

種苗生産過程にみられるアカウニ稚ウニの大量斃死を防ぐ 飼育方法の検討— I (予報)

— 各種条件下における感染実験 —

川原 逸朗・後藤 政則・真崎 邦彦*

佐賀県栽培漁業センターでは、1976年度にアカウニ *Pseudocentrotus depressus* の種苗生産に着手し、その後5年間は大量斃死もなく順調な生産を続けていた。しかし1981年度に、殻皮表面への黒斑の出現、脱棘などの症状を特徴とする大量斃死がはじめて発生し、それ以来、年度によって多少変動はあるが、この斃死は毎年起きており、アカウニ種苗生産上大きな問題となっている。当センターで見られる大量斃死は、大体1月から3月の低水温期に発生し、4月中旬から下旬の水温が上昇する時期に治まる傾向がある。

この間斃死の原因を究明するため、細菌感染症

の疑いを持ちその原因菌の分離などを試みてきたが、まだはっきりとした原因をつかむことはできていない。しかし、以前に報告したように¹⁾、この斃死は同居感染が成立することから、感染性のあることが明らかになっている。またその後の実験で、発症したアカウニを滅菌海水に漬けて作製した浸漬海水にも、感染力のあることが認められた。そこで、この浸漬海水による感染実験を基本として、どのような条件下で感染が成立するかを検討した結果、量産飼育における大量斃死を軽減できる飼育方法の可能性が得られたので報告する。

材料および方法

実験は、1989、1991年の大量斃死の発生時期である3～4月にかけて行った。供試した稚ウニは、当センターで常法²⁾により採卵、幼生飼育を行ったのち、屋外の水槽で飼育していたものを用いた。このうち、浸漬海水を作製するための稚ウニは、飼育中に発症し、脱棘症状を示していた6～15mmのアカウニ稚ウニ約850個体を用いた。また感染実験には、外観上正常な7～16mmのアカウニ稚ウニ560個体を用いた。なお、各感染実験は2例で行い、それらの結果は、2例の平均生残率で表わした。

浸漬海水による感染実験

浸漬海水の作製方法 感染実験に用いた浸漬海水は、オートクレーブで滅菌した海水（以下滅菌

海水とする）を5ℓ入れたフラスコに、52g（約300個体）の発症稚ウニを収容し、24時間通気することにより作製した。なお、浸漬海水は、8.0μmのメンブランフィルターで濾過したものを実験に供した。

感染方法 感染試験は、200mlビーカーに浸漬海水を175ml入れ、この中に外観上正常な稚ウニを10個体収容して2日間、12.6～12.9℃の水温で飼育を行い、発症あるいは斃死状況を観察した。なお、浸漬海水の代わりに滅菌海水を用い、感染区と同様の方法で飼育したものを対照とした。

ホモジネート懸濁海水による感染実験

ホモジネート懸濁海水の作製方法 感染実験に用いたホモジネート懸濁海水は、4.6g分の発症稚

* 現：佐賀県水産振興課

ウニをガラスホモジナイザーでホモジナイズし、これを滅菌海水 2 l の中に懸濁させて作製した。

感染方法 まず、発症稚ウニのホモジネート懸濁海水を 1 l 入れたピーカーの中に外観上正常な稚ウニ10個体を収容して12時間浸漬した後、流水で6日間飼育を行い、発症あるいは斃死状況を観察した。なお、正常稚ウニ4.2g分を前記と同様の方法で作製したホモジネート懸濁海水に12時間浸漬した後、流水で飼育したものを対照とした。

生菌数の測定 発症稚ウニおよび正常稚ウニのホモジネート懸濁海水の生菌数は、1.5%NaCl加BHI寒天平板を用いて、混釈法で測定した。

フィルター感染実験

浸漬海水の作製方法 感染実験に用いた浸漬海水は、62g(約350個体)の発症稚ウニを滅菌海水 8 l に収容し、前記と同様の方法で作製した。

感染方法 まず、浸漬海水を0.45, 0.8, 1.2および8.0 μ mのメンブランフィルターで濾過した。つぎに、この濾液175mlを入れた200mlピーカーの中に、外観上正常な稚ウニをそれぞれ10個体収容して3日間、12.7~13.0°Cの水温で飼育を行い、発症あるいは斃死状況を観察した。なお、各濾液の代わりに滅菌海水を用い、感染区と同様の方法で飼育したものを対照とした。

