

みどりの食料システム戦略実現技術開発・実証事業のうち
農林水産研究の推進（委託プロジェクト研究）

現場ニーズ対応型研究

クロマグロ養殖の人工種苗への転換促進のための早期採卵・人工種苗育成技術や低
環境負荷養殖技術の開発

令和4年度 最終年度報告書

| | |
|----------------|--|
| 課題番号 | 18064722 |
| 研究実施期間 | 令和30年度～令和4年度（5年間） |
| 代表機関 | 国立研究開発法人水産研究・教育機構 |
| 研究開発責任者 | 森 広一郎 |
| 研究開発責任者 連絡先 | TEL : 095-860-1617 |
| | FAX : 095-850-7767 |
| | E-mail : mori_koichiro78@fra.go.jp |
| 共同研究機関 | 国立大学法人 長崎大学（大学院水産・環境科学総合研究科、海洋未来イノベーション機構） |
| | 学校法人 近畿大学 水産研究所 |
| | 長崎県総合水産試験場 種苗量産技術開発センター |
| | マルハニチロ株式会社（中央研究所、増養殖事業部） |
| | 株式会社ケービデバイス 製品統括部 |
| 普及・実用化 支援組織 | |

<別紙様式3>最終年度報告書

I-1. 年次計画

| 研究課題 | 研究年度 | | | | | 担当研究機関・研究室 | | 研究担当者 (注1) |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|----|----------------------|--------------------|---|
| | H30 | R1 | R2 | R3 | R4 | 機関 | 研究室 | |
| 研究開発責任者 | / | / | / | / | / | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 | まぐろ養殖部 | ◎玄浩一郎 (~2021.3) ◎森広一郎 (2021.4~) |
| 1 クロマグロにおける早期人工種苗供給システムの開発 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 | まぐろ養殖部 | ○樋口健太郎 (~2021.3) ○入路光雄 (2021.4~) |
| 1-1 陸上水槽を用いた早期成熟・産卵誘導技術の開発 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 | まぐろ養殖部 | △樋口健太郎 (~2021.3) △入路光雄 (2021.4~) 玄浩一郎 (~2021.3) 高志利宣 横田高士 (2022.4~) 沖田光玄 林田貴雄 車遥介 (2022.4~) 石井慶太 (2021.4~) 久門一紀 山下貴示 (~2022.3) 橋本博 (~2022.3) 江場岳史 篠田理仁 (2021.4~) 小出佑紀 (2021.4~) |
| | ○ ○ | ○ ○ | ○ ○ | ○ ○ | ○ | | シラスウナギ生産部 生理機能部 | 風藤行紀 尾崎雄一 (~2022.3) |

| | | | | | | | | |
|------------------|---|---|---|---|---|----------------------|------------------|---|
| | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 水産資源研究所 | 生命情報解析部 浮魚資源部 | 山口寿哉 (~2022.3) 相馬智史 入路光雄 (~2021.3) |
| | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 長崎大学 | 海洋未来イノベーション機構 | 征矢野清 |
| | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | マルハニチロ | 中央研究所 | 椎名康彦 (~2021.3) 吉武政広 (2021.4~) 森脇俊尚 (~2021.3) 中本正俊 (2021.4~) 川瀬純也 篠原孝司 (~2021.3) 吉本充 (~2021.3) 関昭生 (~2021.3) 渡辺勤 (2021.4~) 天野文雄 (2021.4~) 伊藤暁 (~2021.10) 三原章義 (2021.11~) |
| | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | 増養殖事業部 | |
| 1-2 早期種苗の養殖適性の解明 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 | まぐろ養殖部 | △沖田光玄 玄浩一郎 (~2021.3) 高志利宣 横田高士 (2022.4~) 樋口健太郎 (~2021.3) 入路光雄 (2021.4~) 林田貴雄 |

| | | | | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|----------------------|---------|---|
| | | | | | | | | 樋口健太郎 (~2021.3) 入路光雄 (2021.4~) 沖田光玄 林田貴雄 車遥介 (2022.4~) 石井慶太 (2021.4~) 山本剛史 古板博文 奥宏海 松成宏之 村下幸司 吉永葉月 相馬智史 |
| | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | 生理機能部 | |
| | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 水産資源研究所 | 生命情報解析部 | |
| 2-2 摂餌特性に応じた至適給餌方法の開発 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 | まぐろ養殖部 | △高志利宣 玄浩一郎 (~2021.3) 横田高士 (2022.4~) 樋口健太郎 (~2021.3) 入路光雄 (2021.4~) 沖田光玄 林田貴雄 車遥介 (2022.4~) 石井慶太 (2021.4~) 久門一紀 山下貴示 (~2022.3) 橋本博 (~2022.3) 江場岳史 篠田理仁 (2021.4~) |

| | | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|----------------------|-----------------------------|--|
| | ○ | | | | | 日本電気株式会社 ケービデバイス | プラットフォームソリューション事業部 製品統括部 | 小出佑紀 (2021. 4～) 佐多直明 (～2019. 3) 宮武千香 (～2019. 3) 宮野弘平 (2020. 4～) 木村竜介 (2022. 4～) |
| 3 クロマグロの種苗 期に発生する疾病の防 除手法の開発 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 | 病理部 | ○中易千早 (～2021. 3) ○松山知正 (2021. 4～) |
| 3-1 マダイイリド ウイルス病等の重要疾 病に対するワクチンの 開発 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 | 病理部 | △松山知正 栗田潤 高野倫一 寺島祥子 (～2021. 3) 坂井貴光 (～2021. 3) 山崎雅俊 (～2021. 3) 西岡豊弘 (～2021. 3) 佐藤純 嶋原佳子 松浦雄太 中易千早 (～2021. 3) 吉野友晃 (2021. 4～) 前田知己 (2021. 4～) 中川徹優 (2021. 4～) 梅田剛佑 (2021. 4～) 湯浅啓 (2021. 4～) |

| | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|----------------------|--------|---|
| | | | | | | | | 2022. 3) 桐生郁也 米加田徹 (~2022. 3) 河東康彦 稲田真理 新田理人 (2022. 4~) 高田優三 (2022. 4~) 久門一紀 山下貴示 (~2022. 3) 橋本博 (~2022. 3) 江場岳史 篠田理仁 (2021. 4~) 小出佑紀 (2021. 4~) 白樫正 升間主計 青木隆一郎 |
| | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | まぐろ養殖部 | |
| | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 近畿大学 | 水産研究所 | |
| 3-2 住血吸虫に対する駆虫剤の最適な投与方法等の開発 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 近畿大学 | 水産研究所 | △白樫正 升間主計 青木隆一郎 米加田徹 (~2022. 3) |
| | ○ | ○ | ○ | ○ | | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 | 病理部 | |

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付してください。

I-2. 研究目的

太平洋クロマグロの資源量が逼迫する中で、完全養殖技術によって作出された人工種苗の普及・実用化が強く望まれている。しかし、人工種苗は同時期に採捕される天然種苗と比較して体サイズが小さく、越冬期の生残率も低い等から、天然種苗から人工種苗への転換促進が進んでいない。このため、完全養殖クロマグロから従来よりも早い時期に採卵し、天然種苗と同等の大きさの人工種苗を作出する新たな技術開発が望まれている。また、完全養殖クロマグロの生産性の向上にあたって、クロマグロ養殖特有の多量給餌に起因する漁場環境への負荷や、種苗期の各種疾病による大量減耗等も大きな問題となっている。

このため、本研究では、

1. 大型陸上水槽を用いた早期成熟・産卵誘導技術の開発
2. 海面生簀における早期種苗の養殖適性の解明
3. 配合飼料における消化特性の解明
4. 摂餌特性に応じた至適給餌方法の開発
5. マダイイリドウイルス病等の重要疾病に対するワクチンの開発
6. 住血吸虫に対する駆虫剤の最適な投与方法等の開発

により、早期人工種苗の作出、低環境負荷対策並びに種苗期の疾病防除に関する研究開発を実施し、当該人工種苗の生産効率を向上することを目標とする。

その結果、

1. 天然種苗と同等の大きさの人工種苗を作出するとともに、その養殖用原魚が1歳魚に至るまでの冬季の生残率（30～40%）を2倍に向上
2. 疾病対策及び環境負荷低減対策により生産コストの10%削減が期待される。

I-3. 研究方法

1. クロマグロにおける早期人工種苗供給システムの開発

(1) 大型陸上水槽を用いた早期成熟・産卵誘導技術の開発

クロマグロの人工種苗は、同時期に天然で採捕される幼魚と比較して体サイズが小さく、冬季の低水温期に死亡が急増する。そのため、人工種苗の従来産卵期（6～7月）よりも早い時期に人為的に産卵を誘導し、天然種苗と同等の大きさの人工種苗を作出する新たな技術開発が強く望まれている。そこで、環境制御が可能な大型陸上水槽を用いて、日長・水温プログラムを調整することで、従来よりも早い時期（4～5月）にクロマグロの産卵を誘導する技術を開発した。さらに、SNP（一塩基多型）解析に基づく新規親子判別用遺伝子マーカーを開発することで、継代親魚の産卵特性を明らかにした。

(2) 海面生簀における早期種苗の養殖適性の解明

早期の採卵によって、従来よりも早い時期すなわち従来よりも低い水温環境下で種苗の飼育が開始されることから、クロマグロの低水温下における養殖適性を明らかにする必要がある。また、早期に飼育を開始することで、天然で採捕され種苗として使用される天然種苗と同程度に成長するか、これにより冬季の生残率が向上するかを明らかにする必要がある。そこで、本課題では、小規模飼育システムを用い飼育水温の違いがクロマグロ人工種苗の生残・成長に及ぼす影響を調査するとともに、従来よりも早い時期に沖出しされた早期種苗の生残・成長を調査した。さらに、早期種苗の冬季の養殖適性を明らかにするため、冬季に至るまでの体サイズや冬季の生残

率を調査した。

2. 低環境負荷型クロマグロ給餌手法の開発

(1) 配合飼料における消化特性の解明

クロマグロの給餌頻度は、飼育担当者の経験と勘に基づいて決定されているが、飼餌料の種類、成長段階、飼育水温等により消化速度などが変化するため、最適な給餌頻度はこれら条件の違いに大きく影響を受ける。このため、本課題では(i)消化生理実験系の確立として、クロマグロの消化生理を調査する実験系を確立し、(ii)飼餌料形態が消化に及ぼす影響の解明として、(i)で確立した実験系を用いて飼餌料の違いが消化応答へ及ぼす影響を調査した。さらに、(iii)水温や成長が消化時間に及ぼす影響として、配合飼料を用いた飼育実験により水温及び成長段階ごとの胃内容物の消失時間及び消化酵素の活性と分泌量との関係を調べ、クロマグロの消化特性を明らかにした。上記で得られた知見をもとに、(iv)最適な給餌頻度の解明として、配合飼料の給餌実験により水温や成長段階ごとに変化するクロマグロの飼育に最適な給餌頻度を明らかにした。

(2) 摂餌特性に応じた至適給餌方法の開発

クロマグロ養殖漁場環境の改善には、主な有機物負荷の要因となる残餌の低減が必要となる。一般的にクロマグロ養殖では、給餌者の経験と勘によって給餌を終了するタイミングが決定されており、このタイミングの個人間の差異が残餌の増減に関わる。そこで、(i)陸上水槽及び海上生簀用に摂餌関連行動の指標化手法を検討し、(ii)リアルタイムで指標値を算出可能な行動評価システムを構築した。さらに、(iii)行動評価システムにさらに機能を追加して、計算された指標値に基づいてクロマグロへの給餌終了の判断を支援する給餌判断支援システム（以下、給餌支援システム）を構築した。

3. クロマグロの種苗期に発生する疾病の防除手法の開発

(1) マダイイリドウイルス病等の重要疾病に対するワクチンの開発

(i)魚病診断と診断マニュアルの作成として、養殖現場で感染症が疑われる死亡事例について原因を究明し、明らかになった病原体の検出法を確立した。重要な疾病については疫学調査を実施して流行期や流行漁場を把握し、また精度の高い検査法を開発し、開発した病原体の検出法及び診断方法を取りまとめた診断マニュアルを作成した。また、(ii)感染試験手法の開発として、ワクチンの評価試験に必要な感染手法等の開発を行った。(iii)ワクチンの開発と改良として、クロマグロ養殖において発生するマダイイリドウイルス病とレンサ球菌症の病原体の特性と、市販のワクチンの有効性を明らかにした。市販のワクチンの効果が不十分であれば、クロマグロに対して十分な効果を発揮するワクチンの開発を検討した。ワクチン開発の研究を効率化するために、小型水槽での飼育が可能で試験魚の入手が容易な魚種をマグロの代替とするモデル魚種として、ワクチンの効果改善を目的とした試験研究を行い、モデル魚種で得られた効果の高いワクチン成分及び投与方法について、クロマグロを用いた大型水槽での感染試験により効果を検証した。

(2) 住血吸虫に対する駆虫剤の最適な投与方法等の開発

住血吸虫症の発生状況と予測のため、(i)寄生モニタリング法の確立として、分子生物学的手法と免疫学的手法によるモニタリング方法の開発を試みた。養殖マグロで確認されている3種の住血吸虫を解析し、各種に特異的な定量遺伝子検出系（qPCR）を構築し、マグロ養殖場の異なる

時期と水深で採取した海水をqPCRに供して、遺伝子検出が可能か検証した。*Cardicola opisthorchis* 特異抗体を計測するELISAを構築し、0～4歳マグロの血中抗体価を測定して人工種苗における抗住血吸虫特異抗体の産生時期とその維持について調べた。(ii)最適な投薬スケジュールの構築として、住血吸虫が魚体に侵入してから成熟・産卵に要する期間を推定するため、沖出し後のマグロ人工種苗を定期的に検査し、心臓と鰓における住血吸虫の出現状況を調べた。未成熟虫に対するプラジクアンテルの薬効を検証するため、*C. orientalis* のスポロシスト幼虫及びセルカリア幼虫を異なる濃度のプラジクアンテルに曝露し、薬剤感受性を調べた。これらの調査・実験で得られた結果を元に最適な投薬スケジュールを構築し、その実用性と整合性をマグロ養殖担当者や県魚病診断担当者と検討した。(iii)寄生を軽減する新防除法の開発として、住血吸虫の発生源となる、養殖生簀周辺の間宿主ゴカイの生息場所を特定するため、生簀構造物に生息するゴカイ類における住血吸虫の寄生の有無を調べた。人工種苗沖出し用の生簀ロープ上に生息する間宿主ゴカイを駆除し、マグロへの寄生を軽減できるか検証した。また、簡便に生簀構造物間宿主ゴカイの防除法を開発するため、生簀網用の水性亜酸化銅系防汚剤で処理したロープを生簀に垂下し、定着したゴカイ数を非処理ロープと比較した。

I-4. 研究結果

1. クロマグロにおける早期人工種苗供給システムの開発

(1) 大型陸上水槽を用いた早期成熟・産卵誘導技術の開発

(i) 早期成熟・産卵誘導技術の開発

年周期の環境条件を約2ヵ月前倒しする日長・水温プログラム(シフト型)または冬至の時期に日長を短日から長日にする日長・水温プログラム(長日型)で親魚を養成することにより、早期成熟・産卵誘導できる方法を確立した。特に、シフト型の早期成熟・産卵誘導法は、試験を繰り返すことで再現性の高い方法であることが示されたことから、日長・水温プログラムの操作手順をまとめて、早期産卵誘導マニュアルを作成した。

(ii) 早期受精卵の大量生産及びその再現性の確認

シフト型の早期・成熟産卵誘導法により、3～5月の早期に4千万～4億粒の早期受精卵を生産した。本方法は、遺伝的バックグラウンドの異なる2つの親魚群に有効であることが確認された。

(iii) 新規遺伝子マーカーの開発

次世代シーケンサーを利用したマーカー検出技術であるGRAS-Di解析を利用して、SNPマーカーを探索して、親魚と仔魚の親子判別を行う方法を確立した。シフト型及び長日型の環境プログラムにより継続的に産卵した親魚群と仔魚の親子判別により、早期産卵した親魚の産卵数や産卵間隔等が明らかになった。

(2) 海面生簀における早期種苗の養殖適性の解明

(i) 水温の違いが人工種苗の生残・成長に及ぼす影響の解明

早期に採卵された受精卵の卵管理や従来よりも低い水温で仔魚を飼育できるかを調べるため、受精卵及びふ化仔魚に与える水温操作の影響について飼育試験を実施した。その結果、受精卵に水温操作を施してもふ化率は変わらず、23℃以上であれば仔魚を飼育可能であり、昇温操作により成長が促進されることが明らかになった。また、沖出しサイズの稚魚期の人工種苗に適した水流と水温を調節できる小規模飼育システムを開発し、当該システムを用いて水温別飼育試験を実施した。その結果、沖出しサイズの人工種苗は少なくとも17℃以上であれば生残可能であること、水温が低いほど成長は遅延するが成長効率は20～23℃で最も高くなることが明らかになっ

た。さらに、低水温で成長効率が高くなる要因について、沖出しサイズの人工種苗のエネルギー収支を20℃と26℃で比較したところ、20℃で飼育すると熱増加などに消費されるエネルギーが26℃よりも少ないために、効率よく成長できることが分かった。以上の結果から、従来よりも低い水温環境下に沖出しされた早期種苗は、海面生簀において飼育可能であることが示唆された。

(ii) 早期種苗の養殖適性の解明

協力機関に早期受精卵を提供して種苗生産が行われた結果、全長 50 mm 時点の生残率はいずれの機関でも従来と遜色ない値であったことから、早期受精卵は質的に問題のないことが確認された。早期受精卵から生産された早期種苗を、九州以北海域の協力機関の海面生簀に沖出しして1ヶ月間の飼育試験を実施した。その結果、早期種苗を20℃前後で沖出した場合、従来よりも成長は遅れるものの飼育可能であることが養殖場での実証試験で明らかになった。成長については九州以南・四国海域の養殖場で早期種苗の海上育成について実証試験を6回実施したところ、従来種苗と比較して冬季の低水温期に至るまでの飼育期間が長いことから、早期種苗は越冬前の当歳12月時点で越冬可能な天然種苗の体サイズである体重2 kgを越えることが6事例全てで確認された。さらに、天然種苗と同等以上の体サイズに成長した早期種苗の利用により、九州以北海域及び九州以南・四国海域で従来30%から40%であった冬季の生残率を2倍程度（それぞれ86.7%及び86.8%）に向上できることが養殖場での実証試験で明らかになった。

2. 低環境負荷型クロマグロ給餌手法の開発

(1) 配合飼料における消化特性の解明

(i) 消化生理実験系の確立

海上生簀で育成中のクロマグロ幼魚を用い、成長に伴う消化酵素の生化学的特性の変化を解析し、クロマグロ幼魚の消化生理における測定系を確立した。

(ii) 飼餌料形態が消化に及ぼす影響の解明

上記で確立した測定系を用いて、飼餌料形態の違いとして配合飼料区（以下、配合区）と生餌区（イカナゴ）を海上生簀に設定し、成長段階による飼餌料の消化特性に及ぼす影響を調査した。その結果、配合区の幼魚は生餌区の幼魚と比べて胃及び幽門水重量が数倍程度大きくなること、幽門垂組織における膵臓消化酵素活性が配合区で生餌区よりも高い値となることを明らかにした。

(iii) 水温や成長が消化時間に及ぼす影響

配合飼料を用いた飼育実験により水温（22℃、25℃、28℃）及び成長段階ごと（体重1 g、10 g、100 g、1,000 g）の胃内容物の消失時間や消化酵素の活性、分泌量との関係を調べ、クロマグロの消化に関わる情報を得た。

(iv) 最適な給餌頻度の解明

上記で得られた知見をもとに比較飼育試験を実施し、体重1 gでは水温28℃時の至適給餌頻度は3回/日（4時間間隔、胃での配合滞留率は25%）、体重10 gでは水温28℃時の至適給餌頻度は5回/日（2.4時間間隔、胃での配合滞留率は25%）、体重100 gでは水温28℃時の至適給餌頻度は2回/日（8時間間隔、胃での配合滞留率は0%）と、各サイズの至適な給餌頻度を明らかにした。また体重1,000 gの幼魚についてはこれまでの成果を応用し、至適給餌頻度は1日1回の給餌で十分であると推定した。以上、課題2-(2)へ提供するための体重別の至適給餌頻度の成果を得た。

(2) 摂餌特性に応じた至適給餌方法の開発

(i) 摂餌関連行動の指標化

陸上水槽及び海上生簀で摂餌時の行動を撮影し、それらを画像処理することにより摂餌関連行動を指標値化する方法を陸上水槽及び海上生簀用として各2種類開発した。

(ii) 摂餌行動の自動検出システムの構築

開発した指標化手法に基づいて、陸上水槽や海上生簀で撮影した動画をリアルタイムで解析し、指標値を算出可能な行動評価システムを構築した。システムはC言語を用いて開発し、LinuxベースのOS (Ubuntu) 上で動作可能なアプリケーションとして開発した。

(iii) 摂餌終了の意思決定を支援するシステムの構築

行動評価システムに給餌をタイマー開始する機能及び指標値に基づいて給餌終了判断を行い、自動給餌機を停止する機能などを組み込んだ給餌支援システムを開発した。開発した給餌支援システムを用いて陸上水槽及び海上生簀において性能評価試験を行った。クロマグロ稚魚を対象とした陸上水槽での試験では、成長・生残は対照区(手撒き)とシステム区で遜色ない結果が得られた。コスト計算したところ、給餌支援システムを導入することで飼料費では53.6%、人件費を含めた1尾当りの生産コストでは71.9%の削減が可能と試算された。海上生簀における性能評価試験においても、成長・生残は対照区と比べて遜色ない結果が得られ、また、給餌量も削減できた。コスト計算では、給餌支援システムを導入することで飼料費では14~16%程度の削減、1尾当りの生産コストでは40~70%程度の削減と試算された(1尾当りの生産コストは供試魚数で大きく変わるため注意が必要)。

3. クロマグロの種苗期に発生する疾病の防除手法の開発

(1) マダイイリドウイルス病等の重要疾病に対するワクチンの開発

(i) 魚病診断と診断マニュアルの作成

養殖現場において発生した不調事例について調査を行い、9種類の感染症の原因を明らかにした。また、被害が大きいレンサ球菌症とマダイイリドウイルス(RSIV)病については疫学調査を行い、クロマグロでは α 溶血性レンサ球菌1型が流行していることを明らかにするとともに、養殖漁場においてRSIVの流行を拡大させるリスク要因を複数推定した。特定した9種類の感染症については、組織病理及び検出法をまとめた感染症診断マニュアルを作成した。また本マニュアルには、RSIVの疫学調査から考えられた本病の蔓延防止対策と、水研機構奄美庁舎で実施しウイルス性神経壊死症(VNN)の蔓延防止に効果がみられた配偶子洗浄法も盛り込んだ。

(ii) 感染試験手法の開発

ワクチンの有効性を評価する上で必要なRSIV及びレンサ球菌の感染試験法を開発した。

(iii) ワクチンの開発と改良

上記において確立したRSIV及びレンサ球菌の感染試験法を用いて、市販のワクチン及び改良した試作ワクチンのクロマグロに対する有効性を調査した。市販のRSIV注射ワクチンはクロマグロ稚魚に対して殆ど効果がないが、レンサ球菌注射ワクチン及び経口ワクチンには一定の効果があることを明らかにした。市販ワクチンに効果が見られないRSIVについては、試作ワクチンのクロマグロに対する有効性試験を行い、有意に効果が高まることを確認した。

(2) 住血吸虫に対する駆虫剤の最適な投与方法等の開発

(i) 寄生モニタリング法の確立

構築したqPCR系のマグロ住血吸虫3種に対する種特異性と定量性が確認された。養殖場海水からもそれぞれの種の遺伝子を定量的に検出できたが、検出量や検出の有無は採水場所や採水日によって大きく変動することが分かった。海水中の遺伝子量は表層と1 m水深では大きな違いが無

いこと、海水0.5 Lからも遺伝子検出が可能であること、イリドウイルス検出用のサンプルを共有できることなども確認した。海水からの遺伝子検出によるモニタリングには複数地点で経時的な調査が必要なことも示された。

*C. opisthorchis*に対する血中抗体価計測ELISA法で良好な反応が示され、抗マグロ住血吸虫測定方法が構築された。陸上飼育中のマグロから抗体は検出されず、海面生簀に移動後約3ヶ月では抗体産生が認められた。魚体重が50 kg以上の出荷魚全検査個体からも抗体反応が認められたが、当歳魚との間に抗体価の大きな違いはみられなかった。年級群、雌雄による違いや魚体重、肥満度との相関は確認されなかった。一方、同一群のマグロ内でも抗体価の個体差が大きく、最大で6倍以上の開きが認められた。抗体価が顕著に高い個体は住血吸虫に対する抵抗性が高いか、特別な重篤寄生を受けているか検証する必要がある。開発した検出系は寄生のモニタリングの他、抗住血吸虫系統の育種に活用できる可能性がある。

(ii) 最適な投薬スケジュールの構築

マグロ人工種苗を海面生簀に移動1週目で、心臓から*C. opisthorchis*の遺伝子が検出されはじめ、4週目には100%に達した。鰓では3週目から検出され始めたが、遺伝子量は心臓より少なかった。顕微鏡検査では生簀収容4週目にはじめて心臓に成虫と鰓に虫卵が確認され、qPCRは早期診断に極めて有効であることが示された。*C. opisthorchis*が成熟・産卵するまでの期間は約4週間と推定された。*C. orientalis*については、発育速度が*C. opisthorchis*より遅く、産卵までに5週間以上のかかることが示された。両種ともに、それぞれの寄生部位の鰓と心臓で遺伝子が確認されてから、2週間程度で虫卵の産生が認められた。また、*C. orientalis*の幼虫に対するプラジクアンテルの殺虫効果が認められた。

最適な投薬方法として、以下の投薬スケジュールを構築した：1) qPCRにより発生する住血吸虫種を特定する。2) 人工種苗を海面生簀に導入後、1ヶ月を目処にプラジクアンテル製剤の投薬を開始する。3) *C. opisthorchis*については4週間、*C. orientalis*については、5週間を目処に投薬を繰り返す。4) 投薬は魚体が5 kg程度になるまで継続すると死亡被害が軽減できる。5) 赤潮の発生が予想される海域では、発生1～2週間前を目処に投薬し住血吸虫による赤潮被害の増大を防ぐ。構築した最適な投薬法を養殖業界誌へ掲載するとともに、マグロ養殖関係者を対象とした講演で発表し、現場への実装を推進する普及活動を行った。

