精巣破碎法と同様の採卵数を確保でき、精巣採取のために個体を殺す必要がなくなると言える。

瀬戸内海産リシケタイラギに対する8月3日、8月31日、9月1日の産卵誘発では、同一個体を繰り返し使用した。期間中、産卵誘発ペプチドの注射は1個体につき1回限りとし、8月3日に放精・放卵した個体に対して8月31日または9月1日にペプチド注射を行ったところ、放精・放卵し、ふ化幼生が着底稚貝まで育つことを確認した。このことから、誘発時期および経産回数に応じて産卵誘発ペプチドの注射対象をオスからメスに広げていくことで種苗生産のための採卵を安定的に行うことが可能になると考えられる。

9月と10月にかけて全個体注射法によるズベタイラギの産卵誘発を試みたところ、放精・放卵することを確認し、産卵誘発ペプチドがズベタイラギにも適用できることが明らかになった。採卵数、得られた着底稚貝数は極めて少なかったが、これは親貝飼育水槽での飼育期間が7月から2カ月以上経過し、産卵適期から大きく外れたことによると考えられる。

【次年度に向けた提言】

精巣破碎法による産卵誘発では、25℃に設定した採卵水槽での放精・放卵が終息した個体を18℃の水槽に一時的に収容することで放精・放卵をほぼ完全に止めることができている。

る。しかし、産卵誘発ペプチドを注射した個体は採卵水槽での放精・放卵終息後に 18℃水槽に移すことによって再度放精・放卵を始めてしまう現象が多数確認された。これは配偶子を無駄に放出させ、同一個体による複数回採卵の機会を減少させることにつながる。現在、産卵誘発ペプチドは 1μM の溶液 1ml を個体の大小にかかわらず注射している。ペプチドの注射量を調整することで放精・放卵の量や持続時間を調節することが可能になれば、採卵技術の安定度は著しく上昇することが期待される。今後、個体サイズと産卵誘発ペプチドの作用強度の関係について検討する必要がある。

【引用文献】

Funayama S, Matsumoto T, Kodera Y, Awaji M (2022) A novel peptide identified from visceral ganglia induces oocyte maturation, spermatozoa active motility, and spawning in the pen shell *Atrina pectinata*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 598: 9-14

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>)

松本才絵・小島大輔 (2019) 3-3-4 百島庁舎における採卵. タイラギ種苗生産・養殖ガイドブック. 国立研究開発法人水産研究・教育機構. pp. 27-28

小島大輔・前田 雪・井上俊介・兼松正衛・伊藤 篤・山崎英樹・淡路雅彦・橋本和正・西本篤史 (2022) 陸上養成期間の給餌量がタイラギの成熟、栄養状態、産卵、幼生サイズに及ぼす影響. 水産技術, 15 (1): 7-15

3) 産卵誘発剤の投与による採卵

【目的】

タイラギ内臓神経節から発見したペプチドは、卵成熟誘起活性と精子運動の活性化を持ち、このペプチドを個体に投与することにより放卵・放精が誘発されることが明らかになっている。そこで、このペプチドを用いた効率的な採卵方法について検討するために、どのような親貝から採卵可能か、投与後の反応時間、メス個体ごとに得られる卵数、受精率、孵化率を調べる。

【研究方法】

採卵試験には 2022 年に漁獲され、2022 年 2 月から五ヶ所湾で垂下飼育した香川県産有

鱗型タイラギを使用した。採卵試験は6回行い、毎回ペプチドを投与しないコントロール試験とペプチド投与試験を行なった。試験を行った日は次の通り（コントロール、投与試験の順）。1回目は2022年4月11日、12日、2回目は4月25日、26日、3回目は5月9日、10日、4回目は5月31日、6月1日、5回目は7月4日、6日、6回目は7月29日、28日。コントロール試験では、雌雄3個体ずつにペプチドを含まない溶媒（塩類溶液）のみを注射し、2時間経過観察し放卵放精がないことを確認後サンプリングし、生殖腺指数（以下 IOV）を算出、生殖巣の一部を固定して組織観察した。ペプチド投与試験では、殻サイズ、全重量を測定後、塩類溶液に溶解し 1 μ M に調製したペプチド 1mL/個体を閉殻筋に注射した。放卵放精を開始した時間を記録するとともに、メス個体ごとに産卵数を計測し 1 個体当たり 5 万粒を媒精に用いた。オスの放精海水は 1 個体あたり 100mL ずつ採り、全個体分混合して媒精に用いた。媒精後洗卵して得られた受精卵は 500mL ビーカーに収容し 25°C でインキュベートした。受精 3 時間後に沈殿している卵を一部回収し受精率を計数し、翌朝孵化率を算出した。

【研究成果の概要】

コントロール試験においては放卵放精は認められなかった。IOV は、1 および 2 回目は 14~23、3 回目は増加して 23~32、4 および 5 回目は 14~52、6 回目は減少して 7~10 であった（図 1）。生殖巣の組織観察から 1~3 回目は成熟期、4 回目は放出期の個体がみられるようになり、6 回目は全ての個体が放出期であり（図 1）産卵終期にあると考えられた。

ペプチド投与試験では、ペプチド投与により使用した全オス個体が放精、メスは 1 および 3 回目を除いて（1 回目は 3/5 個体、3 回目は 4/5 個体が放卵）全個体が放卵した。雌雄ともに回を重ねるごとに反応時間は短くなり、オスでは 20 分以内に放精、メスでは 30 分程度で放卵を開始した（図 2）。生殖巣内に精子あるいは十分発達した卵母細胞がある期間であれば、どの親貝からもペプチド投与により 1 時間以内に採卵可能であるとわかった。

産卵数は 4 回目が最も多く、5 回目はそれより少なく、6 回目は 5 回目に比べて多い個体も少ない個体もあった（図 3）。5 回目の IOV は、有意差はないが 6 回目のそれよりも高い。組織観察からも IOV の高い個体の方が卵巣内の卵数は多いと考えられるが、放卵数はペプチドが作用したときそれに反応できる卵数であり、単純に卵巣内に卵が多く存在するから放卵数が多くなるということではないようだ。受精率は試験期間を通じてほぼ 100% であり、孵化率は 30~70% であった（図 3）。ペプチド投与により得られた卵は受精するが、孵化する卵の割合は異なると考えられる。

【次年度に向けた提言】

産卵期に入ったと考えられる 4 月から試験を行い、ほぼ全ての個体がペプチドに反応して産卵した。これまでは、産卵する個体数を増やすため IOV の高い時期に採卵を行なっ

てきた。6 回目のような IOV が低いと考えられる個体からは採卵できない場合が多かったが、そのような親貝を使ってもペプチド投与すれば種苗生産が可能になった。今後は生産効率の高い卵を選別する技術が必要である。

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、親貝の卵巢や卵の状態と、人工受精で得られる受精卵のふ化率、幼生の正常発生率との関係を調べるとともに、卵巢の生体成分として、7 個の遺伝子の発現量を調べて、卵質の評価指標となる要素について検討する。

【研究方法】

本課題では、まず、高松産天然貝を用いて切開法による人工受精(Awaji et al., 2018)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、卵巢の組織切片像を、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、幼生の孵化率、幼生の正常発生率を、③卵巢の生体成分として、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、タイラギ卵巢の RNA-seq データとズベタイラギのゲノム情報(横浜市倉岡野氏提供)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、各項目の数値に基づいて階層クラスター解析を実施して、サンプルの分類を行ったのち、各クラスターにおける各候補遺伝子の発現量を調べて、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 2022 年 4 月から 6 月までの間に 4 回実施し、昨年度得られた結果と併せて解析に用いた。

次に、事前に採取した卵巢組織を用いて卵質の評価指標となる要素について検討するために、6/23 および 8/8 に産卵誘発ペプチド(以下 SIP)投与試験を行った。この試験では、タイラギ雌雄それぞれに SIP 投与を行い、全オスの放出した精子を混合して各メスの放出した卵に媒精し、個体別に放卵数、幼生の孵化率、および正常発生率を調べた。また、事前にバイオブシーで採取した卵巢組織から RNA を抽出し、上述の 7 個の候補遺伝子について発現量を調べ、放卵数、幼生の孵化率、および正常発生率との関係を調べた。なお、6/23 の試験では、バイオブシーに加えて血リンパ液(約 1 ml)も併せて採取した。また、両試験日において、ネガティブコントロールとして BSS 投与区を設定した。SIP 投与試験の方法は 3) 産卵誘発剤の投与による採卵の研究 방법에記載の内容に従って実施した。

【研究成果の概要】

人工受精試験に用いたメス個体の IOV の推移は、最小値が 10.1(4/12)、最大値が 43.3(6/6)、中央値が 21.6(4/27)であった。また、卵巣の組織切片像の観察により、成長初期から放出期までの各成熟段階を示す個体が確認された。各項目の結果を用いた階層クラスター解析を実施したところ、メス個体は 5 つのクラスター(C1-C5)に分類されることが示唆された(図 4)。このうち、IOV、RA 処理による GVBD 率、孵化率、および正常発生率の平均値が C2 で最も高かったことから、C2 は卵質の良い卵を持つ親貝が属するクラスターであると考えられた。クラスターごとの各遺伝子の発現量を調べたところ、NEK2X2 と ELL1 において、C2 で有意に発現量が高い結果となった(図 5)。このことから、NEK2X2 と ELL1 は卵質の評価指標となる遺伝子として有力であると考えられた。

SIP 投与試験においては、6/23 の試行では BSS 投与区に 4 個体のメスを、SIP 投与群に 4 個体のメスと 3 個体のオスを用意した。溶媒および SIP 投与の結果、BSS 投与区で 1 個体、SIP 投与区で 4 個体(メス 2 個体、オス 2 個体)が投与後に配偶子を放出した。組織切片観察の結果、事前の雌雄判別でメスと判定されていたが、配偶子を放出したメス 3 個体のうち 2 個体(BSS 投与区 1 個体、SIP 投与区 1 個体)が雌雄同体であったため、当初予定していた解析は実施不可能だった。また、SIP 投与で配偶子を放出しなかった個体の IOV は 36.6 と 27.9 であり、通常であれば SIP 投与で配偶子を放出しうる状態と考えられた。このことから、事前の血リンパ液採取によって SIP 反応性が低下した可能性が考えられたため、次の試行では血リンパ液の採取を行わないこととした。8/8 の試行では、BSS 投与区に 3 個体のメスを、SIP 投与区に 4 個体のメスと 3 個体のオスを用意した。SIP 投与の結果、BSS 投与区では配偶子の放出は見られず、SIP 投与区では全個体が配偶子を放出した。各メス個体から得られた放卵数、幼生の孵化率、正常発生率と各遺伝子の発現量の相関係数(ピアソンの積率相関係数)を求めた結果、NEK2X2 と RETST で強い正の相関が見られた(図 6、 $p < 0.05$)。一方、放卵数および孵化率と相関係数が高い遺伝子は確認されなかった。以上のことから、事前に採取した卵巣組織を用いた卵質の評価指標となる遺伝子として、NEK2X2 と RETST が有力であると考えられた。

【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、人工受精で得られる幼生においては、NEK2X2 と ELL1 が評価指標として、SIP 投与で得られる幼生においては、NEK2X2 と RETST が評価指標として有力であると考えられた。人工受精では卵の状態に関わらず切り出した卵全てが幼生の作出に使用されるのに対して、SIP 投与では SIP に反応した卵のみが放出されて幼生の作出に使用されるため、指標となる遺伝子の組み合わせに違いが生じたと考えられるが、NEK2X2 が両方法に共通する有力な評価指標遺伝子として見出された。なお、SIP 投与試験においては、解析に用いた個体数が 4 個体と少ない

ため、SIP 投与試験を引き続き実施して、解析個体数を増やすことで当該遺伝子の有用性について調べていく必要がある。また、複数の遺伝子を評価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。

【引用文献】

Awaji, M., Matsumoto, T., Ojima, D., Inoue, S., Suzuki, M., Kanematsu, M., 2018. Oocyte maturation and active motility of spermatozoa are triggered by retinoic acid in pen shell *Atrina pectinata*. Fish. Sci. 84, 535-551.

