

## 論文

## ガザミ幼生の真菌症の防除に関する研究

安信秀樹\*

Prevention of fungal infection in the swimming crab *Portunus trituberculatus* larvae by high pH of rearing water

## 目次

第 I 章	緒論	2
第 II 章	ひょうご豊かな海づくり協会におけるガザミの種苗生産と真菌症の発生状況	5
第 III 章	原因真菌の分離, 同定および生理学的性状	8
第 IV 章	<i>Halocrusticida okinawaensis</i> の病原性	18
第 V 章	飼育水の pH 調整による <i>H. okinawaensis</i> の感染防除	21
	第 1 節 ガザミ幼生への感染に及ぼす pH の影響	22
	第 2 節 pH がガザミおよびその他の生物に及ぼす影響	24
	第 3 節 ガザミの生残に及ぼす pH と水温の相互作用	28
	第 4 節 pH 調整が飼育水の細菌叢に及ぼす影響	31
	第 5 節 <i>H. okinawaensis</i> の生物活性に対する pH の影響	34
	第 1 項 遊走子および休眠胞子に対する影響	34
	第 2 項 菌糸に対する影響	37
第 VI 章	pH 調整防除法の応用	38
	第 1 節 クサリフクロカビ目真菌に対する効果	38
	第 2 節 <i>Lagenidium callinectes</i> の防除法の検討	41
第 VII 章	総合考察	44
引用文献		46
要約		52
謝辞		54
関係公表論文		55
Abstract		55

キーワード：ガザミ幼生, 真菌症, 防除法, pH, 種苗生産, *Halocrusticida okinawaensis*

本論文は広島大学に提出した学位審査論文である。

\* Tel: 078-941-8601. Fax: 078-941-8604. Email: hideki\_yasunobu@pref.hyogo.lg.jp

兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術総合センター(674-0093 兵庫県明石市二見町南二見 22-2)

## 第1章 緒論

獲る漁業にかわり育てる漁業を目指した栽培漁業は1960年代に瀬戸内海で始まった。1962年(昭和37年)に香川県屋島と愛媛県伯方島に初めて国の栽培漁業の事業場が設置され、この事業を実施する機関として、社団法人瀬戸内海栽培漁業協会が翌1963年に設立された。本事業は発足当初は瀬戸内海に限定されていたが、次第に全国展開されるようになり、昭和54年に日本栽培漁業協会へと組織替えが行われた。発足当初はクルマエビのみであったが、種苗生産対象種は62種にも拡大されるに至り、日本栽培漁業協会に追随する形で始まった各県市町の種苗生産も含めると、現在、放流用種苗として魚類、甲殻類、貝類をはじめ、棘皮動物のウニ、ナマコに至るまで74種が生産されている(水産庁, 2009)。そのうち100万尾以上の種苗の量産が行われているのはマダイ *Pagrus major*, ヒラメ *Paralichthys olivaceus*, クルマエビ *Penaeus japonicus*, ガザミ *Portunus trituberculatus*, タイワンガザミ *Portunus pelagicus*, ヨシエビ *Metapenaeus ensis* およびクロアワビ *Haliotis discus discus* など約30種にも上る(日本栽培協会, 1983; 水産庁, 2009)。このうち甲殻類は魚類に比べて生産尾数が多く、クルマエビは145,188千尾、ガザミは44,136千尾でホタテガイ *Patinopecten yessoensis* などの天然採苗を除けば、魚種別生産尾数では第1位と4位であり(水産庁, 2009), 栽培漁業の事業として、重要な位置を占めていることが分かる。

甲殻類の種苗生産は国の事業発足当初から取り組み、その後大量生産が可能となったものであるが、その間には疾病による大量斃死が発生し、安定生産を図る上での阻害要因となってきた(西岡ら, 1997; 室賀, 1998; 畑井, 1998)。これまでに報告されている種苗生産期における甲殻類の疾病をTable 1-1に示した。これをみると、エビ、カニ類において、多くの疾病が種苗生産過程で発生している。ウイルス病は種苗生産

期のカニ類では報告されておらず、エビ類においてのみ報告されている(Sano *et al.*, 1981; 佐藤ら, 1999; Manivannan *et al.*, 2002; Lightner and Redman, 1985; Couch, 1974)。細菌性疾病はエビ、カニ類のいずれにも認められているが、わずかに2種類が報告されているだけである(室賀ら, 1989; Karunasagar *et al.*, 1994)。一方、真菌症では、*Haliphthoros* 属, *Halocrusticida* 属, *Lagenidium* 属, *Sirolopidium* 属および *Atkinsiella* 属に属する多数の原因真菌が、多くのエビ、カニ類幼生で報告されている(Hatai *et al.*, 1980; Hatai *et al.*, 1992; 泉川ら, 1999; Nakamura and Hatai, 1995a; 浜崎・畑井, 1993a; Roza and Hatai, 1999a; Kitancharoen and Hatai, 1995; Couch, 1942; Karunasagar *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 1994a; Bian *et al.*, 1979; Nakamura *et al.*, 1995; Lightner and Fontaine, 1973; Armstrong *et al.*, 1976; Fisher *et al.*, 1976; Nilson *et al.*, 1976; 勝俣・玉城, 1987; Roza and Hatai, 1999b)。なお、1995年までに報告された *Atkinsiella* 属の真菌は *A. dubia* を除き、新属 *Halocrusticida* に移されたことから(Nakamura and Hatai, 1995b), 本研究ではそれに従うこととする。

本研究の対象種であるガザミは、函館から九州の両沿岸、韓国、中国、台湾に分布する大型のカニで、本邦では東京湾、三河湾、伊勢湾、瀬戸内海、有明海および八代海が有名な産地である。水深5~30mの砂、砂泥に多く分布し、漁期は晩春から初冬で、抱卵期は4月中旬~8月である(三宅, 1983)。

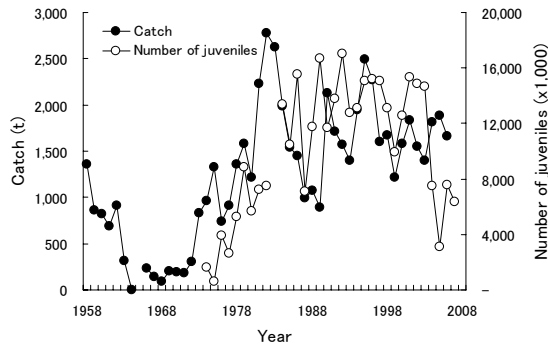
1958年からの瀬戸内海におけるガザミの漁獲量\*をみると(Fig. 1-1), 1963~1972年の漁獲量は極めて低水準となっている。この原因としては、沿岸開発による生息場の減少や水質悪化および漁獲過剰などが考えられている(北田, 1984)。そこで、ガザミ資源量の回復を目的として、事業規模でのガザミの種苗生産技術開発が1963年に水産庁の指定研究に取り上げ

\*1983年までは農林水産省統計情報部の「漁業養殖業生産統計年報」、1984年以降は中国四国農政局統計情報部の「瀬戸内海地域の漁業」による。

**Table 1-1.** Infectious diseases reported in the seed production of crustaceans

	Causative agent	Host	Reference
Virus	Baculoviral mid-gut gland necrosis virus (BMNV)	Kuruma prawn	Sano <i>et al.</i> , 1981
	Penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) = White spot syndrome virus (WSSV)	Kuruma prawn	Satoh <i>et al.</i> , 1999
	Penaeus monodon-type baculovirus (MBV)	Tiger prawn	Manivannan <i>et al.</i> , 2002
	Hepatopancreatic pavrovirus (HPV)	Korai prawn	Lightner and Redman, 1985
	Baculovirus penaei (BP)	Pink shrimp	Couch, 1974
	Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHNV)	Blue shrimp	Lightner, 1983
Bacteria	<i>Vibrio</i> sp. Zoea	Swimming crab	Muroga <i>et al.</i> , 1989
	<i>Vibrio harveyi</i>	Tiger prawn	Karunasagar <i>et al.</i> , 1994
Fungus	<i>Haliphthoros philippinensis</i>	Tiger prawn	Hatai <i>et al.</i> , 1980
	<i>Haliphthoros milfordensis</i>	Kuruma prawn	Hatai <i>et al.</i> , 1992
		Greasyback shrimp	Izumikawa <i>et al.</i> , 1999
		Marine crab	Nakamura and Hatai, 1995a
		Mangrove crab	Roza and Hatai, 1999a
	<i>Haliphthoros</i> sp.	Swimming crab	Hamasaki and Hatai, 1993a
	<i>Haliphthoros</i> sp.	Mud crab	Hamasaki and Hatai, 1993a
	<i>Halocrusticida okinawaensis</i>	Marine crab	Nakamura and Hatai, 1995a
		Swimming crab	Yasunobu <i>et al.</i> , 1997
	<i>Halocrusticida panulirata</i>	Spiny lobster	Kitancharoen and Hatai, 1995
		Greasyback shrimp	Izumikawa <i>et al.</i> , 1999
	<i>Halocrusticida</i> sp.	Mud crab	Hamasaki and Hatai, 1993a
	<i>Halocrusticida</i> sp.	Mangrove crab	Roza and Hatai, 1999a
	<i>Lagenidium callinectes</i>	Blue crab	Couch, 1942
		Marine crab	Nakamura and Hatai, 1995a
		Mangrove crab	Roza and Hatai, 1999a
	<i>Lagenidium marina</i>	Tiger prawn	Karunasagar <i>et al.</i> , 2004
	<i>Lagenidium myophilum</i> *	Coonstripe shrimp	Nakamura <i>et al.</i> , 1994a
	<i>Lagenidium scyllae</i>	Mangrove crab	Bian <i>et al.</i> , 1979
	<i>Lagenidium thermophilum</i>	Mangrove crab	Nakamura <i>et al.</i> , 1995
		Tiger prawn	Muraosa <i>et al.</i> , 2006
	<i>Lagenidium</i> sp.	White shrimp	Lightner and Fontaine, 1973
<i>Lagenidium</i> sp.	Dungeness crab	Armstrong <i>et al.</i> , 1976	
<i>Lagenidium</i> sp.	American lobster	Fisher <i>et al.</i> , 1976	
<i>Lagenidium</i> sp.	American lobster	Nilson <i>et al.</i> , 1976	
<i>Lagenidium</i> sp.	Kuruma prawn	Katumata and Tamaki, 1987	
<i>Lagenidium</i> sp.	Swimming crab	Hamasaki and Hatai, 1993a	
<i>Lagenidium</i> sp.	Mud crab	Hamasaki and Hatai, 1993a	
<i>Sirolopidium parasitica</i>	Tiger prawn	Karunasagar <i>et al.</i> , 2004	
<i>Sirolopidium</i> sp.	Swimming crab	Hamasaki and Hatai, 1993a	
<i>Atkinsiella dubia</i>	Japanese mitten crab	Roza and Hatai, 1999b	

\* *Lagenidium myophilum* changed to *Pythium myophilum* (Muraosa *et al.*, 2009).