3～4歳の大型マグロでも寄生を確認し、死亡被害は稀であるものの、リザーバーとなっている可能性が示された。

(iii) 寄生を軽減する新防除法の開発

生簀ロープの清掃を実施する以前は、ロープ上のフサゴカイ類の最大20%程度で住血吸虫の寄生が確認されたが、ロープ清掃以降に感染ゴカイは殆どみられず、清掃により生簀周辺から感染ゴカイが駆除できたことが示された。清掃を実施した生簀に収容されたマグロ人工種苗の虫卵陽性率も、生簀ロープの清掃を実施せず収容していた過去の事例ではは収容7週目の時点で100%であったのに対し、32週目でも20%と低い状態を維持した。ロープを亜酸化銅系防汚剤処理することで、最低1年間以上はゴカイを簡便に防除できることを確認し、中間宿主の生息密度を減らしてマグロへの寄生を軽減する抜本的な対策方法が確立された。これら成果についても養殖現場での実装推進のため、投薬スケジュールと共に公表して普及啓蒙を行った。一方、*C. opisthorchis*については、生簀構造物上の感染ゴカイ生息場所が特定できず、投薬を主体とした対策が重要であると考えられた。

I - 5. 今後の課題

クロマグロ親魚の飼育に際して、陸上水槽では8～10月の秋季に斃死が発生しやすい。その理由として、病気の発生や、産卵後の衰弱などが考えられるが、主な要因は明らかでない。陸上水槽での斃死発生の主要因の特定と、その防除技術の開発は今後の課題とされる。クロマグロにおいては、完全養殖に適した優良系統の作出が求められている。一方、本研究により、完全養殖クロマグロの近交度が高くなっていることが分かった。近交度が高まると環境への適応能力が低下し、繁殖能力や病気への耐性が低くなることが知られている。今後は、繁殖能力への近交度の影響を評価しつつ、近交度の上昇を抑えて、育種技術を確立することが必要である。

早期種苗の養殖適性（生残・成長）は、生産された翌春の1歳時点で従来種苗よりも優れ、天然種苗に劣らないことを明らかにした。今後は3歳の出荷に至るまでの成長を明らかにし、早期種苗の有効性を示すことで、クロマグロ養殖の人工種苗への転換を進めて行く必要がある。

給餌支援システムについては、基本形は完成したと考えているが、事例数が少ないため実用化に向けてはさらに使用事例を増やし、ブラッシュアップする必要がある。また、本課題では、稚魚期から幼魚期を対象としているため、大型の生簀を要する未成魚以降の魚を対象とするには、さらなる技術・研究開発が必要と考えている。

重要疾病のワクチンの開発において、効果を確認できたレンサ球菌症ワクチンはブリ属に対して承認された製品であるため、承認対象をクロマグロに拡大するための試験が必要である。また、試作RSIVワクチンを製品化するためには、承認申請に必要なデータを取得する必要がある。

住血吸虫の対策については、適切な投薬スケジュールで虫卵産生前に駆虫を実施し続ければ、虫卵の産生を遮断でき、理論的には漁場全体から住血吸虫を駆逐できるはずである。寄生予防法と共に、その効果については養殖場での実施事例を集積し、他の養殖現場にフィードバックすることで社会実装を推進させる必要がある。

| | | | |
|-----------------------------|---|--------------|------------------|
| 実行課題番号 | 18064722-0101 | 実行課題 研究期間 | 平成30年度～ 令和4年度 |
| 小課題名 | 1 クロマグロにおける早期人工種苗供給システムの開発 | | |
| 実行課題名 | (1) 大型陸上水槽を用いた早期成熟・産卵誘導技術の開発 | | |
| 小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 まぐろ養殖部 入路光雄 | | |
| 実行課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 まぐろ養殖部・入路光雄、高志利宣、横 田高士、沖田光玄、林田貴雄、車遥介、石井慶太、久門一 紀、江場岳史、篠田理仁、小出佑紀 シラスウナギ生産部・風藤行紀 水産資源研究所 生命情報解析部・相馬智史 | | |
| 共同研究機関・研究室・研究者 名等 | 長崎大学 海洋未来イノベーション機構・征矢野清 マルハニチロ 中央研究所・吉武政広、中本正俊、川瀬純 也 増養殖事業部・渡辺勤、天野文雄、三原章義 | | |

II. 実行課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

クロマグロの人工種苗は、同時期に天然で採捕される幼魚と比較して体サイズが小さく、冬場の低水温期に死亡が急増する。そのため、人工種苗の従来の産卵期（6～7月）よりも早い時期に人為的に産卵を誘導し、天然種苗と同等の大きさの人工種苗を作出する新たな技術開発が強く望まれている。そこで、環境制御が可能な大型陸上水槽を用いて、日長・水温プログラムを調整することで、従来よりも早い時期（4～5月）にクロマグロの産卵を誘導する技術を開発した。さらに、SNP（一塩基多型）解析に基づく新規親子判別用遺伝子マーカーを開発することで、継代親魚の産卵特性を明らかにした。

2) 研究方法

上述の目的を達成するため、本実行課題は、(i) 早期成熟・産卵誘導技術の開発、(ii) 早期受精卵の大量生産及びその再現性の確認、(iii) 新規遺伝子マーカーの開発の3項目の取組みを実施した。

(i) 早期成熟・産卵誘導技術の開発

水産研究・教育機構では、大型陸上水槽を用いて日長・水温を人為的に制御して、6～7月にクロマグロの産卵を誘導することに成功していた。そこで、この技術を応用し、年周期の環境条件を約2ヵ月前倒しする日長・水温プログラム（シフト型）で親魚を養成することで、従来よりも早く成熟・産卵を誘導して、4～5月に採卵する技術の開発を目指した。併せて、ブリ類の早期成熟・産卵誘導に用いられる、冬至の時期に日長を短日から長日にする日長・水温プログラム（長

日型) が、クロマグロの早期成熟・産卵誘導に有効であるかどうかについても検討した。早期産卵誘導条件下における生殖腺の発達過程などの生物情報を収集し、得られた知見をもとに早期成熟・産卵誘導条件の至適化を図った。

(ii) 早期受精卵の大量生産及びその再現性の確認

(i) で開発した技術を用いて親魚を養成して、国内で使用が見込まれる十分量の早期卵を生産するとともに、遺伝的バックグラウンドが異なる親魚群を用いて早期産卵を誘導することで、当該技術の再現性を確認した。なお、得られた早期受精卵は、実行課題1-(2)へ提供した。

(iii) 新規遺伝子マーカーの開発

クロマグロの種苗生産では、1回につき50万~100万粒の受精卵を使用するため、種苗生産開始時には大量の早期卵を一度の供給する必要がある。しかし、現状では雌1尾当りの産卵回数や産卵間隔等が特定できないため、種苗生産に提供できる受精卵数については極めて不確実性が高い。一般に水産有用魚種では、遺伝子マーカーによる親魚と卵の親子判別を行うことで個体毎の産卵数等を明らかにしているが、近親交配が進んでいる完全養殖クロマグロではマイクロサテライト等の既存のマーカーが使用できない。そこで、より精度の高いSNP(一塩基多型)マーカーを開発し、早期産卵誘導した親魚の産卵数や産卵間隔等を明らかにすることで、種苗生産サイドへの計画的・効率的な早期卵の供給システムの確立を目指した。

3) 研究結果

(i) 早期成熟・産卵誘導技術の開発

シフト型と長日型のどちらの環境プログラムにおいても、早期成熟・産卵誘導できる条件を確立した(表1、2: 図1、2)。

① シフト型

2017年に搬入した2歳の親魚群を通常的环境プログラムで飼育することにより、2018年6~8月の通常期に産卵を誘導した(試験A)。次に、この3歳の親魚群を継続飼育して、2018年10月より2ヵ月前倒した環境プログラムの下で養成した(試験B)。その結果、2019年の産卵期に、従来よりも2ヵ月ほど早い、4月23日に産卵を開始した。6月10日までの49日間のうち12日で産卵が確認され、総採卵量は11百万粒であった。なお、同様のシフト型的环境条件で2017年から2018年にかけて飼育した親魚群においては、通常は6月頃に出現する卵黄形成個体が3~4月に出現した。これらの試験から、シフト型的环境プログラムによる親魚養成が、クロマグロの早期成熟・産卵誘導に有効であることが示された。

一方、2018年7月に搬入して、搬入後から1ヵ月前倒した環境プログラムの下で養成した2歳の親魚群(試験C)においては、翌年に早期の成熟・産卵は誘導できず、産卵は7月から開始した。この要因として、成熟開始時の体サイズが小さかったことが考えられる。

2020年(試験D)、2021年(試験F)には、産卵前年の6~7月に2歳の親魚群を搬入して、2ヵ月前倒した環境プログラムの下で養成した。いずれの試験においても、3~4月の早期に産卵が誘導できた。2022年(試験H)には、前年より2.5ヵ月前倒した環境プログラムの下で養成したところ、2021年(試験F)よりも1週間早く産卵が開始した。なお、試験B及び試験Fでは、採卵終了後に魚を取り上げて、生殖腺を組織観察した。その結果、オスはほぼ100%が成熟するのに対し、メスの成熟率は30%程度であった。

このように、シフト型の早期成熟・産卵誘導法は再現性の高い方法であることが示されたことから、日長・水温プログラムの操作手順をまとめて、早期産卵誘導マニュアルを作成した。

② 長日型

2019年6～8月に産卵した3歳の親魚群（試験C）を継続飼育して、通常環境プログラムで養成した後、2019年12月22日からは明期15時間：暗期9時間（15L：9D）の長日条件で飼育した（試験E）。その結果、2020年3月15日に産卵が確認されて、3月24日までの間に4日産卵した。

2020～2021年には、2020年12月に搬入した3歳の親魚群を用いて再試験を行った（試験G）。本試験では、より安定した産卵を目指して、飼育尾数を増やすとともに、搬入後に1ヵ月の馴致期間を設けた。12月15日に搬入後は短日条件（10.5L：13.5D）で飼育した後、翌年1月12日に長日条件（15L：9D）に切り替えた。その結果、3月22日に産卵を開始し、その後も継続的に産卵した。親魚を取り上げた4月25日までの間に、29日産卵して、総産卵量は37百万粒であった。

2021～2022年には、2021年12月に搬入した2歳の親魚群を用いて、3歳の親魚でも早期産卵が誘導されるかを検証した（試験I）。試験Fと同様の条件で養成した結果、3月15～23日に散発的な産卵が確認された。その後、4月20日に産卵が再開し、継続的な産卵が7月22日まで続いた。産卵日数は69日で、総採卵量は85百万粒であった。なお、試験Gにおいて、採卵終了後に取り上げた個体の生殖腺観察による成熟率は、メスで67%、オスで100%であった。

以上より、長日型の環境プログラムも、早期成熟・産卵誘導に有効であることが示された。

表1. 早期成熟・産卵誘導試験

| 試験 | 採卵年 | 採卵年 (西暦) | 系群 | 生まれ年 | 世代 | 水槽搬入日 | 環境操作 | 産卵年齢 (歳) |
|----|------|-------------|-----------------|------|-------|------------|-------------|-------------|
| A | 平成30 | 2018 | 2006年級 | 2015 | F2 | 2017/11/12 | 通常 | 3 |
| B | 令和1 | 2019 | 2006年級 | 2015 | F2 | 2017/11/12 | シフト型(2ヵ月) | 4 |
| C | 令和1 | 2019 | 2004年級 | 2016 | F3 | 2018/7/7 | シフト型(1ヵ月) | 3 |
| D | 令和2 | 2020 | 2006年級 | 2017 | F3 | 2019/7/10 | シフト型(2ヵ月) | 3 |
| E | 令和2 | 2020 | 2004年級 | 2016 | F3 | 2018/7/7 | 長日型 | 4 |
| F | 令和3 | 2021 | 2006年級 | 2018 | F3 | 2020/6/5 | シフト型(2ヵ月) | 3 |
| G | 令和3 | 2021 | 2006年級 | 2017 | F3 | 2020/12/9 | 長日型 | 4 |
| H | 令和4 | 2022 | 2004年級 | 2019 | F4 | 2021/6/17 | シフト型(2.5ヵ月) | 3 |
| I | 令和4 | 2022 | 2004年級(♂)+民間(♀) | 2019 | F4(♂) | 2021/12/8 | 長日型 | 3 |

表2. 各試験における産卵実績

| 試験 | 産卵開始時の尾数 | | | 産卵終了時の尾数 | | | 産卵開始日 | 産卵終了日 | 産卵期間 (日) | 産卵日数 (日) | 総採卵量 (百万粒) | 平均正常 ふ化率(%) |
|----|----------|----|----|----------|----|----|-------|-------|-------------|-------------|---------------|----------------|
| | メス | オス | 合計 | メス | オス | 合計 | | | | | | |
| A | 27 | 15 | 42 | 26 | 15 | 41 | 6/22 | 8/20 | 60 | 54 | 97 | 78.6 |
| B | 23 | 14 | 37 | 11 | 6 | 17 | 4/23 | 6/10 | 49 | 12 | 11 | 85.0 |
| C | 15 | 26 | 41 | 14 | 24 | 38 | 7/2 | 8/7 | 37 | 24 | 5 | 74.9 |
| D | 30 | 28 | 58 | 28 | 23 | 51 | 3/9 | 7/4 | 118 | 113 | 561 | 81.6 |
| E | 3 | 8 | 11 | 3 | 8 | 11 | 3/15 | 3/24 | 10 | 4 | 2 | 48.6 |
| F | 32 | 22 | 54 | 18 | 12 | 30 | 4/16 | 7/28 | 104 | 100 | 424 | 87.4 |
| G | 9 | 28 | 37 | 9 | 23 | 32 | 3/22 | 4/25 | 35 | 29 | 37 | 90.0 |
| H | 8 | 10 | 18 | 6 | 7 | 13 | 4/9 | 9/4 | 149 | 138 | 175 | 77.0 |
| I | 24 | 9 | 33 | 19 | 6 | 25 | 3/15 | 7/22 | 130 | 69 | 85 | 46.9 |

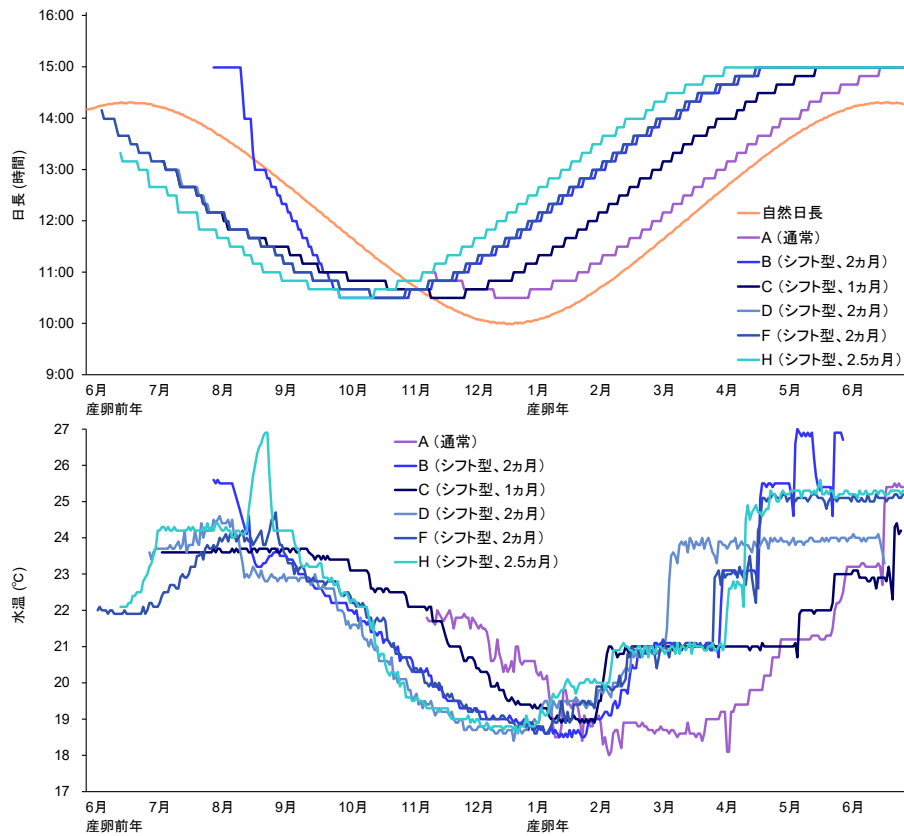


図1. シフト型試験の日長・水温

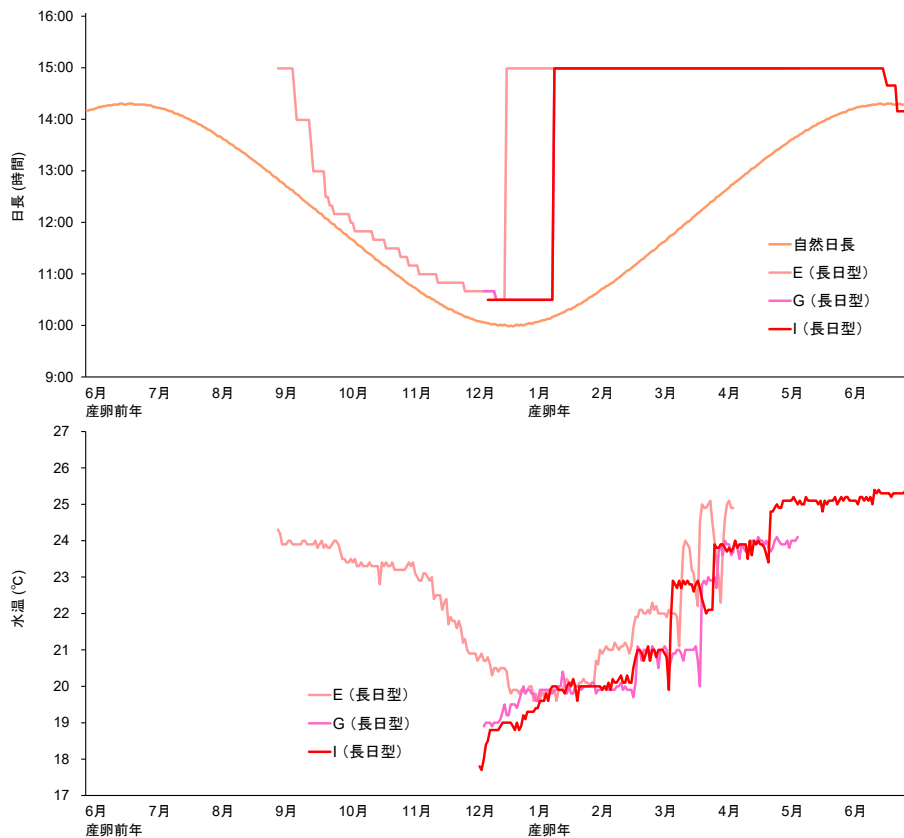


図2. 長日型試験の日長・水温

(ii) 早期受精卵の大量生産及びその再現性の確認

シフト型の早期・成熟産卵誘導法により、3～5月の早期に4千万～4億粒の早期受精卵を生産した。本方法は、遺伝的バックグラウンドの異なる2つの親魚群に有効であった。3年連続で、早期の産卵開始から3ヵ月以上の継続産卵を誘導することに成功したことから、本方法が再現性の高い方法であることが示された。長日型の方法においては、産卵年が3歳と4歳の両年齢群に有効であることが示された。

① シフト型

シフト型の環境プログラムによる早期成熟・産卵誘導では、2020年（試験D）、2021年（試験F）、2022年（試験H）の3回において、いずれも3～4月の早期に産卵を開始して、3ヵ月以上継続的に採卵することに成功した（図3）。試験D、Fでは、4ヵ月間以上の継続産卵により、それぞれ5億61百万粒、4億24百万粒の卵が得られた。試験Hでは、産卵開始時のメス個体数が少なかったため総採卵数は比較的少なかったものの、1億75百万粒の卵が得られた。

採卵量は、6月に産卵が開始する通常環境プログラムにおいては、7月に盛期となる（図3、試験A）。一方、早期に産卵を開始した産卵群では、産卵開始の1～2ヵ月後の4～6月に盛期となった（試験D、F、H）。

正常ふ化率は、3ヵ月以上に渡って産卵が継続した2020年（試験D）、2021年（試験F）、2022年（試験H）において、それぞれの平均が81.6%、87.4%、77.0%と、いずれも80%前後の高い値であった（表2、図4）。3月に産卵が開始した試験Dでは、産卵開始当初に正常ふ化率が20%以下になる日があったものの、産卵期間全体を通すと、ばらつきは小さかった。

② 長日型

長日型の環境プログラムによる早期成熟・産卵誘導では、2021年（試験G）において、3月22日からの約1ヵ月間の産卵により37百万粒の早期受精卵を採卵した。本試験では、次年度の試験を実施するために親魚を4月下旬から取り上げて、採卵を停止した。一方、2022年（試験I）は、親魚を途中で取り上げることなく夏季まで飼育することで、4ヵ月間産卵を継続させることに成功した。産卵は継続したものの、採卵期間における産卵日数は130日中69日、総採卵数は85百万粒であり、シフト型と比べると、産卵日数、採卵量ともに少なかった。

正常ふ化率は、2021年（試験G）は平均90.0%と高く、ばらつきも小さかった（表2、図4）。対して、2022年（試験I）は平均46.9%で、ばらつきが大きかった。2022年（試験I）の正常ふ化率が良くなかった原因は不明であるが、試験Gは4歳、試験Iは3歳という産卵年齢による違いは、要因の候補の1つである。

以上より、長日型については、早期成熟・産卵誘導が可能であり、再現性も示されたものの、採卵量やふ化率には、試験によるばらつきがみられた。

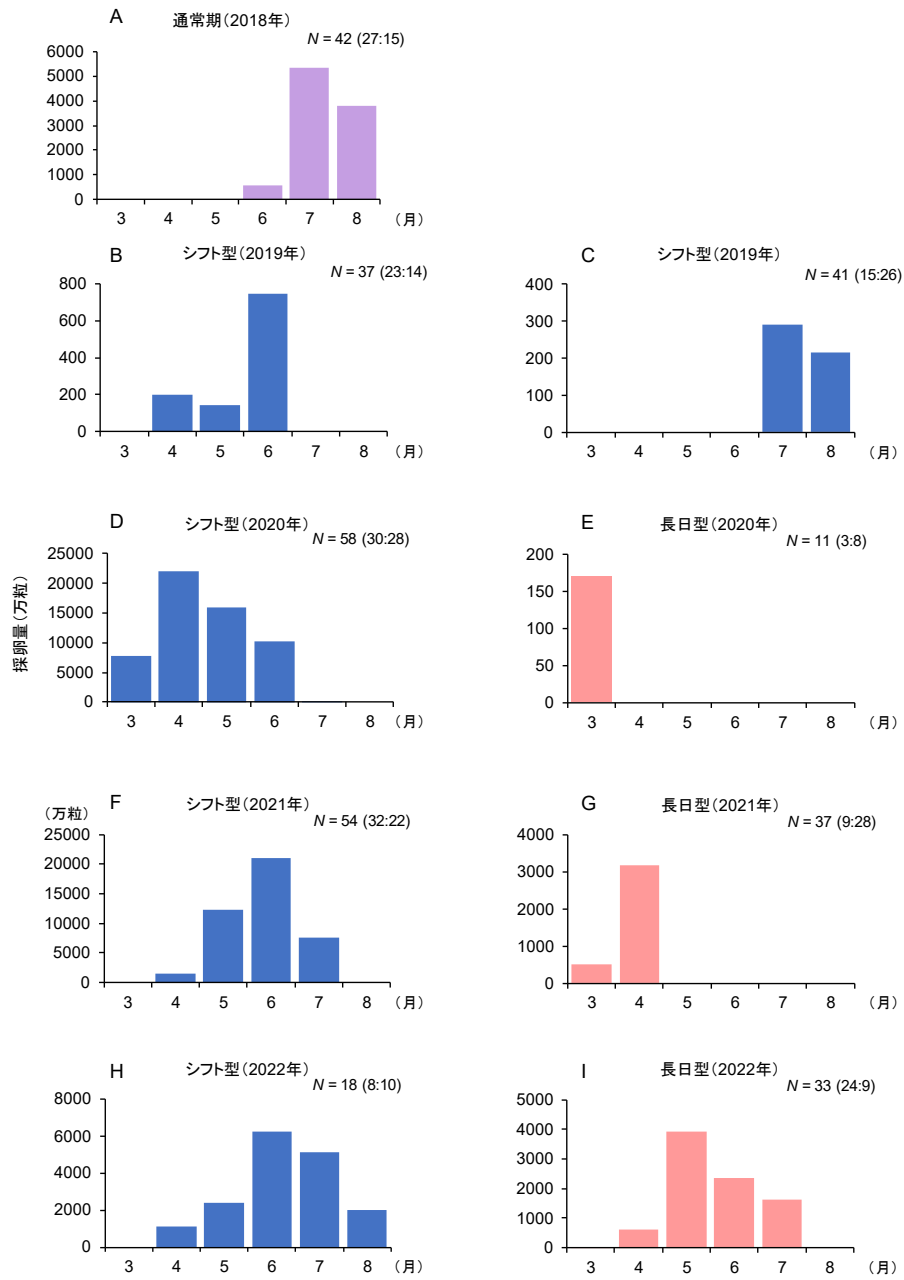


図3. 各試験における月別採卵量の推移 右上のN数は産卵開始日の親魚数（メス：オス）。

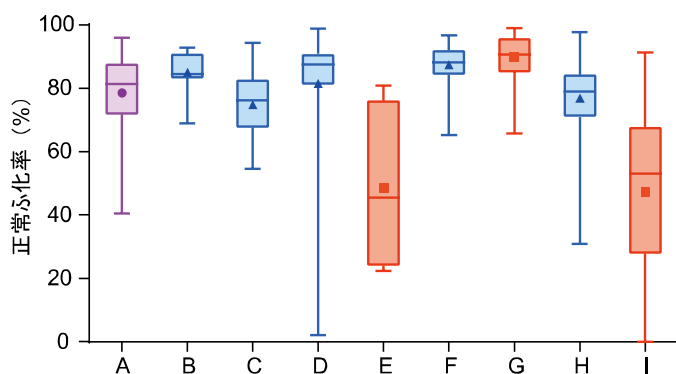


図4. 各試験における正常ふ化率

(iii) 新規遺伝子マーカーの開発

① 遺伝子マーカーの開発と親子判別方法の検討

次世代シーケンサーを利用したマーカー検出技術であるGRAS-Di解析を利用して、SNPマーカーを探索して、親魚と仔魚の親子判別を行う方法を検討した。

まず、試験Aより得られた親魚42尾（2006年級群、F2）についてGRAS-Di解析を用いたジェノタイピングを行い、得られたSNP情報から絞り込みを行った結果、311個の遺伝子マーカーが得られた。これらのマーカーを用いて、試験A及びBの仔魚計94尾の親子判別を行った結果、それぞれ87%と85%の判別率で両親ペアが同定された。また、試験Cの親魚50尾（2004年級群、F3）についても同様の解析を行った結果、240個の遺伝子マーカーが得られた。これらのマーカーを用いて、試験Cの仔魚40尾の親子判別を行った結果、100%の判別率で両親ペアが同定された。さらに、2006年級と2004年級の2つの家系から得られた遺伝子マーカーの比較により、約50個の共通するマーカーが得られた。これらのマーカーを用いて、それぞれの家系の仔魚の親子判別を行った結果、判別率は43%（2006年級群）及び18%（2004年級群）となった。このことから、継代が進んだクロマグロ集団の親子判別には、集団ごとにSNP情報を収集し、得られた遺伝子マーカーを用いて親子判別を行う必要があることが分かった。