【図表】

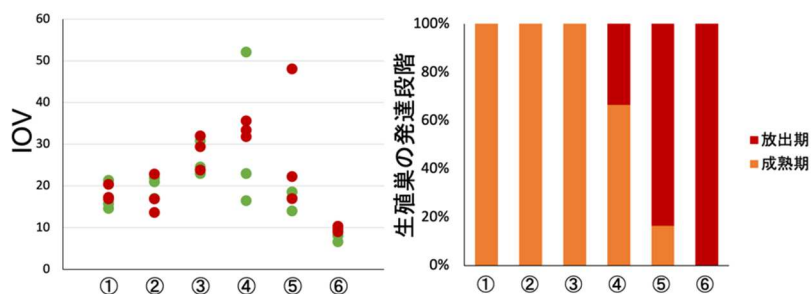


図1 採卵試験におけるコントロール群①2022年4月11日、②4月25日、③5月9日、④5月31日、⑤7月4日、⑥7月29日に試験した親貝の IOV (左) と生殖巣の発達段階 (右)

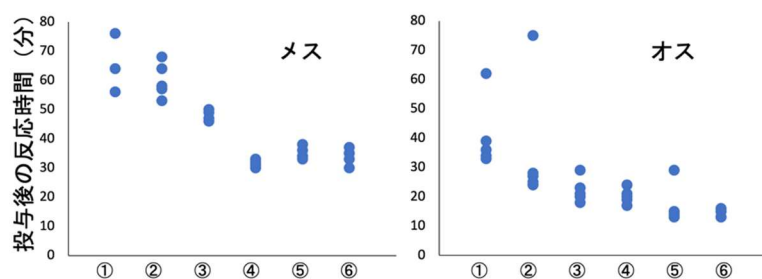


図2 ペプチド投与後の反応時間。①2022年4月12日、②4月26日、③5月10日、④6月1日、⑤7月6日、⑥7月28日に試験した親貝の投与後放卵 (左) と放精 (右) を開始するまでの時間

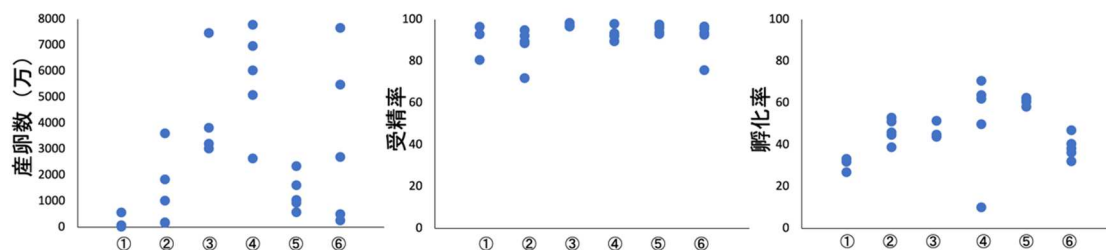


図3 ペプチド投与による採卵試験結果。①2022年4月12日、②4月26日、③5月10日、④6月1日、⑤7月6日、⑥7月28日に試験したメス個体の産卵数 (左)、受精率 (中央)、孵化率 (右)

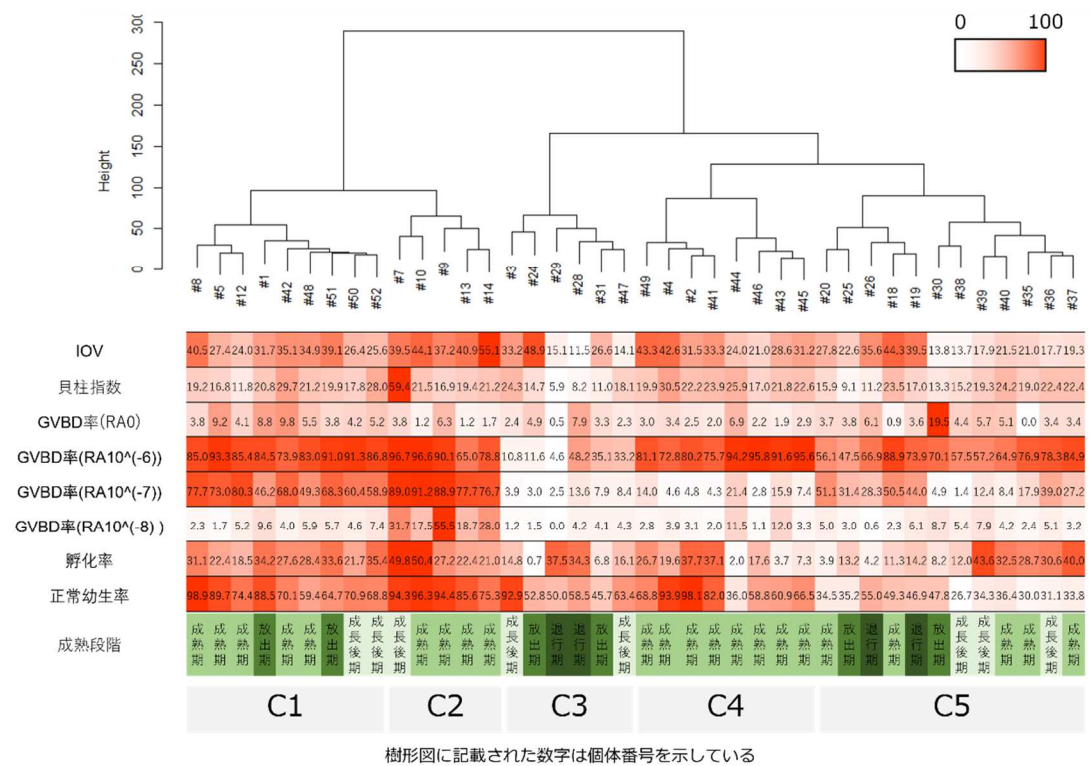


図 4 各項目の数値に基づいて実施した階層クラスター解析。最下段に組織切片観察で判定された各個体の成熟段階を示している。

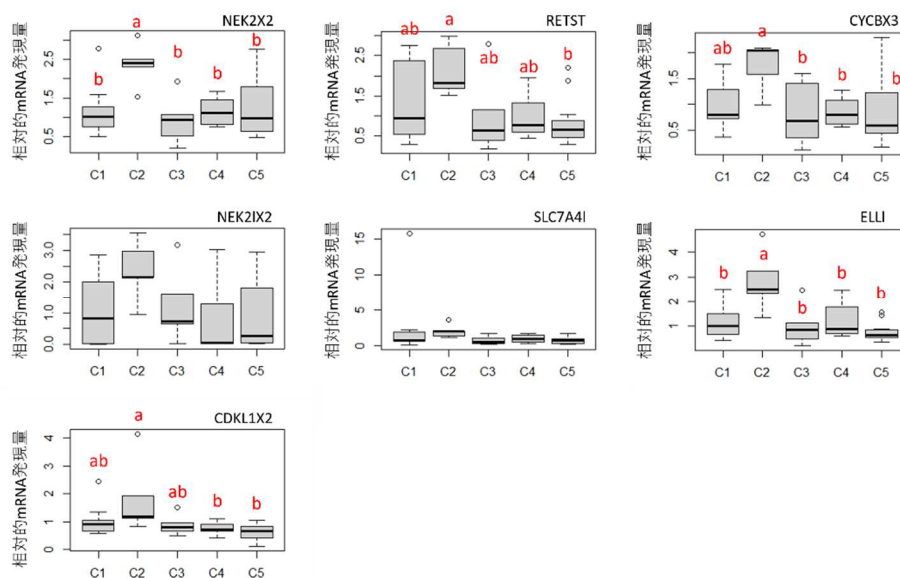


図 5 階層クラスター解析で分かれた各クラスターにおける候補遺伝子の発現量。異なるアルファベットはクラスター間に有意差があることを示す(Tukey-Kramer、 $p < 0.05$)。

	放卵数	孵化率	正常発生率	NEK2X2	RETST	NEK2IX2	SLC7A4I	ELLI	CYCBX3	CDKL1X2
放卵数	1									
孵化率	0.589776983	1								
正常発生率	-0.329457216	0.400844848	1							
NEK2X2	-0.120639707	0.636134221	0.961006866	1						
RETST	-0.339289275	0.495195297	0.969945823	0.972080829	1					
NEK2IX2	-0.229407162	0.591345318	0.519658199	0.642301409	0.711907717	1				
SLC7A4I	0.107019977	0.697274289	0.183535472	0.389861374	0.408703375	0.908360876	1			
ELLI	-0.53334327	0.242343364	0.394790878	0.439374609	0.589051575	0.924667987	0.783198317	1		
CYCBX3	-0.370188719	0.507533354	0.645865971	0.722207577	0.810549938	0.980778776	0.809313942	0.932232406	1	
CDKL1X2	-0.473707436	-0.053673644	-0.130865159	-0.088345493	0.084891225	0.670112123	0.678088158	0.854525453	0.622563035	1

図 6 各メス個体から得られた放卵数、幼生の孵化率、正常発生率と各遺伝子の発現量の相関係数。太字で書かれた数値は相関係数の有意性が $p < 0.05$ であることを示す。