**Fig. 1-1.** Changes in the annual catch and the number of released juvenile swimming crab *Portunus trituberculatus* in the Seto inland sea of Japan.

られた。その後、国の助成と並行して各県でもガザミの種苗生産事業に取り組むようになり、飼育技術は顕著に進歩した。しかし、1970年頃までは最も成績が良い事例でも飼育水量 $1\text{ m}^3$ 当たり1,000尾程度にとどまり、大量生産には至らなかった(尾田, 1983)。その後1972年に、高橋・松井(1971, 1972a, 1972b)は、S型シオミズボウムシ *Brachionus rotundiformis* (以下ワムシ) とアルテミア *Artemia salina* を基礎餌料として、アサリ、醤油粕, marine-G (プランクトン増殖促進剤; 玄洋工業) 等の有機物を飼育水に加えることにより(有機懸濁物法)、飼育水量 $1\text{ m}^3$ 当たり10,000~15,000尾もの稚ガニの生産を可能にした。また、1973年には瀬戸内海栽培漁業協会が微生物フロックを用いた方法で、飼育水量 $1\text{ m}^3$ 当たりおよそ10,000尾の効率で大規模生産技術を開発し、初めて100万単位の稚ガニ生産が可能となり、種苗の大量放流が実施されるに至った(日本栽培協会, 1983)。その結果、放流量の多い海域ほど漁獲量が増大し、放流に伴う漁獲量の増加効果が期待できることが示唆された(北田, 1984)。日本栽培漁業協会の種苗生産尾数と瀬戸内海のガザミ漁獲量を見ると(Fig. 1-1)、種苗生産尾数の増加と漁獲量の増加がよく連動していることが分かる。放流種苗の回収率は大阪湾では31.3%にも及んでいる(有山, 2000)。以上の経緯により、2007

年度にはガザミの種苗放流事業は12県15機関において実施されるまでになり、合計44,136千尾が生産され、29,542千尾が放流されている。

しかしながら前述したように、ガザミ種苗の大量生産が可能になったのと期を一にして、疾病問題が顕在化するようになった。そこで、1971年に病害対策も含めてガザミ種苗生産の技術や情報交換を目的としてガザミ種苗生産研究会が発足し、この研究会が中心となって1983年にそれまでの種苗生産技術を整理した「ガザミ種苗の量産技術」が、日本水産資源保護協会から発行された。その中の「疾病と対策」の章ではガス病、白濁症、奇形、付着生物が取り上げられているだけで、病原微生物による疾病は扱われていない。その後、1997年にこれに新たな知見を追加して「ガザミ種苗生産技術の理論と実践」が日本栽培漁業協会から発行され、その「疾病と対策」の章には、細菌性疾病と真菌症が大きく取り上げられている。それによると、細菌性疾病は1~2機関でのみ発生が認められているに過ぎないが、真菌症は約2割の生産機関で報告されている。真菌症が発生した機関では総飼育例の半数以上で発生している年もあり、真菌症はガザミ種苗生産において最も重要な疾病ととらえられている(浜崎, 1997)。

ガザミ類の種苗生産で発生する真菌症で確認されている原因真菌は、いずれもクサリフクロカビ目に属し、ガザミからは *Haliphthoros* sp., *Lagenidium* sp., *Sirolopidium* sp. (浜崎, 畑井, 1993a) および *Halocrusticida okinawaensis* (安信ら, 1997) が、タイワンガザミからは *Haliphthoros milfordensis*, *Halocrusticida okinawaensis* および *Lagenidium callinectes* (Nakamura and Hatai, 1995a) が、ノコギリガザミ *Scylla serrata* からは *Haliphthoros* sp. および *Lagenidium* sp. (浜崎, 畑井, 1993a) がそれぞれ報告されている。これらの真菌はいずれも、宿主内でのみ増殖する組織内寄生菌であること、遊走子産生時には放出管を宿主外へ伸張さ

せ、そこから遊走子を水中に放出させるのが特徴である(畑井, 1996)。放出された遊走子は宿主に付着して休眠孢子となり、発芽して宿主体内に菌糸を形成して死に至らしめる。

このようなガザミの種苗期に発生する真菌症は、感染卵を抱卵した親ガニからふ化幼生に感染すると推定されてきた。その対策として卵およびふ化幼生におけるホルマリン浴が検討された(加治ら, 1991; 浜崎・畑井, 1993b)。その結果、ふ化水槽でのホルマリン浴の有効性が報告され、種苗生産現場においても使用された。しかし、このホルマリン浴を実施しても、真菌症の発生を防除できない例がしばしば見られている(浜崎, 1995)。ひょうご豊かな海づくり協会(旧兵庫県栽培漁業協会、以下“ひょう豊協”と略す)でもまた、卵およびふ化幼生においてホルマリン浴を実施しても真菌症が多発し、壊滅的な被害を受け続け(五利江ら, 1995)、被害額は1年当たり約1,000万円にも達した。くわえて、2003年にホルマリンは薬事法の改正により使用禁止となったことから、抗菌剤によらない方法、すなわち飼育水槽でも利用できる防除法の開発が強く求められるようになった。

本研究は、ガザミの種苗生産事業で大きな被害を受けたひょう豊協の依頼を受けて始まった。目的は飼育水槽でも可能な、飼育環境の制御による真菌症防除方法の開発である。感染防除法の開発については、まず屋外水槽では真菌症の被害が少なかったことに着目した。その後、屋外水槽は照度が高く、飼育水に添加されている植物プランクトンが活発に光合成して、飼育水のpHが高く保たれていることが分かったため、pHを用いた感染防除法を検討した。本論文ではまず、ひょう豊協におけるガザミ種苗生産での真菌症の発生状況について述べる(第II章)。次に、第III章で、原因真菌の分離、同定および生理学的性状について検討し、第IV章では、分離された真菌 *Halocrusticida okinawaensis* のガザミ幼生に対する病原性をガザミの発達段階別に検討し、また感染率に及ぼす飼育水温

の影響および宿主特異性についても検討した。第V章では、この *H. okinawaensis* 感染に対する防除法としてのpH調整について詳細に検討した。まず第1節では、*H. okinawaensis* の生理学的性状を利用した飼育水のpH調整によるガザミ幼生への感染防除について述べる。第2節では、飼育水のpH調整が餌料生物および植物プランクトンへ与える影響について述べ、第3節ではガザミ幼生の生残に及ぼすpHと水温の相互作用を検討し、これらの結果に基づいて実用化に向けた高pH調整法の使用方法を述べる。さらに、第4節では高pH調整が飼育水の細菌叢に及ぼす影響について、第5節では *H. okinawaensis* の生物活性に及ぼすpHの影響について検討した。続く第VI章では、第1節で、*H. okinawaensis* 以外のクサリフクロカビ目真菌に対する高pH調整防除法の応用性について検討し、第2節で、高pH調整が応用できないクサリフクロカビ目の *Lagenidium* 属真菌の防除法について検討した。最終章の第VII章では、総合考察を行った。

## 第II章 ひょうご豊かな海づくり協会におけるガザミの種苗生産と真菌症の発生状況

前述したように、ひょう豊協では、ガザミ幼生の真菌症対策として卵およびふ化幼生のホルマリン浴(加治ら, 1991; 浜崎・畑井, 1993b)を実施していたが、1992~1993年に真菌症が多発し、壊滅的な被害を受けた。本章では、その際のガザミ種苗生産方法と真菌症の発生状況について述べる。

### 材料および方法

ひょう豊協の1992~1993年のガザミ種苗生産野帳を用い、種苗生産方法、飼育時の水温(ゾエア期間のみ)、pH(ゾエア期間のみ)、真菌症の発生の有無、真菌症発生時のガザミ幼生の発達段階、生残率などを集計した。なお、1992および1993年の屋