試験Dの仔魚の親子判別においては、従来の方法による仔魚の親子判別率は30%と低くなった。その理由として、近交度が高くなり、個体判別がより困難になったと考えられた。そこで、SNP抽出方法及びSNPフィルタリング条件を再検討した。具体的には、gatk best practicesに従ってSNPを抽出し、sequencing depth 20以上、サンプル共有率100%、マイナーアレル頻度（MAF）が0.1以上0.2以下、連鎖不平衡係数（ r^2 ）が0.4以下の条件でフィルタリングを行った。さらに、同一リードに由来するSNPを目視で除去して、297個の遺伝子マーカーを得た。これらのマーカーを用いて、排除法による親子判別を実施した。234尾の親子判別を行った結果、77%の判別率で両親ペアが同定された。

試験Gの仔魚の親子判別においては、SNPフィルタリング条件をさらに更新した。具体的には、親魚集団におけるSNPを抽出して、sequencing depth 20以上、サンプル共有率100%、MAFが0.3以上0.4以下の条件でフィルタリングを行った。さらに、ゲノム上で隣接する座位間の物理的距離が1 Mb以上になるようにSNPを選抜した。これらのリストをもとに、排除法による親子判別を行った。親子判別の結果に基づいてミスマッチアレルを除去することで、77個の遺伝子マーカーを得た。これらのマーカーを用いて、260尾の親子判別を行った結果、99%の判別率で両親ペアのいずれかが同定された。

② 産卵特性の解析

シフト型（試験D）：3～6月の各月後半の連続する6～8日について、各8～9尾の仔魚を親子判別した。同定された仔魚のメス親の情報に基づいて、メスの産卵特性を推定した。3月、4月、5月、6月の産卵に関与した個体数は、それぞれ10尾、11尾、12尾、6尾と推定された。各月の総採卵量に占める、各メス親の採卵量の割合から、いずれの月においても、ある6尾のメス個体が50～80%の採卵量に貢献することが分かった。いずれの月においても、連日産卵した個体があった。月ごとの産卵間隔の平均は、1.3～2.4日の範囲であった。1日の個体当たり採卵量の月平均は、94万～232万粒の範囲にあり、4月に最も多くなった。個体ごとの採卵量の推移から、産卵量が4月に増加する個体があった一方で、3月や5月に多い個体もあり、個体による違いが見られた。

長日型（試験G）：1ヵ月間の各産卵日について、各10尾の仔魚を親子判別した。同定された仔魚のメス親の情報に基づいて、メスの産卵特性を推定した。産卵に関与したメス個体は6尾と推定された。いずれの月においても、ある2尾のメス個体が、ほとんどの産卵日で50～80%の採卵量に貢献していた。長期間産卵した4尾のメス親の産卵間隔は1～6日で、いずれもメスも連日産卵していた。個体ごとの産卵間隔の平均は、1.4～2.1日の範囲であった。1日の個体当たり採卵量の平均は、28万～75万粒の範囲にあった。個体ごとの採卵量の推移から、産卵量が4月に増加する個体があった一方で、3月から4月かけて変わらない個体もあり、個体による違いが見られた。

4) 成果活用における留意点

本課題では、シフト型と長日型の両方の環境プログラムがクロマグロの早期成熟・産卵誘導に有効であることを示した。各プログラムの特徴を表3にまとめた。

シフト型の環境プログラムでは、年周期の日長・水温条件を通常よりも約2ヵ月前倒しする。環境操作は産卵前年の6～7月より開始する必要がある。搬入時に2歳、3歳の両方の親魚群に対して有効であり、それぞれ3歳、4歳となる年の3月上旬から4月上旬の早期に産卵が開始する。メスの成熟率は3歳で30%、4歳で26～50%と推定された。オスはほぼ全て成熟する。産卵は、停止処理を行わない限り、少なくとも5ヵ月は継続する。過去の試験では1日平均230万粒の受精卵が得られた。個体の産卵間隔は2日と推定され、ふ化率は平均96%、正常ふ化率は平均81%であった。

長日型の環境プログラムでは、冬至の時期に日長を短日から長日にする。環境操作は産卵前年の12月に開始すればよい。搬入時に2歳、3歳の両方の親魚群に対して有効であり、それぞれ3歳、4歳となる年の3月上旬から4月上旬の早期に産卵が開始する。メスの成熟率は3歳で9%、4歳で33～67%と推定された。オスはほぼ全て成熟する。産卵は、停止処理を行わない限り、少なくとも4ヵ月は継続する。過去の試験では1日平均98万粒の受精卵が得られた。個体の産卵間隔は1.7日と推定され、ふ化率は平均89%、正常ふ化率は平均62%であった。

環境プログラムは、それぞれの特徴を踏まえて最適な方法を選ぶことを推奨する。シフト型は3年連続で早期受精卵の大量生産を実現しており、再現性の高い方法であることから、早期産卵誘導マニュアルを作成した。その一方、環境操作は産卵前年の夏季に開始する必要がある。陸上水槽における産卵開始までの養成期間は9～10ヵ月に及ぶ。陸上水槽では、8～10月の秋季に斃死が発生しやすい（図5）。そのため、陸上飼育にかかる労力や光熱費にかかるコストの負担が大きい。対して、長日型は産卵前年の12月に環境操作を開始するため、陸上での養成期間は3～4ヵ月で済む。そのため、シフト型と比べて、労力が軽減され、コストも削減できる。しかし、メスの成熟率は4歳ではシフト型より高いのに対して、3歳ではシフト型（30%）より低く推定された（9%）。また、3歳の産卵群では、正常ふ化率が総じて低く、ばらつきも大きかった。複数のメスが産んだ卵を養殖に用いる方が、病気や奇形の発生に対する耐性が強いと考えられている。ま

た、正常ふ化率の低さは歩留りに影響する。そのため、3歳の親魚群に長日型を適用する際には、メスの成熟率や卵質に留意する必要がある。個体の産卵間隔は、それぞれのプログラム間で差はなかった。1日当たりの採卵量はシフト型の方が多かったものの、これは、メスの成熟率や飼育個体数の違いが関係している。

本課題では、GRAS-Di解析により遺伝子マーカーを開発して、完全養殖クロマグロにおける親子判別を行った。異なる家系で開発した遺伝子マーカーを比較したところ、共通するマーカーは十分の程度に絞られてしまい、それらのマーカーでは仔魚の親子判別率が著しく低下した。また、継代が進んで近交度が高くなると個体判別も困難になる。そのため、親子判別には、集団ごとにSNP情報を収集し、得られた遺伝子マーカーを用いて親子判別を行う必要がある。

表3. シフト型と長日型の環境プログラム特徴

| | シフト型 | 長日型 |
|-----------------------|------------------|------------------|
| 方法 | 年周期の前倒し(2~2.5ヵ月) | 冬至より長日処理 |
| 環境操作の開始時期 | 産卵前年の6~7月 | 産卵前年の12月 |
| 産卵開始 | 3月上旬~4月上旬 | 3月中旬 |
| 親魚年齢 | 3歳、4歳ともに可 | 3歳、4歳ともに可 |
| 成熟率 | | |
| 3歳 メス | 30% | 9% ^a |
| オス | 95% | 83% ^a |
| 4歳 メス | 26~50% | 33~67% |
| オス | 100% | 100% |
| 産卵継続 | 5ヵ月以上 | 4ヵ月以上 |
| 1日の平均採卵数 ^b | 230万粒 | 98万粒 |
| 産卵間隔 ^c | 2.0日 | 1.7日 |
| ふ化率 ^d | 96% | 89% |
| 正常ふ化率 ^d | 81% | 62% |

^a 仔魚の親子判別結果に基づく。その他の値は、生殖腺の組織観察に基づく。

^b 各試験の「産卵数 / 産卵日数」の平均値。

^c 個体ごとの平均値。

^d シフト型、長日型のそれぞれ全試験の平均値。

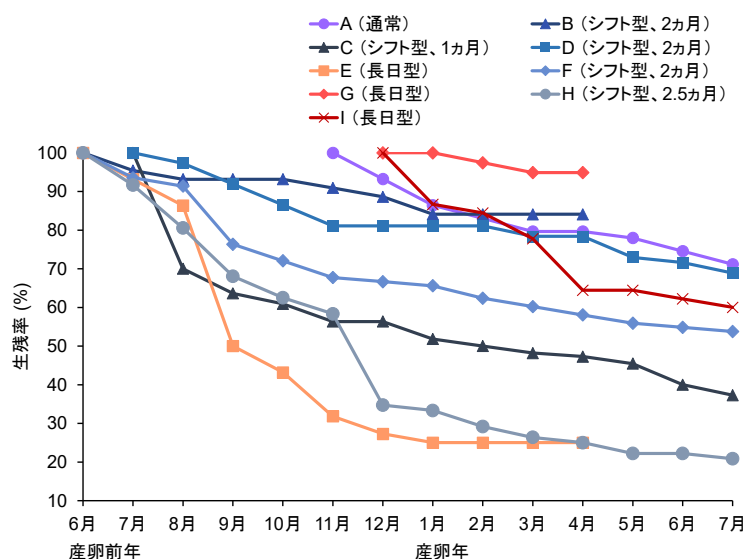


図5. 産卵前年から産卵年にかけての生残率の推移

5) 今後の課題

陸上水槽では、8～10月の秋季に斃死が発生しやすい。その理由として、病気の発生や、産卵後の衰弱などが考えられるが、主な要因は明らかでない。陸上水槽での斃死発生の主要因の特定と、その防除技術の開発は今後の課題とされる。クロマグロにおいては、完全養殖に適した優良系統の作出が求められている。一方、本研究により、完全養殖クロマグロの近交度が高くなっていることが分かった。近交度が高まると環境への適応能力が低下し、繁殖能力や病気への耐性が低くなることが知られている。今後は、繁殖能力への近交度の影響を評価しつつ、近交度の上昇を抑えて、育種技術を確立することが必要である。

| | | | |
|-----------------------------|--|--------------|----------------|
| 実行課題番号 | 18064722-0102 | 実行課題 研究期間 | 平成30～ 令和4年度 |
| 小課題名 | 1. クロマグロにおける早期人工種苗供給システムの開発 | | |
| 実行課題名 | (2) 海面生簀における早期種苗の養殖適性の解明 | | |
| 小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 まぐろ養殖部・ 入路光雄 | | |
| 実行課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 まぐろ養殖部・沖田光玄、高志利宣、横 田高士、入路光雄、石井慶太、林田貴雄、車 遥介、久門 一紀、江場岳史、篠田理仁、小出佑紀 水産技術研究所 生理機能部・松成宏之 | | |
| 共同研究機関・研究室・研究者 名等 | 長崎県総合水産試験場 種苗量産技術開発センター・ 濱崎将臣、山田敏之 長崎大学大学院 水産・環境科学総合研究科・阪倉良孝 | | |

II. 実行課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

小規模飼育システムを用いて飼育水温の違いがクロマグロ人工種苗の生残・成長に及ぼす影響を解明する。また、従来よりも早い時期、すなわち低い水温環境下に沖出しされた早期種苗の生残・成長を調査することで早期種苗の飼育特性を明らかにする。さらに、早期種苗の体サイズや冬季の生残率を従来の人工種苗と比較することで、早期種苗の養殖適性を明らかにする。

2) 研究方法

(i) 水温の違いが人工種苗の生残・成長に及ぼす影響の解明

試験1

一般的な種苗生産現場では、クロマグロの初期飼育を26℃で実施しているが、より低い水温で飼育できれば加温コストを削減できる。そこで、早期に24℃で採卵された受精卵に対して、ふ化管理時に±3℃の水温操作を行い、受精卵に対する水温操作がふ化に与える影響を小型水槽で調べた。また、通常期に25℃、早期に21℃または23℃で採卵・ふ化した仔魚に対して±2℃の水温操作を行い、各水温で10日齢まで小型水槽で飼育を実施して、仔魚の生残・成長に与える水温操作の影響を調べた。

試験2

早期種苗を従来よりも低い水温環境下に沖出しできるかを明らかにするため、開発した小規模飼育システムを用いて、沖出しサイズの人工種苗の生残・成長に与える飼育水温（17、20、23及び26℃）の影響を調査した。また、各水温での成長効率を明らかにするため、試験開始時（0日目）及び終了時（14日目）に得られたサンプルの体成分分析を行い、試験期間中に摂餌量をもとに各飼育水温における人工種苗のエネルギー蓄積率を算出した。

試験 3

沖出しサイズの人工種苗のエネルギー収支に与える飼育水温（20℃及び26℃）の影響を調査した。各水温で14日間の飼育を行い、飼育期間中の摂取、消費及び蓄積エネルギーを元にエネルギー収支を算出して水温間で比較した。

(ii) 早期種苗の養殖適性の解明

試験 1

令和2年度から4年度に得られた早期受精卵（30～200万粒）を協力機関に提供して、陸上水槽（50～100 kL容量）で種苗生産を実施した。沖出しサイズの全長50 mmサイズ時点の生残率を指標として、早期受精卵の質的評価を行った。

試験 2

令和2年度から4年度に生産された早期種苗を協力機関の海面生簀に沖出しして、沖出し2ヶ月後に一部をサンプリングして体重を測定し、従来よりも早い時期（＝低水温）に沖出しされる早期種苗の飼育特性を調べた。

試験 3

さらに上記試験に続き、越冬前の当歳12月時点で一部をサンプリングまたはステレオカメラ撮影を行って体重を測定し、天然種苗と同等の2 kg以上の大きさに成長するのかを調べた。

試験 4

越冬前に天然種苗と同等の大きさに成長した早期種苗を利用することで、冬季（12月～翌4月）の生残率が向上するのかどうか、追跡調査を実施した。令和3年度は九州以北の海域（以下、九州以北海域）、令和4年度は九州以南の海域と四国南西の海域を含む海域（以下、九州以南・四国海域）を試験の対象海域とした。

3) 研究結果

(i) 水温の違いが人工種苗の生残・成長に及ぼす影響の解明

試験 1

24℃の受精卵に水温操作を施してもふ化率は変わらなかった（表1）。早期に23℃で採卵・ふ化した仔魚の10日齢時点の生残率は25℃で飼育した場合と同等で、全長は23℃から25℃に昇温した試験区で大きかったことから、早期採卵の場合でも23℃以上であれば仔魚を飼育可能であり、昇温操作により成長を促進する効果のあることが明らかになった（表2）。

試験 2

沖出しサイズの人工種苗は飼育水温が低いほど生残率は高く、少なくとも17℃以上であれば飼育可能であることが明らかになった。また、水温が低いほど成長は遅れたが、実際の養殖生産では絶対的な成長度と併せて成長の効率、すなわち給餌量に対してどのくらい成長したかということも重要視されていることから、エネルギー蓄積率（期間中に魚体に蓄積したエネルギーが期間中に餌から摂取したエネルギー量に占める割合）を調べた。その結果、20℃及び23℃で飼育された人工種苗は17℃及び26℃の場合と比較して、エネルギー蓄積率が高い傾向が認められ、稚魚期の人工種苗は従来の飼育水温である26℃よりも20～23℃で最も効率よく成長することが示唆された。

試験 3

異なる飼育水温における成長効率の違いについて各水温3水槽設けることで再現性を確認するとともに、その違いが生じる要因をエネルギー収支の観点から調べた。その結果、20℃で飼育さ

れた人工種苗は26℃の場合と比較して、エネルギー蓄積率及び飼料効率（＝期間中の体重の増加量が期間中の摂餌量に占める割合）が有意に高かったことから、稚魚期の人工種苗は26℃よりも20℃で成長効率が高いという再現性が得られた。さらに、各水温でエネルギー収支を比較した結果、20℃で飼育された人工種苗は26℃の場合と比較して、熱増加などの消費エネルギーが有意に低かったことから、消費によるエネルギーロスが少ないために、効率良く成長できることが明らかになった。以上、試験2及び3の飼育試験の結果から、早期種苗を従来よりも早い時期に26℃よりも低い水温の海面に沖出ししても飼育可能であることが実験レベルで示唆された。

（ii）早期種苗の養殖適性の解明

試験1

提供した早期受精卵で協力機関が種苗生産を行った結果、全長50 mm時点の生残率はいずれの機関でも従来と遜色ない値であった（0.4～5.1%）。したがって、令和2年度から4年度に得られた早期受精卵は質的に問題のないことが確認された。

試験2

令和2年度から4年度に得られた早期受精卵から生産された早期種苗を実際の海面生簀に沖出して飼育を行い、沖出し2ヶ月後の成長を同海域の過去の従来種苗のデータと比較した（表3）。A社では21.6～24.0℃の海面生簀に沖出しされた早期種苗は2ヶ月後に平均体重354～438 gに成長した（早期の事例1～4）。他方、27℃程度の海面生簀に沖出しされた従来種苗の2ヶ月後の平均体重は700 g前後であった（従来事例1～2）。B社についても同様の傾向が認められた。また、沖出し2ヶ月後の生残率については、選別等が行われるため正確なデータは得られなかったが、A社及びB社の生残率の範囲は6.4～22.0%であった。マダイイリドウイルス病の発生があり、生残率が低い事例も認められたが、従来種苗においても沖出し後の減耗は著しく2ヶ月後の平均的な生残率は20%程度であり、従来種苗と比較し早期種苗の生残率が低くなる傾向は認められなかった。以上の結果から、従来よりも早い時期に沖出しされる早期種苗は、沖出し直後の同一期間で従来種苗と比較すると成長は遅いものの、低水温下であっても飼育可能であることが分かった。

試験3

さらに、越冬前の当歳12月時点の早期種苗の体サイズを測定した（表3）。早期種苗の平均体重は2.8～3.5 kgとなっており、6事例ともに天然種苗と同等の体重である2 kg以上に成長することが明らかになった。さらに、令和4年度についてはB社で従来種苗と早期種苗の両方が生産されたことから、同一条件で飼育された早期種苗と従来種苗を比較できた。その結果、早期種苗は従来種苗よりも2～3倍程度の体重に12月時点で到達することを確認した（早期事例6及び従来事例6）。

試験4

クロマグロ人工種苗は水温が低下する冬季に水温が15℃以下になると大量減耗が発生し（Tsuda et al. 2012）、特に水温の低い九州以北海域で問題視されている（樋口ら 2018）。そこで、令和2年度に生産された早期種苗を用いて、九州以北海域で越冬飼育試験を実施した（図1）。その結果、試験開始時の体重が0.6 kgの従来種苗の冬季（12～翌年4月）の生残率が44.6%だったのに対して、2.9 kgの早期種苗の冬季の生残率は86.7%だったことから、冬季の生残率を2倍に向上できた。さらに、令和3年度は九州以南・四国海域についても試験開始時の体重が3.3 kgの早期種苗の冬季の生残率は86.8%と従来（55.1%）よりも大幅に生残率が改善されることが再確認された。また、試験終了時の早期種苗の魚体重は九州以北海域で3.2 kg（開始時の1.1倍）、九州以南・四国海域で5.7 kg（開始時の1.7倍）だったことから、より温暖な九州以南・

四国海域では冬季も遅滞なく成長することが分かった。

4) 成果活用における留意点

早期種苗の成長について、越冬前の当歳の12月時点で天然種苗と同等以上の体サイズであることを当プロジェクトで明らかにしたが、その後出荷までの成長については不明である。今後は3歳の出荷に至るまでの早期種苗の成長を明らかにし、早期種苗の有効性を示すことで、クロマグロ養殖の人工種苗への転換を進めて行く必要がある。

5) 今後の課題

本課題では養殖初期の1歳という短期間での養殖適性の評価であったことから、実際のクロマグロ養殖産業に早期種苗を普及するためには出荷する3歳までの養殖期間全体を通じた養殖適性を明らかにする必要がある。また、早期種苗の生残について、従来種苗よりも冬季の生残率を大幅に向上できることを明らかにしたが、従来及び早期種苗含めて人工種苗は天然種苗と比較すると養殖期間中に生簀内での衝突や擦れによるへい死率が高いことが問題視されている。解決に向けては飼育技術の開発や天然種苗の行動特性に近い人工種苗の能力開発及び個体選抜などの多角的なアプローチが必要である。

<引用文献>

樋口健太郎, 吉川壮太, 濱崎将臣, 馬場和郎, 櫻井啓介, 乗田孝雄, 宮城島 省吾, 山下 昌, 高志利宣, 玄 浩一郎, 岡 雅一 (2018) 低水温期におけるクロマグロ人工種苗の体サイズと生残の関係. 水産増殖 66, 147-153

Tsuda Y., Sakamoto W., Yamamoto S., Murata O. (2012) Effect of environmental fluctuations on mortality of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, in closed life-cycle aquaculture. Aquaculture 330-333, 142-147

表1 受精卵に対する水温操作の影響

| 採卵時期 | 採卵水温 | ふ化管理水温 | ふ化 |
|--------------|--------|--------|----|
| | | 27°C | ○ |
| 早期 (4~5月) | 24°C → | 24°C | ○ |
| | | 21°C | ○ |

表2 ふ化仔魚に対する水温操作の影響

| 採卵時期 | 採卵・ふ化管理水温 | 仔魚飼育水温 | 10日齢までの飼育 | |
|---------------|-----------|--------|-----------|----|
| | | | 生残 | 成長 |
| 通常期 (6~7月) | 25°C → | 25°C | ○ | ○ |
| | | 23°C | × | × |
| 早期 (4~5月) | 23°C → | 25°C | ○ | ○ |
| | | 23°C | ○ | △ |
| | | 23°C | × | △ |
| | | 21°C | × | × |
| | | 19°C | × | × |

表3 早期種苗の沖出し2ヶ月後及び当歳の12月時点での平均体重

| | 従来 | | | | | | 早期 | | | | | | | |
|---------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 事例1 | 事例2 | 事例3 | 事例4 | 事例5 | 事例6 | 事例1 | 事例2 | 事例3 | 事例4 | 事例5 | 事例6 | | |
| 機関名 | A社 | A社 | B社 | B社 | B社 | B社 | A社 | A社 | A社 | A社 | B社 | B社 | | |
| 産卵 (年月日) | 2017年 ※月日 不明 | 2017年 ※月日 不明 | 2018年 6月6日 | 2018年 6月27日 | 2019年 7月27日 | 2022年 7月12日 | 2020年 4月27日 | 2020年 5月15日 | 2021年 4月19日 | 2022年 4月26日 | 2022年 4月27日 | 2021年 5月10日 | 2022年 5月11~ 12日 | 2022年 6月18~ 19日 |
| 沖出し (月日) | 7月14日 | 9月15日 | 7月9日 | 7月28日 | 8月27日 | 8月8日 | 5月30日 | 6月15日 | 5月21日 | 5月27日 | 5月28日 | 6月14日 | 6月12日 | 7月26日 |
| 沖出し時 の水温 | 27.6℃ | 27.0℃ | 25.6℃ | 26.7℃ | 26.4℃ | 30.4℃ | 21.6℃ | 22.7℃ | 23.5℃ | 24.0℃ | 23.7℃ | 24.0℃ | 23.2℃ | 26.6℃ |
| 沖出し2ヶ月後 の平均体重 | 692 g | 759 g | 760 g | 618 g | ND | ND | 349 g | 438 g | 432 g | 354 g | 357 g | 622 g | 519 g | ND |
| 当歳12月時点 での平均体重 (範囲) | ND | ND | 1.5 kg (1.2~2.0) | 0.8 kg (0.4~1.0) | 1.2 kg (0.8~1.4) | 1.3 kg (0.9~1.8) | 3.1 kg (2.5~3.9) | 2.9 kg (1.3~3.9) | 3.2 kg (ND) | 2.8 kg (1.9~3.4) ※生糞統合 | 3.3 kg (2.8~3.8) | 3.5 kg (1.5~4.8) ※生糞統合 | | |

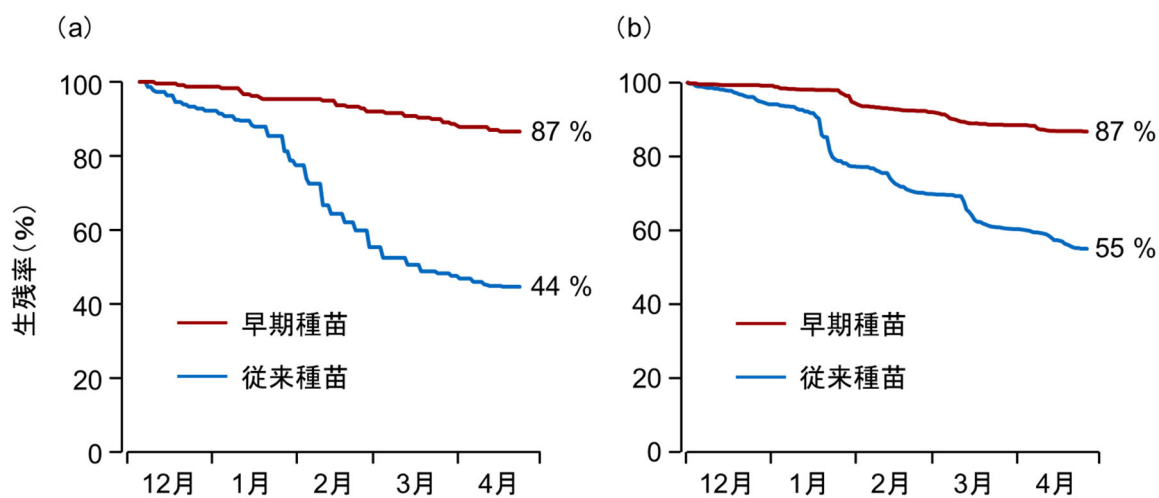


図1 九州以北海域(a)及び九州以南・四国海域(b)における早期種苗の越冬期の生残率の推移
赤線は早期種苗(a:2020年生産、b:2021年生産)、青線は同海域での過去の従来種苗の実績
(a:2015年生産、b:2017年生産)を示す。

| | | | |
|-----------------------------|---|--------------|------------|
| 実行課題番号 | 18064722-0201 | 実行課題 研究期間 | 平成30～令和4年度 |
| 小課題名 | 2 低環境負荷型クロマグロ給餌手法の開発 | | |
| 実行課題名 | (1) 配合飼料における消化特性の解明 | | |
| 小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所・まぐろ養殖部 高志利宣 | | |
| 実行課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 まぐろ養殖部・小出佑紀、久門一紀、江 場岳史、篠田理仁、高志利宣、入路光雄、沖田光玄、林田 貴雄、車 遥介、石井慶太 水産技術研究所生理機能部・山本剛史、古板博文、奥 宏 海、松成宏之、村下幸司、吉永葉月 水産資源研究所 水産資源研究センター生命情報解析部・ 相馬智史 | | |
| 共同研究機関・研究室・研究者 名等 | なし | | |