表 1 令和 4 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	誘発方法	供試貝種 (雌雄)	供試個体数(※)	放精・放卵個体数(※)	採卵数 (万粒)	ふ化率 (%)	生産稚貝数 (個体)
6月1日	精巢破砕液	リシケ (♂) リシケ (♀)	12 (0) 15 (0)	12 (0) 10 (0)	18,292	96.7	80,694
7月28日	一部個体にペプチド注射	リシケ (♂) リシケ (♀)	9 (4) 18 (0)	8 (4) 16 (0)	23,200	30.5	0
8月3日	一部個体にペプチド注射	リシケ (♂) リシケ (♀)	3 (2) 12 (2)	2 (2) 5 (2)	5,126	24.4	62,809
8月31日	一部個体にペプチド注射	リシケ (♂) リシケ (♀)	6 (2) 18 (6)	2 (2) 6 (3)	3,710	57.8	6,073
9月1日	全個体ペプチド注射	リシケ (♂) リシケ (♀) ズベ (♂) ズベ (♀)	3 (3) 2 (2) 2 (2) 1 (1)	1 (1) 1 (1) 1 (1) 1 (1)	6,850	25.0	105
10月12日	全個体ペプチド注射	ズベ (♂) ズベ (♀)	2 (2) 4 (4)	2 (2) 3 (3)	2,650	85.0	0

※ () 内は産卵誘発ペプチド注射を実施した個体数を示す

表 2 令和 4 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	誘発方法	供試貝種 (雌雄)	供試個体数(※)	放精・放卵個体数(※)	採卵数 (万粒)	ふ化率 (%)	生産稚貝数 (個体)
6月8日	精巢破砕液	リシケ (♂) リシケ (♀)	10 (0) 13 (0)	10 (0) 13 (0)	45,000	96.7	10,273
7月13日	一部個体にペプチド注射	リシケ (♂) リシケ (♀)	7 (2) 10 (0)	6 (2) 9 (0)	19,426	≧99	112,331

※ () 内は産卵誘発ペプチド注射を実施した個体数を示す

ア．親貝の養成と採卵技術の開発

② ハマグリ親貝の養成と採卵技術の開発 - 1

熊本県水産研究センター

徳留 剛彦・上原 美咲・安藤 典幸

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

【目的】

ハマグリは、二枚貝の中でもアサリと並び、重要な水産資源として利用されてきたが、熊本県では、平成 18 年には漁獲が 106 トンとピーク時の 50 分の 1 にまで減少している。

ハマグリ資源の回復のためには、人工種苗を用いた母貝団地造成が必要とされており、安定的な人工種苗生産から母貝団地造成までの技術開発が不可欠となっている。

本研究では、種苗生産に必要な良質な卵を大量に確保するため、天然親貝の生殖腺成熟状況とハマグリ漁場の水温を調べて採卵適期を推定することと、安定的に受精卵を得るための採卵技術を開発することを目的とした。

【研究方法】

1. 生殖腺成熟状況の調査

1) サンプルリング

令和 4 年 1 月 13 日～11 月 25 日の期間、熊本市地先の緑川漁場（図 1）から、5 月～9 月までは潮ごとに、それ以外は月 1 回、大サイズ 5 個、小サイズ 10 個のサンプルを入手し、殻高、殻長、殻幅、殻付重量、むき身重量を測定し、肥満度を算出した。測定後サンプルを Davidson 液で固定し、水産技術研究所に送付した。

2) 組織観察

Davidson 液で固定した軟体部の中央部を切り出し、パラフィン包埋して切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色後に検鏡した。生殖腺の発達段階は、未分化期、成長初期、成長後期、成熟期、放出期、退行期の 6 段階に分類し、松本等（2014）に従って判定した。

3) 積算水温の検討

令和 4 年 1 月 6 日～令和 4 年 8 月 13 日までの間、ペンダントデータロガー（Onset 社製）を緑川河口域のハマグリ漁場の砂面から 10 c m 程度の位置（ハマグリ の 潜 砂 深 度）に埋めて設置し、その水温と組織観察の結果から、生殖腺の発達が始まる水温との関係を検討した。令和 4 年 1 月 6 日以前の水温データは、ロガーの直上に設置していた水温塩分計のデータで補完して分析した。

2. 採卵技術の開発

1) 使用した親貝

川口漁業協同組合の生産者が緑川河口域で採捕したハマグリ（大サイズ、小サイズ）を買い上げ、採卵試験の親貝とした。持ち帰った親貝は、17℃に設定した恒温室内に設置した 100L パンライト水槽に収容し、1 日以上静置してから採卵誘発に用いた。

2) 採卵誘発方法

5 月中旬～9 月中旬の潮ごとに計 9 回実施した。採卵誘発は、大サイズと小サイズで分けて行い、50L アルテミア孵化水槽に棒状の 150W ヒーターを投入し、水温 20℃から 30℃まで、1～2℃/時間のペースで水温を上昇させる緩慢昇温刺激で行った。水温が 25℃を超えた時に、あらかじめオスから切り出した生殖腺懸濁海水を添加し、誘発刺激を行った。

得られた受精卵は、受精率を確認するとともに、メッシュネット（目合：180 μ m（ゴミ取り用）、30 μ m（回収用））を用いて回収・洗卵した後、孵化水槽（200L パンライト水槽）に収容し、空調にて水温が 25℃を下回らないように調整して孵化まで静置した。卵の収容密度は、200L 水槽に 500 万粒を上限として収容し、採卵した翌日に、表層に浮いている幼生を回収し、計数した。

親貝 1 個体あたりの産卵数（万粒）と孵化率（%）と正常 D 型幼生率を乗じて算出した”親貝 1 個体あたりから生まれる正常 D 型幼生数”の推移から採卵適期の検討を行った。

3) 個別採卵

7 月 28 日～9 月 14 日までの間に計 4 回実施した。採卵誘発は、ろ過海水を入れた 150L の角形バットにプラスチック容器もしくは 500ml ビーカーを入れ、その中にハマグリを入れてウォーターバスで緩慢昇温刺激を行った。その後の手順は、前述の採卵手法と同様の手法で採卵誘発を行った。

【研究成果の概要】

1. 生殖腺成熟状況の調査

1) サンプルング結果

サンプルング回次別の測定結果を表 1 に、期間中の肥満度の推移を図 2 に示した。

大サイズの平均殻長は 51.11～64.65mm、平均殻高は 43.62～54.40mm、平均殻幅は 26.79～35.56mm、平均重量は 37.93～81.46g、平均むき身重量は 5.94～11.69g、肥満度は最高が 6 月 13 日の 14.01、最低が 10 月 23 日の 7.79 であった。

小サイズの平均殻長は 34.24～46.73mm、平均殻高は 30.10～39.28mm、平均殻幅は 19.17～25.43mm、平均重量は 12.57～29.76g、平均むき身重量は 2.17～4.82g、肥満度は最高が 6 月 13 日の 13.45、最低が 10 月 23 日の 8.65 であった。

肥満度は、6 月中旬以降に急激に低下しており、過去の調査では 7 月下旬頃の梅雨明けと連動して低下していたが、今年度は空梅雨で雨がほとんど降らず、6 月中旬には漁場水温が 25℃を超えていたことから、例年よりも早く調査海域での産卵期が訪れていた

と推測された。(図 2)。

2) 成熟状況調査

組織観察したハマグリ（大サイズ 5 個体、小サイズ 10 個体）生殖腺の発達段階を図 3 に示した（上：大サイズ、下：小サイズ）。大サイズでは、1 月 13 日は未分化期の個体もあったが、主には成長初期を示した。5 月 13 日には成熟期を示す個体が出始めて、6 月 27 日には放出期の個体がみられた。その後 8 月前半までは主に成熟、放出期を示した。8 月後半には退行期を示す個体がみられ、9 月後半には成熟、放出期も認められるものの主には退行期であった。10 月には全ての個体が未分化期を示し、産卵が終了したと考えられた。11 月には主に未分化期であったが成長初期もみられた。

小サイズにおいては、2 月 16 日に未分化期を示す個体がみられたが、1 月 13 日から 4 月 14 日まで主に成長初期を示した。5 月 13 日から成熟期が認められるようになり、一部放出期がみられた。その後退行期を示す個体があるものの 9 月まで主に成熟、放出期が認められる傾向は変わらなかった。大サイズと同様に 10 月には主に未分化期を示し、産卵が終了したと考えられた。11 月には未分化期と成長初期を示した。

3) 積算水温の検討

昨年度調査では 1 月下旬～2 月下旬に未分化期から成長初期へと生殖腺の発達が進むのが観察され、そのときの平均水温は 11℃であった。令和 4 年は 1、2 月に未分化期の個体が認められるものの、主に成長初期が観察された。1 月から 3 月までは主に成長初期のままであり、4 月に成長後期の割合が増え生殖巣の発達が進むのが観察された。漁場の平均水温は 3 月以降 11℃を超え上昇したことから、昨年同様 11℃を上回った水温を積算水温として加算（図 4）し、一部放卵が確認された 5 月 17 日までの積算水温は 1,532℃であった。また、本格的な放卵が確認された 5 月 31 日までの積算水温は 1,841℃であった。、令和 3 年度調査で放卵反応が得られた積算水温は 1,818℃、令和 2 年度調査では 1,744 であったことから、有明海のハマグリ of 採卵積算水温は 1,800℃前後と推定された。

2. 採卵技術の開発

1) 採卵技術の開発

採卵誘発試験を 9 回行い、5 月中旬から 9 月中旬まで採卵することができた（表 2）。今年度の調査では、これまでで最も長く放卵の反応を得ることができた。また、生殖腺組織観察では、6～8 月は成熟期及び放出期が主であり、8 月下旬は産卵終了個体も認められるものの依然として成熟期及び放出期が多く観察された。このため、上記の成熟状態の個体を親貝として使用するのであれば、親貝養成することなく採卵可能であった。

採卵数は、初回の 5 月 17 日の誘発試験では反応したのは大サイズのみで極少数であった。5 月 31 日も大サイズのみで反応であったが、採卵数が増え、6 月 30 日の採卵で大サイズが 1,932 万粒、小サイズが 1588 万粒と採卵数がピークとなった後、7 月以降は

採卵数が減少した。

受精率は、初回の5月17日と最終回の9月14日が90%を下回ったが、それ以外では親貝サイズや採卵時期による大きな違いはなく、安定していた。孵化率は大サイズが44.1%~92.7%、小サイズは51.8%~80.7%であり、正常D型幼生の割合は大サイズが52.1%~96.9%、小サイズが44.3%~96.1%であった。この結果は昨年度採卵試験結果とほぼ同等であり、安定した採卵が行えていることが確認された。