外形形 100 m<sup>3</sup> 水槽を用いた種苗生産については野帳が現存しなかったため、飼育水温、pHなどの詳細は不明である。

## 結果および考察

### 種苗生産方法

ひょう豊協における種苗生産方法は次のとおりである。すなわち、親ガニには、2~7月にかけて兵庫県内（一部は岡山県と大阪府）の漁業協同組合から小型底曳き網、小型定置網および刺網にて漁獲された未抱卵個体および抱卵個体を使用した。未抱卵個体が産卵するためには砂が必要なため(浜崎, 1996), 未抱卵個体は砂を敷いた水槽に收容し、活きアサリおよび冷凍むき身アサリを与えて飼育して産卵させた。卵を観察して真菌の感染がみられない親ガニを3 m<sup>3</sup> 円形水槽にカゴを浮かべて1尾ずつ收容し、活きアサリおよび冷凍むき身アサリを与えて飼育した。5月中旬の生産開始を目標に4月20日前後から加温を開始し、1日2~3℃ずつ上昇させ、20℃前後まで加温した。卵の発生が進行したら、卵塊の一部を顕微鏡で毎日観察し、ふ化直前の指標であるパープルポイントが明瞭になったものをふ化水槽(0.5 m<sup>3</sup> 黒色 FRP 水槽)に收容し、止水で弱通気し、ふ化を待った。真菌症対策のため、ふ化水槽にはホルマリンを25~30 μg/mLになるように添加した。種苗生産は屋内100 m<sup>3</sup> 円形水槽(直径8 m 深さ2.5 m)4面をもっぱら使用し(Fig. 2-1), 1992年には屋外100 m<sup>3</sup> 水槽(7×8×2 m)4面を、また1993年には屋外70 m<sup>3</sup> 角形水槽(7×7×1.2 m)5面と屋外100 m<sup>3</sup> 水槽(7×8×2 m)4面も補助的に使用した。ふ化水槽でのふ化が確認されると、幼生を顕微鏡下で観察し、活力の良いもののみを使用した。通気を止めて夾雑物を沈下させ、底掃除を行って夾雑物を除去した後、30 mm 径のサイフォンで海水ごと幼生を飼育水槽に移した。飼育水槽では、5 cm 間隔で直径2

mmの穴を開けた13 mm 径の塩化ビニルパイプやエアストーンを用いて十分に通気した。ワムシはS型を使用し、給餌前にナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* と油脂酵母などで栄養強化したものを、午前と午後の2回に分けて残存量を計数して不足分を補充した。アルテミアは北米産を使用し、ふ化幼生をドコサ 65E(ハリマ化成)で栄養強化して給餌した。生餌として、アサリ、オキアミおよびアミの冷凍物をスライサーで削り、50目のネットで残ったものを給餌した。これら以外に、協和発酵社製の甲殻類用飼料 B250, B400, C700 などの配合飼料を補助的に使用した。飼育水にはナンノクロロプシスを50~100万細胞/mLになるよう添加した。屋内水槽は加温が可能であることから、取水海水の水温が低い場合は水温23℃を目安に調整した。餌料系列の詳細を Table 2-1 に示した。

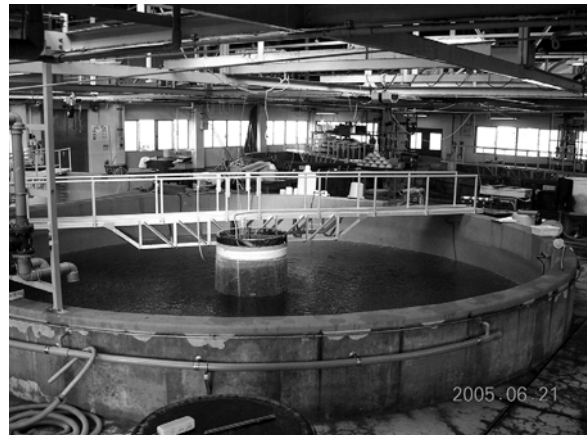


Fig. 2-1. Facilities of seed production of swimming crab in Hyogo Prefectural Mariculture Center (100 m<sup>3</sup> indoor tank).

**Table 2-1.** Procedures for seed production of swimming crab at Hyogo Prefectural Mariculture Center

Days after hatching	Developmental stage	Volum of rearing water (m <sup>3</sup> )	Water exchange ratio by running water (%)	Rotifer (inds./ml)	Brine shrimp (inds./ml)	Artificial food (g)	Minced clam and mysid (kg)
0	Zoea- I	60	—	5	—	50	—
1	"	65	—	"	—	"	—
2	"	70	—	10	—	60	—
3	Zoea- I, II	80	—	"	—	70	—
4	Zoea- II	80→70→90*	—	"	—	80	—
5	"	90→70→100	—	"	—	100	—
6	Zoea- II, III	100→65→100	—	15	0.5	150	—
7	Zoea-III	"	50	"	"	200	—
8	"	"	"	"	"	250	—
9	Zoea-III, IV	"	"	"	1	300	0.5
10	Zoea-IV	"	100	"	"	400	1
11	"	"	"	"	2	"	2
12	"	"	"	"	"	"	4
13	Zoea-IV, Megalopa	"	"	"	3	500	6
14	Megalopa	"	200	—	"	700	10
15	"	"	"	—	"	"	"
16	"	"	"	—	"	800	12
17	"	"	"	—	"	"	14
18	Megalopa, Crab- I	"	"	—	"	"	16
19	"	"	"	—	"	900	"
20	Crab- I	"	"	—	1	900	"

\* Volume of pond water was changed.

**真菌症発生状況**

ひょう豊協において真菌症は 1990 年に初めて発生したが、その被害は 10 回次中 2 回のみで軽微であった。しかし、1992 年および 1993 年には、真菌症の発生防除を目的として、ふ化水槽に 25 µg/mL となるようにホルマリンを投入していたにもかかわらず、真菌症が多発した (Table 2-2)。すなわち、両年とも 5 月から種苗生産を開始したが、真菌症の発生はその当初から認められ、1992 年は生産回次 34 回中 32 回で、また 1993 年は 37 回中 21 回で真菌症が発生し、多くの場合発生後 2~3 日で全滅状態となった。

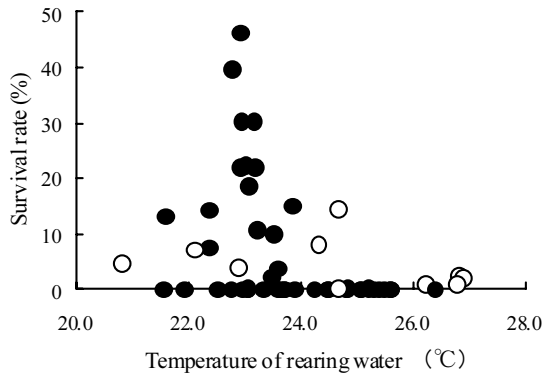
Fig. 2-2 にゾエア期の飼育水温と生残率との関係を示す。この時期のガザミは 20.8~26.9℃の範囲で飼育されており、特に、屋外水槽は水温調整ができないため水温幅は大きかった。生残率が 0%になった回次は 1990~1993 年の全生産 88 回次中 24 回次で、そのうち、19 回次が真菌症によるものであった。

真菌症は 21.5~25.6℃で認められたが、水温と真菌症発生数について一定の傾向は見られなかった。なお、生残率は 23℃前後で高い傾向が認められた。

**Table 2-2.** Occurrence of fungal disease in larvae of swimming crab at Hyogo Prefectural Mariculture Center in 1990-1993

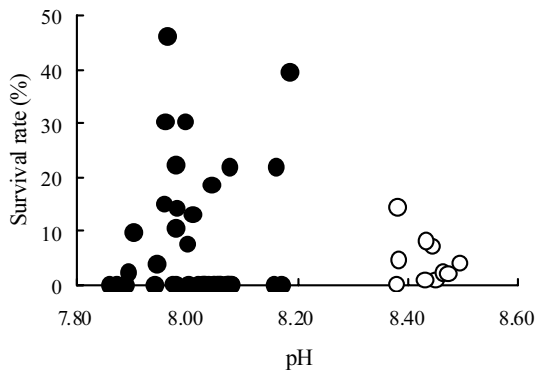
Year	Tank (m <sup>3</sup> )	Production trials	Trials with fungal disease	Mean survival rate(%)*
1990	Indoor (100)	10	2	15.9
1991	Indoor (100)	7	0	22.9
1992	Indoor (100)	27	26	0.8
	Outdoor (100)	7	6	4.5
Total		34	32	0.3
1993	Indoor (100)	20	17	1.3
	Outdoor (100)	6	4	4.6
	Outdoor (70)	11	0	4.3
Total		37	21	2.6

\*Survival rate = (Number of surviving juvenile crab- I /Number of zoea- I )×100 (%)



**Fig. 2-2.** Rearing water temperature and survival rate of swimming crab at Hyogo Prefectural Mariculture Center in 1990-1993. Closed circles (●) and open circles (○) indicate indoor tank and outdoor tank, respectively.

ゾエア期の飼育水の pH と生残率との関係を Fig. 2-3 に示す。pH は 7.86~8.49 の範囲で、真菌症が発生して生残率が 0% になった回次の pH は 7.86~8.17 であったが、pH 8.2 以上では生残率は低かったものの真菌症で全滅した回次はなかった。特に、屋外水槽での生産は、照度の影響から飼育水に添加されているナンノクロロプシスの代謝が活発となるため pH が上昇して pH 8.38 以上を示し、真菌症で全滅することはなかった。



**Fig. 2-3.** pH of rearing water and survival rate of swimming crab at Hyogo Prefectural Mariculture Center in 1990-1993. Closed circles (●) and open circles (○) indicate indoor tank and outdoor tank, respectively.

真菌症の発生は最短で収容 2 日後に見られた。ま

た、真菌症はゾエア I 期で発生する割合が 56% と高く、次にゾエア II 期の 27% で、それ以降の III 期から V 期では 5~7% と少なく、メガロパでの発生はなかった。

真菌症が多発した際の飼育水槽における真菌症対策としては、飼育水へのホルマリンの連続添加 (50 µg/mL) とマラカイトグリーン 0.1~0.3 µg/mL 添加が実施されたが、真菌症の発生を防止することはできなかった。なお、マラカイトグリーンは薬事法並びに動物用医薬品等取締規則の改正により 2005 年に使用が禁止された。これらの薬剤による処理は、飼育水に添加されているナンノクロロプシスに悪影響を与えるうえに、ガザミゾエア自体へも悪影響を与えると推測されたので 1993 年度 6 月以降は実施されなかった。また、取水海水の紫外線殺菌も実施されたが、真菌症は発生した。全国的にも同様の現象が認められ、1985 年以降真菌症の発生が増加し、1989 および 1992 年には全国のガザミ種苗生産機関の 2 割前後で真菌症の発生が確認されている (浜崎, 1997b)。

### 第三章 原因真菌の分離, 同定および生理学的性状

前述したように、ひょう豊協におけるガザミ幼生種苗生産においては、ホルマリンを用いた対策を講じたにもかかわらず、真菌症の発生を防ぐことができなかった。また、現在は水産現場でのホルマリンの使用は禁止されているので、新たな防除法を開発する必要があった。このような状況から著者は、ガザミ幼生期に発生する真菌症の新たな防除対策を図るための基礎的研究として、1993 年および 1994 年にひょう豊協においてガザミ感染個体から原因真菌を分離し、それらの形態学的性状に基づいて真菌を同定するとともに、その生理学的性状を調べた。