II. 実行課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

クロマグロは稚魚期から幼魚期にかけて成長が非常に早く、その成長の維持には 高頻度の給餌が必要である。クロマグロの給餌頻度は、過去の経験や勘に基づいて決定されている。しかしながら、最適な給餌頻度は、生餌や配合などの飼餌料の形態、成長や水温により消化速度などの消化特性の変化が影響していると考えられる。このため、本課題では、(i)消化生理実験系の確立として、クロマグロの消化生理における測定系を確立する。次に、(ii)飼餌料形態が消化に及ぼす影響の解明では、(i)で確立した測定系を用いて、飼餌料の違いがクロマグロ幼魚の消化応答へ及ぼす影響を明らかにする。さらに、(iii)水温や成長が消化時間に及ぼす影響では、配合飼料を用いた飼育実験により水温及び成長段階ごとの胃内容物の消失時間や消化酵素の活性、分泌量との関係を調べ、クロマグロの消化に関わる情報を得る。(iv)最適な給餌頻度の解明では、上記で得られた知見をもとに、配合飼料の給餌実験により水温や成長段階ごとに変化するクロマグロの飼育に最適な給餌頻度を明らかにする。

2) 研究方法

(i)消化生理実験系の確立

海上生簀で育成中のクロマグロ幼魚を用い、成長に伴う消化酵素の生化学的特性の変化を解析した。配合飼料または生餌で飼育を行った高水温時(約25℃)の体重約479 g(配合飼育群)及び体重約993 g(生餌飼育群)、低水温時(約22℃)の体重約1,482 g(配合飼育群)及び体重約3,020 g(生餌飼育群)を供試魚とし、各群4尾を用いて以下の解析を行った。各群の胃または幽門垂組織における各種消化酵素(ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、リパーゼ及びアミラ

ーゼ)の至適pH、至適温度及び温度安定性(10~70℃の各温度で10時間インキュベート後の残存活性)を解析し、クロマグロ幼魚期の消化酵素活性を適正に評価するための条件を決定した。

(ii) 飼餌料形態が消化に及ぼす影響の解明

飼餌料形態の違いとして配合飼料区(以下、配合区)と生餌区(イカナゴ)を海上生簀に設定し、成長段階による飼餌料の消失時間や消化特性に及ぼす影響を明らかにした。

① 成長段階別の消化特性への影響

配合区及び生餌区において沖出し直後から約1ヶ月毎に計9回のサンプル採取を行った。解析用サンプルは空胃の状態での採取し、体重、幽門垂及び胃について重量測定を行い、比幽門垂重量(%BW)及び比胃重量(%BW)の経日的な変化を調査した。また、胃及び幽門垂組織を用いて各種消化酵素の活性を測定し、経日的な変化を解析した。

② 消化時間及び各種消化酵素への影響

形態が異なる飼餌料の摂餌後の消化時間を調査するため配合区及び生餌区において、沖出し3ヶ月後(試験時海水温:25.2℃)及び沖出し7ヶ月後(試験時海水温:21.8℃)にサンプリングを行った。サンプリングでは、飼餌料の給餌前、飽食給餌の3時間後、6時間後、9時間後及び25時間後に釣獲し、胃組織、幽門垂組織、胃内容物及び腸内容物を採取した。胃と腸の内容物は凍結乾燥後の重量を測定し、飼餌料摂餌後の魚体重当たりの乾重量(%BW)の変化を調べた。また、胃(組織及び内容物)、幽門垂組織及び腸内容物における各種消化酵素の活性を測定し消化生理の摂餌後変化を解析した。

(iii) 水温や成長が消化時間に及ぼす影響

陸上水槽で体重1g、10g及び100gの稚魚、海上生簀で体重1,000gの幼魚を対象に胃内容物の消失時間及び消化特性を水温段階別に調査した。

体重約1g及び10gの稚魚での試験水温は22℃、25℃及び28℃の3区を設定した。体重100gの幼魚での試験水温は25℃及び28℃、体重1,000gの幼魚での試験水温は自然水温(22℃)を設定した。摂餌後のサンプリングは、配合飼料飽食直後以降、経時的に幼魚を採取した。採取した幼魚は、200ppmの濃度になるようエチレングリコールモノフェニルエーテルを添加した海水氷の中に入れ麻酔後に、-80℃のディープフリーザで冷凍した。後日、解凍を行い、体重及び消化管(胃、腸)内容物の重量を測定した。消化管内容物は凍結乾燥後の乾燥重量を測定し、魚体重当たりの乾重量(%BW)を算出した。なお、付加的な知見を得るため、胃及び幽門垂における消化酵素活性も測定した。

(iv) 最適な給餌頻度の解明

体重1g、10g及び100gの稚魚を対象に飼育試験を実施し、最適な給餌頻度について調査した。また、体重1,000g幼魚については、(iii)水温や成長が消化時間に及ぼす影響の結果のうち摂餌した配合飼料の胃からの消失状況を分析し、最適な給餌頻度を考察した。

体重約1g、10g及び100gの稚魚での試験水温は28℃を設定した。給餌頻度の設定は以下の通りとした。(iii)水温や成長が消化時間に及ぼす影響の項目で、各体重別の水温28℃における配合飼料摂餌後の胃における消失時間を明らかにしている。消失時間の結果から、胃における配合飼料の残存率が、50%、25%及び0%となる給餌後の時間を推定し、給餌頻度の回数を決定した。飼育期間は10日間とした。給餌量は日々測定し、飼料効率の算出に用いた。試験終了時に、生残数を計数するとともに、各試験区の生残魚全てについて体重を測定し、日間成長率を算出した。

体重1,000 g幼魚では、(iii)水温や成長が消化時間に及ぼす影響の結果のうち胃内容物の消失状況を使用した。調査時の水温は22℃（自然水温）であった。調査結果についてより詳細に胃内容物の消失状況を解析するため、解析方法として一般化加法モデルを用いた。体重1,000 gの胃内容物の滞留率と経過時間の関係を求め、さらに体重1 g～100 gの最適給餌頻度試験結果を考慮して、体重1,000 g幼魚の最適な給餌頻度を考察した。

3) 研究結果

(i) 消化生理実験系の確立

海上生簀で配合飼料または生餌を用いて育成中のクロマグロ幼魚を用い、異なる大きさ（約0.5～3 kg）及び水温期における消化酵素の生化学的特性を調べた。胃組織のペプシンは配合飼料区及び生餌区、または高水温期及び低水温期のいずれにおいてもpH 3、40～50℃で最大活性を示し、40℃までは安定的に活性が維持されていた（図1）。また、幽門垂組織由来の膵臓消化酵素（トリプシン、キモトリプシン、リパーゼ及びアミラーゼ）においても、その至適pH、至適温度及び温度安定性といった生化学特性に飼餌料形態や水温による違いは認められなかった。いずれの消化酵素においても、別途調査した沖出し時の稚魚（体重1.5 g）と同様な結果を示し、1.5 gから3 kg程度の大きさまではその生化学的特性に大きな変化は無かったことから、続く試験における消化酵素活性の測定には今回確立した実験系を用いることとした。

(ii) 飼餌料形態が消化に及ぼす影響の解明

① 成長段階別の消化特性への影響

配合区及び生餌区の魚（1.5 g）を沖出しから沖出し8ヶ月後まで約1ヶ月毎に定期的にサンプルを採取し、飼餌料形態が消化生理に及ぼす影響を長期的に調査した。その結果、配合区における魚体重に対する幽門垂重量は沖出し時（4.6%）から最終取上日（6.1%）まで終始高い値を維持したのに対し、生餌区は沖出し後から3ヶ月程度をかけて徐々に低下し、その後は1.5%程度の低い値で推移した（図2）。配合区では、生餌区と比べて幽門垂重量は相対的に大きくなった。一方、魚体重に対する胃の重量は、生餌区では沖出し時の1%から0.8%程度まで僅かな減少傾向を伴いながら低い値で推移したのに対し、配合区では沖出し後から4ヶ月程度をかけて徐々に大きくなり、最終的には生餌区の約2倍（1.6%）の大きさとなった（図2）。本試験では長期間にわたる定期的な調査を行うことで、飼餌料形態の違いが胃重量へ大きく影響することが初めて示された。

胃及び幽門垂組織における各種消化酵素（ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、リパーゼ及びアミラーゼ）の体重当たりの総活性（U/gBW）は、いずれの酵素においても配合区で高い値を示していた（図3）。一般的な活性表示法の一つである組織重量当りの活性（U/g tissue）に換算した場合も、胃のペプシン活性は両区で大きな違いは無かったが、幽門垂組織における膵臓消化酵素（トリプシン、キモトリプシン、リパーゼ及びアミラーゼ）はやはり配合区で生餌区よりも高い値となった。本試験では空胃状態の消化管組織における消化酵素活性に違いがみられたことから、飼餌料形態の違いによって消化酵素の貯蔵量も大きく変化することが明らかとなった。

② 消化時間及び各種消化酵素への影響

沖出し3ヶ月後の魚を用いて、配合区と生餌区で消化時間を調べた。生餌区の胃内容物は摂餌後25時間までに緩やかに減少し（図4）、腸内容物は同9時間目に最大となり、その後、減少した（図5）。一方、配合区では摂餌直後の推定摂餌量は生餌区より多かったものの、配合区の

胃内容物は摂餌後3時間目にはほとんど消失しており、他方、生餌区では多くが残存していた（図4）。配合区の腸内容物重量はこの時すでに最大値を示しており、沖出し3ヶ月後について配合区の消失時間は非常に早いことが明らかになった（図5）。胃または幽門垂組織における各種消化酵素の活性は、いずれも配合区で生餌区よりも高く、配合区では消化酵素をより多く貯蔵しているものと考えられた。一方、胃または腸内容物中の消化酵素活性は、トリプシンやアミラーゼで配合区の方が高い傾向にあったものの、ペプシン、キモトリプシン及びリパーゼでは両区に大きな差は無く、配合区では消化酵素の貯蔵量に見合った分泌ができていないものと考えられる。

飼餌料形態の違いが及ぼすより長期的な影響を確認するため、沖出し7ヶ月後においても同様な試験を行ったところ、胃及び腸内容物の滞留時間は配合区の方が長かった（図4、5）。また、胃または幽門垂組織における消化酵素の貯蔵量は配合区で多く、腸管内への分泌量（内容物中の活性）も配合区の方が生餌区よりも多い傾向にあった。

(iii) 水温や成長が消化時間に及ぼす影響

① 体重1 g

体重約1 gのクロマグロ稚魚における胃内容物の消失時間を水温別に調べたところ、22℃区では給餌後9～12時間の間、25℃区及び28℃区では同6～9時間の間に配合飼料が胃から完全に消失していた（図6）。また、配合飼料の腸での滞留時間をみると、22℃区では給餌後2～12時間、25℃区では同1～9時間及び28℃区では同1～6時間の間に腸管全体が内容物で満たされているのが確認され、水温が低いほど胃や腸での配合飼料の滞留時間が長くなることが明らかになった。体重約1gの魚について、付加的な解析として胃（組織及び内容物）または幽門垂組織における各種消化酵素活性を測定したところ、ペプシンの活性には水温による顕著な違いは確認されなかったが、キモトリプシンは、水温が低いほど組織での活性（貯蔵量）が低く、摂餌前や絶食時間（摂餌後の時間）が長いほどその傾向は顕著であった。

② 体重10 g

体重約10 gの稚魚において胃内容物の消失時間を調べたところ、22℃区及び25℃区では給餌後12～24時間、28℃区では同6～9時間に配合飼料が胃から完全に消失していた（図7）。一方、腸内容物は、22℃区及び25℃区では給餌後12～24時間、28℃区では同9～12時間で腸内容物が完全に消失していた。体重約10 gの魚も約1 gの魚と同様に飼育水温が低いほど消化管での配合飼料の滞留時間が長くなっていた。付加的な解析として胃（組織及び内容物）または幽門垂組織における各種消化酵素活性を測定したところ、胃組織におけるペプシンの活性（貯蔵量）には経時的な変化は見られず、水温による顕著な違いもなかった。一方、幽門垂組織におけるキモトリプシンは、摂餌後に分泌に伴う活性の減少が確認され、その後12時間にかけて摂餌前の値まで回復した。

③ 体重100 g

体重100 gの稚魚において胃及び腸内容物の消失時間を水温別に調査した結果、胃内容物の消失状況は25℃区で給餌後6～9時間の間、28℃区で同4～6時間の間に配合飼料が胃から完全に消失していた（図8）。腸内容物の消失状況は25℃区及び28℃区ともに給餌後9～12時間の間に配合飼料が腸から完全に消失していた。腸での滞留状況は、25℃区で給餌後2～9時間にかけてゆっくりと減少していくのに対し、28℃区では給餌後4～6時間にかけて急速に減少していた。次に、供試魚の消化管組織及びその内容物を用いて各種消化酵素活性を測定した。その結果、胃組織におけるペプシン活性はほぼ横ばい、または若干増加する傾向がみられた。一方、幽門垂組織におけるキ

モトリブシンでは、摂餌後ほぼ横ばい、また若干の減少傾向が認められた。

④ 体重1,000 g

体重約1,000 gの幼魚において胃及び腸内容物の消失時間を調査した結果、胃内容物の消失状況は給餌後3～6時間の間で急速に減少し、同9～25時間の中に内容物（配合飼料）が胃から完全に消失していた（図9）。胃内容物におけるpHは、配合飼料が胃に流入してきた直後に4.5から5.5へと変化した後、給餌後9時間にかけて7程度まで上昇した。その後は、胃内容物が消失する給餌後9～25時間の間で、pHの値は下降した。一方、配合飼料の給餌直後から胃から腸へ内容物が排出されており、腸内容物は給餌後6時間まで増加し、その後25時間にかけて減少した。給餌後25時間においても、腸内容物はピーク時（6時間）の半分程度が残っていた。腸内容物におけるpHは、胃から腸へと流れ込んでくる内容物の増加に同調して値が上昇し、給餌後6時間をピークに、給餌後25時間にかけて給餌開始前の値まで下降した。

(iv) 最適な給餌頻度の解明

① 体重1 g

沖出しサイズである体重1 gの稚魚を対象に最適な給餌頻度について調査した。1日あたりの給餌頻度を7回（1.5時間間隔）、3回（4時間間隔）、2回（8時間間隔）の3区で10日間の飼育実験を行った。その結果、成長及び生残率が最も良かったのは3回区で、次に7回区、2回区の順となった（表1）。1尾あたりの総給餌量は7回区で最も多く、次に3回区、2回区となっていた。一方で、飼料転換効率は7回区、3回区、2回区と給餌頻度が少なくなるにつれて高くなり、2回区が最も優れていた。今回得られた成長や飼料転換効率などの結果を総合して考えると、体重1 g稚魚の至適給餌頻度は、3回/日（4時間間隔、胃での配合滞留率：25%）と推察された。

② 体重10 g

体重1 gの沖出しから約2週間育成したサイズである体重10 gの稚魚を対象に最適な給餌頻度について調査した。1日あたりの給餌頻度を9回（1.2時間間隔）、5回（2.4時間間隔）、2回（8時間間隔）の3区で10日間の比較飼育試験を行った。その結果、給餌頻度9回区は、日間成長率が優れていたが、飼料効率が同5回区と比較して劣っていた。同5回区は、日間成長率、生残率及び飼料効率が他の2区と比較して同等もしくは優れていた。同2回区は、1尾あたりの配合飼料の総給餌量は他の2区と比較して最も少ないが、日間成長率が悪く、さらに飼料効率も劣っていた（表2）。今回得られた成長や生残、飼料効率の結果を総合して考えると、体重10 g稚魚の至適給餌頻度は従来の給餌頻度である5回/日（2.4時間間隔、胃での配合滞留率：25%）と推察された。

③ 体重100 g

体重1 gの沖出しから約40日間育成したサイズである体重100 gの稚魚を対象に最適な給餌頻度について調査した。1日あたりの給餌頻度を6回（2.1時間間隔）、4回（3.3時間間隔）、2回（8時間間隔）の3区で10日間の比較飼育試験を行った。その結果、給餌頻度6回区は、他の区と比較してすべての項目で劣っていた。同4回区は、日間成長率及び生残率で良好であったが、飼料効率は同2回区と比較して劣っていた。同2回区は、1尾あたりの配合飼料の総給餌量が最も少なく、日間成長率、生残率及び飼料効率で最も優れていた（表3）。今回得られた成長や生残、飼料効率の結果を総合して考えると、体重100 g幼魚の至適給餌頻度は、2回/日（8時間間隔、胃での配合滞留率：0%）と推察された。

④ 体重1,000 g

体重1,000 g幼魚の胃内容物の消失状況及び体重1 g～100 gの至適給餌頻度結果から、体重1,000 g幼魚の最適な給餌頻度を考察した。令和3年度に体重1,000 g幼魚の胃内容物の消失状況を

調査した結果を使用し、一般化加法モデルを用いることにより、より詳細に胃内容物の消失状況を解析した。その結果、体重1,000 g幼魚に関する胃内容物の滞留率と経過時間の関係は、滞留率が50%となる経過時間は4.4時間、滞留率が25%となる経過時間は8.2時間、滞留率が10%となる経過時間は12.2時間であった（図10）。ここで、これまで本プロジェクトで得られている体重別の至適給餌頻度と胃内容物の滞留率の関係を見ると、体重1 gでは胃内容物の滞留率が25%、体重10 gでは胃内容物の滞留率が25%、体重100 gでは胃内容物の滞留率が0%となっている。これらの結果から、クロマグロ幼魚の次の配合飼料の給餌のタイミングは、体重1 gから100 gへと成長すると胃内容物がほぼ無い状況が次の給餌のタイミングであることが伺える。以上の結果を踏まえると、体重1,000 g幼魚の次の配合飼料の給餌のタイミングは胃内容物の滞留率が0%となった時点であると推察される。一方、体重1,000 g幼魚の胃内容物の滞留率を見ると、配合飼料摂餌後12時間でも滞留率は10%であった。以上の胃内容物の滞留状況から、体重1,000 g幼魚の至適給餌頻度は1日1回で十分であると考察される。

(V) 体重別の至適給餌頻度の総括

本課題の最終目標である成長段階別の最適な給餌頻度を取り纏め、課題2-(2) 摂餌特性に応じた至適給餌方法の開発へ情報を提供した。

① 体重1 g

最適な給餌頻度を調査するため比較試験を水温28℃で実施した結果、胃内容物の滞留率が25%になった時点で次の配合飼料の給餌のタイミングであることが明らかとなった。以上の結果から、体重1 gでは胃内容物の滞留率が25%になった時点で次の配合飼料の給餌のタイミングであると考えられる。体重1 gの至適給餌頻度として、水温22℃の時は4時間間隔、水温25℃の時は5時間間隔、水温28の時は4時間間隔、以上を課題2-(2)へ提案した（表4）。

② 体重10 g

最適な給餌頻度を調査するため比較試験を水温28℃で実施した結果、胃内容物の滞留率が25%になった時点で次の配合飼料の給餌のタイミングであることが明らかとなった。以上の結果から、体重10 gでは胃内容物の滞留率が25%になった時点で次の配合飼料の給餌のタイミングであると考えられる。体重10 gの至適給餌頻度として、水温22℃の時は5.4時間間隔、水温25℃の時は3.2時間間隔、水温28の時は2.4時間間隔、以上を課題2-(2)へ提案した（表4）。

③ 体重100 g

最適な給餌頻度を調査するため比較試験を水温28℃で実施した結果、胃内容物の滞留率が0%になった時点で次の配合飼料の給餌のタイミングであることが明らかとなった。以上の結果から、体重100 gでは胃内容物の滞留率が0%になった時点で次の配合飼料の給餌のタイミングであると考えられる。体重100 gの至適給餌頻度として、水温25℃の時は8時間間隔、水温28℃の時は8時間間隔、以上を課題2-(2)へ提案する（表4）。

④ 体重1,000 g

体重1,000 g幼魚の胃内容物の滞留率の詳細な解析及び体重1～100 g幼魚の至適給餌頻度結果から、体重1,000 g幼魚の水温22℃における至適給餌頻度は1日に1回であることが考察された。以上を課題2-(2)へ至適給餌頻度として提案する。

4) 成果活用における留意点

今回、体重1 g、10 g、100 gの稚魚及び1,000 gの幼魚の配合飼料の胃における消失時間や消化特性に及ぼす影響を水温別で明らかにした。さらに、各体重別の配合飼料の消失時間の結果を基

に給餌頻度の比較飼育試験を実施し、体重1 g、10 g及び100 gの各種魚の至適な給餌頻度を明らかにした。体重1,000 g幼魚についてはこれまでの成果を応用して、至適給餌頻度を推定した。サイズ毎に提案した至適給餌頻度を実証規模且つ自動給餌システムで実施することにより、給餌作業に対する大幅な労力の削減に繋がることが期待される一方、給餌を自動給餌器に任せきりにするのではなく、定期的に摂餌状況、魚の行動を観察することで早期に病気等の問題に気付き対応することが養殖業では重要であることから、日々の観察は怠らないという点に留意する必要がある。

5) 今後の課題

今回のプロジェクトにおいて、体重1~1,000 gのクロマグロ幼魚の配合飼料の胃における消失時間や消化特性が明らかになったこと、並びに体重1~1,000 gのクロマグロ幼魚の水溫別の至適給餌頻度が明らかになったことは大きな成果であると考えられる。一方で、明らかとなった至適給餌頻度と自動給餌システムとの連携は始まったばかりである。実証規模である海上生簀において効率的に自動給餌を行うのに必要な知見を集積、調査していくことが必要である。また、配合飼料による給餌は生餌と比較して幽門垂重量及び胃重量の消化器官が大きくなることを明らかにした。なぜこのような事象が発生するのか、詳細な調査が今後必要と考える。

胃：ペプシン

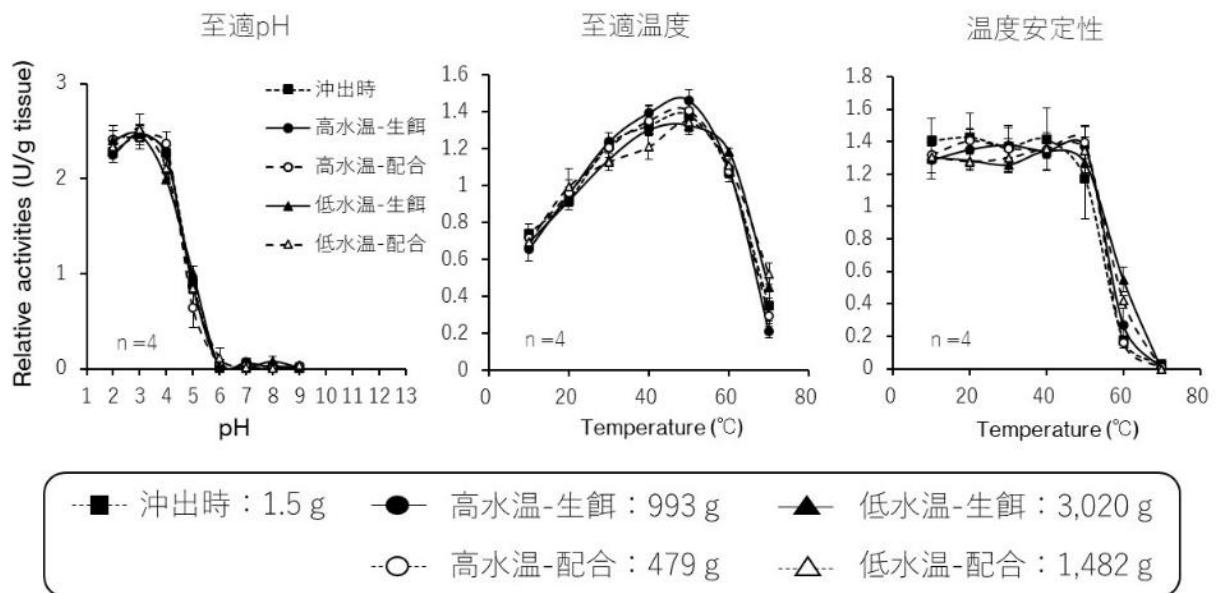


図1. クロマグロにおける胃ペプシンの生化学的特性

(空胃の状態にて測定)

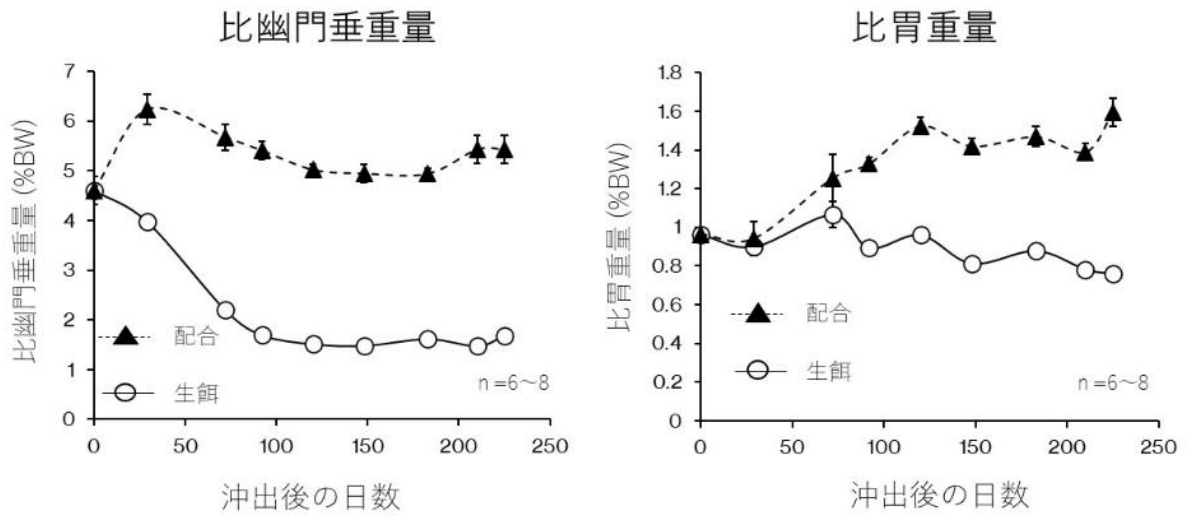


図2. 形態が異なる飼餌料がクロマグロの消化管重量に及ぼす影響

胃・幽門垂組織の消化酵素活性 (空胃の状態にて測定)