親貝1個体あたりの産卵数に孵化率(%)を乗じ、さらに正常D型幼生率を乗じた、誘発に使用した親貝1個体あたりから生まれる正常D型幼生数を算出した結果、大サイズ、小サイズともに6月30日に採卵したものが最も多い結果となった。よって、5月中旬~9月中旬まで採卵可能であるが、今年度は6月下旬が採卵適期であったと考えられた。

2) 個別採卵

4回実施したうち、反応が得られたのは7月28日に実施した1回のみで、放精個体は確認されたものの、放卵個体は確認されなかった。この時採卵に使用したハマグリの子宮組織を観察したところ、放精後の雄はまだ放精可能な状態であり、雌は十分に卵を持っていたが反応していなかったことが分かった。

【次年度に向けた提言】

1. 生殖腺成熟状況の調査

昨年度の調査結果では1月下旬~2月下旬に未分化期から成長初期へと生殖腺の発達が進むのが観察されたが、令和4年の1月は既に成長初期が主に観察された。それ以前の令和3年11月から12月に未分化期から成長初期になるのが観察され、漁場の水温は11月から下降していたが生殖腺の発達が進むのに十分な程度に高かった可能性はある。その後1月から2月は11℃以下の低い水温で推移したため生殖腺の発達が進まず、3月以降水温の上昇に伴い成長初期から成長後期へと発達が進んだと考えられる。これは令和3年から令和4年に特異的な状況であった可能性も考えられることから、さらにデータを収集する必要がある。

積算水温は、過去の試験結果から1,800℃程度と推定された。次年度は、3~4月にかけて漁場から採捕した親貝を加温飼育し、漁場からの積算水温とともに組織を観察することで積算水温の検証を行うこととしたい。

2. 採卵技術の開発

今年度の試験においても、緩慢昇温刺激による産卵誘発方法により安定して産卵することができたため、緩慢昇温刺激による誘発方法は確立したといえる。

個別採卵では、放精は確認できたものの放卵は確認できなかった。1個体あたりの放卵量や、ハマグリが産卵期の際に多回採卵を行うかどうかを明確にするため、採卵ピークと考えられる6~7月に個別採卵を行うとともに、通常の採卵誘発を行って反応して

いる個体を個別容器に移すなど、別の手法も検討しながら実施していくこととしたい。

参考文献

松本等、日本国内 6 地点におけるアサリの生殖周期 日本水産学会誌、80、548-560 (2014)

【図表】



図1 ハマグリ採取場所

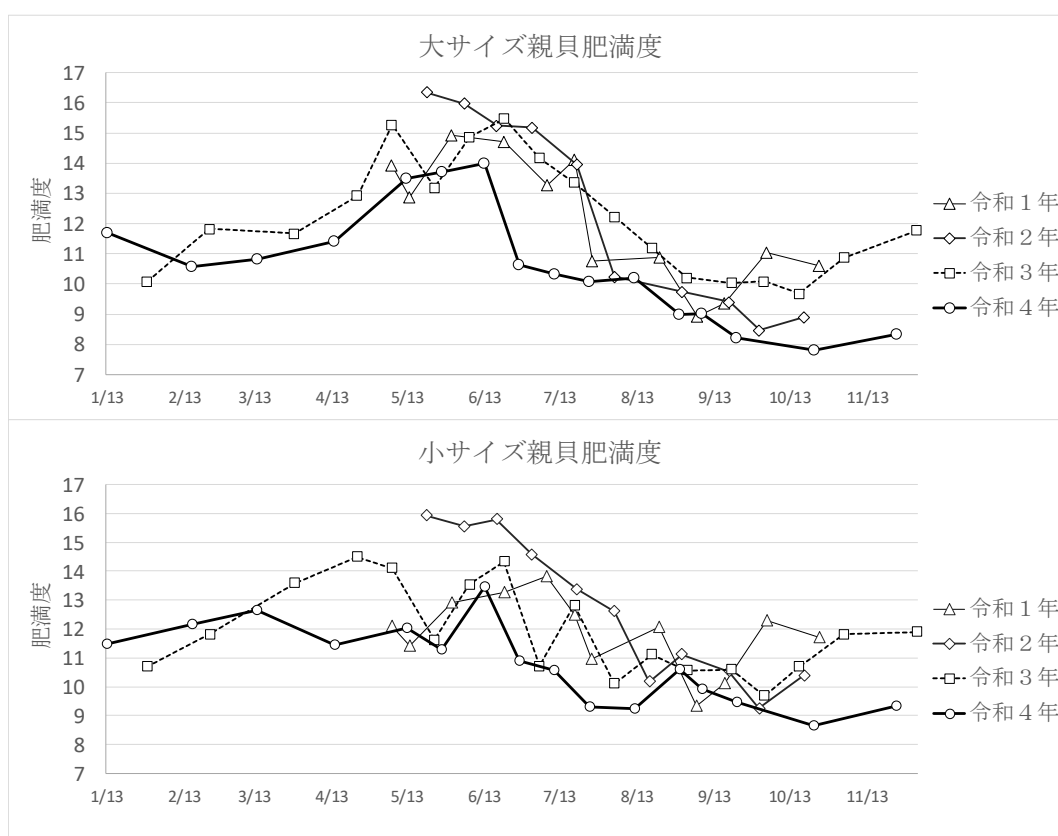


図2 令和元年～4年度調査の肥満度の推移（上：大サイズ、下：小サイズ）

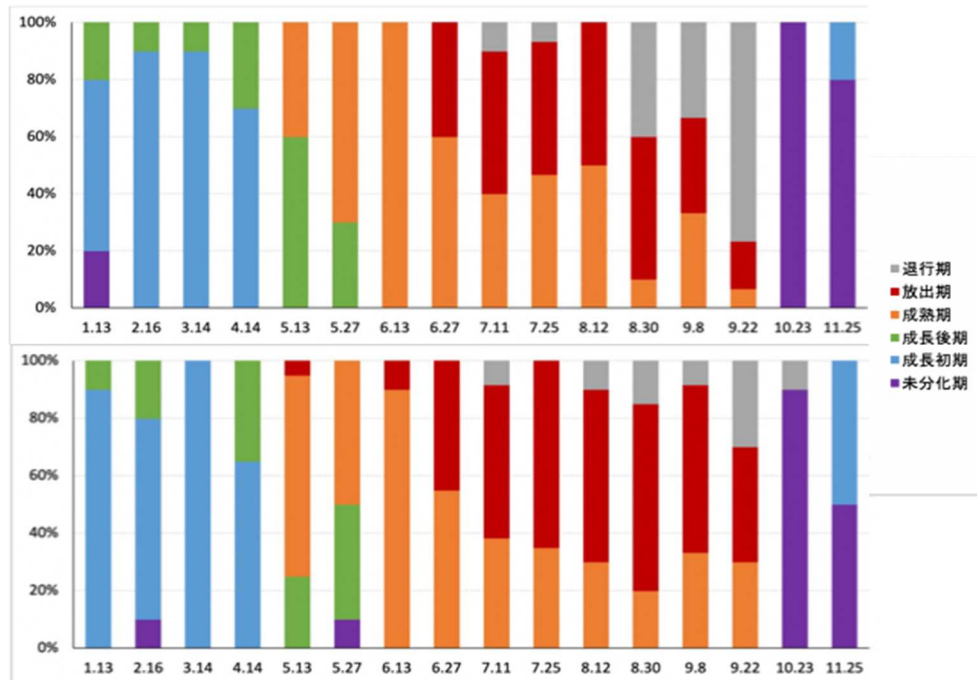


図3 組織観察によるハマグリ生殖腺の発達段階。
上：大サイズ5個体分、下：小サイズ10個体分。



図4 漁場水温と積算水温の推移

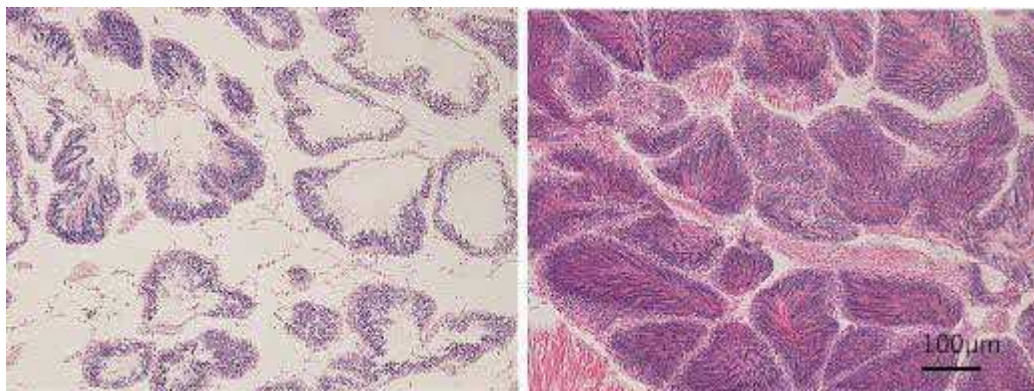


図5 個別採卵に使用した雄の生殖腺（左：抜けた部分 右：十分量確認される部分）

表1 サンプル測定結果

大サイズ							小サイズ						
採捕日	平均殻高 (mm)	平均殻長 (mm)	平均殻幅 (mm)	平均重量 (g)	平均むき 身重量 (g)	肥満度	採捕日	平均殻高 (mm)	平均殻長 (mm)	平均殻幅 (mm)	平均重量 (g)	平均むき 身重量 (g)	肥満度
1月13日	46.49	56.26	29.99	50.73	9.27	11.68	1月13日	34.21	40.69	22.51	20.49	3.63	11.47
2月16日	48.14	57.40	31.83	57.02	9.21	10.56	2月16日	37.36	44.62	23.49	25.43	4.82	12.18
3月14日	47.38	55.78	31.49	55.23	9.09	10.81	3月14日	35.85	42.00	22.96	22.95	4.41	12.65
4月14日	43.62	51.11	26.79	37.93	6.85	11.40	4月14日	35.26	40.99	22.08	20.88	3.67	11.46
5月13日	45.78	54.54	28.82	45.55	9.68	13.50	5月13日	35.57	41.61	21.98	21.18	4.09	12.03
5月27日	45.33	54.09	28.81	45.04	9.73	13.72	5月27日	31.31	36.36	19.61	14.90	2.73	11.28
6月13日	47.65	56.62	29.82	47.11	11.32	14.01	6月13日	31.34	36.22	19.44	13.65	3.09	13.45
6月27日	47.26	56.21	31.56	53.00	8.93	10.64	6月27日	30.10	34.24	19.17	12.57	2.17	10.89
7月11日	46.12	55.16	29.79	46.24	7.86	10.33	7月11日	31.52	36.66	19.63	13.85	2.43	10.57
7月25日	45.73	54.84	29.12	44.57	7.41	10.06	7月25日	34.14	39.67	21.59	17.51	2.77	9.30
8月12日	45.71	54.85	29.27	43.19	7.57	10.21	8月12日	33.44	38.31	20.42	16.57	2.44	9.26
8月30日	46.47	54.77	29.46	45.12	6.72	8.98	8月30日	33.33	39.11	20.92	16.95	2.96	10.60
9月8日	49.95	60.15	32.17	58.23	8.77	9.01	9月8日	35.92	41.73	22.23	21.18	3.43	9.91
9月22日	48.07	57.23	29.93	48.40	6.80	8.19	9月22日	32.24	37.11	20.58	15.43	2.37	9.48
10月23日	51.55	61.05	32.93	63.63	8.17	7.79	10月23日	37.53	44.01	23.65	23.92	3.43	8.65
11月25日	45.27	54.20	28.99	42.95	5.94	8.34	11月25日	34.64	40.59	21.80	19.51	2.89	9.33