## 材料および方法

### 真菌の分離培養

1993年7月および1994年5月に、ひょう豊協で飼育されていたガザミゾエアⅡ期幼生に真菌症が発生した際に、体内に菌糸が認められる幼生から真菌の分離を試みた。感染個体をベンジルペニシリンカリウム（和光純薬工業）およびストレプトマイシン硫酸塩（和光純薬工業）をそれぞれ10%含む溶液で3~5回洗浄した後、カナマイシン（和光純薬工業）を添加（60 mg/L）したPYGS寒天培地（ペプトン1.25 g, 酵母エキス1.25 g, ブドウ糖3 g, 寒天12 g, 海水1 L; 以下カナマイシン加PYGS寒天培地）に接種し、25°Cで培養した。なお、培地の作製に使用した海水は、トリスを1%になるように添加した砂濾過海水（塩分31~34）を塩酸でpHを8に調整した（以下pHの記載のない海水および培地についてはpHを8に調整したものとする。pHの記載があるものについては塩酸および水酸化ナトリウム溶液で記載のpHに調整した）。培養後、培地に増殖した真菌の集落の辺縁をメスで直径3 mm程度切り出し、それを10 mLの滅菌海水に接種し、25°Cで培養した。翌日に放出された遊走子をカナマイシン加PYGS寒天培地に接種し、25°Cで培養後、ひとつのコロニーを選んで純粋培養した。継代は毎回ひとつのコロニーを用いて遊走子を産生させ、その遊走子を培地に接種する方法で行った。カナマイシンは組織培養液で細菌の混入防止に使用され、オートクレーブ処理しても効果が持続するため（日本組織培養学会, 1990）、真菌分離当初はこれを応用し、培地にカナマイシンを添加した。カナマイシンの濃度は一般に使用される組織培養液Eagle's MEM（ニッスイ）に添加されている60 mg/Lとした。

### 真菌の性状

#### 形態学的性状

PYGS寒天培地上の真菌集落の縁辺部を寒天ごとメスで切り取り、菌糸の形態を顕微鏡下で観察した。また、寒天小片を滅菌海水に添加して遊走子の形成過程を観察した。

#### 生理学的性状

1) **増殖温度** カナマイシン加PYGS寒天培地上で25°C、10日間培養した菌の集落辺縁（直径3 mm）を10 mLのカナマイシン添加（60 mg/L）滅菌海水に接種し、25°Cで培養した。接種翌日に放出された遊走子を10 mLのカナマイシン加PYGS液体培地に遊走子数が $10^3$ 個/mLとなるように接種し、10~35°Cの範囲内の6段階の温度で10日間静置培養した。これらを超音波破砕機（日本精機製作所 US-300）により300  $\mu$ Aで1分間処理して菌体を破壊した後、分光光度計（波長600 nm）で吸光度を測定して、増殖量を比較した。

2) **増殖塩分** 無希釈海水（塩分31.2）、3/4（23.4）、2/3（20.8）、1/2（15.6）、1/3（10.4）および1/4海水（7.9）で作製した10 mLのカナマイシン加PYGS液体培地に遊走子数が $10^3$ 個/mLとなるように接種し、25°Cで10日間静置培養し、上述の方法で増殖量を比較した。

3) **増殖 pH** pHを5~10の範囲内に調整したカナマイシン加PYGS液体培地を作製した。上述した方法で、それらに遊走子を接種し（ $10^3$ 個/mL）、25°Cで培養して増殖量を比較した。なお、培養後のpHは測定していない。

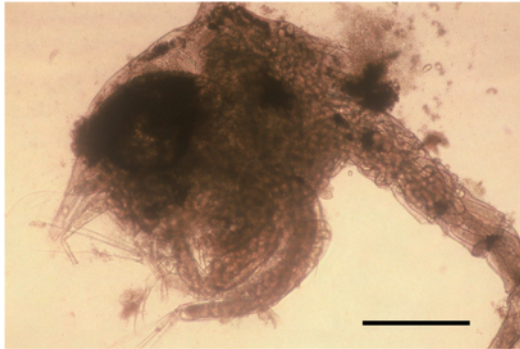
#### 真菌の同定

分離された真菌の同定は、Nakamura and Hatai (1995a, 1995b)の記載に従って、集落の形状、栄養体の形態、遊走子の形成様式および発芽様式などの性状により行った。

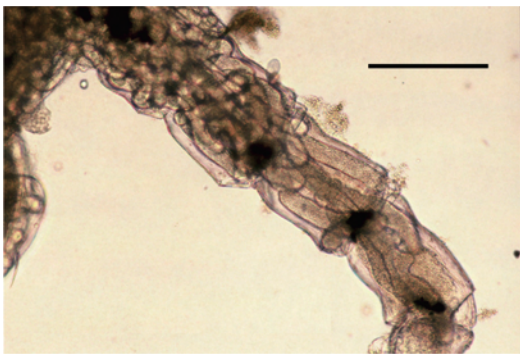
## 結 果

### 真菌の分離培養

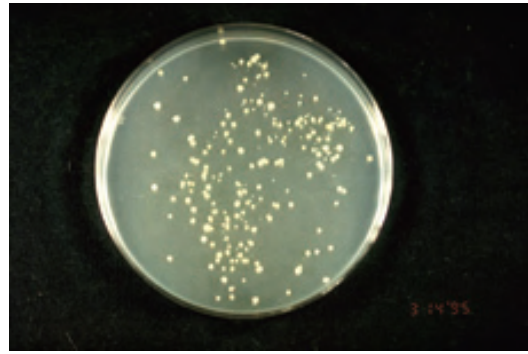
真菌に感染したガザミ幼生は肉眼的にはやや黄色く見える。顕微鏡下では甲殻内部に菌糸がぎっしり充満しているのが観察される (Fig. 3-1, 3-2)。1993年と1994年にそれぞれ分離された真菌をZH93株およびZH94株とした。それらの遊走子をカナマイシン加PYGS寒天培地に接種し、25℃で10日間培養すると、いずれも直径3~5mmの小さな、やや淡黄色の葉状の集落を形成した (Fig. 3-3)。以下の試験にはこれらZH93株, ZH94株を用いた。



**Fig. 3-1.** Zoeal swimming crab with fungal infection. Scale bar is 0.25mm.



**Fig. 3-2.** Fungal hypha in abdomen of swimmig crab. Scale bar is 0.125mm.

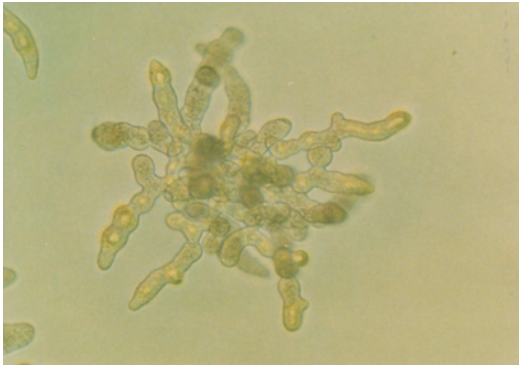


**Fig. 3-3.** Yellowish small colony of the fungus grown on PYGS containing kanamycin agar plate after incubation at 25℃ for 10 days.

### 真菌の性状

#### 形態学的特徴

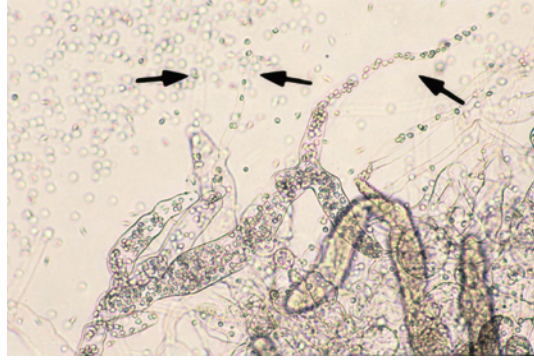
栄養体は分岐し、10~30 μmの太い菌糸を形成する (Fig. 3-4)。菌糸内部には微分干涉顕微鏡下で光る小さな顆粒が認められた (Fig. 3-5)。海水中では菌糸に仕切りが形成され、その仕切られた部位が遊走子のうとなる。遊走子のうに遊走子が形成されると、一つの遊走子のうから、一つまたは数本の放出管が、その先端または側部から伸張する。まれに、遊走子のうの近くで分岐した放出管が見られる。放出管内に遊走子が2列以上産生されて、一斉に遊走子が放出される (Fig. 3-6)。放出された遊走子は直径およそ5~7.5 μmの洋なし型で、側生形の2本の長さ9 μmの鞭毛を有し、遊泳する(2次型遊走子)。やがて、2本の鞭毛は脱落し、休眠孢子となる。休眠孢子はおよそ直径5~7.5 μmの球形もしくはやや楕円で、1個の休眠孢子から再び同形の遊走子(2次型遊走子)が遊出する(2回遊泳性)。遊出した遊走子は再び休眠し、休眠孢子から細長い75~120 μmのフィラメントが伸張して、その先端に栄養体を形成する (Fig. 3-7)。有性生殖は確認されなかった。なお、遊走子は海水表面付近に濃密に遊泳することが多かった。