【貯蔵量の目安】

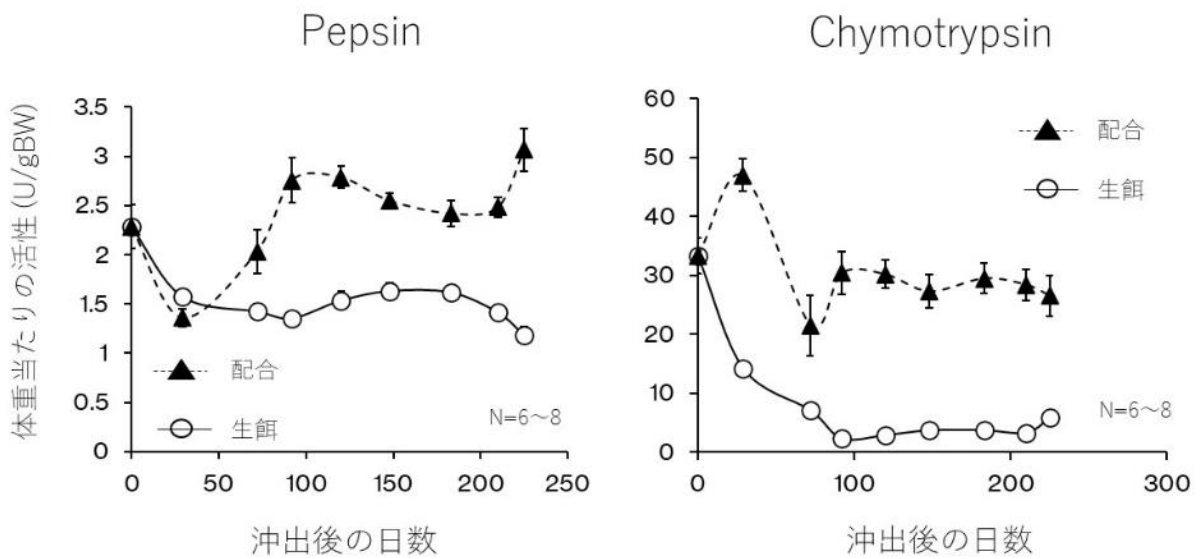


図3. 形態が異なる飼餌料がクロマグロの消化酵素活性に及ぼす影響

胃内容物

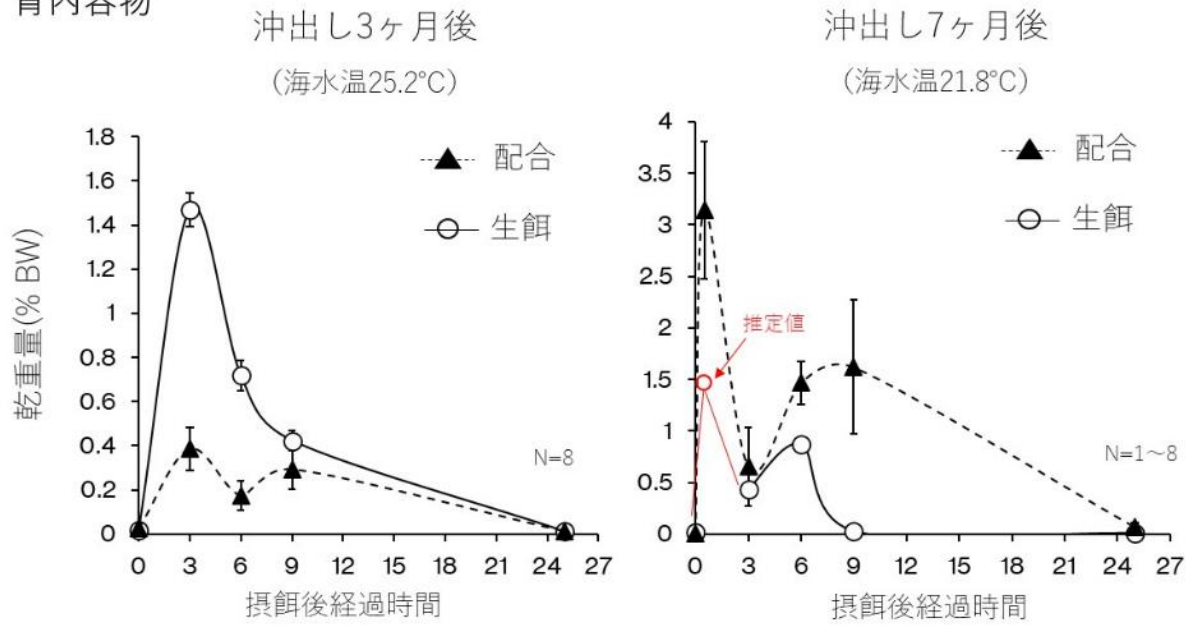


図4. 沖出し3ヶ月及び7ヶ月後のクロマグロにおける胃内容物の滞留状況

腸内容物

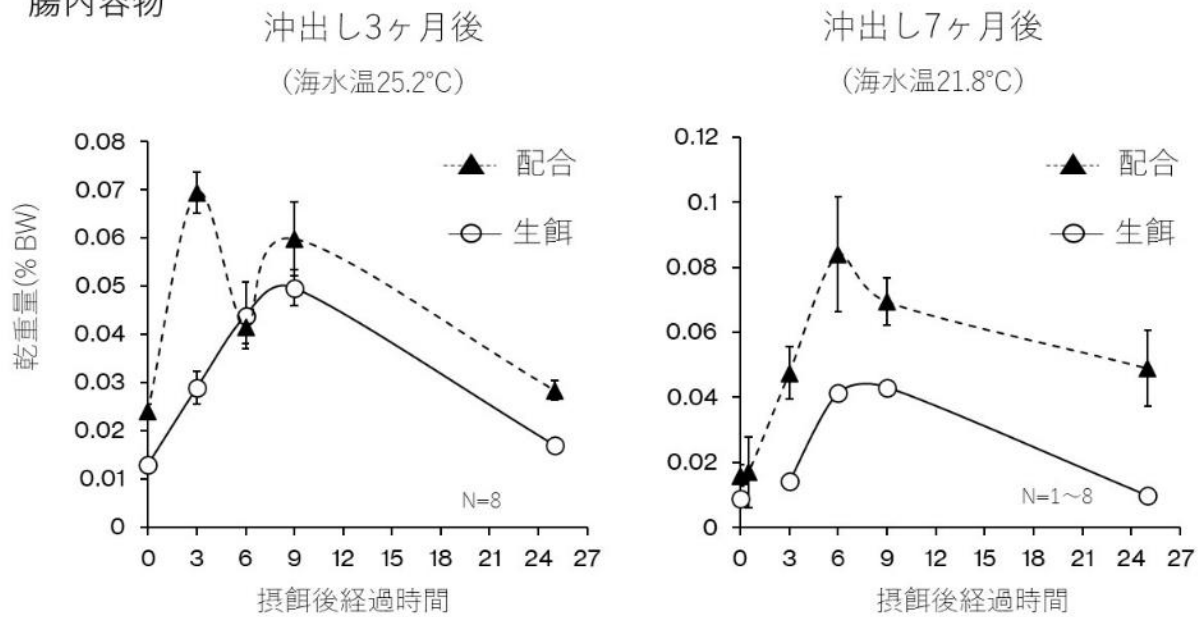


図5. 沖出し3ヶ月及び7ヶ月後のクロマグロにおける腸内容物の滞留状況

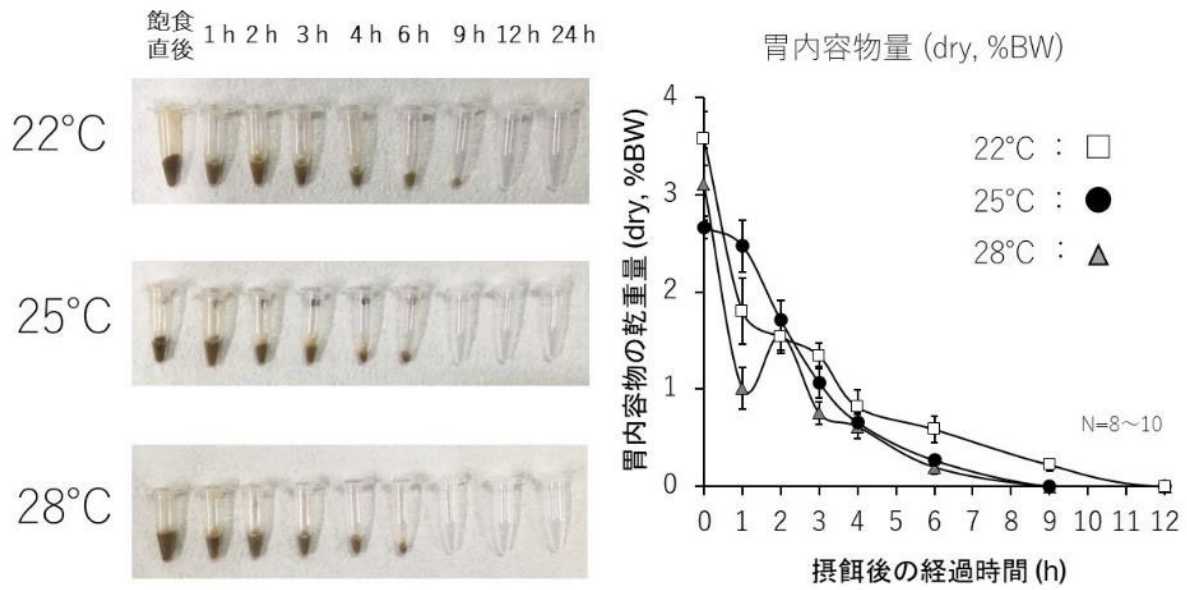


図6. 体重1 gクロマグロ稚魚の消化管における配合飼料の滞留時間

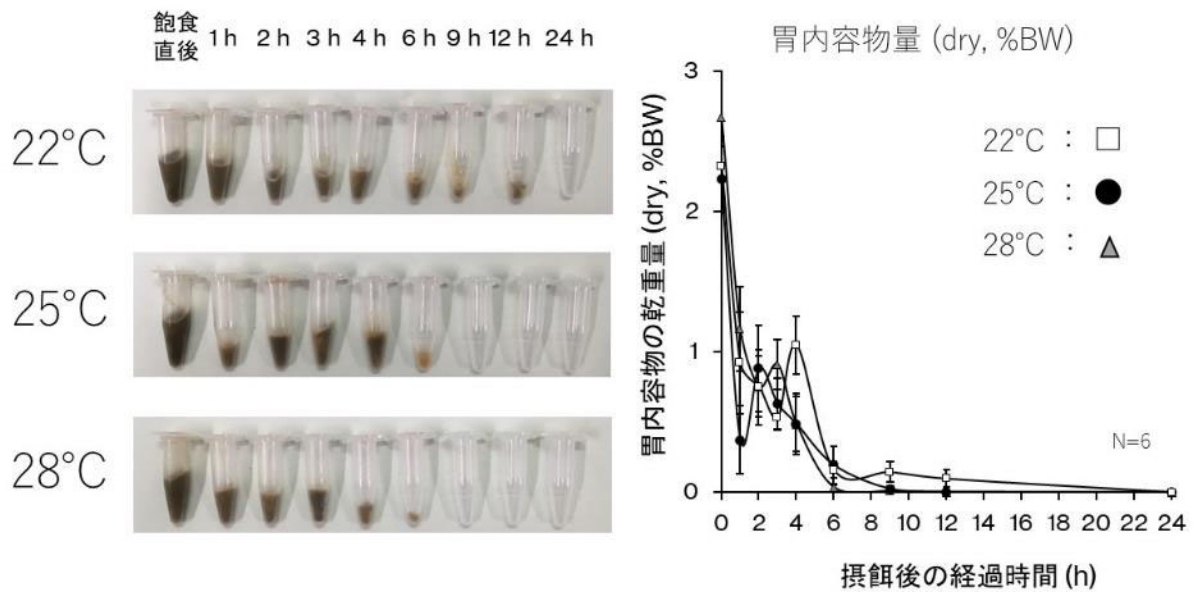
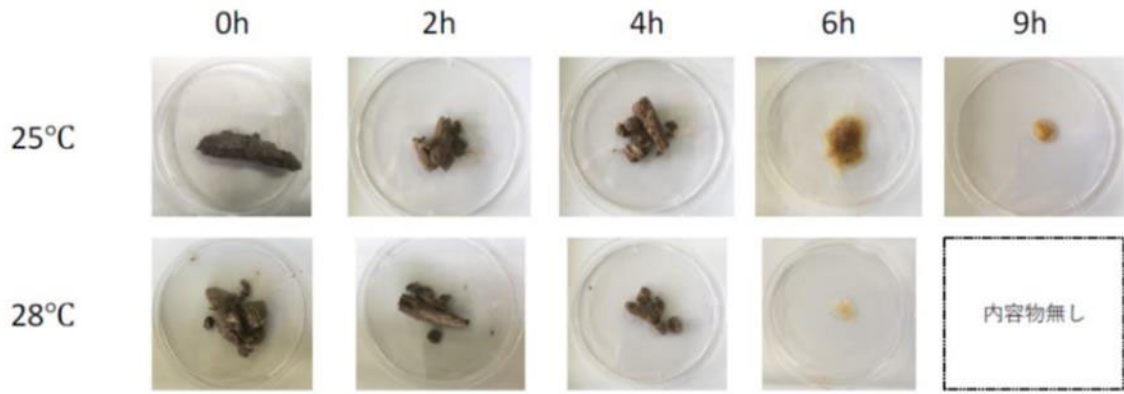


図7. 体重10 gクロマグロ稚魚の消化管における配合飼料の滞留時間



胃での滞留状況 (n = 6)

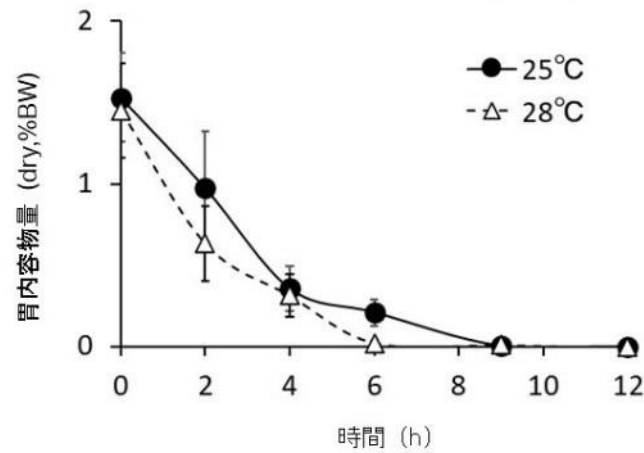


図8. 体重100 gクロマグロ稚魚の消化管における配合飼料の滞留時間

胃内容物の経時的変化

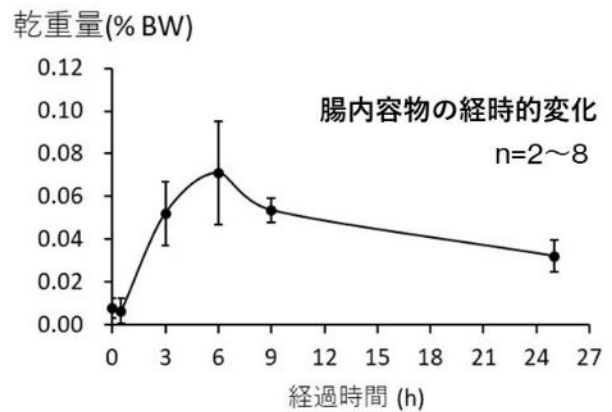
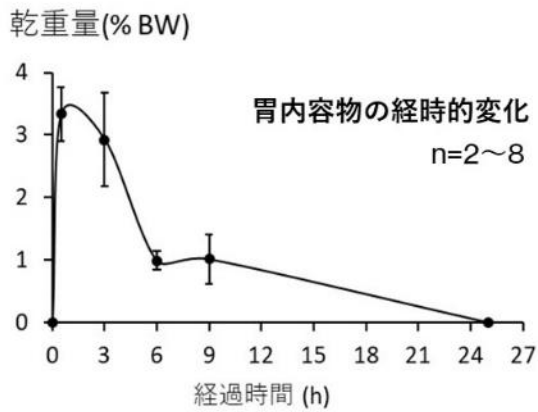
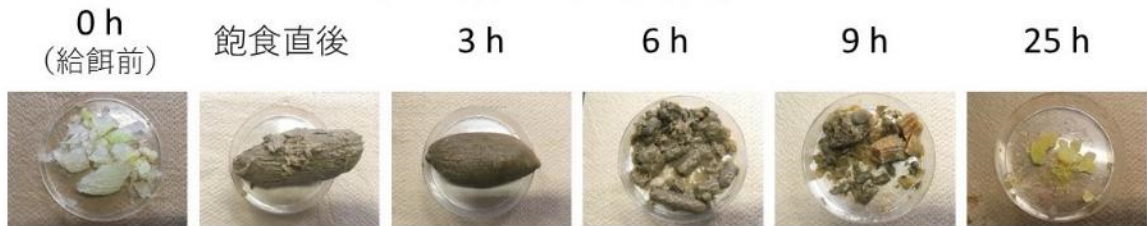


図9. 体重1,000 gクロマグロ幼魚の消化管における配合飼料の滞留時間

表1 体重1 g稚魚の給餌頻度試験結果の概要

| 給餌頻度 (胃での配合滞留率) | 試験終了時 平均体重 (g) | 日間成長率 (%) | 生残率 (%) | 1尾あたりの 総給餌量 (g) | 飼料効率 (%) |
|--------------------|----------------------|--------------|------------|-----------------------|-------------|
| 2回/日 (0%) | 3.19 | 14.2 | 42.3 | 3.43 | 70.7 |
| 3回/日 (25%) | 3.60 | 15.4 | 52.9 | 4.07 | 69.5 |
| 7回/日 (50%) | 3.41 | 14.9 | 51.6 | 5.32 | 49.7 |

表2 体重10 g稚魚の給餌頻度試験結果の概要

| 給餌頻度 (胃での配合滞留率) | 試験終了時 平均体重 (g) | 日間成長率 (%) | 生残率 (%) | 1尾あたりの 総給餌量 (g) | 飼料効率 (%) |
|--------------------|----------------------|--------------|------------|-----------------------|-------------|
| 2回/日 (0%) | 14.7 | 5.4 | 72.0 | 11.5 | 53.3 |
| 5回/日 (25%) | 20.1 | 8.6 | 71.6 | 18.9 | 61.2 |
| 9回/日 (50%) | 21.0 | 9.0 | 65.5 | 21.7 | 57.2 |

表3 体重100 g稚魚の給餌頻度試験結果の概要

| 給餌頻度 (胃での配合滞留率) | 試験終了時 平均体重 (g) | 日間成長率 (%) | 生残率 (%) | 1尾あたりの 総給餌量 (g) | 飼料効率 (%) |
|--------------------|----------------------|--------------|------------|-----------------------|-------------|
| 2回/日 (0%) | 186.4 | 5.1 | 66.7 | 118.0 | 63.3 |
| 4回/日 (25%) | 185.8 | 5.1 | 64.4 | 133.1 | 55.6 |
| 6回/日 (50%) | 168.3 | 4.1 | 47.8 | 134.9 | 42.0 |

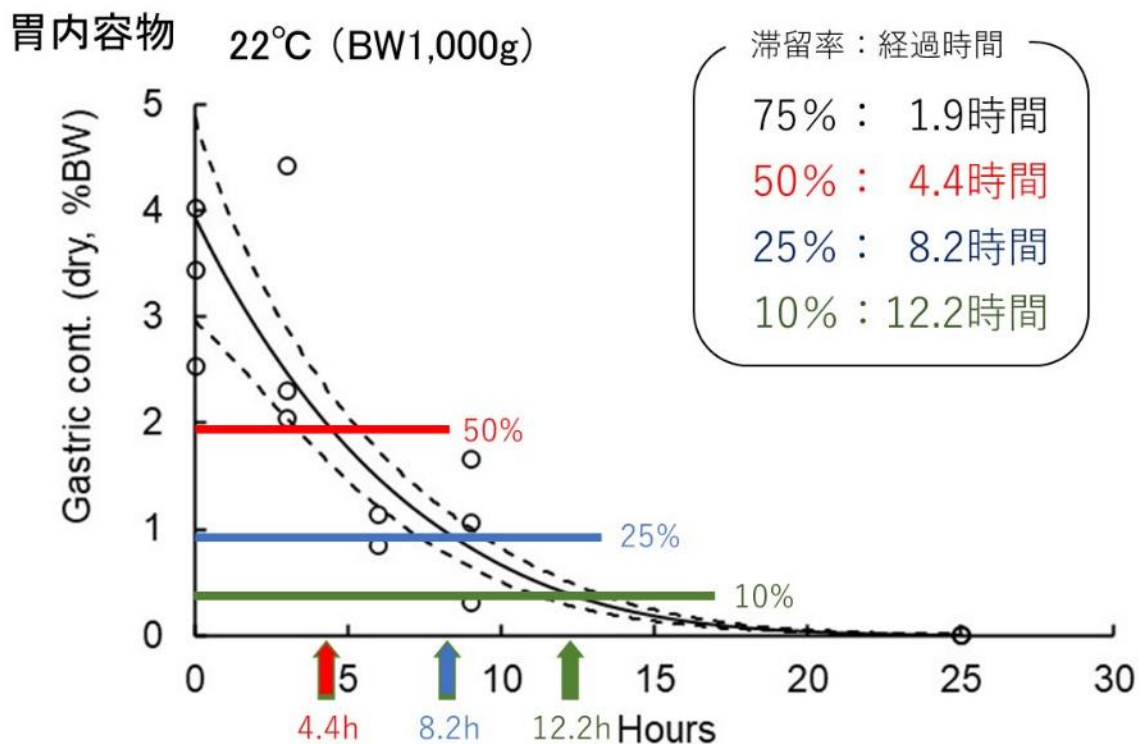


図10. 体重1,000 gクロマグロ幼魚における胃内容物の滞留率と経過時間の関係 (水温22°C)

表4 体重別の至適給餌頻度

| 体重：1g | | | | 体重：10g | | | | 体重：100g | | |
|-------|------|------|------|--------|------|------|------|---------|------|------|
| 残存率 | 22°C | 25°C | 28°C | 残存率 | 22°C | 25°C | 28°C | 残存率 | 25°C | 28°C |
| 100% | 0.0h | 0.0h | 0.0h | 100% | 0.0h | 0.0h | 0.0h | 100% | 0.0h | 0.0h |
| 75% | 1.4h | 1.6h | 0.7h | 75% | 1.2h | 0.7h | 0.5h | 75% | 1.1h | 1.0h |
| 50% | 2.4h | 2.4h | 1.6h | 50% | 2.8h | 1.6h | 1.2h | 50% | 2.5h | 2.1h |
| 25% | 4.0h | 5.0h | 4.0h | 25% | 5.4h | 3.2h | 2.4h | 25% | 4.3h | 3.3h |
| 10% | 8.8h | 6.0h | 5.6h | 10% | 9.0h | 5.1h | 3.7h | 10% | 5.7h | 4.7h |
| | | | | | | | | 0% | 8.0h | 8.0h |

・ 給餌頻度試験により、 が至適給餌間隔であることを確認

| | | | |
|-----------------------------|---|---------------|----------------|
| 実行課題番号 | 18064722-0202 | 実行課題* 研究期間 | 平成30～令和4年 度 |
| 小課題名 | 2 低環境負荷型クロマグロ給餌手法の開発 | | |
| 実行課題名 | (2) 摂餌特性に応じた至適給餌手法の開発 | | |
| 小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所・まぐろ養殖部 高志利宣 | | |
| 実行課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 まぐろ養殖部 高志利宣、横田高士、入路光雄、沖田光玄、林田貴雄、車 遥介、石井慶太、久門一紀、江場岳史、篠田理仁、小出佑 紀 | | |
| 共同研究機関・研究室・研究者 名等 | ケービデバイス・宮野 弘平、木村竜介 | | |

II. 実行課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

最新の画像処理技術を用いて満腹時の遊泳行動や魚群の分布などの特徴を自動で解析可能なシステムを構築し、それらを指標としてクロマグロへの給餌終了の判断を支援する給餌終了判断支援システム（以下、給餌支援システム）を構築する。構築したシステムにより、生産コスト5～10%削減を目指す。

2) 研究方法

クロマグロを含む魚類養殖では、給餌者は魚の行動を観察しながら、給餌を終了する判断を行う。本課題では、摂餌時のクロマグロの行動を指標値化し、指標値の時間的な変化により客観的に給餌終了判断を行うというプロセスをシステム化する事を目指した。システムを開発するにあたり、下記の3つの細部課題を推進した。

(i) 摂餌関連行動の指標化

① 撮影方法の検討

指標化にあたり、種苗生産水槽で稚魚の、海上生簀では稚魚から幼魚の摂餌行動を撮影する条件について検討した。撮影実験は水産技術研究所 奄美庁舎の種苗生産水槽（40 kL）及び海上生簀で行い、海面上部からの撮影及び水中での撮影の二通りについて、得られた動画を目視で確認し、魚の行動を捉えやすい撮影方法を選択した。

② 指標化手法の検討

奄美庁舎において種苗生産水槽の稚魚を水槽上部から、また海上生簀の幼魚の摂餌行動を水中で撮影し、得られた映像を摂餌関連行動の指標化の検討材料とした。

(ii) 摂餌行動の自動検出システムの構築

種苗生産用及び海上生簀用で撮影と同時にリアルタイムで指標値を計算可能な行動評価システムを構築した。構築するシステムはC言語を用いて開発し、Linux ベースのOS (Ubuntu) 上で動作可能なアプリケーションを開発することとした。

(iii) 終了意思決定を支援するシステムの構築

① 給餌支援システムの構築

(ii)の課題において確立した行動評価システムに、計算された指標値に基づいてクロマグロへの給餌終了を判断する機能、指標値などの時間変化をロギングする機能などを追加し、給餌支援システムを構築した。

② 種苗生産水槽における給餌終了判断支援システムの性能評価試験

構築した給餌支援システムによる終了条件は下記による。指標値が指定した終了判断値以下となるかなどの条件を満たした場合に給餌終了判断を行うようにした。試験は奄美庁舎種苗生産棟の40 kL水槽で行い、対照区と給餌支援システム区を各1水槽とした。水槽にはふ化後34日目の体重 1.27 ± 0.35 gのクロマグロ稚魚を1,000尾収容し、試験期間は10日間とした。試験開始前及び終了時に、供試魚をサンプリングし、体重と全長を計測した。また、1日に4～5回死亡魚を回収し、計数した。給餌は1日4回とし、給餌時間は8:30、10:30、13:00、15:30とした。対照区では従来法である人による手撒きで給餌し、給餌終了のタイミングは給餌者の判断とした。システム区では、改良型給餌支援システムに自動給餌機（中部海洋開発社製 DF-160B0）を接続し、電源制御により給餌の開始と終了判断を行った。

③ 海上生簀における給餌終了判断支援システムの性能評価試験

陸上水槽における性能評価試験と同様に、指標値に基づいて給餌終了判断をするように設定し、性能評価試験を行った。

試験 1

性能評価試験は奄美庁舎の直径10mの海上生簀において行い、対照区とシステム区として各1基ずつの生簀を使用した。各生簀には体重 21.1 ± 7.3 gのクロマグロ稚魚を100尾収容し、試験期間は10日間とした。給餌は課題2-(1)からの情報を参考に1日4回（8:10、11:00、13:30、15:50）とした。対照区では人による手撒きで給餌し、終了のタイミングは給餌者の判断とした。システム区では自動給餌機（中部海洋開発社製 DF-160B0）と給餌支援システムを接続し、システムによる電源制御により給餌の開始・終了が可能となるようにした。