表 2 採卵誘発試験結果

採卵日	サイズ	親貝数	肥満度	採卵数 (万粒)	親当たりの 採卵数(万粒)	受精率 (%)	ふ化槽収容卵 数 (万粒)	ふ化率 (%)	正常D型 幼生率 (%)	孵化後殻長 (μ m)	親当たりの採卵数*ふ 化率*正常D型幼生率
5月17日	大	43	13.5	21.6	1.0	87.7	21.6	69.2	80.0	118.0	1
	小	60	12.0				反応せず*				0
5月31日	大	35	13.7	1,346.7	77.0	95.5	500	51.7	61.5	115.7	24
	小	38	11.3				反応せず*				0
6月16日	大	45	14.0	1,319.3	58.6	92.0	500	59.1	52.1	112.7	18
	小	43	13.5	222.5	10.3	91.7	222.5	58.4	69.0	115.5	4
6月30日	大	53	10.6	1,932.0	72.9	99.3	500	69.7	84.1	115.6	43
	小	103	10.9	1,588.7	30.8	91.6	500	80.7	59.7	115.9	15
7月14日	大	39	10.3	434.0	22.3	96.2	434	44.1	96.9	116.2	10
	小	95	10.6	552.7	11.6	97.8	434	51.8	96.1	117.0	6
7月28日	大	35	10.1	705.3	40.3	95.9	500	69.1	92.0	117.2	26
	小	95	9.3	282.0	5.9	98.7	282	76.0	95.8	115.6	4
8月16日	大	34	10.2	215.3	12.7	97.6	215.3	92.7	96.2	115.4	11
	小	110	9.3	557.5	10.1	90.8	215	62.5	94.8	115.3	6
8月30日	大	39	9.0	357.0	18.3	98.5	357	74.1	92.2	114.1	13
	小	100	10.6	557.7	11.2	91.0	357	68.3	88.5	113.8	7
9月14日	大	40	9.0	1,433.0	71.7	96.9	500	59.1	82.5	116.0	35
	小	84	9.9	837.5	19.9	88.2	500	52.9	44.3	115.4	5

ア．親貝の養成と採卵技術の開発

② ハマグリ親貝の養成と採卵技術の開発 - 2

公益財団法人 三重県水産振興事業団 三重県栽培漁業センター

濱辺 篤

国立研究開発法人水産研究所・教育機構 水産技術研究所

松本 才絵・船山 翔平

【目的】

ハマグリの採卵においては、安定的に受精卵は得られるものの、正常D型幼生孵化率が不安定で計画的に生産ができないことが課題となっている。また卵管理においては、受精卵の適正収容密度が分かっておらず、大型水槽で卵管理を行うため正常D型幼生を回収するのに時間を要していた。

本研究では、千葉県水産総合研究センターで実施している採卵誘発手法を活用し、早期に安定した卵質で採卵するための親貝養成技術の開発と卵管理時の適正な受精卵収容数の検討を行った。

【研究方法】

1) 親貝養成飼育

三重県桑名市の赤須賀漁業協同組合で、令和4年3月4日から7月22日までに水揚げされたハマグリ（銘柄：中大サイズ）を購入し、親貝養成に使用した。購入時の自然海水温が17℃未満の場合は、アンスラサイト1.3mm径（以下、アンスラサイト）を約5cm敷いたプラスチック容器（トロフネ80，幅93cm×奥行62cm×高さ21cm）に親貝を収容し、海水を1回転/時間になるよう注水した。翌日、潜砂した個体と潜砂しなかった個体及び貝殻の割れている個体に仕分け（以下、潜砂選別）した。購入時の自然海水温が17℃以上の場合は、親貝の放卵放精を抑制するため冷却器Cool Master（ニットー製：N200）を使用し、水温17℃に設定した水槽に親貝を収容し、1日以上静置した。その後、潜砂選別において潜砂した親貝及び17℃で抑制した親貝約30個を丸籠（直径45cm）に入れ、2.0m³ FRP水槽に収容した。飼育水は、海水を1～2回転/日で注水し、水温は1kwチタンヒーターを用いて1～1.5℃/日で昇温し23～24℃に保った。餌にはパブロバ・ルテリ（以下、パブロバ）とキートセロス・ネオグラシーレ（以下、ネオグラシーレ）を混合したものを使用した。コールターカウンター（ベックマン・コールター株式会社製：マルチサイザー3）を用いて残餌濃度を測定し、飼育水の餌料濃度が40,000cells/mlになるように調整して1日3回給餌した。夜間は餌料濃度が20,000 cells/ml以下にならないよう定流量ポンプ（名東化工機械株式会社製：NE-1000）を使用し給餌を行った。

購入した親貝は定期的にサンプリングを行い、水産技術研究所において、サンプルの軟体部の一部をDavidson液で固定し、パラフィン包埋して切片を作成後、ヘマトキシリン・エオシン染色を施した。それらの検鏡を行い生殖腺の発達段階を、成長初期、成長後期、

成熟期の3つに分類をした。

上記の条件で養成したものを養成あり親貝とした。一方養成無しの親貝として令和4年5月25日から7月22日までに購入したもの（銘柄：中大サイズ）は冷却器Cool Master（ニットー製：N200）を使用し、水温17℃に設定した水槽に1日以上静置してから採卵に用いた。

2) 採卵

小林（2019）の方法に準じて、採卵当日に親貝を直射日光下に30～45分間干出後、20℃の海水を入れた100Lアルテミア孵化槽に收容し、1kwチタンヒーターを用いて水温を1～2℃/時間ずつ昇温させた。25℃に達した時点で反応が見られない場合は、精子懸濁液を作成し、孵化槽に添加した。さらに30℃まで昇温しても反応がない場合は20℃の海水に戻し、再度30℃まで昇温した。放卵放精が始まり、精子濃度が濃い場合は適度に雄を間引きした。得られた受精卵は、プランクトンネット（目合い：20・40・80・132・230 μm）を用いて洗卵し、26～27℃に調温した30Lパンライトに受精卵を收容した。22時間後に正常D型幼生数を計数し、飼育水槽に收容した。

3) 卵収容数の検討

採卵で得られた受精卵を26～27℃に調温した30Lパンライトに150～1,300万粒の密度で收容した。22時間後に正常D型幼生数を計数し、 $(\text{正常D型幼生数}/\text{卵収容数}) \times 100$ で正常D型幼生孵化率を求め、正常D型幼生の殻長を測定して比較した。

【研究成果の概要】

1) 親貝養成

親貝は令和4年3月4日から7月22日までに合計5回購入した。3月4日と4月13日はアンスラサイト上に並べて選別を行い、5月25日と6月15日及び7月22日は17℃で抑制後に養成を開始した。

3月4日採捕群と4月13日採捕群の潜砂選別結果を表1に示した。3月4日採捕群は328個、4月13日採捕群は204個を購入し、翌日に潜砂した個体はそれぞれ285個(87.4%)と162個(79.4%)であった。3月4日採捕群については潜砂個体と同様、表面に露出していた個体も採卵時期まで飼育をし、斃死率はそれぞれ1.05%と4.88%であった。

組織観察結果を図1に示した。3月4日採捕群は收容後約1週間をかけて23℃まで昇温した。收容後2週間目から成熟が徐々に進んでいき、4月8日（5週間目）には成熟期の割合が60%となった。それに比べ天然海域のハマグリは4月13日の段階で成長初期が60%を占めており、3月4日採捕群は養成飼育を行うことにより、順調に成熟が進んでいくことが確認できた。昨年度の最初の採卵は5月25日であったが、今年度は4月7日に採卵に成功し、約1ヶ月半程度、早期に採卵することができた。

2) 採卵

養成あり親貝の採卵結果を表2に、養成無し親貝の採卵結果を表3に示した。採卵は令

和 4 年 4 月 7 日から 7 月 28 日にかけて合計 14 回行った。養成あり親貝は合計 14,666.2 万粒の受精卵を得ることができ、そのうち 13,749.4 万粒を収容した。正常 D 型幼生孵化率は平均 52.0%で、合計 7,148.3 万個体を回収した。養成無し親貝は合計 4,667.1 万粒の受精卵のうち 3,314.6 万粒を収容し、正常 D 型幼生孵化率は平均 22.1%、合計 731.6 万個体を回収した。以上の結果、親貝の養成を行うことにより、正常 D 型幼生孵化率が向上し安定した採卵が可能となった。

3) 卵収容数の検討

卵収容数比較結果を表 4 に示した。試験は合計 4 回行ったが、このうち孵化幼生に奇形が多く混ざるなど、異常が見られたのは 2 回目の 1,300 万粒収容と 4 回目の 1,000 万粒収容の 2 回であった。4 回目の 1,000 万粒収容については、腐敗臭がしていた。これは受精卵にゼリー層が多かったため、沈下した際に卵が積み重なり腐敗してしまったと考えられる。これらの卵の腐敗を防ぐには、洗卵時に 80 μm のプランクトンネット上に受精卵が多く残るような場合については、ネットを通過した受精卵のみを収容することが対策の 1 つと考えられる。以上の結果より上記の対策を実施した時の 30L パンライトへの適正な卵収容数は 1,000 万粒以下であることがわかった。

【次年度に向けた提言】

今回の親貝養成方法で、3 月 4 日（採捕）から 4 月 7 日（採卵）までの 35 日間（23℃になるまで 7 日）で採卵が可能となり、早期採卵に成功した。ただし、親貝養成ができるのは 5 月採捕群までで、それ以降は養成中の親貝が水槽内で自然放卵放精することが多発し、養成を行うのは困難であった。また、産卵最盛期である 6 月中旬に養成無し親貝から採卵したものは奇形が多く発生した。現在の採卵工程では、放卵放精を抑制するために水温 17℃の水槽に 1 日以上静置してから採卵に用いているが、この抑制期間は共同研究機関により異なっている。来年度は、安定した採卵技術の開発に向けて、正常 D 型孵化率が抑制期間によって異なるかどうかを調べる予定である。