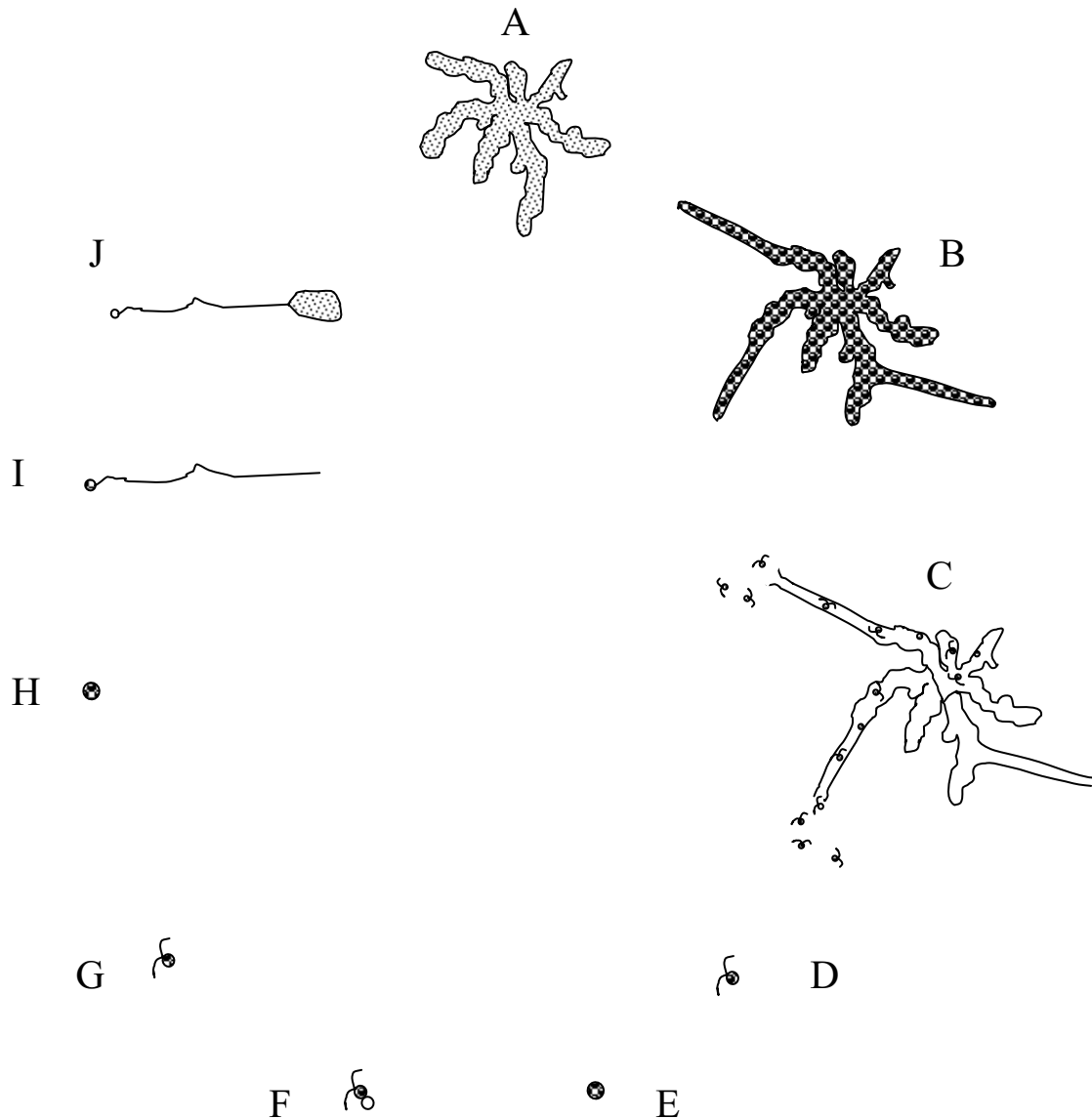
**Fig. 3-4.** Mycelia in PYGS broth. Hyphae were stout, non-septate, irregularly branched, with a 10 – 30  $\mu\text{m}$  width.



**Fig. 3-5.** Granules in hyphae. Hyphae have numerous shiny granules under differential interference contrast microscope.



**Fig. 3-6.** Discharge of zoospore. In seawater, hyphae were divided into subthalli with septa. Zoosporangia were the same in size and shape as subthalli. Discharge tubes (arrows) 1 to several per sporangium.



**Fig. 3-7.** Schema of life cycle of *Halocrusticida okinawaensis*\*

\* Source: Nakamura and Hatai (1995a) with a minor modification

A: Hyphae in PYGS broth; B: Zoosporangium in seawater; C: Zoospores released from each discharge tube; D: Zoospore; E: Encysted zoospore; F: Zoospore released from cyst; G: Zoospore; H: Encysted zoospore; I: Germination (firament formation from encysted zoospore); J: Production of hypha (vegetative cell formed at the top of firament)

栄養体は内部寄生性の全実性で、太い分岐した菌糸を有する。集落は葉状を呈し、遊走子は遊走子のう内で、まず、運動した後、遊走子のう内で被のうすることなく、そのまま遊走子のうから遊出する。一つの遊走子のうから、一つまたは数本の放出管が、その先端または側部から伸張する。遊走子は2回遊

泳性で、側生型の2本の等長毛を有する。発芽は細いフィラメント状の発芽管を伴う。これらの特徴から、本真菌は *Halocrusticida* 属に分類された (Table 3-1)。さらに、分岐した放出管が認められることや、遊走子が放出管内に2列以上に産生されることから、*H. okinawaensis* に同定された (Table 3-2)。

**Table 3-1.** Key to genera of the holocarpic fungi (Lagenidiales) from marine crustaceans\*

1 Colonies filamentous, mycelioid	To 2
1 Colonies lobed, bulbous	To 3
2 Vesicles produced on the orifices of the discharge tubes	<i>Lagenidium</i>
2 Vesicles not produced	To 4
3 Zoospores encysted in the zoosporangia following the first motile stage	<i>Atkinsiella</i>
3 Zoospores in the first motile stages released from the zoosporangia	<i>Halocrusticida</i>
4 Zoosporangia disarticulating from thalli	<i>Silorpidium</i>
4 Zoosporangia fragmenting from thalli	<i>Haliphthoros</i>

\* Source: Nakamura and Hatai (1995b) with a minor modification

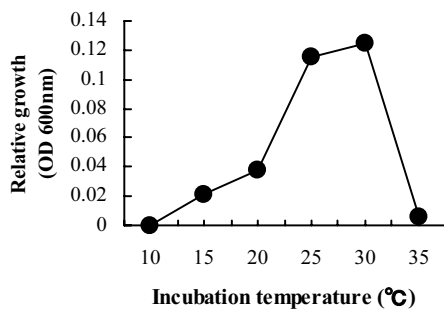
**Table 3-2.** Key to species of *Halocrusticida*.\*

1 Colonies filamentous, less than 2 tubes produced from each sporangium	<i>H. awabi</i>
1 Colonies lobed, bulbous	To 2
2 Encysted spores more than 9 μm, parasitic on insect eggs	<i>H. entomophaga</i>
2 Encysted spores less than 9 μm, parasitic on crustaceans	To 3
3 Branched discharge tubes present	To 4
3 Branched discharge tubes absent	To 5
4 Zoospores generally formed two or more deep in the discharge tubes	<i>H. okinawaensis</i>
4 Zoospores generally formed in a single row in the discharge tubes	<i>H. parasitica</i>
5 Pigmentation from gray to light brown, optimum temperature for growth 30-32°C	<i>H. hamanaensis</i>
5 No pigmentation, optimum temperature for growth 25°C	<i>H. panulirata</i>

\* Source: Nakamura and Hatai (1995b) with a minor modification

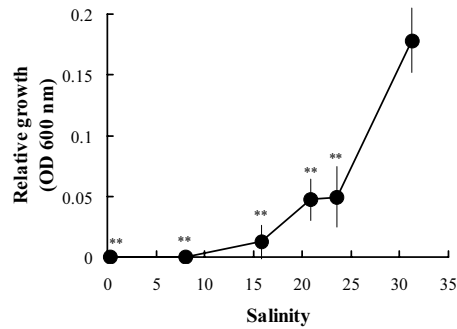
生理学的性状

1) 増殖温度 ZH93 株の温度と増殖量との関係を Fig. 3-8 に示す。増殖可能温度域は 15~35°C の範囲であったが、35°C での増殖は極めて微弱であった。増殖至適温度は 25~30°C と判断された。なお、増殖温度については ZH93 株でのみ調べた。



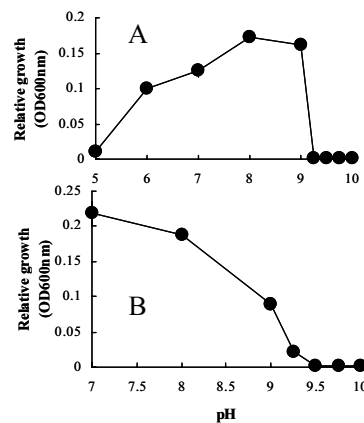
**Fig. 3-8.** Effect of temperature on the growth of *H. okinawaensis* ZH93 in PYGS broth (pH8.0). OD was measured after 10 days inoculation at each temperature.

2) 増殖塩分 ZH94 株の結果を Fig. 3-9 に示した。増殖量は塩分濃度が低くなるにしたがい減少し、1/4 海水（塩分 7.9）での増殖は認められなかった。増殖量は 3/4 海水（23.4）で有意に低下した (Turkey’s test,  $P < 0.01$ )。なお、ZH93 株については長期間の継代の影響から活力が低下したため検討していない。



**Fig. 3-9.** Effect of salinity on the growth of *H. okinawaensis* ZH94. OD was measured after 10 days inoculation at 25°C. The vertical bars show standard deviations. \*\*: Significantly different from undiluted seawater (Turkey’s test,  $P < 0.01$ )

3) 増殖 pH ZH93 株は pH5~9 の範囲で増殖が認められたが、pH9.0 を超えると増殖は認められなかった。ZH94 株は pH7~10 についてのみ検討したが、ZH93 株とほぼ同じように、pH9.0 では急激に低下し、pH9.5 では増殖しなかった (Fig. 3-10)。



**Fig. 3-10.** Effect of pH on the growth of *H. okinawaensis* ZH93 (A) and ZH94 (B) in PYGS broth. OD was measured after 10 days inoculation at 25°C. The vertical bars show standard deviations.