作製温度別感染実験

浸漬海水作製温度 浸漬海水の作製は、14, 16, 18, 20および22°Cの各温度で行った。

浸漬海水の作製方法 感染実験に用いた浸漬海水は、1つの温度区について、滅菌海水を500ml入れたフラスコに、発症稚ウニ6g分(16個体)を収容して前記と同様の方法で作製し、処理したものを実験に供した。

結 果

浸漬海水による感染実験

浸漬海水で感染実験を行った結果は、表1に示したとおりである。浸漬海水で攻撃した区では、1日目に量産飼育で見られるような脱棘などの症状が現われ、2日目には供試した個体すべてが斃

感染方法 各温度で作製した浸漬海水を200mlのピーカーに175ml入れ、この中に外観上正常な稚ウニを10個体収容して2日間、13.2~13.9°Cの水温で飼育を行い、発症あるいは斃死状況を観察した。なお、各浸漬海水の代わりに滅菌海水を用い、感染区と同様の方法で飼育したものを対照とした。

水温別感染実験

浸漬海水の作製方法 感染実験に用いた浸漬海水は、数十個体の発症稚ウニを滅菌海水 5 l に収容して前記と同様の方法で作製し、処理したものを実験に供した。

感染方法 200mlのピーカーに浸漬海水を200ml入れ、この中に外観上正常な稚ウニを10個体収容して12, 14, 16, 18および20°Cの各水温で、前記と同様の方法によって感染させた。なお、浸漬海水の代わりに滅菌海水を用い、感染区と同様に各水温で飼育したものを対照とした。

紫外線照射浸漬海水による感染実験

浸漬海水の作製方法 感染実験に用いた浸漬海水は、約30g(50個体)の発症稚ウニを滅菌海水 3 l に収容して20時間通気することにより作製した。なお、浸漬海水は、10 μ mのメンブランフィルターで濾過したものを実験に供した。

浸漬海水の紫外線処理方法 前記の方法で作製した浸漬海水を紫外線殺菌灯(日立殺菌ランプGL15)で2時間照射し、紫外線照射浸漬海水を作製した。

感染方法 1 l ピーカーに紫外線照射浸漬海水と浸漬海水をそれぞれ700mlずつ入れ、この中に外観上正常な稚ウニを10個体収容して19時間止水状態とし、その後、流水で9日間飼育を行なって、発症あるいは斃死状況を観察した。

死した。これに対して、対照の滅菌海水で飼育したものは、3日目に生残率95%になっているが、ほぼ異常は認められなかった。

ホモジネート懸濁海水による感染実験

ホモジネート懸濁海水で感染実験を行った結果

は、表2に示したとおりである。発症稚ウニのホモジネート懸濁海水で攻撃したほうは、流水飼育後3日目から斃死がみられ、6日目までに半数以上の個体が脱棘症状を伴って斃死した。これに対して正常稚ウニのホモジネート懸濁海水では、ほとんど異常は認められなかった。なお、発症稚ウニおよび正常稚ウニのホモジネート懸濁海水の生菌数は、それぞれ 1.3×10^5 および 6.8×10^4 cfu/mlであった。

フィルター感染実験

浸漬海水を0.45~8.0 μ mのメンブランフィルターで濾過し、その濾液で感染実験を行った結果は、表3に示したとおりである。0.8~8.0 μ mのフィルターを通した濾液では、供試したアカウニのほとんどが3日目までに斃死したが、0.45 μ mの濾液では、対照区と同様まったく異常はみられなかった。

作製温度別感染実験

浸漬海水を14~22°Cの温度で作製して感染実験

表1 発症稚アカウニ浸漬海水による感染実験

実験区	生 残 率 (%)		
	1日目	2日目	3日目
感染区 (浸漬処理飼育)	100	0	—
対照区 (滅菌海水飼育)	100	100	95

実験年月日：1989年3月5~9日
実験水温：12.6~12.9°C

表2 ホモジネート懸濁海水による感染実験

実験区	生 残 率 (%)					
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目
発症稚ウニ ホモジネート 懸濁海水	100	100	90	70	50	45
正常稚ウニ ホモジネート 懸濁海水	100	100	100	95	95	95

実験年月日：1989年3月20~27日
実験水温：13.5~14.1°C

を行った結果は、表4に示したとおりである。14~20°Cで作製した浸漬海水では、脱棘症状がみられ、2日目にはほとんどの個体が斃死したのに対して、22°Cで作製したのものでは、対照区と同様まったく異常は認められなかった。