参考文献

小林 豊（2019）ハマグリ人工採卵技術．令和元年度二枚貝類飼育技術研究会．

【図表】

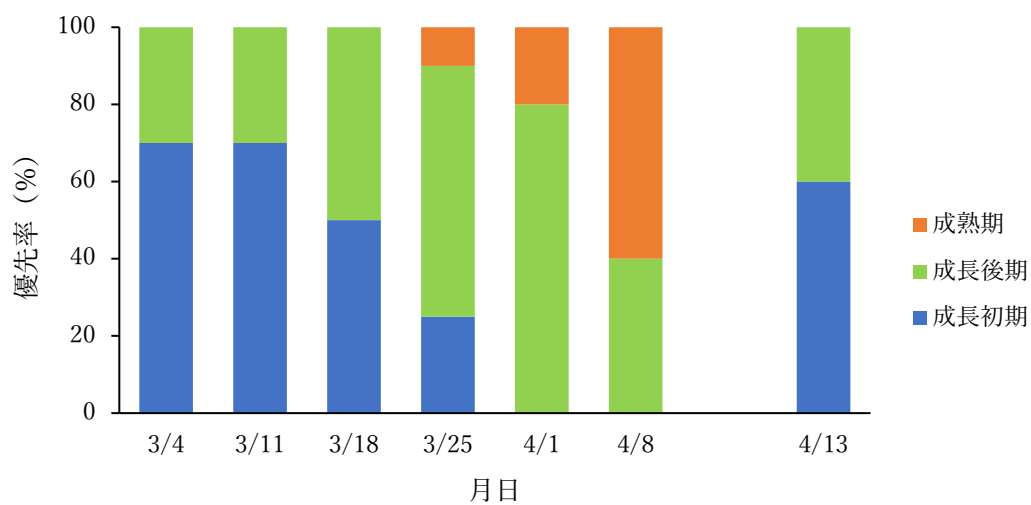


図1 3月4日採捕群の組織観察結果

表1 潜砂別結果

購入日	購入数 (個)		アンスラサイト収 容後の仕分け数 (個)	死亡数 (個)	斃死率 (%)
3月4日	326	潜砂	285	3	1.05
		露出	41	2	4.88
		割れ	2	-	-
4月13日	204	潜砂	162	-	-
		露出	38	-	-
		割れ	4	-	-

表 2 養成あり親貝の採卵結果

回数	採捕日	採卵日	養成期間 (日間)	総重量 (g)	個数 (個)	産卵量 (万粒)	受精率 (%)	収容槽	収容数 (万粒)	収容密度 (粒/cm ³)	正常D型幼生数 (万個)	正常D型孵化率 (%)	殻長 (μm)	備考
1	3月4日	4月7日	35	2,271.0	68	1,585.0	89.1	500L	1,585.0	2,237	1150.0	72.6	118.4	
2	3月4日	4月18日	46	881.0	28	1,588.5	93.6	500L	1,588.5	2,242	753.9	47.5	117.8	
3	3月4日	4月25日	53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	自然放卵放精
4	4月13日	4月26日	14	1,100.0	49	-	-	-	-	-	-	-	-	反応無し
5	3月4日	5月3日	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	自然放卵放精
6	3月4日	5月6日	64	1,919.0	62	2,100.0	-	500L	2,100.0	2,964	375.0	17.9	120.2	作業ミス
								30L	150.0	1,653	105.0	70.0	117.6	
	4月13日	5月6日	24	1,685.0	70	1,085.0	-	30L	300.0	3,307	185.0	61.7	118.3	
								30L	635.0	7,001	437.4	68.9	118.9	
7	3月4日	5月11日	69	1,390.0	34	565.0	88.5	30L	565.0	6,229	381.6	67.5	120.6	
8	4月13日	5月19日	37	1,191.0	50	1,682.5	98.0	30L	182.5	2,012	122.5	67.1	117.0	
								30L	500.0	5,513	295.0	59.0	117.3	
								30L	1,000.0	11,025	675.0	67.5	117.4	
						1,475.0	93.2	30L	175.0	1,929	127.5	72.9	118.1	
								30L	1,300.0	14,333	320.0	24.6	117.6	
9	4月13日	5月31日	49	986.0	41	165.0	90.0	30L	165.0	1,819	141.8	85.9	120.4	
						421.5	92.5	30L	421.5	4,647	306.8	72.8	118.9	
								30L	133.3	1,470	90.0	67.5	117.3	
11	5月25日	6月7日	14	1,686.0	68	2,450.1	95.5	30L	400.0	4,410	307.5	76.9	116.3	
								30L	1,000.0	11,025	782.5	78.3	117.4	
12	5月25日	6月25日	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	自然放卵放精
13	6月15日	6月25日	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	自然放卵放精
14	6月15日	6月28日	14	1,520.0	61	265.0	96.2	30L	265.0	2,922	147.5	55.7	118.9	
						410.0	97.6	30L	410.0	4,520	197.5	48.2	113.8	
15	5月25日	7月8日	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	自然放卵放精
16	5月25日	7月14日	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	自然放卵放精
17	5月25日	7月16日	53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	自然放卵放精
18	7月22日	7月24日	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	自然放卵放精
19	7月22日	7月28日	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	自然放卵放精
				1,390.0	55	874	97	30L	874	9,632	246.8	28.3	113.6	

表 3 養成無し親貝の採卵結果

回数	採捕日	採卵日	総重量 (g)	個数 (個)	産卵量 (万粒)	受精率 (%)	収容槽	収容数 (万粒)	収容密度 (個/cm ³)	正常D型幼生数 (万個)	正常D型孵化率 (%)	殻長 (μm)	備考
1	5月25日	5月26日	1,708.0	65	80.8	93.6	30L	80.8	891	0.0	0.0	-	ほぼ奇形
2	5月25日	5月27日	1,122.0	46	182.5	88.9	30L	182.5	2,012	3.3	1.8	106.0	ほぼ奇形
3	6月15日	6月16日	1,967.5	80	2025.0	96.6	30L	1012.5	11,163	137.5	13.6	114.6	奇形多い
					793.8	93.8	30L	543.8	5,996	170.8	31.4	112.7	奇形多い
4	7月22日	7月23日	1,085.0	44	495.0	87.9	30L	495.0	5,458	205.0	41.4	110.7	
					1,090.0	92.7	30L	1,000.0	11,025	215.0	21.5	111.4	腐敗臭あり

表 4 卵収容数比較結果

回数	養成 (有,無)	産卵量 (万粒)	受精率 (%)	ゼリー層 (多,少)	収容槽	収容数 (万粒)	収容密度 (粒/cm ²)	正常D型幼生数 (万個)	正常D型孵化率 (%)	殻長 (μm)
1	有	1,085.0	-	少	30L	150.0	1,653	105.0	70.0	117.6
					30L	300.0	3,307	185.0	61.7	118.3
					30L	635.0	7,001	437.4	68.9	118.9
2	有	1,682.5	98.0	少	30L	182.5	2,012	122.5	67.1	117.0
					30L	500.0	5,513	295.0	59.0	117.3
		1,475.0	93.2		30L	1,000.0	11,025	675.0	67.5	117.4
					30L	175.0	1,929	127.5	72.9	118.1
					30L	1,300.0	14,333	320.0	24.6	117.6
3	有	2,450.1	95.5	少	30L	133.3	1,470	90.0	67.5	117.3
					30L	400.0	4,410	307.5	76.9	116.3
					30L	1,000.0	11,025	782.5	78.3	117.4
4	無	1,585.0	89.5	多	30L	495.0	5,458	205.0	41.4	110.7
					30L	1,000.0	11,025	215.0	21.5	111.4

イ．人工種苗生産技術の開発

① タイラギ人工種苗生産の開発

国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

山田充哉・伊藤 篤

【目的】

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、給餌量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とともに、着底稚貝を中間育成課題（ウ-①、ウ-②）に供試する。

【方法】

課題ア-①において 6 月 1 日に採卵した瀬戸内海産リシケタイラギの浮遊幼生を用い、6 月 11 日から 7 月 22 日にかけて飼育試験を行った。

浮遊幼生飼育には、瀬戸内海区水産研究所（現水産技術研究所百島庁舎）で開発した連結式幼生飼育装置（総水量 1,000L：以下、連結水槽）を用いた。連結水槽をウォーターバスの中に設置し、連結水槽中の水温が 25℃になるように加温した。ふ化水槽で遊泳している正常発生胚（トロコフォア期～D 型期）を海水ごとバケツで掬い取り、連結水槽 6 セットに収容した。連結水槽 1 セットあたりの収容数は令和 3 年度の収容密度試験で稚貝生産率が最も高かった 100 万個体とした。飼育水攪拌用のローターの回転数は毎分 90 回転とし、水面に張り付いた浮遊幼生を沈めるために水槽上部から 20 分に 1 回 20 秒間の海水噴射を行った。

給餌は一日 2 回朝夕に行い、連結された個々の水槽について残餌量を求め、給餌直後の餌料密度が目標値になるように水槽ごとに給餌量を調整した。飼育水中の残餌と給餌に用いる微細藻類培養液の密度は Multisizer 3 (Beckman Coulter 社製) を用いてコールター・カウンター法で計数し、事前に測定しておいたシース液中での微細藻類の長径に基づいて自動検出する粒子径を設定した。シース液で飼育水を 40 倍、微細藻類培養液は 200 倍に希釈し、希釈液 1ml 中の粒子数を計数した後、飼育水または微細藻類培養液 1ml 中の粒子数に換算した。

1 日齢（6 月 2 日）と 2 日齢は自家培養した *Pavlova lutheri* を給餌後の密度が 5,000 cells/ml になるように給餌し、3 日齢から 7 日齢にかけては 1 日ごとに濃縮餌料（*Chaetoceros calcitrans*）を 1,000cells/ml ずつ追加して *P. lutheri* との混合給餌とした。7～9 日齢は 10,000cells/ml（*P. lutheri* 5,000cells/ml : *C. calcitrans* 5,000cells/ml）になるように給餌し、10 日齢（6 月 11 日）以降に 10,000cells/ml を維持する区（以下、1 万区）と 15,000cells/ml（*P. lutheri* 7,500cells/ml : *C. calcitrans* 7,500cells/ml）に増量する区（以下、1.5 万区）を設けて試験区とした。両試験区は 3 反復とした。試験開始時点で連結水槽ごとに幼生数のばらつきが生じていたことから、試験