試験 2

試験 2 では幼魚期のクロマグロを対象に性能評価試験を実施した。試験は奄美庁舎の直径10mの海上生簀において行い、対照区とシステム区として各1基ずつの生簀を使用した。各生簀には体重 577.8 ± 110.5 gのクロマグロ幼魚を、対照区には87尾、システム区には97尾収容し、21日間試験を行った。給餌は課題2-(1)からの情報を参考に1日3回（8:30、13:30、15:30）とした。対照区では人による手撒きで給餌し、終了のタイミングは給餌者の判断とした。システム区では自動給餌機（松阪製作所社製 さんし郎KC-20）を給餌支援システムに接続し試験に供した。そのほかの手法は試験 1 と同様とした。

コスト計算

試験 1 及び 2 で得られた飼育データに基づいてコスト計算を行った。給餌支援システム活用によるコスト削減効果の計算のため、コスト指数（システム区の増肉係数／対照区の増肉係数）を

計算した。次に、対照区の飼料費にコスト指数を乗じることにより、システム区の潜在的な削減費を算出し、削減率を求めた。人件費は、対照区では1回の給餌に45分、斃死魚回収を1日1回15分を要すると仮定して、労働時間を算出し、人件費を乗じた。システム区では、餌の補給やシステムの確認などの作業を1日に1回15分行い、対照区と同様の斃死魚回収を行うと仮定して算出した。1尾当りのコストは、各試験区の総経費（飼料費と人件費の和）を生残尾数で除して求めた。

3) 研究結果

(i) 摂餌関連行動の指標化

① 撮影方法の検討

種苗生産水槽における撮影では、水中の撮影では給餌時に急激に濁りが発生し、魚の認識が非常に困難となることが分かった。次に水槽上部からの撮影では、給餌時に飼育水が濁っても群れの集群逸散を把握可能であり、遊泳速度や遊泳方向といった個体レベルの遊泳行動もある程度把握可能であった。

一方、海上生簀では、上部から撮影した場合、稚魚の背部が青黒く見えることで海面とのコントラストが不明瞭になること、また広範囲で水面の反射光により水中内部が見えなくなった。反射光に関しては偏光フィルターの導入を検討したが、太陽光の入射角が経時的に変わるため、時間ごとに撮影角度の調整が必要になるなど、海上生簀での魚の行動の撮影には向いていないと判断した。一方、水中で撮影した場合、時間の経過とともに給餌による濁りで若干不鮮明になるが、給餌完了まで十分に魚の行動を認識することができた。

以上より、種苗生産水槽では水面上部から、海上生簀では水中で撮影することにより魚の行動を明瞭に記録可能であることから、以降の撮影ではこれらの撮影条件を採用することとした。

② 指標化手法の検討

摂餌関連行動の指標化手法は、クロマグロの摂餌時の行動が数値化可能な手法を陸上水槽用及び海上生簀用それぞれ2種、計4種の方法を検討した。その結果、各手法において図1のように給餌開始時の活発な摂餌、後半の摂餌が鈍くなった際の行動の特徴を数値化し、時系列として示すことが可能になった。

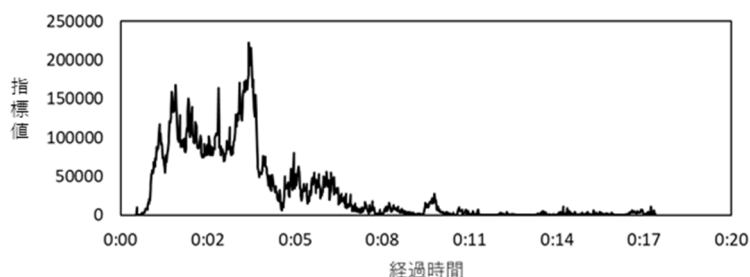


図1. 給餌時の生簀内における指標値の時系列。

(ii) 摂餌行動の自動検出システムの構築

(i) 摂餌関連行動の指標化において確立した種苗生産水槽及び海上生簀用の指標化手法に基づいて、リアルタイムで指標値を算出可能な行動評価システムを開発した。

(iii) 終了意思決定を支援するシステムの構築

① 給餌支援システムの構築

種苗生産水槽及び海上生簀用の指標値に基づいて給餌終了判断を行う給餌支援システムを開発した。構築したソフトは汎用シングルボードPC Raspberry Pi 3 Model B+ に導入した。また、小型PCを通じて給餌終了判断に応じて電源を制御する機能を組み込んだ。この電源に自動給餌器に接続することで、給餌終了判断に基づいた制御が可能となる。

システムの流れは下記の通りである。

- ①タイマーにより稼働を開始し、給餌機に給電を開始
- ②撮影した動画を連続的に解析、指標値を算出
- ③指標値に基づいて終了判断し、自動給餌器への給電を停止

② 種苗生産水槽における給餌終了判断支援システムの性能評価試験

給餌支援システムを用いた飼育の結果を表1に示す。取り上げ尾数（生残率）及び成長（体長、体重、肥満度）に関して、システム区は対照区と遜色のない結果となった。次に、給餌量は対照区で4,658 gであったのに対しシステム区では3,161 gとなった。飼料効率もシステム区で79.8と良好な結果が得られた。以上の結果より、給餌支援システム区の飼育は成長などに負の影響はなく、さらに給餌量の削減が可能であることが示唆された。得られた結果に基づいてコスト計算を行ったところ、飼料費で53.6%削減可能であり、人件費を含めた総経費では61.6%の削減となった（表2）。また、1尾あたりの生産コストを計算すると71.9%のコスト削減と試算された。

表1. 種苗生産水槽における性能評価試験の飼育結果概要

| | 対照区 | システム区 |
|---------|------------|------------|
| 生残率(%) | 37.7 | 48.5 |
| 体長(cm) | 6.44±0.61 | 6.76±0.72 |
| 体重(g) | 3.56±0.98 | 4.17±1.26 |
| 肥満度 | 13.03±0.67 | 13.18±0.73 |
| 日間成長率 | 9.9 | 10.5 |
| 総給餌量(g) | 4658 | 3161 |
| 飼料効率 | 37 | 79.8 |
| 増肉係数 | 2.70 | 1.25 |

表2. 種苗生産水槽における性能評価試験で得られた結果に基づいてコスト計算した結果

| | 対照区 | システム区 | コスト削減率(%) |
|-------------|---------|---------|-----------|
| 飼料費 | ¥18,129 | ¥8,412 | 53.6 |
| 人件費 | ¥28,650 | ¥9,550 | 66.7 |
| 総経費 | ¥46,779 | ¥21,569 | 61.6 |
| 1尾あたりの生産コスト | ¥147 | ¥41 | 71.9 |
| コスト指数=0.464 | | | |

③ 海上生簀における給餌終了判断支援システムの性能評価試験

試験1

試験終了時の生残尾数及び体長、体重、肥満度などの飼育結果を表3に示す。生残率は対照区で22.3%、システム区で22.3%となり両者に大きな差は認められなかった。成長は、尾叉長、体重、肥満度、日間成長率ともに対照区と比較して遜色のない結果が得られた。次に、給餌量は対照区で3,468 gであったのに対し、システム区では3,196 gとなり、システム区の給餌量は約8%少なかった。また、飼料効率は対照区で38.3、システム区で45.7、となっておりシステム区の方が効率良く給餌していたと推定される。得られた結果に基づいて、コスト計算を行ったところ、飼料費で16.2%削減、人件費を含めた総経費では70%の削減となった（表4）。また、1尾あたりの生産コストでは78.1%のコスト削減が可能であった。

表3. 試験1の飼育結果概要

| | 対照区 | システム区 |
|----------|-----------|-----------|
| 生残率(%) | 26.4 | 22.3 |
| 尾叉長(cm) | 13.7±1.4 | 15.0±1.4 |
| 体重(g) | 51.2±15.4 | 61.2±18.4 |
| 肥満度 | 19.0±2.6 | 17.7±2.2 |
| 日間成長率 | 8.9 | 10.6 |
| 総給餌量(kg) | 3468 | 3196 |
| 飼料効率 | 38.3 | 45.7 |
| 増肉係数 | 2.61 | 2.19 |

表4. 試験1のコスト計算の結果

| | 対照区 | システム区 | コスト削減率(%) |
|-------------|---------|---------|-----------|
| 飼料費 | ¥13,733 | ¥11,508 | 16.2 |
| 人件費 | ¥50,700 | ¥7,800 | 84.6 |
| 総経費 | ¥64,433 | ¥19,308 | 70.0 |
| 1尾あたりの生産コスト | ¥202 | ¥44 | 78.1 |
| コスト指数=0.838 | | | |

試験2

試験終了時の生残尾数及び体長、体重、肥満度などの飼育結果を表5に示す。生残率は対照区で88.5%、システム区で78.3%となり、システム区でやや低い結果となった。試験開始後9日目まではほぼ死亡もなく順調であったが、試験開始後10日目以降に死亡がやや増加傾向にあった。本試験では夜間の衝突死を低減するため、小型の照明を点灯していたが、システム区では操作ミスなどにより夜間照明が点灯していなかった事例が2日あった。両区の生残率の差は、照明の未点灯により衝突斃死が影響しているものと考えられた。一方で、尾叉長、体重、肥満度、日間成長率など、成長に関わる項目については対照区と比較して遜色のない結果が得られた。給餌量は両区でほぼ差がないものの、飼料効率は対照区で38.3、システム区では45.7となり、システム区の方が効率が高かった。コスト計算を行ったところ、飼料費で14.0%削減、人件費を含めた総経費では24.7%の削減となった(表6)。また、1尾あたりの生産コストでは44.9%のコスト削減と試算された。

表5. 試験2の飼育結果概要

| | 対照区 | システム区 |
|----------|-------------|-------------|
| 生残率(%) | 88.5 | 78.3 |
| 尾叉長(cm) | 31.9±2.6 | 33.8±1.8 |
| 体重(g) | 868.7±174.0 | 884.2±133.9 |
| 肥満度 | 26.7±3.4 | 22.8±2.2 |
| 日間成長率 | 2 | 2.1 |
| 総給餌量(kg) | 61.13 | 60.95 |
| 飼料効率 | 39.9 | 46.4 |
| 増肉係数 | 2.51 | 2.15 |

表6. 試験2のコスト計算の結果

| | 対照区 | システム区 | コスト削減率(%) |
|-------------|----------|----------|-----------|
| 飼料費 | ¥242,067 | ¥208,178 | 14.0 |
| 人件費 | ¥46,800 | ¥9,360 | 80.0 |
| 総経費 | ¥288,867 | ¥217,538 | 24.7 |
| 1尾あたりの生産コスト | ¥906 | ¥499 | 44.9 |
| コスト指数=0.860 | | | |

4) 成果活用における留意点

本課題で開発した給餌支援システムは、養殖現場に近い条件になるように心掛けた。しかし、養殖業者によって種苗生産水槽や海上生簀の形状や大きさが異なることが多いため、本システムの導入にあたっては飼育条件の差による影響を踏まえて、撮影条件やパラメーターの設定を検討する必要があると推察する。また、本課題では稚魚期から約1 kgまでの幼魚期を対象としたため、成魚への活用についてはさらなる検討が必要と考える。

本課題のコスト計算では下記について留意する必要がある。

- (i) 飼料費について、特に種苗生産水槽での人手による手撒きでは給餌量が多かった。この理由としては、給餌者が全体的な摂餌が止まった後に壁の端を遊泳する稚魚などに対して丁寧な給餌を行っていた。これが給餌量の増大につながっていた可能性がある。

(ii) 1尾当りの生産コストについて、試験区間の生残尾数の違いが大きく影響する。本研究において両区で生残率の差は小さかったものの、尾数の違いがコスト計算の結果に影響を与えていたと考えている。また、システム区では生残率がやや高い事例が多く、システム及び給餌機の活用で過剰な給餌を防いだことが生残率の高さに影響していた可能性はある。この点については、今後検証が必要と考えている。

5) 今後の課題

本課題により、給餌支援システムの基本形は完成したと考えているが、事例数が少ないため実用化に向けてはさらに使用事例を増やし、ブラッシュアップする必要がある。また、本課題では、稚魚期から幼魚期を対象としているため、大型の生簀を要する未成魚以降の魚を対象とする際は、撮影方法の検討等さらなる技術・研究開発が必要と考えている。

| | | | |
|-----------------------------|--|--------------|----------------|
| 実行課題番号 | 18064722-0301 | 実行課題 研究期間 | 平成30～令和4年 度 |
| 小課題名 | 3. クロマグロの種苗期に発生する疾病の防除手法の開発 | | |
| 実行課題名 | (1) マダイイリドウイルス病等の重要疾病に対するワクチンの開発 | | |
| 小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 病理部 松山知正 | | |
| 実行課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 病理部 松山知正、栗田潤、高野倫一、佐藤純、嶋原佳子、松浦雄太、桐生郁也、河東康彦、稲田真理、梅田剛佑、吉野友晃、新田理人、高田優三、中川徹優、前田知己 水産研究・教育機構 水産技術研究所 まぐろ養殖部 久門一紀、江場岳史、小出佑紀、篠田理仁 | | |
| 共同研究機関・研究室・研究者 名等 | 近畿大学 水産研究所 白樫正、升間主計、青木隆一郎 | | |

II. 実行課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

(i) 魚病診断と診断マニュアルの作成では、養殖現場で感染症が疑われる死亡事例について原因を究明し、明らかになった病原体の検出法を確立する。重要な疾病については疫学調査を実施して流行期や流行漁場を把握し、また精度の高い検査法を開発する。開発した病原体の検出法及び診断方法を取りまとめた診断マニュアルを作成する。また、(ii) 感染試験手法の開発では、ワクチンの評価に不可欠な各種実験手法の開発を行う。さらに、(iii) ワクチンの開発と改良では、クロマグロ養殖において発生するマダイイリドウイルス (RSIV) 病とレンサ球菌症の病原体の特性と、市販のワクチンの有効性を明らかにする。市販のワクチンの効果が不十分であれば、クロマグロに対して十分な効果を発揮するワクチンを開発する。ワクチンの開発では、研究を効率化するために、小型水槽での飼育が可能で試験魚の入手が容易な魚種をマグロの代替とするモデル魚種として、ワクチンの効果改善を目的とした試験研究を行う。モデル魚種で得られた効果の高いワクチン成分及び投与方法について、クロマグロを用いた大型水槽での感染試験を行い効果を実証する。

2) 研究方法

(i) 魚病診断と診断マニュアルの作成

① 死亡原因の究明と診断マニュアルの作成

クロマグロ養殖において発生した原因不明の死亡事例について病理組織学的、分子生物学的解析等を行い原因を究明し、それをもとに診断マニュアルを作成した。

② α レンサ球菌症の疫学調査

養殖クロマグロから分離されたレンサ球菌株を収集し、菌種の同定、パルスフィールド電気泳動法によるゲノム型の調査を行い、他の魚種から分離されるレンサ球菌と比較した。

③ RSIVの疫学調査

クロマグロを含む養殖魚から分離されるRSIVについて主要キャプシド遺伝子を解読し、遺伝型を調査した。本病が発生しているクロマグロ養殖海域において、病魚、死魚、海水、飼育器具等におけるウイルス量を測定し、ウイルスが多く存在し感染リスクとなりうる事項を整理し、感染拡大を抑制するための対策を提案した。

(ii) 感染試験手法の開発

クロマグロに対するRSIVと α レンサ球菌の経口、浸漬、注射感染法を検証し、十分に死亡を再現でき、クロマグロに対するストレスが少ない方法をワクチンの有効性評価試験のための手法として選定した。クロマグロで感染方法を検討する前に、飼育試験を容易に行えるブリ類を用いて予備試験を実施した。

(iii) ワクチンの開発と改良

① 市販のRSIVワクチンのクロマグロに対する有効性試験

他の魚種に対して使用が承認されている単味ワクチン、あるいはイリドウイルス抗原を含む4種混合ワクチンを、近畿大学白浜実習所において全長約10 cmのクロマグロに接種し、3日後に増養殖研究所上浦庁舎へ輸送した。流水で25℃に調整した40 kL水槽で飼育し、ワクチン接種の10日後に(ii)で確立した手法によりRSIVを経口投与し感染試験を行った。陰性対照群の一つにはワクチンの代わりにPBSを接種し、RSIVで攻撃した。もう一つの陰性対照群には4混ワクチンを接種し、感染試験を行わずに飼育を継続した。

② 市販の注射 α レンサ球菌ワクチンのクロマグロに対する有効性試験

近畿大学白浜実習所において、ブリ属に対して使用が承認されている単味のレンサ球菌注射ワクチン、あるいは陰性対照としてワクチンの代わりにPBSを、全長約10 cmのクロマグロに接種し、接種3日後に水産技術研究所上浦庁舎へ輸送した。流水で25℃に調整した40 kL水槽で飼育し、ワクチン接種の17日後に(ii)で確立した手法により腹腔内接種法で感染試験を実施した。もう一つの陰性対照群には同ワクチンを接種し、感染試験を行わずに飼育を継続した。

③ 市販の経口 α レンサ球菌ワクチンのクロマグロに対する有効性試験

近畿大学奄美研究所で生産した人工種苗を水研機構上浦庁舎へ輸送し、流水で25℃に調整した40 kL水槽で19日間飼育した後に、ブリ属に対して承認されている経口レンサ球菌ワクチンを用量通りに5日間連続でクロマグロに経口投与した。最終投与日から3週間飼育した後に、(ii)で確立した手法により腹腔内接種法で感染試験を実施した。

④ RSIVワクチンの改良

上記①の研究で、市販のRSIVワクチンを投与しても、クロマグロに対して殆ど効果が得られなかった。そこで初めに、製薬メーカー2社より提供された4種の試作ワクチンについて、同じく市販のワクチンに効果が認められないイシダイをモデルとして有効性試験を4回行った。次に、イシダイに対して市販品よりも高い効果が確認できた2製剤のうちの1製剤について、クロマグロに対する有効性試験を経口感染法により行った。

⑤ クロマグロの液性免疫の成熟時期の調査

十分なワクチン効果を得るためには、免疫系が成熟した成長段階の魚にワクチンを投与する必要がある。そこで、クロマグロの免疫系が発達する成長段階を明らかにするために、各成長段階

における腎臓中のIgM陽性細胞（抗体を分泌する細胞）の出現動態と血清中の総抗体(IgM)量の変化を測定した。腎臓中のIgM陽性細胞は、臓器のパラフィン切片に対して本研究で作成した抗マダグロIgMマウス血清を用いた免疫染色を行い検鏡して検出した。血清中の総IgM量は別に作成した2クローンのIgMマウスモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により、クロマグロ血清より精製したIgMで検量線を作成して絶対量を測定した。

ワクチン抗原に対する抗体価を指標として免疫機構の成熟時期を把握するために、平均体長40.4 mm、133.1 mm、193.9 mmの3群の人工種苗を3試験区（各N=20~30）に分け、市販のレンサ球菌経口ワクチンを経口投与、4種（ α レンサ、ビブリオ、類結、RSIV）混合ワクチンを腹腔内接種、及びPBSを腹腔内接種した試験区を設定した。3群を、それぞれ52日、31日及び30日間飼育した後に心採血し、血清を回収した。 α レンサ球菌の超音波破碎液あるいはFBSを抗原、ペルオキシダーゼ標識した抗マダグロIgMマウスモノクローナル抗体を検出抗体として用いて、直接ELISA法により抗体価を測定した。

⑥ アジュバントのクロマグロに対する副作用の検証

平均体重82.2 gのクロマグロの腹腔内に、オイルアジュバントを添加したRSIV試作ワクチンを接種した。比較のためにアジュバントを含まないRSIVワクチンあるいはPBSを腹腔内に接種した群と、ブリ属に対して承認されている5種混合オイルアジュバントワクチンを接種した群を設定した。試験魚はピットタグで標識し、一つの網生簀に混泳して海上で飼育した。接種35日後に体重と内臓の状況を目視で確認した。

3) 研究結果

(i) 魚病診断と診断マニュアルの作成

① 死亡原因の究明と診断マニュアルの作成

次の9種類の感染症の原因を明らかにした。ウイルス性神経壊死症ウイルス (VNNV)、マダイイリドウイルス (RSIV)、 α レンサ球菌 (*Lactococcus garvieae*)、滑走細菌 (*Tenacibaculum maritimum*)、べこ病 (微孢子虫感染症 *Microsporidium* sp.)、脳クドア症 (*Kudoa* sp.)、粘液胞子虫症 (*Unicapsula* sp.)、住血吸虫症 (*Cardicola* sp.)、ウオノエ感染症 (*Ceratothoa* sp. *Norileca* sp.) である。これら感染症の組織病理及び検出法をまとめた感染症診断マニュアルを作成した（水産研究・教育機構 水産技術研究所のホームページで公表予定）。また本マニュアルには、水研機構奄美庁舎で実施しVNNVの蔓延防止に効果がみられた卵消毒法と、後述するRSIVの疫学調査から考えられた本病の蔓延防止対策も盛り込んだ。

② α レンサ球菌症の疫学調査

クロマグロ養殖において問題となるレンサ球菌症の原因は、*L. garvieae* 1型であり、ブリ類等において1型とともに発生している2型及び3型は、クロマグロ由来分離株からは見つからなかった。また、パルスフィールド電気泳動法でゲノム型を調べたところ、クロマグロ由来株のほとんどは、ブリ類等から分離される株と同じ型であった。*L. garvieae* 1型は、市販の全てのレンサ球菌ワクチンに抗原として含まれており、クロマグロに対する利用が期待できる。

③ RSIVの疫学調査

クロマグロで流行しているイリドウイルスは、他の養殖魚と同様にRSIV2型であった。RSIVが多く含まれ本病の発生を促進する要因として、瀕死魚、死亡魚の体液、生簀の底に溜まった排泄物に加え、汚染された養殖器具類、死亡魚を扱ったたも網や手袋や容器が想定された。一方で、海水中のウイルス量は高くなく、生簀間の感染拡大は海水による伝搬よりも、死亡魚を扱った作業者がリスクとなりうることが示唆された。また、クロマグロ当歳魚でRSIV病が発生すると、他魚種で発生するRSIV病よりも病勢が強いことや、クロマグロでは長期間の餌止めができないことか

ら被害を軽減することが難しいことも明らかとなった。そのため、マグロ養殖生簀内にRSIVを持ち込まないことを最優先とした対策が必要であり、そのためには以下の対策が考えうる。①共同の死亡魚廃棄場所をハブとして、長靴や手などを介して各養殖場に病原体が持ち帰っている可能性があることから、共同の死亡魚廃棄場所を利用した際には長靴裏（次亜塩素酸ナトリウム200 ppm以上）や手（消毒用エタノール）の消毒を行う。特に、漁場内（湾内）でRSIV病発生の情報があった際にはこれを徹底する。②養殖場の一部の生簀のみでのRSIV病の発生が認められる際には、疾病発生生簀の作業は最後に実施し、1日の作業終了時には長靴、たも網、手袋等を次亜塩素酸ナトリウム（200 ppm以上）により消毒する。③瀕死魚はなるべく早く回収し、血液は海水中に流出させない。④死亡魚（瀕死魚含む）のドリップを海水中に流出させない。⑤フンが生簀底になるべく溜まらないようにする。これら飼育管理の改善による被害軽減策を構築するために、養殖事業者とともに協議を行った。

（ii）感染試験手法の開発

RSIVの感染手法をカンパチで検討したところ、注射感染、経口感染、高濃度な条件での浸漬感染によって死亡が発生した。そこで、クロマグロを用いて経口投与と浸漬法による感染試験を実施した。いずれにおいても高濃度のウイルス液が必要なため、感染試験により作出したイシダイ病魚の臓器摩砕濾液を感染源に用いた。浸漬法ではRSIVによる死亡は殆ど発生しなかった。経口法では、感染9日目から死亡が発生し、ウイルスを含む餌料の1回給餌よりも3回給餌により死亡率は増加した（Matsuura et al., 2021）。よって、以降の試験ではクロマグロに対するRSIVの感染試験はウイルスを混ぜた餌を3回給餌することで実施した。

レンサ球菌の感染手法では、死亡を再現できたのは注射法によってのみであった。ブリを用いて浸漬、経口、注射感染法を複数回試験したが、十分な死亡を再現性高く発生しうる手法は、やはり注射法によってのみであった。注射法は小型のクロマグロに対してはハンドリングストレスが大きく適した手法ではないが、やむを得ず注射法によりワクチンの有効性を評価することとした。

（iii）ワクチンの開発と改良

① 市販のRSIVワクチンのクロマグロに対する有効性試験

攻撃を行わなかった陰性対照区でも飼育に伴う死亡が継続的に発生したが、攻撃試験を行った4試験区では、感染8日から10日目にかけて明瞭に死亡率が上昇した。単味あるいは4種混合ワクチンを接種した試験区では、ワクチン接種せずに攻撃を行った陰性対照区と比較して死亡の発生が1日遅れたが、累積死亡率に有意差はなく、ワクチンの効果は認められなかった（図1）。

② 市販の注射 α レンサ球菌ワクチンのクロマグロに対する有効性試験

ワクチンを投与せずに感染試験を行った陰性対照区では、攻撃試験に用いた全個体が攻撃7日目までに死亡した（図2）。一方で、ワクチンを接種した後に感染試験を行った区では、終了時の累積死亡率は70%であった。Fisherの直接確率検定ではワクチン区と非投与区の生存率に有意差が認められた。よって、市販のレンサ球菌注射ワクチンには、本病に対して効果があると考えられた。

③ 市販の経口 α レンサ球菌ワクチンのクロマグロに対する有効性試験

ワクチンを投与せずに感染試験を行った群と比較して、ワクチンを投与し感染試験を行った群の死亡曲線はログランクテストにおいて有意に抑制された（図3）。よって、市販の経口レンサ球菌ワクチンがクロマグロに対しても有効と考えられる。

④ RSIVワクチンの改良

インダイを用いた予備試験では、感染方法等を変えて実施した4回の試験全てにおいて2つの試作ワクチンで市販ワクチンより有意に高い効果が確認できた。インダイに対して市販品よりも高い効果が確認できた1製剤について、クロマグロに対する有効性を試験したところ、試作ワクチンでは市販ワクチンよりも有意に死亡が抑制された。したがって、本試作ワクチンがクロマグロ稚魚に対して有効であることが示された。

⑤ クロマグロの液性免疫の成熟時期の調査

体長300 mmのクロマグロの腎臓には多数のIgM陽性細胞が分布したが、陸上水槽から沖出しされる最小サイズに相当する体長50 mmのクロマグロの腎臓には、ごくわずかにしか存在しなかった。体長50 mmでは抗体産生が成魚と比較して少ないと予測された。

血中の総抗体(IgM)量を調査したところ、沖出しが想定される体長50~120 mm程度の稚魚では、出荷サイズの成魚と比較して抗体量が明らかに少なかった。特に沖出し最小サイズである体長50 mmでは、抗体は検出されるもののその量は極めて少ない。成魚に匹敵する抗体量が検出されるのは、体長200 mm以上までの成長を待たねばならない(図4)。より高いワクチン効果を期待するには、200 mm程度にまで成長したクロマグロにワクチンを投与することが好ましいと考えられた。

ワクチン抗原に対する抗体価を指標とした免疫機構の成熟時期の把握では、大きさの異なる3群いずれにおいても、レンサ球菌に対する抗体を明確に検出することはできなかった。ブリにおいてもワクチン接種後の α レンサ球菌に対する抗体価は高くないことが知られており、マグロでも本菌に対する抗体価の検出が困難な可能性が考えられた。また、別の検体を用いた予備試験において、高感度なサンドイッチELISA法によってもRSIVに対する抗体価を検出することはできなかった。一方で、レンサ球菌の感染後生残した個体ではレンサ球菌に対する抗体価が上昇していた。よって、本試験における抗体検出系自体には問題はないと考えられる。以上より、レンサ球菌及びFBSに対するクロマグロの抗体価を測定することはできず、抗原に対する抗体価を指標とした免疫機構の成熟時期の把握は行えなかった。今後、より高感度な抗体測定系を確立して評価する必要がある。

⑥ アジュバントのクロマグロに対する副作用の検証

オイルアジュバントには成長を抑制する副作用は認められず、むしろオイルアジュバント添加試作ワクチンを接種した群においてPBSや5種混合オイルアジュバントワクチンを接種した群よりも成長が良い傾向がみられた。オイルアジュバントを接種した群の一部の個体に、軽微な脾臓の肥大とアジュバントの残留がみられた。内臓の癒着はいずれの個体にもみられなかった。よって、80 g前後のクロマグロにはオイルアジュバントの副作用は軽微と考えられた。なお、接種35日目のサンプリング時には血清を採取し抗体測定のために保存した。上記⑤で記したように、クロマグロの抗体価測定が予想に反して困難であり、今後測定系を確立した後にワクチン抗原に対する抗体価を測定する予定である。

4) 成果活用における留意点

ワクチンの開発と改良において効果を確認できたレンサ球菌ワクチンはブリ属に対して承認された製剤であり、クロマグロに使用するためには獣医師の処方が必要である。ワクチンの効率的な利用を促進するためには、承認申請に必要なデータを集積し、承認対象をクロマグロに拡大する必要がある。また、試作RSIVワクチンを製品化するためには、承認申請に必要なデータを取得する必要がある。レンサ球菌、RSIVいずれのワクチンも、感染試験だけではなく養殖現場でも十分な効果が得られるのか実証データを取得する必要がある。

5) 今後の課題

承認対象の拡大、新規ワクチンの承認のいずれにも、製品化する製薬会社が飼育試験及び実地試験により多くのデータを取得する必要がある。しかし飼育が難しいクロマグロでは感染試験が困難なため、抗体価等の感染試験を必要としないワクチンの有効性指標を確立する必要がある。あるいは、クロマグロの代替となりうる魚種で得たデータをもとに承認を認めるよう制度を改変する必要がある。

<引用文献>

Matsuura, Yuta, et al. "Development of a method for experimental infection of Pacific bluefin tuna with red seabream iridoviral disease." *Aquaculture* 539 (2021): 736627.