表3 各種ポアサイズのフィルターで濾過した浸漬海水による感染実験

ポアサイズ (μ m)	生 残 率 (%)		
	1日目	2日目	3日目
8.0	100	40	0
1.2	100	50	5
0.8	100	70	5
0.45	100	100	100
対照*	100	100	100

*：滅菌海水
実験年月日：1991年3月8~12日
実験水温：12.7~13.0°C

表4 各温度で作製した浸漬海水による感染実験

浸漬海水作製温度 (°C)	生 残 率 (%)	
	1日目	2日目
14	95	0
16	85	5
18	80	0
20	95	0
22	100	100
対照*	100	100

*：滅菌海水
実験期間：1991年3月18日~21日
実験水温：13.2~13.9°C

表5 水温別感染実験

感染温度 (°C)	浸漬海水の生残率 (%)			滅菌海水の生残率 (%)		
	1日目	2日目	3日目	1日目	2日目	3日目
12	100	75	15	100	100	95
14	100	95	50	100	100	100
16	100	95	90	100	100	100
18	100	100	100	100	100	100
20	100	100	100	100	100	100

実験期間：1991年3月9～13日

表6 浸漬海水の紫外線照射処理による感染実験

実験区	生 残 率 (%)				
	1日目	3日目	5日目	7日目	9日目
紫外線照射 浸漬海水	100	100	100	100	100
浸漬海水	100	90	80	70	70

実験年月日：1989年3月24日～4月3日
実験水温：13.8～15.7°C

水温別感染実験

水温別に感染実験を行った結果は、表5に示したとおりである。12および14°Cの水温で感染させた区では、3日目までに半数以上の個体が黒斑や脱棘などの症状を伴ってへい死した。これに対し

て、16°C区では、一部の個体に脱棘などの症状がみられたものの、生残率が90%と比較的高い値を示した。また、18あるいは20°Cで感染させたもの、および滅菌海水で飼育した各温度区では、ほとんど異常は認められなかった。

紫外線照射浸漬海水による感染実験

紫外線を照射した浸漬海水で感染実験を行った結果は、表6に示したとおりである。本実験では、未処理の浸漬海水での斃死率がやや低く、斃死までの日数も長かかったが、紫外線照射浸漬海水と未処理の浸漬海水飼育の稚ウニの状態には明らかな差があり、紫外線照射浸漬海水では、まったく発症も斃死も認められなかった。

考 察

本研究における浸漬海水による感染実験の結果、感染した稚ウニは量産飼育にみられるものと同様に脱棘症状を示して斃死するのが認められた。しかし、この感染実験については、浸漬海水が腐敗細菌などのいろいろなものの懸濁液であり、このような懸濁液に稚ウニを漬けるだけでもウニが斃死する可能性も考えられ、その成立が疑われた。そこで発症稚ウニと正常稚ウニのホモジネート懸濁海水による感染実験を行った結果、発症稚ウニのホモジネート懸濁海水では稚ウニが斃死したのに対して、正常稚ウニのそれではほとんど異常はみられなかった。このことから、稚ウニは腸内細菌や腐敗細菌などのいろいろなものの懸濁液に漬

けるだけでは斃死せず、発症した稚ウニの何かが原因で斃死したものと思われる。また、これらの結果は、当センターで発生する大量斃死には、感染性を持つ病原体が何らかの関与をしていることを示唆するものと考えられる。

ウニ類の大量斃死については、Goodbody³⁾、Pearse *et al.*⁴⁾、Miller and Colodey⁵⁾ など、国外での報告がいくつかあるが、感染性を持った病原体がその原因とするものは少ない。しかし、Scheibling and Stephenson⁶⁾ は、カナダの天然海域で発生した *Strongylocentrotus droebachiensis* の大量斃死の原因が感染性を持つ病原体であることを、浸漬感染によって証明している。

一方、国内のアカウニ種苗生産現場では、当センターでみられるものと類似した症状を示す低温期の大量斃死が発生することが知られている。行武⁷⁾は、福岡県栽培漁業公社のアカウニ種苗生産過程に発生した脱棘症状を示す大量斃死の原因を調べるために、異常稚ウニのホモジネートによる感染実験を行い、この大量斃死が感染症の可能性が高いことを報告している。しかし、当センターと同様に、病原体の特定はなされておらず、2つの機関でみられる大量斃死が同じ原因かどうかは、今後、検討が必要と思われる。

浸漬海水を濾過した濾液による感染実験の結果から、当センターでみられる大量斃死に関与する病原体の大きさは、 $0.45\mu\text{m}$ 以上と考えられる。一般的に、 $0.45\mu\text{m}$ 以上の大きさの病原体としては、細菌、真菌などが考えられ、本実験の結果からは、ウイルスの関与は否定できそうである。