区間で幼生数が偏らないように 9 日齢の幼生数に応じて反復水槽を選択した。

換水作業は毎週火曜日と金曜日に行い、浮遊幼生が居ない水槽を排水し洗浄した。このとき、浮遊幼生が入っている水槽から内径 4mm のアクリル管を用いて 30 ないしは 50ml の柱状採水を行い、浮遊幼生の個体数と殻長を測定した。連結水槽中の浮遊幼生数は採水試料中の幼生数に基づいて推定した。全水槽における浮遊幼生の最大殻長が 400 μ m に達してからは、換水時に排水および海水噴射によって水槽底から剥ぎ落とした付着物を目合い 250 μ m のプランクトンネットで濾して着底稚貝の確認と回収を行った。着底稚貝の計数は目視で行い、数が多い場合には箱型プランクトン分割器による分画の計数値に基づいて推定値を算出した。回収した着底稚貝は中間育成課題に供するまでダウンウェリング容器に収容し、*P. lutheri*、*Isochrysis* sp. (Tahiti)、*C. neogracile* を単独または混合給餌して飼育した。

また、ア-①において 6 月 8 日および 7 月 13 日に実施した有明海産タイラギの産卵誘発で得られた浮遊幼生の飼育では残餌量の測定は行わず、上述の 1 万区における給餌量に準じて給餌を行い、着底稚貝を生産した。連結水槽をのべ 9 セット使用し、飼育開始時の幼生収容数は 100 万個体とした。

【研究成果の概要】

各水槽における給餌前と給餌後の飼育水中の粒子密度推移を図 1 に示した。給餌前の粒子密度（残餌量）は両試験区において飼育開始から 6 日齢（6 月 7 日）にかけて徐々に増加した。その後、1 万区は 16 日齢（6 月 17 日）にかけて 4,000~6,000cells/ml の範囲で推移し、17 日齢（1 月 18 日）以降は減少して 500~4,500cells/ml の範囲で推移した。一方、1.5 万区の残餌量は 10 日齢（6 月 11 日）まで 5,000~7,000cells/ml の範囲で推移したが、11 日齢から 16 日齢にかけては給餌量の増加に伴って残餌量も増加し、17 日齢以降は減少に転じて 700~6,000cells/ml の範囲で推移した。両試験区における 17 日齢以降の残餌量減少は水槽ごとに餌の消費量が増大したことを意味する。タイラギの浮遊幼生飼育では飼育開始から 10 日前後で有鐘纖毛虫をはじめとした原虫類が大量に発生することが経験的に知られている。本試験において原虫類の定量的評価は行っていないが、日々の観察では 15 日齢前後から原虫類の増加が観察された。したがって、17 日齢以降の残餌量の減少は原虫類が発生したことによる餌料消費の増加を示していると考えられる。

試験区および連結水槽別の推定浮遊幼生数と平均殻長の推移をそれぞれ図 2 および図 3 に示した。換水時に着底稚貝が初確認されたのはすべての連結水槽で 41 日齢（7 月 12 日）であったことから、着底開始日は稚貝が初確認された水槽の換水日間隔である 35 日齢（7 月 6 日）から 39 日齢（7 月 10 日）の間と推測された。幼生数はどちらの試験区においても徐々に減少したが、1 万区と 1.5 万区で減少パターンに違いが見られた。着底開始までの期間において、1 万区は 3 水槽とも均質的に漸減したが、1.5 万区の 2 水槽は 13~23 日齢の間に急減耗が発生した。しかし、1.5 万区の 1 水槽ではそのような減耗は見られず、

1 万区の幼生数との差は見られなかった。一方、1 万区では着底開始の前後に急減耗が発生し、着底開始直前に約 36~49 万個体/set が生残していたにもかかわらず、着底稚貝数は 114~1,918 個体/set と極めて少なかった（表 1）。同様に、1.5 万区における着底稚貝数も例年に比べて極めて少なく、55~3,290 個体/set であった。平均殻長は 1 万区の 3 水槽が比較的類似した推移であったのに対し、1.5 万区は水槽ごとのばらつきが大きかった。給餌試験開始から 23 日齢（6 月 24 日）までの期間において、1 万区は 1.5 万区を上回る成長を示したものの、それ以降は成長が鈍化したまま試験終了を迎えた。一方、1.5 万区は急減耗が発生した 13 日齢以降はしばらく成長が停滞したが、23~27 日齢の間に成長率が上昇し始め、それ以降は 1 万区を上回る成長率を示した。1.5 万区において生残率が最も高く推移した水槽は成長が最も遅かった。

なお、1.5 万区で着底稚貝が最も多く得られた水槽の着底稚貝を課題（2）一オにおける親子関係解析に供試した。

本試験において、1 万区の 3 水槽では着底開始前後、1.5 万区の 2 水槽では 13~23 日齢と着底開始後に多くの浮遊幼生が死亡し、得られた着底稚貝数はすべての水槽において例年より極めて少なかった。着底開始前後における大量減耗は例年観察されているが、今年度はほとんど着底稚貝を得られなかった点が特徴的である。今年度の幼生飼育では混合餌料を *C. calcitrans* 主体から *P. lutheri* 主体に切り換えており、*C. calcitrans* の製造メーカーを変更した。そのような餌料組成の変化が着底不良を誘発した可能性も考えられることから、今後は、着底の成否を左右する因子の抽出を目指す必要がある。また、本試験において大量減耗の原因を明確に捉える事はできなかったが、1.5 万区でも 1 水槽だけは大量減耗が発生しなかったことから、給餌量以外の要素によっても浮遊幼生の生残・成長が影響を受けている可能性が高い。一方、1 万区の 3 水槽が 1.5 万区よりも同調的な生残・成長曲線を示し、23 日齢までは比較的良好な成長を示した後に鈍化した点と、同時期の 1.5 万区において大量減耗が生じた点に注目すると、20 日齢前後までは給餌後餌料密度が 10,000cells/ml 程度になるように給餌することで大量減耗のリスクを避けられる可能性がある。その後、15,000cells/ml までの範囲で徐々に給餌量を増やすことで着底開始までの成長率を高めることができるか、今後検討する必要がある。

しかし、給餌量の増加は水質悪化を招く可能性もある。本試験において、20 日齢以降、朝夕の給餌の間に 1 万区で 4,000~5,000cells/ml 程度、1.5 万区で 7,000~8,000cells/ml 程度の餌料が消費されていた。それが捕食による減少か自己分解または腐敗によるものかは不明であるものの、この消費量の差が飼育水中の代謝物量の差となって水質を変化させ、それがタイラギ幼生の生残に影響した可能性が考えられる。今後、幼生の生残に対してより直接的に影響する因子を特定するため、飼育水の水質と幼生の生残・成長との関係を明らかにしていく必要がある。

【次年度に向けた提言】

本試験の結果、給餌量の違いがタイラギ幼生の生残に直接的に影響するというよりも、残餌の腐敗や原虫類による代謝物の産生を招くことで間接的に影響している可能性が示唆された。今年度、産卵誘発試験で得られた余剰卵を用いて FRP 製 6,000L 角型水槽での浮遊幼生飼育を試みた。その過程で幼生数と飼育水中の三態窒素量（アンモニア態、亜硝酸態、硝酸態）をモニタリングしたところ、亜硝酸態窒素量がピークを迎える前後に浮遊幼生数が急減する現象が観察された。ピーク値は 0.04mg-N/L と極めて低いものの、生物体内における酸素運搬能を阻害するとされる亜硝酸態窒素の存在がタイラギ幼生の生残に直接的な影響を及ぼしている可能性が浮上した。このことから、今後は給餌量、幼生飼育密度、原虫類の存在量等に関して飼育水に含まれる化学物質の面から浮遊幼生の生残との関係を明らかにする必要がある。