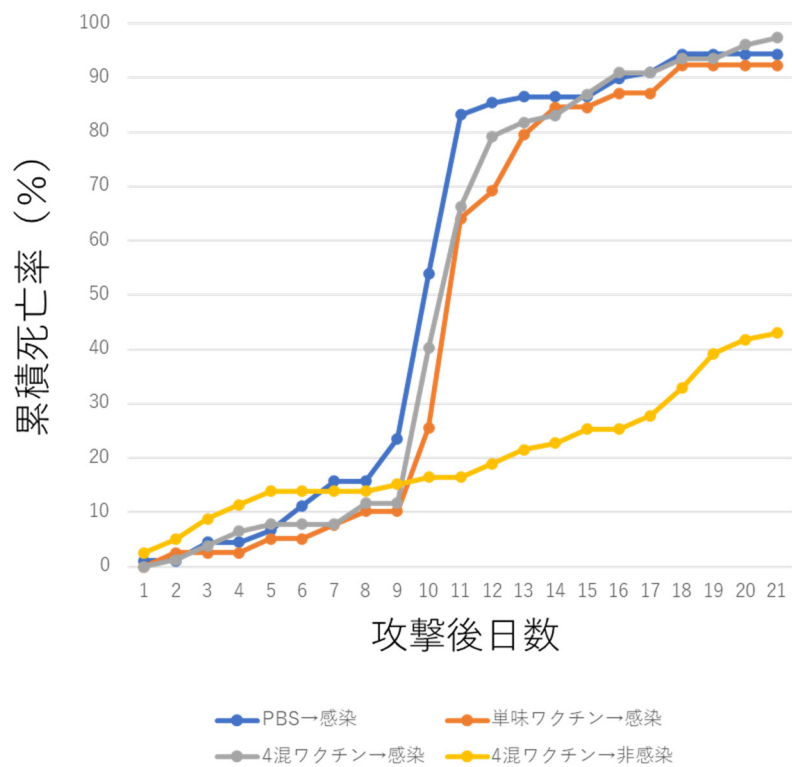


図1. RSIV 注射ワクチンのクロマグロに対する有効性評価試験

ワクチン投与せずに感染試験を行った群 (青: PBS→感染)

単味ワクチンを投与し感染試験を行った群 (オレンジ: 単味ワクチン→感染)

4混ワクチンを投与し感染試験を行った群 (灰: 4混ワクチン→感染)

4混ワクチンを投与し感染しなかった群 (黄: 4混ワクチン→非感染)

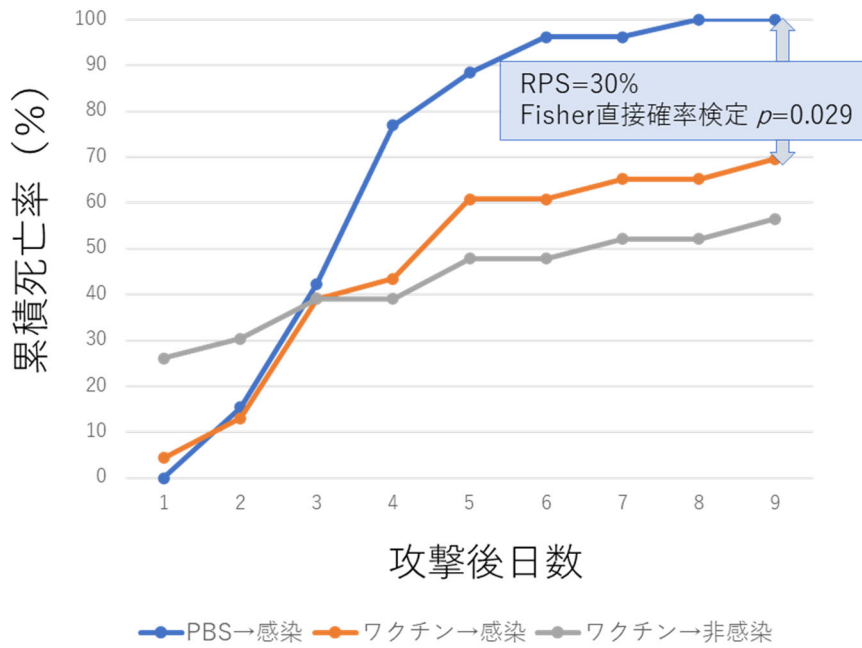


図2. レンサ球菌注射ワクチンのクロマグロに対する有効性評価試験
 ワクチン投与せずに感染試験を行った群 (青: PBS→感染)
 ワクチンを投与し感染試験を行った群 (赤: ワクチン→感染)
 ワクチンを投与しPBSを接種した群 (灰: ワクチン→非感染)

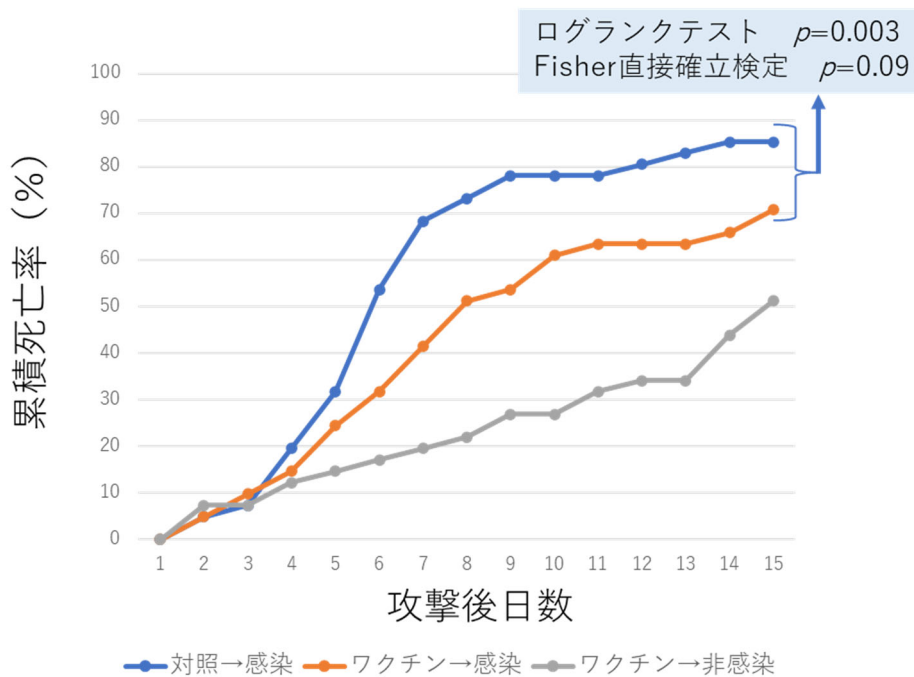


図3. 経口レンサ球菌ワクチンの有効性試験
 ワクチン投与せずに感染試験を行った群 (青: 対照→感染)
 ワクチンを投与し感染試験を行った群 (赤: ワクチン→感染)
 ワクチンを投与しPBSを接種した群 (灰: ワクチン→非感染)

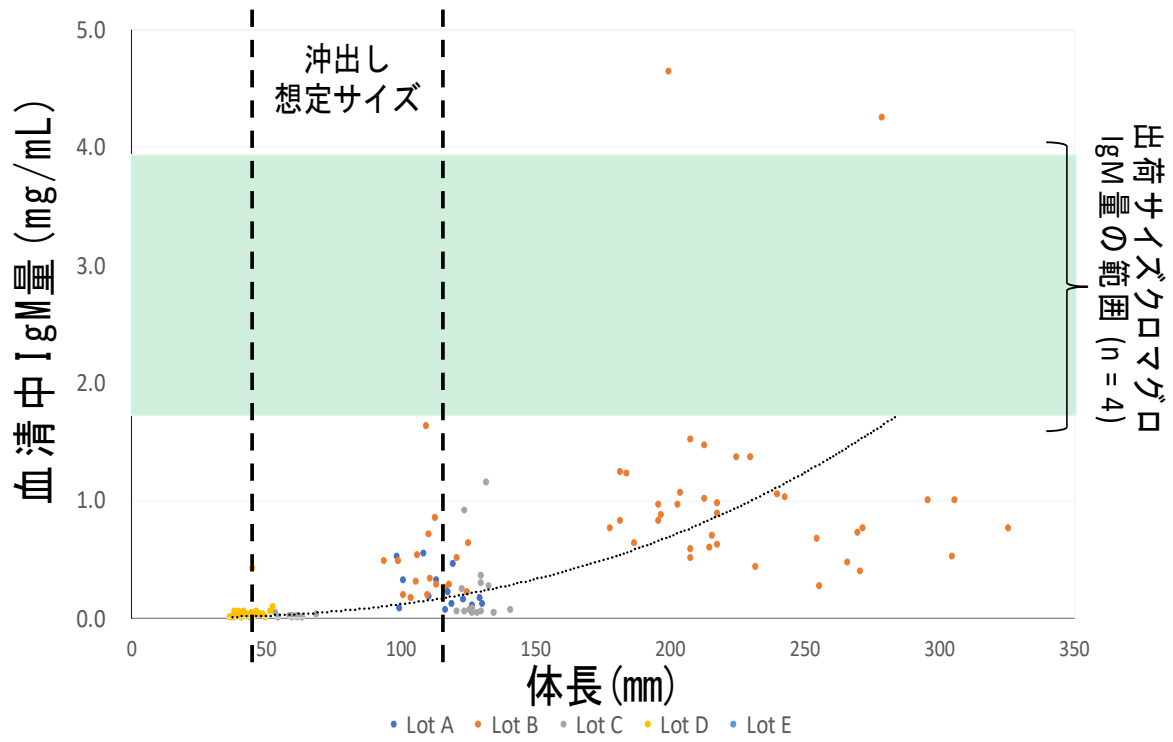


図4. 血清中の総抗体 (IgM) 量の推移

| | | | |
|-----------------------------|---------------------------------|--------------|------------|
| 実行課題番号 | 18064722-0302 | 実行課題 研究期間 | 平成30～令和4年度 |
| 小課題名 | 3. クロマグロの種苗期に発生する疾病の防除手法の開発 | | |
| 実行課題名 | (2) 住血吸虫に対する駆虫剤の最適な投与方法等の開発 | | |
| 小課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 水産研究・教育機構 水産技術研究所 病理部・松山知正 名 | | |
| 実行課題 代表研究機関・研究室・研究者 名 | 近畿大学 水産研究所・白樫 正、升間主計、青木隆一郎 名 | | |
| 共同研究機関・研究室・研究者 名等 | | | |

II. 実行課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

国内の養殖マグロで広く発生する住血吸虫症については、これまで3種の原因寄生虫が確認されており、現在では経口駆虫剤プラジクアンテルによる駆虫が唯一の対策として健全なマグロ養殖に不可欠となっている。しかし、過度で不適切な投薬は徒に薬剤コストを増大させるだけでなく、薬剤耐性虫の出現を促す。本課題では、(i)寄生モニタリング法の確立として、住血吸虫症の発生状況や流行予測に資するため、海水や魚体から各マグロ住血吸虫種の遺伝子の特異的かつ定量的に検出する分子生物学的手法と、マグロ血中内の抗住血吸虫抗体価を測定する手法を構築する。(ii)最適な投薬スケジュールの構築では、高い駆虫効果を得つつ投薬コストを抑えるために、魚体に侵入した住血吸虫が成熟産卵する直前に駆虫を可能とする、最適な投薬スケジュールを構築する。(iii)寄生を軽減する新防除法の開発では、養殖場に定着している住血吸虫の生活環を遮断するため、生簀周辺に生息する中間宿主を駆除して、マグロへの寄生を軽減する抜本的な対策の確立を目指す。これらの成果をマグロ養殖関係者に普及啓蒙して養殖現場での実装を推進する。

2) 研究方法

(i)寄生モニタリング法の確立

養殖マグロで確認されている3種の住血吸虫 (*Cardicola orientalis*, *C. opisthorchis*, *C. forsteri*) のrRNAオペロン塩基配列を解析し、近縁種と比較して各種に特異的な遺伝子領域を探索した。標的遺伝子を組み込んだ合成プラスミドDNAを段階希釈したものを用いて定量PCR (qPCR) 系を構築した。養殖場海水から各住血吸虫種の遺伝子定量を検出できるかを検証するため、和歌山県と鹿児島県のマグロ養殖場生簀周辺の海水を異なる時期と水深で採取し、孔径5 μmのメンブレンフィルターで濾して、開発した検出用定量PCRに供した。マグロ血中の抗*C. opisthorchis*特異抗体を計測する手法として、テトラスパニンを標的抗原としたELISAを構築した。これを用い、0～4歳マグロの抗*C. opisthorchis*血中抗体価を測定し、人工種苗における抗住血吸虫特異抗体の

産生時期とその維持について調べた。

(ii) 最適な投薬スケジュールの構築

海面生簀に沖出し後のマグロ人工種苗を定期的に検査し、国内での被害が大きい*C. orientalis*と*C. opisthorchis*を対象に、心臓の成虫と鰓弁内の虫卵の出現状況を調べた。得られたデータを基に、人工種苗で住血吸虫の遺伝子が検出されてから虫卵が確認されるまでの期間、すなわち寄生虫が魚体に侵入してから成熟・産卵に要する期間を推定した。住血吸虫類は、未成熟虫ではプラジクアンテルの殺虫効果が低い可能性があるため、*C. orientalis*のスポロシスト幼虫（中間宿主内の増殖期）及びセルカリア幼虫（魚への寄生体）を異なる濃度のプラジクアンテルに曝露し、幼虫の動きと正死細胞判別キットで死亡率の経時変化を調べ、発育ステージ別の薬剤感受性を調べた。これらの調査・実験で得られた結果を元に、*C. orientalis*と*C. opisthorchis*の駆虫に最適な投薬スケジュールを構築し、普及促進に向けて、その実用性と養殖現場との整合性についてマグロ養殖担当者や県魚病診断担当者と検討した。

(iii) 寄生を軽減する新防除法の開発

マグロ養殖生簀周辺の*C. orientalis*と*C. opisthorchis*の中間宿主ゴカイの生息場所を特定するため、ロープ、フロート、網などの構造物に生息するゴカイ類を採取し、種類別に大まかに分類して個別検鏡により、住血吸虫寄生の有無を調べた。人工種苗沖出し用の生簀ロープ上に生息する*C. orientalis*の中間宿主である、フタエラフサゴカイを駆除し、マグロへの寄生を軽減できるか検証した（Shirakashi et al., 2016; 2017）。簡便なフタエラフサゴカイ防除法を開発するため、生簀網用の水性亜酸化銅系防汚剤で処理したロープを生簀に441日間垂下し、定着したゴカイ数を非処理ロープと比較した。

3) 研究結果

(i) 寄生モニタリング法の確立

マグロ住血吸虫rRNAオペロンの遺伝子配列を近縁種と比較した結果、ITS2領域を標的として種特異性と定量性が高いqPCRの構築に成功した。確立したqPCRを用いて、マグロ養殖場海水から住血吸虫3種全ての遺伝子を定量的に検出できることを確認した。海水中の遺伝子量は表層と1 m水深では検出量に大きな違いが無いこと、海水0.5 Lからも遺伝子検出が可能であること、イリドウイルス検出用の海水サンプル抽出DNAを住血吸虫検査用に共有できること、などを確認した。一方で海水中の住血吸虫遺伝子量は同一魚場内においても採水場所によって、また同一地点でも採水日によって、大きく変動することが分かり、発生状況のモニタリングには複数地点で経時的な調査が必要なことも示された。

*C. opisthorchis*に対する血中抗体価測定法の開発では、テトラスパニン1及び2の固相化とHRP標識抗マグロIgMモノクローナル抗体を用いたELISA検出系で良好な反応が示され、抗マグロ住血吸虫測定方法を構築した。これを用い、人工種苗由来の養殖マグロの血中抗体化を調べた結果、陸上飼育中は検出されず、海面生簀に移動後約3ヶ月の平均573 gの検査では全個体（5/5）で抗体産生が認められた。魚体重が50 kg以上の3～4歳出荷魚においても、全検査個体から抗体反応が認められたが、その抗体価は0歳魚との間に大きな違いはなかった（図1）。また、年級群、雌雄による違いや魚体重、肥満度と抗体価との相関も確認されなかった。一方、吸光値から判断した血中抗体量は、同一群のマグロ内でも個体差が大きく、最大で6倍以上の開きが認められた。これら抗体価が高い個体は住血吸虫に対する抵抗性が高いか、特別に重篤な寄生を受けている可能性が

あるが、詳細は不明であった。前者であれば抗住血吸虫系統育種への展開も期待できる。

これらの研究から、本研究で開発したqPCRとELISAはマグロ住血吸虫の寄生状況や発生予測などに応用可能で、住血吸虫症のモニタリングに有用であることが示された。

(ii) 最適な投薬スケジュールの構築

マグロ人工種苗における*C. opisthorchis*遺伝子量を経時的に検査したところ、海面生簀に収容1週目の検査個体の8%で本種の寄生部位である心臓から遺伝子が確認された。その後心臓の当該遺伝子検出率は増加し、生簀収容4週目には100%に達した(図2左)。虫卵が蓄積する鰓では3週目から遺伝子が検出され始めたが、検出量は心臓より少なかった。これはまず虫体が寄生部位である心臓に集まり、そこで成熟・産卵した虫体から産出された虫卵が鰓で検出されたと考えられた。顕微鏡検査では生簀収容4週目にはじめて心臓に成虫と鰓に虫卵が確認された(図2右)。このことから、qPCRでは顕微鏡検査より数週間早く寄生を検出できること分かり、早期診断に極めて有効であることが示された。また、*C. opisthorchis*が成熟・産卵するまでは約4週間程度を要することも明らかとなった。*C. orientalis*については、同一ロットのマグロを用いての追跡調査はできなかったものの、寄生部位である鰓から遺伝子が検出されたのは、最短で海面生簀収容後21日目であった。また、遺伝子が確認されてから14日目に検鏡で虫卵を確認した。この結果から、*C. orientalis*の発育速度は*C. opisthorchis*より遅く、産卵までに5週間以上かかることが示された。また、*C. opisthorchis*、*C. orientalis*ともに、それぞれの寄生部位である鰓と心臓で遺伝子が確認されてから、2週間程度で虫卵が産生され始めることが示された。

異なる濃度のプラジクアンテルに暴露した住血吸虫幼虫の生死判別判定試験では、2.0 ppmに暴露したスポロシスト(増殖幼虫)で暴露1時間後から死亡が確認された。それ以下の濃度でも暴露2時間後から死亡が発生し、死亡率は時間とともに増加した(図3)。一方、対照区(0.0 ppm曝露区)のスポロシストでは曝露12時間後まで死亡が認められなかった。同様に、セルカリア幼虫(感染期幼虫)でもプラジクアンテル曝露区での死亡が対照区より多く、死亡率は薬剤濃度に依存して増加した。これらの結果からプラジクアンテルは*C. orientalis*のスポロシスト、セルカリア両幼虫に対して殺虫効果があることが明らかとなった(Norbury et al., 2022)。

これらの結果から、住血吸虫が産卵に至る直前に駆虫して、魚病被害を軽減し養殖場で寄生虫の生活環が維持されるのを防ぎつつ、無駄な投薬によるコスト増大を防ぐことができる最適な投薬方法として、以下の投薬スケジュールを構築した：人工種苗を海面生簀に導入後、1ヶ月を目処にプラジクアンテル製剤の投薬を開始し、*C. opisthorchis*については4週間、*C. orientalis*については5週間を目処に投薬を繰り返す。また、マグロ養殖現場担当者や県魚病担当者との情報共有から、投薬は魚体が5 kg程度になるまで継続すると死亡被害が軽減できること、赤潮の発生が予想される海域では、発生時期に投薬して住血吸虫による赤潮被害の増大を防ぐため、発生1~2週間前を目処に投薬することも、スケジュールに組み込んだ。また、3~4歳の大型マグロでも寄生が確認され、死亡被害は稀であるものの、リザーバーとなっている可能性が示された。そのため、漁場全体から寄生を減らすには、大型魚の寄生状況についても注意が必要である。この最適な投薬法を養殖業界誌へ掲載するとともに、マグロ養殖関係者を対象とした講演で発表し、現場への実装を推進する普及活動を行った。

(iii) 寄生を軽減する新防除法の開発

生簀ロープを清掃して、生息する中間宿主のフタエラフサゴカイを駆除することで、どの程度マグロへの寄生を軽減できるかを調べた。清掃を実施する以前の調査では、生簀ロープ上に生息

するフサゴカイ類における*C. orientalis*寄生率は夏季にピークに達し、最大20%程度であった。一方、ロープ清掃以降は夏季でも感染ゴカイは殆どみられず、清掃により生簀周辺から*C. orientalis*感染中間宿主ゴカイが駆除されたことが示された(図4)。ロープ清掃を実施した生簀に沖出しされたマグロ人工種苗における*C. orientalis*の寄生率(虫卵陽性率)についても、ロープの清掃を実施せず収容していた過去の事例では収容7週目の時点で100%(10/10)に達していたのに対し、中間宿主駆除後には7週目に検査した40尾で寄生は確認されず、32週目でも寄生率20%と低い状態を維持した(表1)。また、水性亜酸化銅系防汚剤で処理したロープでは生簀に垂下441日後でも付着物は殆どなく(図5左)、中間宿主のフタエラフサゴカイの生息密度も最大で1個体/30 cm程度と、無処理ロープ上の6個体/30cmより顕著に少なかった(図5右)。これにより、最低でも1年以上は効果の期待できる簡便な中間宿主防除技術の開発に成功した。また、生簀構造物上の中間宿主の生息密度を減らし、マグロへの*C. orientalis*寄生を軽減する抜本的な対策方法が確立された。これら成果についても養殖現場での実装推進のため、投薬スケジュールと共に公表して普及啓蒙を行った。一方、*C. opisthorchis*については、発生漁場での数年に渡る調査にもかかわらず、生簀構造物上の感染ゴカイの生息場所の特定には至らず、同様の手法での寄生予防は困難である可能性が示された。そのため、本種については投薬を主体とした対策が重要であると考えられた。

4) 成果活用における留意点

海水中からの遺伝子検出においては、懸濁物が多い時期にはPCRが阻害される可能性があるため、阻害を確認するための対照となるサンプルを同時に解析することや、核酸抽出法を工夫するなどの処置が必要な場合もある。住血吸虫の中間宿主であるフサゴカイ類の生息場所は、環境によって異なるため、必ずしも生簀ロープで感染ゴカイの生息密度が高いとは限らない。フサゴカイ類はホヤやフジツボ等の付着生物の間隙に営巣しているため、生簀周辺にこれら付着生物を増殖させないことが重要である。

5) 今後の課題

適切な投薬スケジュールで虫卵産生前に駆虫を実施し続ければ、虫卵の産生を遮断でき、理論的には漁場全体から住血吸虫を駆逐できるはずである。寄生予防法と共に、その効果については養殖場での実施事例を集積し、他の養殖現場にフィードバックすることで社会実装を推進させる必要がある。抗住血吸虫抗体の検出系については、研究の足がかりができたのみで、今後育種研究への活用や投薬スケジュールの高度化に応用するためには、*C. opisthorchis*についても検出系を確立し、寄生状況と抗体産生量についてより多くの個体で詳細に調査する必要がある。

<引用文献>

- Shirakashi, S., K. Tani, K. Ishimuru, T. Honryo, S. P. Shin, H. Uchida and K. Ogawa (2017): Spatial and temporal changes in the distribution of blood fluke infection in *Nicolea gracilibranchis* (Polychaeta: Terebellidae), the intermediate host for *Cardicola orientalis* (Digenea: Aporocotylidae), at a tuna farming site in Japan. *J Parasitol*, **103**, 541-546.
- Shirakashi, S., K. Tani, K. Ishimaru, S. P. Shin, T. Honryo, H. Uchida and K. Ogawa (2016): Discovery of intermediate hosts for two species of blood flukes *Cardicola orientalis* and *Cardicola forsteri* (Trematoda: Aporocotylidae)

infecting Pacific bluefin tuna in Japan. *Parasitology International*, **65**, 128-136.

Norbury, L. J., S. Shirakashi, C. Power, B. F. Nowak and N. J. Bott (2022):
 Praziquantel use in aquaculture - current status and emerging issues
International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance **18**, 87-102.]