浸漬海水をそれぞれ $14\sim 22^{\circ}\text{C}$ の5段階の温度で作製して感染実験を行った結果、 22°C で作製した浸漬海水では、斃死はみられなかった。このことから、浸漬海水の感染力が失活する水温は、 22°C 前後と思われる、それ以下の水温で斃死が発生する可能性が考えられる。しかし、 $12\sim 20^{\circ}\text{C}$ の5段階の水温下で感染実験を行った結果、斃死がみられたのは 16°C 以下であり、感染力があると思われる 18 あるいは 20°C の水温では異常は認められなかった。これは、当センターにおける量産飼育でみられる大量斃死の発生水温とほぼ一致している。このことは、感染可能な水温においても異常が認められなかった原因が、これらの水温におけるウニの抵抗力の方が病原体の感染力よりも高かったことだとすれば、飼育条件が悪化し、ウニの抵抗力

が低下したりしなければ、 16°C 以上の水温では、発症し難いことを示唆するものと思われる。このように、病原体の失活水温と発生水温にずれが生ずる現象は、魚の感染症である類結節症でもみられている。この原因は、はっきりとわかっていないが、その1つに魚の抵抗力の変化によるものが考えられている⁸⁾。また、本実験の結果、 16°C 以下の水温では、感染水温が低くなるほど斃死率が高くなる傾向が認められた。このことから、水温低下が斃死発生の引き金となる可能性も考えられる。

紫外線で照射した浸漬海水で感染実験を行った結果、紫外線照射した浸漬海水では、発症や斃死は認められなかった。このことから、大量斃死に関与する病原体は、紫外線照射によっても失活するものと思われる。一般的に、紫外線は殺菌作用のあることが知られており⁹⁾、この実験結果と病原体の大きさから推察すると、大量斃死に関与する病原体が、細菌である可能性が考えられる。

以上、実験結果から得られた病原体の性質からアカウニの大量斃死を防ぐ飼育方法を推定すると、次のとおりである。

- 1 : $0.45\mu\text{m}$ 以下のフィルターを通した海水で飼育する
- 2 : 16°C 以上に加温した海水で飼育する
- 3 : 紫外線照射した海水で飼育する

これらのうち、 $0.45\mu\text{m}$ 以下のフィルターを通した海水で飼育する方法は、技術的にも経費面からも量産飼育への応用が難しいかもしれない。しかし、加温飼育あるいは紫外線照射海水による飼育については、十分可能性があると考えられる。今後は、これらの方法の有効性を検討するために、飼育実験などを行うことが必要と思われる。

文 献

- 1) 真崎邦彦・野口弘三・金丸彦一郎(1988) : アカウニの種苗生産過程における稚ウニの大量斃死について。西海区ブロック藻類・介類研究会報, 5, 45-59.
- 2) 伊東義信・山田 徹・有吉敏和・野田進治・伊藤 史郎(1985) : ウニ類(アカウニ, パファンウニ, ムラサキウニ)の種苗生産の現状と問題点。昭和55~58年度佐賀県栽培漁業センター事業報告書, 79-96.
- 3) Goodbody, I. (1961) : Mass mortality of a

- marine fauna following tropical rains. Ecology, 42, 150-155.
- 4) Pearse, J. S., D. P. Costa, M. B. Yellin, and C. R. Agegian (1977): Localized mass mortality of red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, near Santa Cruz, California. Fish Bull., U. S., 75, 645-648.
 - 5) Miller, R. J., and A. G. Colodey (1983): Widespread mass mortalities of the green sea urchin in Nova Scotia, Canada. Mar. Biol., 73, 263-267.
 - 6) Scheiblig, R. E. and R. L. Stephenson (1984): Mass mortality of *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinodermata: Echinoidea) off Nova Scotia, Canada. Mar. Biol., 78, 153-164.
 - 7) 行武 敦(1990):アカウニ疾病に関する試験。福岡県栽培漁業公社事業報告書, 44-46.
 - 8) 江草周三著 改訂版(1984):ブリの細菌性類結節症。魚の感染症, 177-187.
 - 9) 佐古 浩・反町 稔(1985):サケ科魚類の病原ウイルス, 細菌およびミズカビの紫外線感受性と紫外線オゾン流水殺菌装置による不活化・殺菌効果。養殖研報, 8, 51-58.