## 考 察

真菌の分類体系は、ほとんどが形態学的特徴に基づいており、細菌のような生化学的および生理学的性状に基づく分類様式はほとんど採用されていなかった(畑井・江草, 1976)。しかし、近年は菌体の超微細構造, 生化学的特徴, そして特に分子遺伝学的

特徴により分類体系が著しく変化している。最新の Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi 第10版 (Kirk *et al.*, 2008)では、従来の菌界がクロミスタ界, 菌界および原生動物界の3つに分割され, 菌界に属するものだけが真菌として扱われている (Fig. 3-11)。

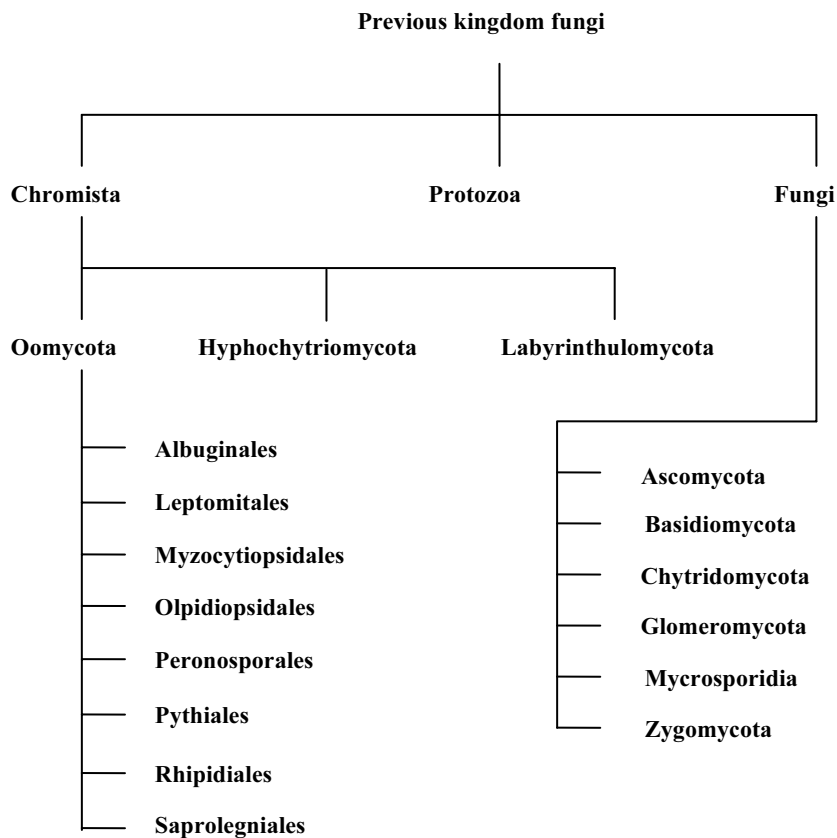


Fig. 3-11. New classification scheme to the order in Oomycota (Kirk *et al.*, 2008).

多くの魚介類真菌病の原因菌を含む卵菌綱 Oomycetes は、新しい分類ではクロミスタ界の卵菌門 Oomycota に移されているため、厳密には真菌として扱われないことになる。したがって卵菌による疾病は真菌症ではなく、最近では卵菌症と呼称され始めている。しかし、種苗生産過程の甲殻類から分離される病原菌のほとんどが属している卵菌綱のクサリフクロカビ目 Lagenidiales は、最新の分類では

消滅しており、新しい目名も決定されていないなど、あまりに大きな分類体系の変化で、なおかつ、未だ不確定な面もあることから (Muraosa *et al.*, 2009) , 本研究では分離菌同定時の分類体系 Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi 第7版(Hawksworth *et al.*, 1983)を用いることとした (Fig. 3-12)。

それによると、真菌症の原因菌はその形態学的特徴から真菌門に分類され、真菌門は5亜門、すなわ

ち鞭毛菌類 Mastigomycotina，接合菌類 Zygomycotina，子囊菌類 Ascomycotina，担子菌類 Basidiomycotina，不完全菌類 Deuteromycotina に分類される。甲殻類の病原真菌の多くは鞭毛菌亜門の卵菌綱に属する（畑井，2004）。卵菌綱にはレプトミタ目 Leptomitales，ミズカビ目 Saprolegniales，クサリフクロカビ目およびツユカビ目 Peronosporales がある（畑井・江草，1976）。

卵菌綱のうち魚類の病原真菌としては，ミズカビ病の *Saprolegnia* 属（Tiffney, 1939; Srivastava, 1979），ワタカビ病の *Achlya* 属（Tiffney and Wolf., 1937; Tiffney, 1939），アフアノマイセス病の *Aphanomyces* 属（Scott and O'Bier, 1962; 江草・益田，1971）が良く知られている。海藻の病原真菌としては，ノリの赤ぐされ菌の *Pythium* 属（新崎，1947; 藤田・銭谷，1976），壺状菌病原菌の *Olpidiopsis* 属（新崎，1960）などが知られている。種苗生産過程の甲殻類から分離される真菌はすべて卵菌綱のクサリフクロカビ目に分類される（畑井，1998）。それらの特徴は，菌糸がすべて遊走子のうに変化する全実性 Holocarpic で組織内寄生菌であること，無性生殖だけで繁殖し，有性生殖器官を形成しないことである（畑井，1998）。

エビ類からは，ホッコクアカエビ *Pandalus borealis* およびトヤマエビ *Pandalus hypsinotus* からの *Pythium* (= *Lagenidium*) *myophilum* (Hatai and Lawhavit, 1988; Nakamura *et al.*, 1994a.; Muraosa *et al.*, 2009)，クルマエビからの *Haliphthoros milfordensis* (Hatai *et al.*, 1992)，およびイセエビ *Panulirus japonicus* からの *Halocrusticida panulirata* がある一方 (Kitancharoen and Hatai, 1995)，ガザミ類においては，ガザミからは *Haliphthoros* sp., *Lagenidium* sp., *Sirolopidium* sp. (浜崎・畑井，1993a) および *Halocrusticida panulirata* (日本獣医生命科学大学 畑井喜司雄教授 私信) が分離され，タイワンガザミ *Portunus pelagicus* からは *Lagenidium callinectes*，*Haliphthoros milfordensis*，*Halocrusticida*

*okinawaensis* が分離された (Nakamura and Hatai, 1995a)。また，ノコギリガザミ *Scylla serrata* からは *Lagenidium callinectes*，*Haliphthoros milfordensis*，*Halocrusticida* sp. が分離されている (Roza and Hatai, 1999a)。これらはすべて卵菌綱のクサリフクロカビ目に属する。

本研究において 1993 および 1994 年に分離された ZH93 株と ZH94 株は、いずれもクサリフクロカビ目の *Halocrusticida okinawaensis* (Nakamura and Hatai, 1995b) に同定された。本真菌は 1994 年に沖縄県のタイワンガザミのゾエアからも分離されており，ガザミに対する実験感染で，クサリフクロカビ目の *Haliphthoros milfordensis* および *Lagenidium callinectes* よりも病原性が強いことが明らかになっている (Nakamura and Hatai, 1995a)。

以上の点から，1993 年および 1994 年のひょう豊協におけるガザミ幼生の種苗生産の不良は *H. okinawaensis* 感染に起因したものと推定された。*H. okinawaensis* は菌糸がすべて遊走子のうに変化し，遊走子のうに形成された放出管から遊走子が放出される。放出された遊走子は休眠し，休眠胞子となる。休眠胞子から 1 回目と同形の遊走子が形成されて 2 回目の遊泳を行う。2 回目の遊走子はガザミ幼生に付着して 2 回目の休眠胞子となる。ガザミ甲殻上の休眠胞子からは，細いフィラメント（発芽管）が出て発芽する (Fig. 3-7, Nakamura and Hatai, 1995b)。フィラメントは甲殻を穿孔し，ガザミ体内でフィラメントの先端に菌糸が形成されると考えられている（畑井私信）。なお，遊走子のうの放出管から放出された遊走子と休眠胞子から遊出する遊走子の判別はできないので，実験で使用した遊走子が 1 回目遊泳のものか 2 回目遊泳のものかは区別していない。

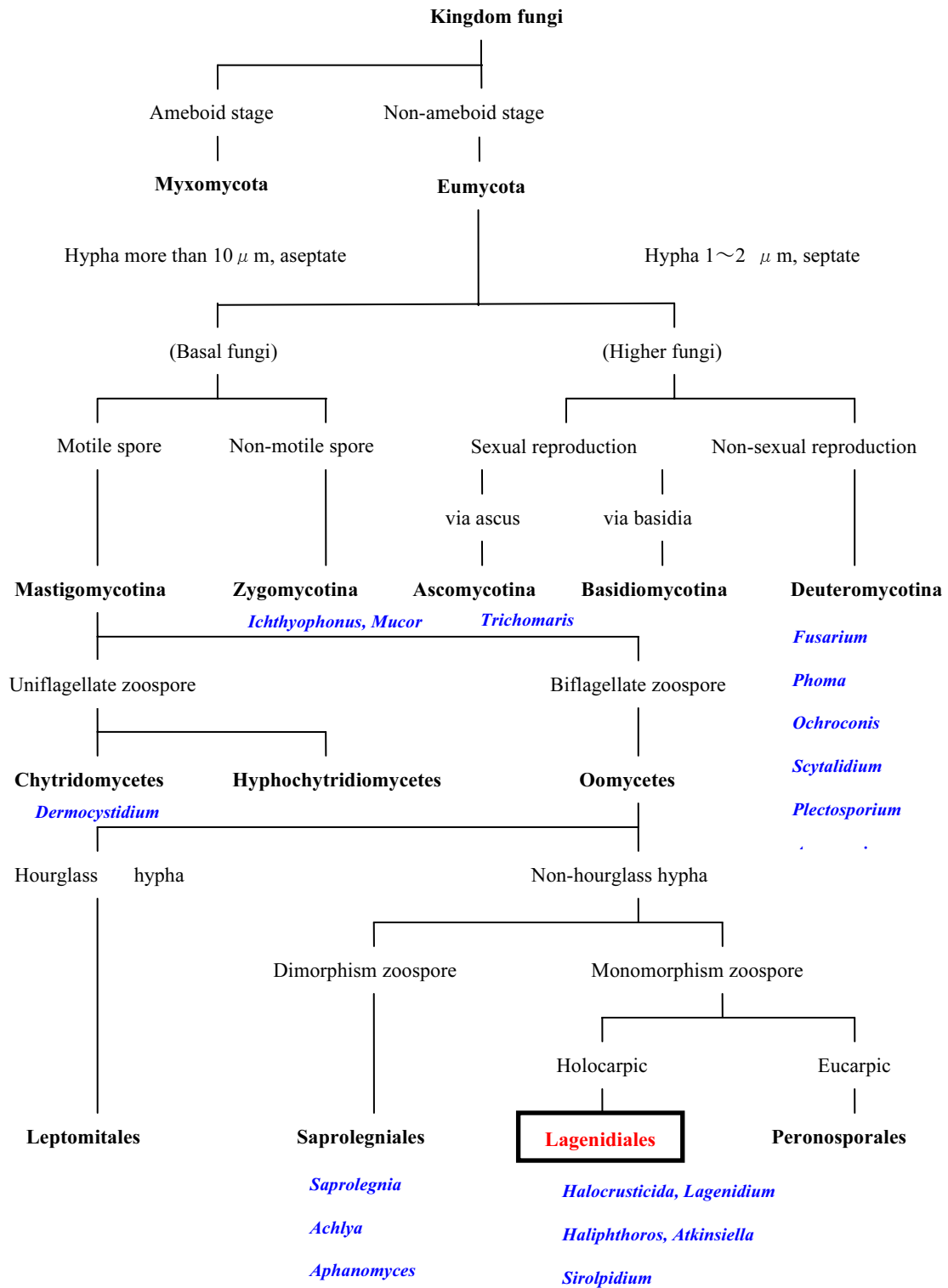
液体培地での *H. okinawaensis* の増殖量測定は，菌糸体の超音波破壊物の吸光度を測定することで行った。それは菌糸体が培養容器の壁面に強く固着することが多く，そのままでは増殖量を測定できなかった。