【図表】

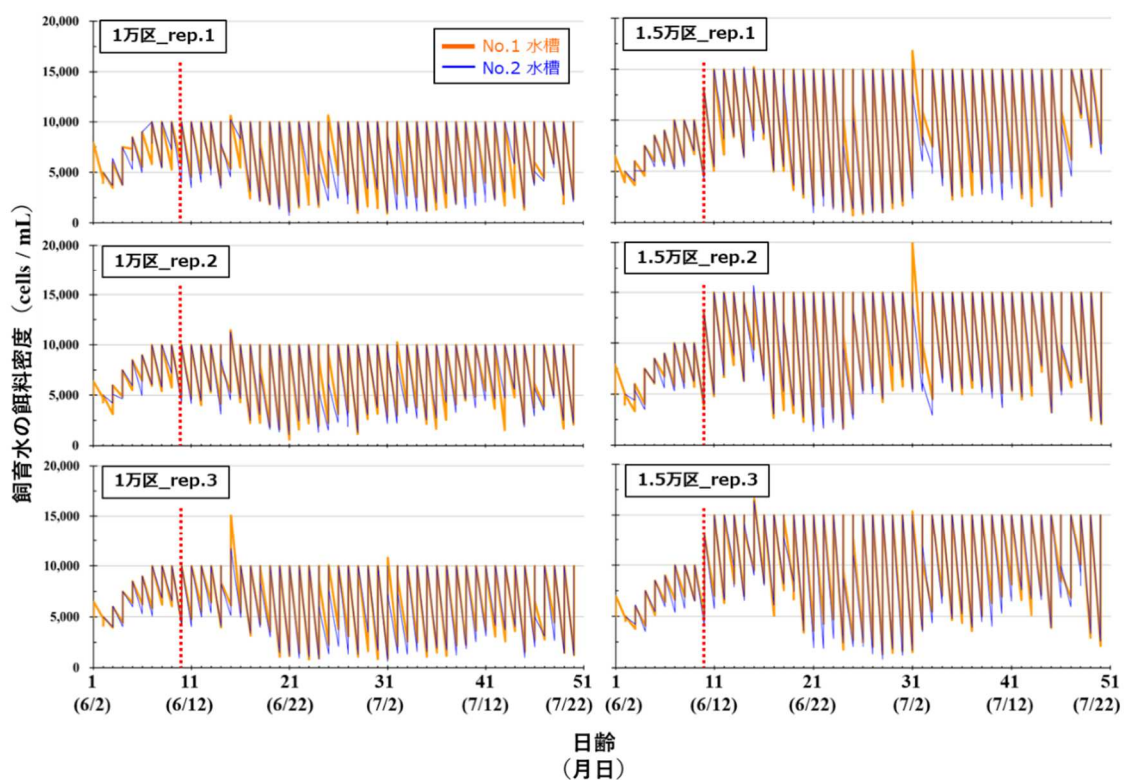


図1 各水槽における飼育水中の餌料密度の推移。給餌試験開始日を赤色破線で示した。

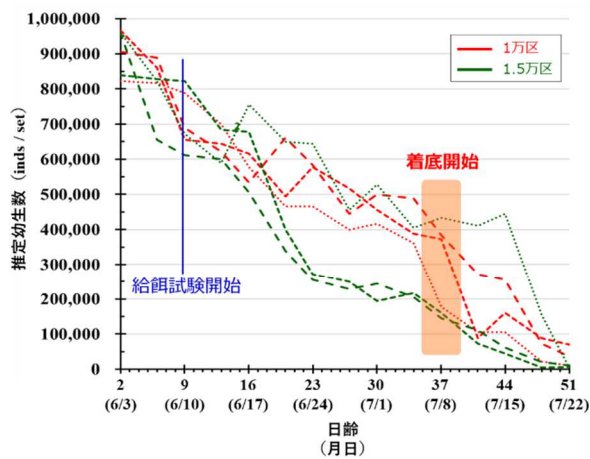


図2 瀬戸内海産タイラギにおける浮遊幼生の連結水槽別推定幼生数の推移

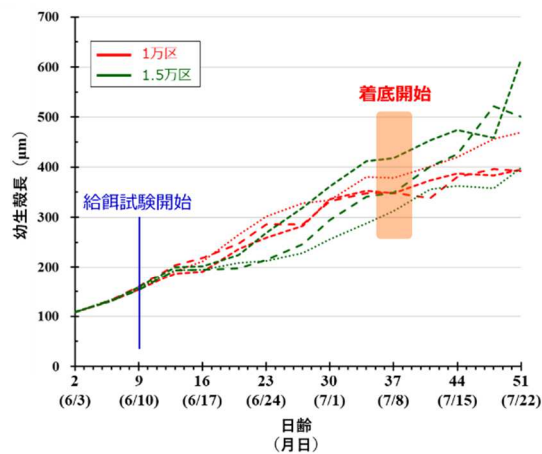


図3 瀬戸内海産タイラギにおける浮遊幼生の連結水槽別平均殻長の推移

表 1 連結水槽別の浮遊幼生数と稚貝生産数

連結水槽番号		試験開始時 幼生数	着底稚貝数	稚貝生産率 (%)
1万区	rep.-1	688,889	114	0.01
	rep.-2	788,889	1,918	0.23
	rep.-3	655,556	465	0.05
1.5万区	rep.-1	672,222	55	0.01
	rep.-2	822,222	3,290	0.39
	rep.-3	611,111	1,132	0.12

イ．人工種苗生産技術の開発

② ハマグリ人工種苗生産技術の開発 - 1

千葉県水産総合研究センター 東京湾漁業研究所

林 俊裕

【目的】

ハマグリの子生から殻長 1mm までの稚貝は、水温 33℃、60%希釈海水（塩分 19～20）、の飼育条件の下で育成できることが分かっているが、着底初期に大量死亡が発生することがあり、種苗生産では着底期間を速やかに乗り切り、この間の大量死亡を軽減することが重要である。

そこで、昨年度は着底までの飼育期間の短縮を目指し、愛知県で得られた知見を踏まえ、幼生中期（以降、アンボ期と呼ぶ）に塩分 15、着底期に塩分 12.5 に調整する低塩分飼育試験を実施した結果、着底終了までの期間が 1 週間程度となり、従来と比較して 5 日間程度着底終了までの飼育期間を短縮することが可能となった。

今年度は、人工種苗から育成した親貝を用いて採卵を実施し、これまでの飼育試験で確認された塩分濃度条件下での種苗生産を実施することにより、種苗生産レベルでのハマグリ種苗の安定生産の再現性を検証した。

【研究方法】

飼育試験は、幼生期から殻長 1mm 以降まで常時塩分 19 で飼育する通常塩分飼育、「D 型幼生期 19、アンボ期 15、着底期 12、着底後 15、翌日以降 19」で飼育する低塩分飼育の 2 条件とし、時期を分けて実施した。

水槽は多段式循環水槽による飼育装置を使用した。飼育架台は木製で、最下段に循環水槽（内寸 753×903×200 mm : RX-130 L、ダイライト（株））を配置し、その上に飼育水槽（内寸 903×1343×200 mm : RX-240 L、ダイライト（株））を 3 段配置し、循環水槽から水中ポンプ（CSL-100L、寺田ポンプ製作所（株））で各水槽へ注水し、再び循環水槽へ排水する仕組みとした。飼育海水を 33℃に保つため、下段の循環水槽に 1 kw チタンヒーターを設置した。飼育容器には塩化ビニール製の円筒型容器（直径 600 mm、高さ 150 mm）の底面に 45、85、125 μm 角目のナイロンネットを貼ったものを使用した（45 μm は D 型幼生期、85 μm はアンボ期、125 μm は着底期以降に使用）。各水槽には 2 つの飼育容器を設置することで、1 水槽当たり最大 6 器設置可能とした。飼育容器への注水はダウンウェリング方式とし、容器への注水量は 0.5～1.2 L/分程度とした。

試験に供した幼生は、平成 30 年度に種苗生産し、干潟で育成した親貝から採卵したもので、各試験区の水槽に D 型幼生を 63～145 万個/器×6 器収容した。また、着底期には着底促進のため粒径 150～200 μm 程度に粉碎した貝化石約 50g を飼育容器の底面に敷設した。

飼育海水は、砂ろ過海水を使用する前日に円形の 1 m³水槽に収容し、水道水で希釈し、

通気しながら 1kw チタンヒーターで 33℃に加温し、小型の紫外線殺菌装置（UV バズーカ、ゼンスイ（株））に循環させて殺菌処理を行った。

飼育期間中の水槽内の飼育水は着底期から着底までは毎日、着底後は隔日で換水した。飼育容器内の稚貝および貝化石は、毎日海水でシャワー洗浄した。

餌料はパブロバ・ルテリを与えた。給餌目安は、1 日 1 回以上コールターカウンター（ベックマン・コールター社製 Z2）で残餌密度を測定し、飼育水槽内の餌料密度が 1,000 細胞/ml を下回らないよう調整した。

【研究成果の概要】

飼育試験結果を表 1-1～3-2 に示す。着底期（足を使用して匍匐する個体が現れ、浮遊する個体が減少する）までの幼生の残留率（選別とへい死による減耗を除いた種苗の残留率）は通常塩分飼育で 30.3%、低塩分飼育で 34.0～44.7%であった。浮遊幼生飼育時にはフルイによる選別を 2～3 回実施し、成長良好個体のみ飼育を継続したため、残留率は 50%を下回ったが、実用的には特に問題のない残留率で、着底期の幼生を確保できた。着底期に達するまでの期間は通常塩分飼育で 10 日間、低塩分飼育では 7～8 日間で低塩分飼育が 2～3 日間短かった。

着底がほぼ完了する飼育日数は、通常塩分飼育で 14 日間、低塩分飼育では 10～11 日間で、低塩分飼育により 3～4 日間短縮できた。

着底期から殻長 1mm 以上に達するまでの生残率は、通常塩分飼育が 9.3%、低塩分飼育では 1.8～5.9%でどちらも非常に低い値であった。

生残率が低下したのは着底前後の減耗および着底後のへい死によるものと考えられ、原因としては、着底期の摂餌量減少による残餌量増加により生じた水質悪化、着底完了後の摂餌料増加への対応不足、飼育容器の洗浄不足などが考えられた。

以上のことから、アンボ期以降に塩分条件を段階的に下げ、ほぼ着底が完了した段階で塩分を 15 、翌日に 19 に上げることで、着底までの飼育日数の短縮が可能であることが実証できた。しかし、着底期以降の生残率低下を防ぐことが出来なかったため着底前後の安定的な飼育にはさらなる飼育方法の改善が必要と考えられた。

【次年度に向けた提言】

引き続き種苗生産した稚貝から育成した親貝を使用して、最適な塩分条件で着底までの飼育期間を短縮し安定生産の可能性を実証するとともに、他機関で実施されている、着底期の飼育容器交換頻度の増加、高ふ化率・高成長の良質種苗の使用等の対策に取り組み生残率向上を目指す。

【図表】

表 1-1 通常塩分飼育結果（D 型～着底期、飼育期間：7 月 5 日～7 月 14 日、10 日間）

開始時 收容個体数	容器数	開始時 個体数	開始時 平均殻長	着底期 個体数	残留率	着底期 平均殻長
145 万/器	6	870 万	0.11mm	264 万	30.3%	0.18mm

表 1-2 通常塩分飼育結果（着底期～稚貝、飼育期間：7 月 14 日～9 月 20 日、78 日間）

開始時 收容個体数	容器数	開始時 個体数	開始時 平均殻長	終了時 個体数	生残率	終了時 平均殻長
44 万/器	6	264 万	0.18mm	24.5 万	9.3%	1.74mm

表 2-1 低塩分飼育①結果（D 型～着底期、飼育期間：7 月 21 日～7 月 28 日、8 日間）

開始時 收容個体数	容器数	開始時 個体数	開始時 平均殻長	着底期 個体数	残留率	着底期 平均殻長
93 万/器	12	1,116 万	0.11mm	379 万	34.0%	0.18mm

※飼育水塩分 19（7/21-26）→15（7/26-28）

表 2-2 低塩分飼育①結果（着底期～稚貝、飼育期間：7 月 28 日～9 月 20 日、54 日間）

開始時 收容個体数	容器数	開始時 個体数	開始時 平均殻長	終了時 個体数	生残率	終了時 平均殻長
63.2 万/器	6	379 万	0.18mm	19.2 万	5.9%	1.37mm

※飼育水塩分 15（7/28-8/1）→12.5（8/2-4）→15（8/5）→19（8/6-）

表 3-1 低塩分飼育②結果（D 型～着底期、飼育期間：7 月 26 日～8 月 2 日、7 日間）

開始時 収容個体数	容器数	開始時 個体数	開始時 平均殻長	着底期 個体数	残留率	着底期 平均殻長
63.3 万/器	12	760 万	0.11mm	188 万 152 万	44.7%	0.18mm 0.17mm

※飼育水塩分 19（7/26-30）→15（7/30-8/2）

表 3-2 低塩分飼育②結果（着底期～稚貝、飼育期間：8 月 2 日～9 月 20 日、50 日間）

開始時 収容個体数	容器数	開始時 個体数	開始時 平均殻長	終了時 個体数	生残率	終了時 平均殻長
47 万/器	4	188 万	0.18mm	4.4 万	2.3%	1.80mm
50.6 万/器	3	152 万	0.17mm	2.7 万	1.8%	1.32mm

※飼育水塩分 15（8/2）→12.5（8/3-5）→15（8/6）→19（8/7-）