表 1. ロープ掃除による中間宿主駆除を実施前と後の生簀に収容したクロマグロ人工種苗の *Cardicola orientalis* 寄生率

| | 6週目 | 7週目 | 8週目 | 32週目 |
|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 清掃前 | 100% (10/10) | 100% (20/20) | 100% (10/10) | 100% (20/20) |
| 清掃後 | 0% (0/28) | 0% (0/40) | | 20% (2/10) |

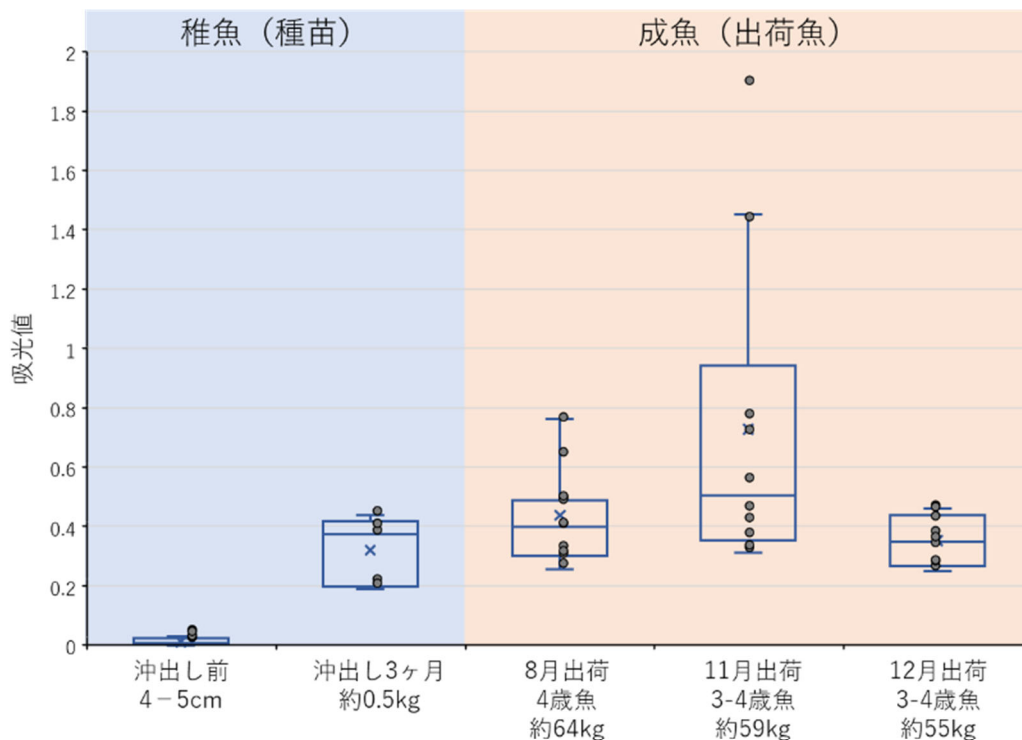


図1. 完全養殖クロマグロ血清のELISA解析で得られた推定 *Cardicola opisthorchis* 抗体量

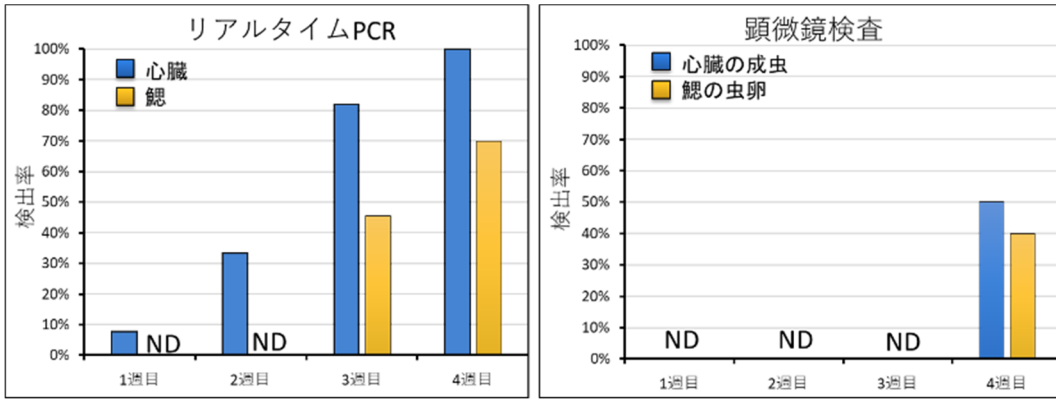


図2. 海面生簀に収容後のマグロ人工種苗の心臓（黄）と鰓（青）におけるqPCRによる *Cardicola opisthorchis* 遺伝子（左）と検鏡による成虫と虫卵の検出率

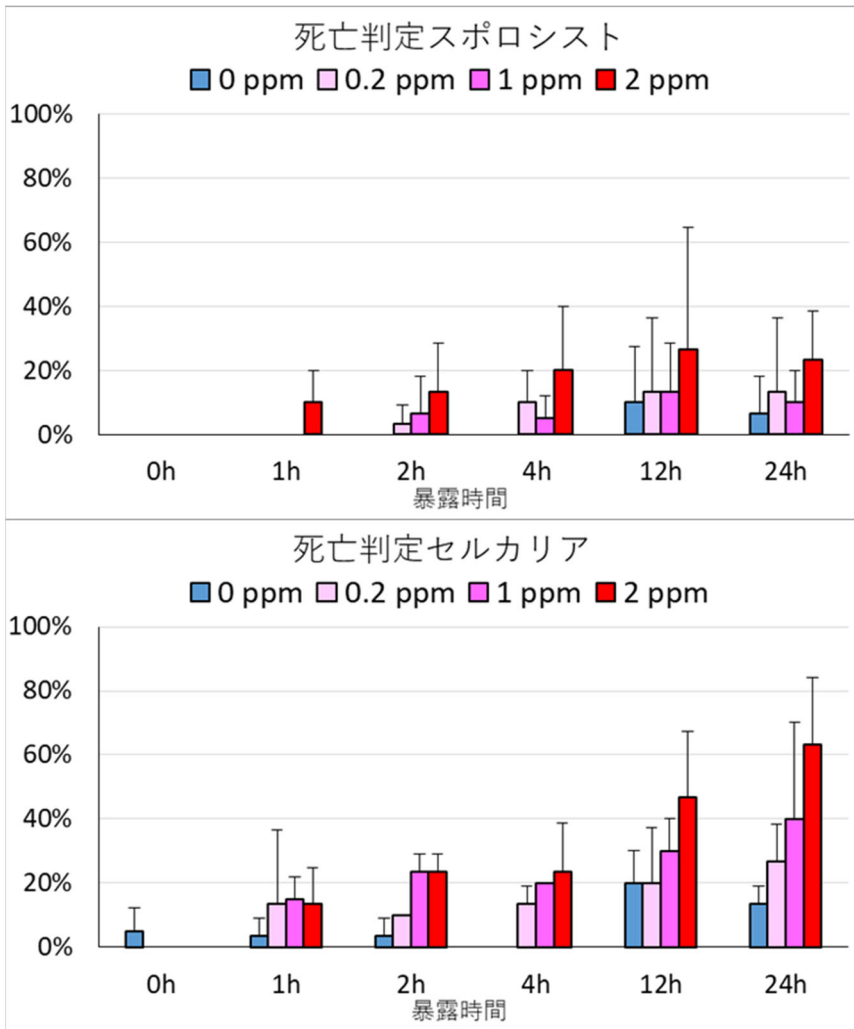


図3. 異なる濃度のプラジクアンテルに曝露したスポロシスト幼虫（上）とセルカリア幼虫（下）の死亡率の変化

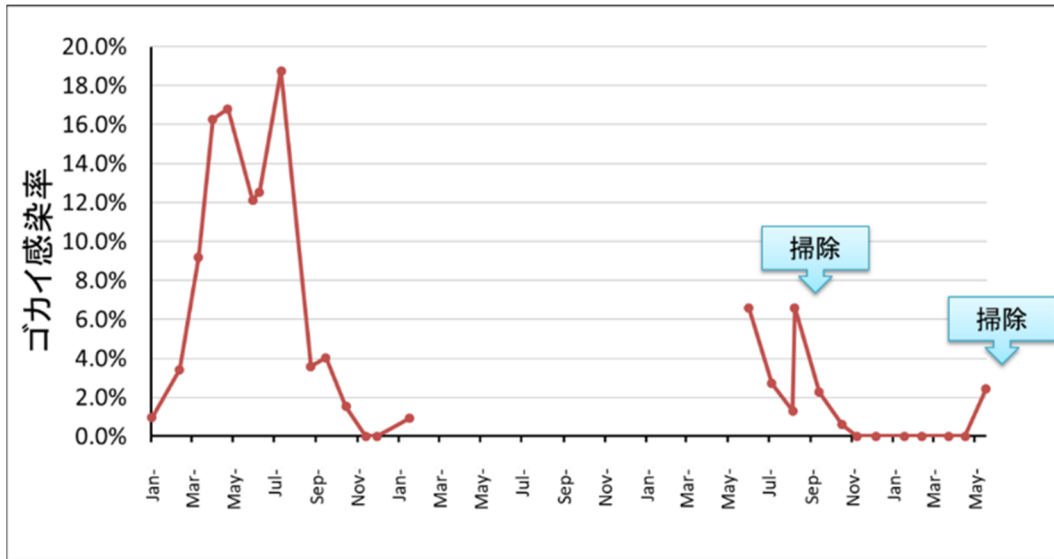


図4. クロマグロ人工種苗飼育用生簀ロープの清掃前後における、ロープ上に生息するフサゴカイ類の*Cardicola orientalis*感染率の推移

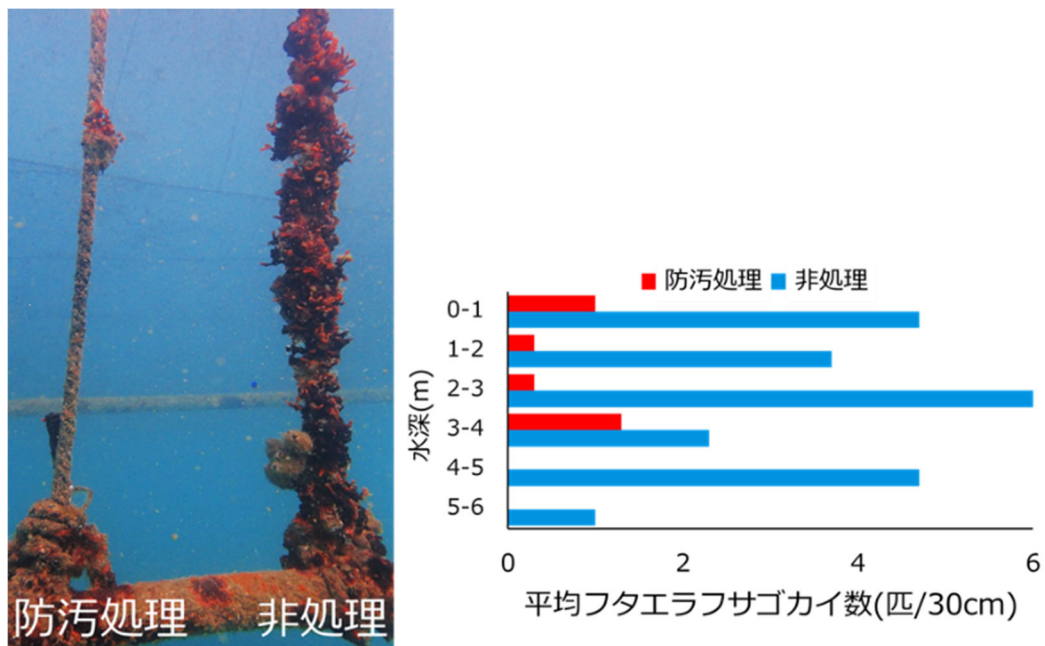


図5. マグロ養殖生簀に441日間垂下した亜酸化銅系防汚剤で処理したロープと非処理ロープ (左) とそれぞれのロープ上におけるフタエラフサゴカイの生息密度

Ⅲ 研究成果一覧【公表可】

課題番号 18064722

中課題名 クロマグロ養殖の人工種苗への転換促進のための
早期採卵・人工種苗育成技術や低環境負荷養殖
技術の開発

成果等の集計数

| 課題 番号 | 学術論文 | | 学会等発表(口頭 またはポスター) | | 出版 図書 | 国内特許権等 | | 国際特許権等 | | PCT | 報道件 数 | 普及しう る成果 | 発表会の 主催(シン ポジウム・ セミナー 等) | アウト リーチ活 動 |
|----------|------|----|----------------------|----|----------|--------|----|--------|----|-----|----------|-------------|--------------------------------------|------------------|
| | 和文 | 欧文 | 国内 | 国際 | | 出願 | 取得 | 出願 | 取得 | | | | | |
| 18064722 | 1 | 5 | 12 | 1 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 1 | 5 | 7 |

(1) 学術論文

区分:①原著論文、②その他論文

| 整理番 号 | 区分 | タイトル | 著者 | 機関名 | 掲載誌 | 掲載論文のDOI | 発行 年 | 発行 月 | 巻 (号) | 掲載 ペー ジ |
|----------|----|---|---------------------------|---------------|------------------------|---|---------|---------|----------|---------------|
| 1 | ① | Effect of tank shape on survival and growth of Pacific bluefin tuna <i>Thunnus orientalis</i> larvae | Aung Naing Winら (阪倉良孝) | 長崎大学 | Aquaculture | https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735283 | 2020 | 7 | 524 | 735283 |
| 2 | ① | Characterization of digestive physiology in Pacific bluefin tuna <i>Thunnus orientalis</i> juvenile fed commercial diet and raw fish feed | 村下幸司ら | 水産研究・教育機 構 | Aquaculture | https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736562 | 2021 | 2 | 538 | online |
| 3 | ① | Development of a method for experimental infection of Pacific bluefin tuna with red seabream iridoviral disease | 松浦 雄太ら | 水産研究・教育機 構 | Aquaculture | https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736627 | 2021 | 3 | 539 | 736627 |
| 4 | ① | Differences in free amino acid compositions in liver and dorsal white muscle of juvenile Pacific bluefin tuna <i>Thunnus orientalis</i> fed raw fish and artificial feeds | 山本剛史ら | 水産研究・教育機 構 | Aquaculture science | なし | 2021 | 10 | 69 | 203- 211 |
| 5 | ① | クロマグロ <i>Thunnus orientalis</i> 卵の発生に伴う比重の変化とそれに基づく卵管理に適した通気量の検討 | 樋口健太郎ら | 水産研究・教育機 構 | 水産増殖 | なし | 2022 | 12 | 70 | 243- 250 |
| 6 | ① | Advanced spawning in Pacific bluefin tuna, <i>Thunnus orientalis</i> , by a shift in consecutive photothermal regimes in a land-based tank | 樋口健太郎ら | 水産研究・教育機 構 | Aquaculture | 未定 | 2023 | 3 | 567 | 739290 |

(2) 学会等発表(口頭またはポスター)

| 整理番 号 | タイトル | 発表者名 | 機関名 | 学会等名 | 発行 年 | 発行 月 |
|----------|--|-----------------------|-----------|---|---------|---------|
| 1 | クロマグロ人工種苗の生残・成長に及ぼす水温の影響 | 沖田光玄 | 水産研究・教育機構 | 平成31年度日本水産学会春季 大会 | 2019 | 3 |
| 2 | Effect of tank proportions on survival and growth of red sea bream <i>Pagrus major</i> and Pacific bluefin tuna <i>Thunnus orientalis</i> larvae | Aung Naing Win (阪倉良孝) | 長崎大学 | 平成31年度日本水産学会春季 大会 | 2019 | 3 |
| 3 | クロマグロに対するマダイリドウイルスの感染試験方法の検討 | 松浦雄太 | 水産研究・教育機構 | 平成31年度日本魚病学会春季 大会 | 2019 | 3 |
| 4 | Effect of tank proportions on survival and growth of Pacific bluefin tuna <i>Thunnus orientalis</i> larvae | Aung Naing Win (阪倉良孝) | 長崎大学 | 12th Asian Fisheries and Aquaculture Forum | 2019 | 4 |
| 5 | マダイリドウイルス国内流行株の分子疫学解析 | 河東康彦 | 水産研究・教育機構 | 令和元年度日本魚病学会春季 大会 | 2020 | 3 |
| 6 | 大型陸上水槽を用いた環境制御によるクロマグロの早期産卵誘導 | 樋口健太郎 | 水産研究・教育機構 | 令和2年度日本水産学会春季 大会 | 2020 | 3 |
| 7 | クロマグロ人工種苗のエネルギー収支に与える水温の影響 | 沖田光玄 | 水産研究・教育機構 | 令和2年度日本水産学会春季 大会 | 2020 | 3 |
| 8 | 卵管理水温および飼育水温がクロマグロ仔魚の生残、成長、摂餌に与える影響 | 宮崎悠暉 (阪倉良孝) | 長崎大学 | 令和2年度日本水産学会春季 大会 | 2020 | 3 |
| 9 | 改良型クライゼル水槽内流れ場の可視化と考察 | 山口勝海 (阪倉良孝) | 長岡技科大 | 令和2年度日本水産学会春季 大会 | 2020 | 3 |
| 10 | 「クロマグロ幼魚における消化酵素の性状と配合飼料が消化生理へ及ぼす長期的影響」 | 村下幸司 | 水産研究・教育機構 | 令和2年度日本水産学会春季 大会 | 2020 | 3 |
| 11 | α連鎖球菌に実験感染させたクロマグロの病理組織像 | 桐生郁也 | 水産研究・教育機構 | 令和3年度日本魚病学会春季 大会 | 2021 | 3 |
| 12 | オミクス解析を水産に活かす討 | 相馬智史 | 水産研究・教育機構 | 令和4年度日本水産学会秋季 大会 | 2022 | 9 |
| 13 | クロマグロ仔魚の飼育初期における適正水温の予備的検討 | 橋本博 | 水産研究・教育機構 | 令和4年度日本水産増殖学会 第20回大会 | 2022 | 12 |

(3) 出版図書

区分:①出版著書、②雑誌(学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

| 整理番 号 | 区分 | 著書名(タイトル) | 著者名 | 機関名 | 出版社 | 発行 年 | 発行 月 |
|----------|----|---|-------------------------|---------------|----------------------|---------|---------|
| 1 | ② | クロマグロにおける養殖用人工種苗の安定供給技術の開発(掲載:食品と容器) | 玄浩一郎、沖田光玄、橋本 博、樋口健太郎 | 水産研究・教育機 構 | 缶詰技術 研究会 | 2019 | 3 |
| 2 | ④ | 親魚から計画的に卵を採るために ③クロマグロの採卵方法(掲載:FRA NEWS) | 樋口健太郎 | 水産研究・教育機 構 | 水産研究・ 教育機構 | 2020 | 3 |
| 3 | ② | 完全養殖クロマグロの生産性向上にむけた新たな取り組み～親魚用陸上水槽を用いた早期採卵技術の開発～(掲載: BIO九州) | 玄浩一郎 | 水産研究・教育機 構 | 九州バイオ リサーチ ネット | 2021 | 2 |
| 4 | ② | 天然資源への依存からの脱却～人工種苗の課題解決の方向性 | 高志利直、椎名康彦 | 水産研究・教育機 構 | マルハニチロ | 2022 | 4 |
| 5 | ② | 陸上水槽での環境操作によるクロマグロの早期採卵 | 入路光雄 | 水産研究・教育機 構 | 緑書房 | 2022 | 4 |
| 6 | ② | 量から質を求められる時代～種苗生産技術の課題と展望 | 橋本博 | 水産研究・教育機 構 | 緑書房 | 2022 | 4 |

| | | | | | | | |
|---|---|-------------------------------------|------|-----------|-----|------|---|
| 7 | ② | RSIV病やレンサ球菌等から見るクロマグロのウイルス病と細菌感染症対策 | 松山知正 | 水産研究・教育機構 | 緑書房 | 2022 | 5 |
| 8 | ② | クロマグロ養殖の重要疾病「住血吸虫症」の予防と治療 | 白櫻正 | 近畿大学 | 緑書房 | 2022 | 5 |

(4) 国内特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

| 整理番号 | 区分 | 特許権等の名称 | 発明者 | 権利者(出願人等) | 機関名 | 出願番号 | 出願年月日 | 取得年月日 |
|------|----|---------|-----|-----------|-----|------|-------|-------|
| 1 | | 該当無し | | | | | | |

(5) 国際特許権等

区分:①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

| 整理番号 | 区分 | 特許権等の名称 | 発明者 | 権利者(出願人等) | 機関名 | 出願番号 | 出願年月日 | 取得年月日 | 出願国 |
|------|----|---------|-----|-----------|-----|------|-------|-------|-----|
| 1 | | 該当無し | | | | | | | |

(6) 報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

| 整理番号 | 区分 | 記事等の名称 | 機関名 | 掲載紙・放送社名等 | 掲載年月日 | 備考 |
|------|----|---|-----------|-----------|------------|---|
| 1 | ② | クロマグロ完全養殖を目指す国家プロジェクト、第二次5カ年計画スタートー継続と新しい取り組み、その展望についてー | 水産研究・教育機構 | 西日本新聞 | 2018/8/25 | |
| 2 | ② | マグロ養殖における人工種苗への転換促進に向けた取り組み～マグロの安定供給を目指す国家プロジェクト～ | 水産研究・教育機構 | 西日本新聞 | 2019/8/24 | |
| 3 | ① | 完全養殖クロマグロの採卵時期を早めることに成功～天然種苗と同等の人工種苗の大量生産に大きく前進～ | 水産研究・教育機構 | | 2020/7/31 | http://www.fra.affrc.go.jp/pressrelease/pr2020/20200731_tuna/index.html |
| 4 | ② | 完全養殖クロマグロから早期採卵 | 水産研究・教育機構 | 長崎新聞 | 2020/8/1 | |
| 5 | ② | マグロ早期採卵に成功 | 水産研究・教育機構 | みなと新聞 | 2020/8/3 | |
| 6 | ② | マグロ早期採卵に成功 | 水産研究・教育機構 | 水産経済新聞 | 2020/8/4 | |
| 7 | ② | 完全養殖クロマグロの早期採卵について | 水産研究・教育機構 | 西日本新聞広告社 | 2020/8/22 | |
| 8 | ② | <成長のカギは養殖にあり！> 水産機構編①完全養殖クロマグロの早期採卵について | 水産研究・教育機構 | 水産経済新聞 | 2020/10/2 | |
| 9 | ③ | クロマグロの早期採卵（イブニング長崎） | 水産研究・教育機構 | NHK | 2020/11/27 | |
| 10 | ③ | クロマグロの早期採卵（ながさナビゲーター ヒルミテ） | 水産研究・教育機構 | NHK | 2020/12/8 | |
| 11 | ③ | クロマグロの早期採卵（おはよう日本） | 水産研究・教育機構 | NHK | 2020/12/25 | |
| 12 | ② | 養殖クロマグロ最前線 | 水産研究・教育機構 | みなと新聞 | 2021/10/18 | |

(7) 普及に移しうる成果

区分:①普及に移されたもの・製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの。

| 整理番号 | 区分 | 成果の名称 | 機関名 | 普及(製品化)年月 | 主な利用場面 | 普及状況 |
|------|----|-----------------|-----------|-----------|--------|-------------------------------|
| 1 | ② | 早期に採卵したクロマグロ受精卵 | 水産研究・教育機構 | 2021 | 4 | クロマグロ早期種苗の生産 民間3社にて試験生産を開始 |

(8) 発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)の状況

| 整理番号 | 発表会の名称 | 機関名 | 開催場所 | 年月日 | 参加者数 | 備考 |
|------|--------------------------|-----------|--------------|------------|------|----|
| 1 | 平成30年度全国クロマグロ養殖連絡協議会技術部会 | 水産研究・教育機構 | ザイマックス博多駅前ビル | 2018/11/15 | 55 | |
| 2 | 令和元年度全国クロマグロ養殖連絡協議会技術部会 | 水産研究・教育機構 | ザイマックス博多駅前ビル | 2019/11/5 | 45 | |
| 3 | 令和2年度全国クロマグロ養殖連絡協議会技術部会 | 水産研究・教育機構 | メール会議 | 2020/11/4 | 55 | |
| 4 | 令和3年度全国クロマグロ養殖連絡協議会技術部会 | 水産研究・教育機構 | メール会議 | 2021/11/15 | 72 | |
| 5 | 令和4年度全国クロマグロ養殖連絡協議会技術部会 | 水産研究・教育機構 | 福岡市・Web併用 | 2022/11/8 | 69 | |

(9) アウトリーチ活動の状況

区分:①一般市民向けのシンポジウム・講演会及び公開講座・サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展・大学及び研究所等の一般公開への参画、③その他

| 整理番号 | 区分 | アウトリーチ活動 | 機関名 | 開催場所 | 年月日 | 参加者数 | 主な参加者 | 備考 |
|------|----|--|-----------|----------------|------------|------|----------------|---|
| 1 | ① | 一般公開「完全養殖」が絶滅危惧種クロマグロを救う！～おいしいマグロを、いつまでも～ | 水産研究・教育機構 | 西海区水産研究所 | 2018/10/21 | 48 | 会社員、主婦、学生等 | |
| 2 | ① | 全国クロマグロ養殖連絡協議会クロマグロ養殖セミナー「クロマグロ養殖における人工種苗への転換促進に向けた早期成熟・採卵技術の開発」 | 水産研究・教育機構 | 東京証券会館 | 2019/3/6 | 49 | 養殖生産者、流通業者、大学等 | http://www.fra.affrc.go.jp/cooperation/knowledge.platform/bluefin_sub/20190306/result.html |
| 3 | ① | 第18回シーフードショー大阪「大型陸上水槽を用いた早期成熟・産卵誘導技術の開発」 | 水産研究・教育機構 | アジア太平洋トレードセンター | 2021/3/18 | 50 | 養殖生産者、流通業者、大学等 | https://www.seafood-show.com/osaka/?t=1613096625 |
| 4 | ① | 第18回シーフードショー大阪「早期受精卵から生産された人工種苗の飼育適性の解明」 | 水産研究・教育機構 | アジア太平洋トレードセンター | 2021/3/18 | 50 | 養殖生産者、流通業者、大学等 | https://www.seafood-show.com/osaka/?t=1613096625 |

| | | | | | | | | |
|---|---|--|-----------|----------|------------|-----|-----------|--|
| 5 | ③ | クロマグロの重要疾病に対するワクチンの有効性試験の報告会 | 農林水産省安全室 | Web | 2022/9/20 | 50 | 製薬会社 | |
| 6 | ② | 画像解析・IoTによる農林水産業の省人力化 | ケービテバイス | 大崎ブライトコア | 2023/11/30 | 100 | 農林水産・食品業者 | |
| 7 | ③ | 養殖生簀内にマダイリドウイルスを持ち込まないための具体的な方法について講演を行う | 水産研究・教育機構 | 愛媛県愛南町 | 2023/1/19 | 50 | 養殖業者 | |