たためである。なお、遊走子添加量と吸光度および培養日数と吸光度は相関があることを確認している。

クサリフクロカビ目に属する真菌はすべて組織内寄生菌であることから、感染後の治療は困難と考えられ、感染を予防することが重要と判断される。感染防止の考え方としては、*H. okinawaensis* の生活環を断ち切ることが基本となる。本実験で遊走子を温度、塩分および pH を変えて液体培地で培養して増殖量を測定したが、液体培地中に接種された遊走子

は、休眠、再遊泳、再休眠、発芽そして菌糸の形成という順序で生活環が回って初めて菌糸体として目で確認されるようになる。培養条件がどの段階を抑制しているかについては後述するが、本試験結果から、本真菌の増殖を低下させる要因を考えると、20°C 以下あるいは 30°C 以上の水温はガザミの成長に影響があるため実施は困難であるが、飼育水の塩分 (3/4 海水) もしくは pH (pH9.25) を調整することにより、真菌症を防除しうる可能性がある。





**Fig. 3-12.** Classification scheme to the order in Oomycetes (Hatai and Egusa, 1976; Hawksworth *et al.*, 1983; Hatai, 1996; Hatai, 2004). The blue characters show the genus name of causative agents of representative fungal diseases in fish and shellfish.

#### 第IV章 *Halocrusticida okinawaensis* の病原性

第III章において、1993年および1994年のひょう豊協におけるガザミ幼生真菌症に *H. okinawaensis* が関与していると推定したが、この *H. okinawaensis* が本真菌症の原因体であることを確定するためには、分離された真菌のガザミ幼生に対する病原性を明らかにする必要がある。また、本真菌症は発育段階の早いガザミ幼生に頻発することから、本症の発生機構を知る上でガザミ幼生の発育段階ごとの感受性を調べる必要がある。また、*H. okinawaensis* と同じクサリフクロカビ目に属する *Atkinsiella dubia*, *Lagenidium callinectes* および *Haliphthoros milfordensis* は宿主特異性に乏しく、複数の甲殻類への感染性が確認されている (Tharp and Bland, 1977; 加治ら, 1991)。宿主特異性がほとんどない場合は、その菌が自然界に広く分布する可能性を示唆し、感染経路の推定において重要な意味を持つ。さらに、種苗生産の状況によっては、高水温期にかかる可能性もあるため、水温と病原性との関係も重要となる。以上の視点から、本章ではガザミおよびその他の生物に対する *H. okinawaensis* の病原性に関する検討を行った。

##### 材料および方法

##### ガザミ幼生に対する病原性

ひょう豊協で飼育されていた健全なガザミゾエア I 期幼生および III 期幼生を用い、*H. okinawaensis* ZH93 株および ZH94 株の病原性を調べた。海水 30 mL (70 mL 容培養フラスコ) にゾエア幼生を 25 個体収容し、第 III 章で示した方法で調製した遊走子を  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  個/mL となるように接種した。対照区には同量の海水を接種した。接種後は無給餌、無通気で 25°C の恒温器内に静置し、3 日後に感染個体および死亡個体を計数した。真菌感染の有無は、幼生の体内で菌糸が増殖しているか否かで判断した。な

お、フラスコ内の海水にはベンジルペニシリンカリウムおよびストレプトマイシン硫酸塩を、それぞれ 400  $\mu\text{g/mL}$  および 500  $\mu\text{g/mL}$  となるように添加した (以下、単に「抗生物質添加」と表記する)。各試験は 2 回ずつ行った。

##### 宿主特異性

*H. okinawaensis* ZH94 株を供試し、甲殻類幼生としてガザミ、ズワイガニ *Chionoecetes opilio*, アルテミア、イシガニ *Charybdis japonica* およびエビジャコ科 (Crangonidae) の *Crangon cassiope* を用いた。ガザミ、ズワイガニ、アルテミアおよびイシガニは 25 尾ずつ、*Crangon cassiope* は 5 尾を用い、それぞれふ化当日の幼生を試験に供した。試験水温は、ガザミ、アルテミア、イシガニおよび *C. cassiope* については 25°C とし、冷水性のズワイガニは 15°C とした。ガザミ、ズワイガニ、アルテミアでは上記と同様に遊走子液を  $10^3$  個/mL となるように接種して感染させ、イシガニおよび *C. cassiope* では飼育水に直径 3 mm の培養菌糸を直接接種する方法で感染を図った。

##### 水温と病原性

前項の実験からアルテミアに対する病原性が認められたため、ここでは広域な水温下での飼育が可能なアルテミアを用いて、各水温下での分離菌 ZH94 株の病原性について検討した。水温を 10, 15, 20, 25 および 30°C の 5 段階とし、遊走子を  $10^3$  個/mL となるように接種することで感染を図った。各試験は 2 回ずつ行い、感染率は遊走子接種 2 日後に求めた。

## 結果

##### ガザミ幼生に対する病原性

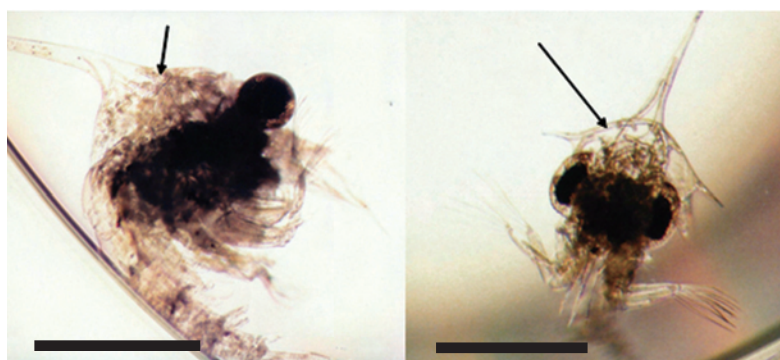
ゾエア I 期と III 期幼生に対する 2 回の病原性試験の結果を Table 4-1 に示した。いずれの株もゾエア

I 期と III 期幼生に対して感染し、それに伴う死亡が認められ、病原性が確認された (Fig. 4-1)。また、接種遊走子数の増加とともに感染率も増加した。真菌感染に対するゾエア I 期と III 期幼生の感受性は、ZH94 株を用いた感染試験の  $10^3$  個/mL 攻撃区の 1 回目の試験ではゾエア I 期と III 期幼生ともに同じ感染率を示し、2 回目の試験でゾエア I 期に比べ、発育が進んだゾエア III 期幼生の方が高い感染率を示したが、その  $10^2$  個/mL 攻撃区では 2 回の試験のいずれもゾエア III 期幼生の方が感受性は低下した。ZH93 株を用いた感染試験では 2 回の試験ともにゾエア I 期に比べ、発育が進んだゾエア III 期幼生の方が感受性は低下した。各試験区で感染が認められた個体について、それらの一部から接種菌の再分離を行ったところ、*H. okinawaensis* が再分離された。なお、一部の感染区およびゾエア III 期幼生の対照区において、真菌の感染によらない死亡があった。

**Table 4-1.** Mortality of swimming crab zoea-I and zoea-III experimentally infected with *Halocrusticida okinawaensis* ZH93 and ZH94 strains

Strain	Stage of zoea	Number of used zoeae	Dose (zoospores/mL)	Infection rate (%)	Mortality (%)
Trial 1	ZH93	I	$10^3$	68	36
			$10^2$	0	12
			$10^1$	0	0
	ZH94	III	$10^3$	44	36
			$10^2$	0	12
			$10^1$	0	12
Trial 2	ZH93	I	$10^3$	84	72
			$10^2$	24	20
			$10^1$	8	0
	ZH94	III	$10^3$	84	92
			$10^2$	4	8
			$10^1$	0	8
Control	I	25	-	0	0
		25	-	0	4
	III	25	-	0	4
		25	-	0	4

Zoeal crab were exposed to zoospores of *H. okinawaensis* and observed at 25°C for 3 days (water: pH8.0).



**Fig.4-1.** Mycelia (arrows) in swimming crab (zoea- I ) experimentally infected with *H. okinawaensis* ZH94 strain. Scale bar is 0.5mm.

**宿主特異性**

結果を Table 4-2 に示した。試験に用いた 5 種類の甲殻類すべてで感染が確認された。本菌はアルテミア (Fig. 4-2) に対してガザミと同等以上の病原性を示した。水温 15°C で行ったズワイガニ (Fig. 4-3),

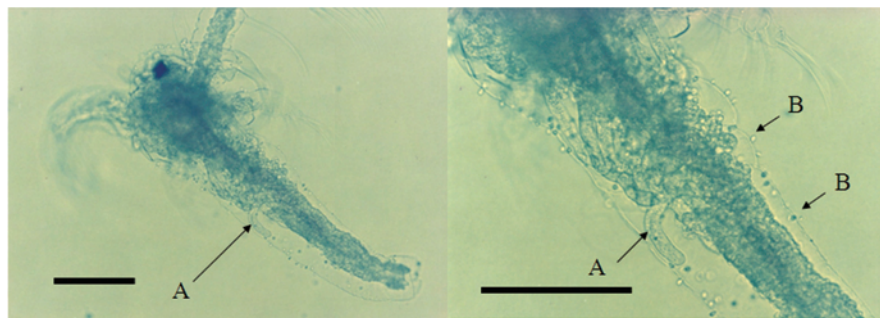
また、感染方法が異なったイシガニおよび *C. cassiope* では感染率は 12~20% と低かった。いずれの対照区も真菌の感染は認められなかった。

**Table 4-2.** Susceptibility of larvae of five crustacean species against *Halocrusticida okinawaensis* ZH94 strain

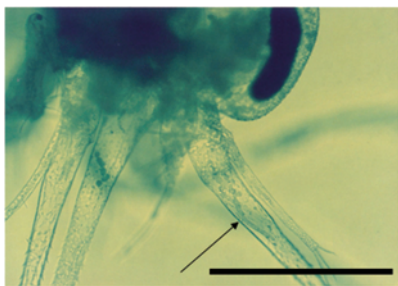
Species	Incubation temperature (°C)	Number of larvae tested	Test period (days)	Infection rate (%)	
				Experiment	Control
Swimming crab <sup>*1</sup> ( <i>Portunus trituberculatus</i> )	25	25	3	92	0
Snow crab <sup>*1</sup> ( <i>Chionoecetes opilio</i> )	15	25	4	12	0
Brine shrimp <sup>*1</sup> ( <i>Artemia salina</i> )	25	25	2	100	0
Shore swimming crab <sup>*2</sup> ( <i>Charybdis japonica</i> )	25	25	7	16	0
Crangonidae <sup>*2</sup> ( <i>Crangon cassiope</i> )	25	5	8	20	0

\* 1 Each animal was exposed to zoospores of  $10^3$  zoospores /mL.

\* 2 A fungal colony with a diameter of about 3 mm was inoculated into culture bottles containing each animal.



**Fig. 4-2.** Hypha (arrow A) in brine shrimp experimentally infected with *H. okinawaensis* ZH94 strain. Encysted zoospores (arrow B) adhered to carapace of brine shrimp. Scale bar is 0.5mm.



**Fig. 4-3.** Hypha (arrow) in snow crab experimentally infected with *H. okinawaensis* ZH94 strain. Scale bar is 0.5mm

#### 水温と病原性

水温 10℃ではアルテミアに感染は認められなかった。15℃で 12~16%の感染がみられ、水温が高くなるにしたがって感染率も高くなり、30℃では 84~96%の感染率となった。水温 35℃でも試験を実施したが、対照区のアルテミアも翌日に死亡したので実験は成立しなかった (Table 4-3)。

**Table 4-3.** Effect of water temperature on the pathogenicity of *Halocrusticida okinawaensis* ZH93 strain to brine shrimp

	Temperature (°C)	Number of used nauplii	Infection rate (%)	
			Challenged	Controlled
Trial 1	10	25	0	0
	15	25	16	0
	20	25	36	0
	25	25	56	0
	30	25	96	0
Trial 2	10	25	0	0
	15	25	12	0
	20	25	36	0
	25	25	64	0
	30	25	84	0

Brine shrimp larvae were exposed to zoospores ( $10^3$  zoospores /mL) and observed at each water temperature for 2 days.

#### 考察

1993年および1994年の真菌症発生時に罹病ガザミゾエアから分離された *H. okinawaensis* ZH93株およびZH94株のガザミ幼生に対する病原性が確認され、本菌がひょう豊協の1993年および1994年の真菌症の原因体であることが明らかになった。本菌は

株 (ZH94) によっては遊走子  $10^1$  個/mL の濃度でもガザミ幼生に対して感染が成立するため、これは既報のクサリフクロカビ目真菌で言われている強病原性株 (浜崎・畑井, 1993a) に分類されると考えられた。幼生の発育段階の I 期と III 期で比較すると、ゾエア I 期幼生で感染率がやや高い傾向が見られた。浜崎・畑井 (1993a) は *Haliphthoros* sp., *Lagenidium* sp., および *Halocrusticida* sp. においても感染率はガザミ幼生の齢期が進行するにともない低くなる傾向があることを報告している。また、同様の傾向がアメリカンロブスター *Homarus americanus* 幼生の *Lagenidium* sp. 感染症 (Nilson et al., 1976) や、ホワイトシュリンプ *Penaeus setiferus* 幼生の *Lagenidium callinectes* 感染症 (Lightner and Fontaine, 1973) でも認められている。第 II 章で述べたように、ひょう豊協での真菌症発生状況を見ても早い発育段階で真菌症の発生が多い。浜崎・畑井 (1993a) は、ガザミ幼生は齢期が進むにつれて外骨格が厚くなり、これが休眠胞子の発芽を抑制すると説明している。

クサリフクロカビ目に属する菌類は宿主特異性が強くないとされている (Tharp and Bland, 1977; 加治ら, 1991)。筆者は *H. okinawaensis* の培養試験で、ガラスやポリプロピレンなどの容器の側面に遊走子が付着し、休眠した遊走子が発芽することを数多く確認しており、*H. okinawaensis* の遊走子の付着には基質選択性はないと考えられる。今回の宿主特異性試験でも *H. okinawaensis* は宿主範囲が広いことが確認された。なお、用いた試験法が異なったため、感染率の点から各甲殻類の *H. okinawaensis* に対する感受性の高低を述べることはできない。

天然海域においてガザミのゾエア幼生はおおむね 4 月から 9 月に出現し (浜崎, 1996), イシガニのゾエア幼生は 5 月から 9 月 (小川, 1997), また *C. cassiope* は年間を通じて産卵とふ化を繰り返している (安田, 1956)。このことは、本菌が各種甲殻類の幼生に順次感染することで、天然海域で年間を通

じて生存し続けることを示唆しており、種苗生産に使用する海水への遊走子の混入も、本菌の感染経路として考えられる。

本研究において、*H. okinawaensis* の実験宿主としてアルテミアが使用できることが確かめられた。従って、アルテミアを用いることにより、ガザミのゾエア幼生が得られる一時期だけでなく、年間を通じて本菌種の感染実験が可能となった。

## 第 V 章 飼育水の pH 調整による *H. okinawaensis* の感染防除

第 III 章で述べたように、*H. okinawaensis* 真菌症の防除法として、原因真菌の生理学的性状に基づくいくつかの方法が考えられる。岩本ら (1973) はガザミ幼生の塩分耐性について検討し、試験水温 19.8~22.9°C という比較的低温で実施したゾエア I 期の塩分耐性試験では、比重 16.3 (15°C 換算塩分: 22.4) が限界値であると報告している。一方、福井県水産試験場 (福井県水産試験場, 1968) が実施した、25~29°C の高温時での塩分耐性試験では、比重 15.20~18.70 (15°C 換算塩分: 20.9~25.4) で生残率が高かったと報告されている。これらのことから、真菌症の防除に希釈海水が使用可能と考えられる。なお、3/4 (塩分: 23.4) と 2/3 海水 (20.8) における *H. okinawaensis* の増殖量はほぼ同じであることから、ガザミ幼生への低塩分の影響を軽減することを考慮すると、3/4 海水 (塩分: 23.4) が適当と考えられた。しかし、増殖阻害効果はあるとはいえ 3/4 海水での増殖は 75% 程度の減少に留まるにすぎないことから、希釈海水のみで真菌症の発生を完全に防除するのは困難と判断された。次に、分離株は 35°C ではほとんど増殖が認められず、ガザミ幼生の水温耐性も少なくとも 34.2°C までは確認されていることから (高橋・松井, 1972a), 加温により本病を制御する方法も考えられた。しかし、ガザミに対して病原性

をもつ真菌のうち、38℃でも増殖するものが存在することや(浜崎・畑井, 1994), 加温に要する費用の面を考えると、事業生産での実施は困難と判断された。

pHについては、いずれの株も pH9.25 で全く増殖しないか、増殖しても増殖量はわずかだったことから、*H. okinawaensis* 真菌症の防除法として飼育水の pH を調整する方法が有望と考えられた。ひょう豊協で真菌症が多発した 1994 年に、試みに水酸化ナトリウムで飼育水の pH を 9.25 に調整したところ、その回次は真菌症の蔓延なく生産することができた。そこで本章では、飼育水を高 pH にすることによる防除法について詳細に検討した。

### 第1節 ガザミ幼生への感染に及ぼす pH の影響

本節ではまず、海水の pH を 9.25 に調整することによる *H. okinawaensis* のガザミ幼生への感染防除効果を実験感染により検討した。次に、同じ親から得られたガザミふ化幼生を2つの水槽に分け、一方は pH を調整せず、もう一方は pH を 9.25 を目安に調整しながら飼育し、真菌症の自然発生に対する高 pH の防除効果をみた。

#### 材料および方法

#### 実験感染における感染防除効果

pH を 8.00 および 9.25 に調整した海水 30 mL (70 mL 容培養フラスコ) にゾエア I 期幼生を 21~26 個体収容し、*H. okinawaensis* ZH93 株および ZH94 株の遊走子をそれぞれ  $10^3$  個/mL になるよう接種した。接種後は無給餌、無通気で 25℃の恒温器内に静置し、3日後の感染個体数および死亡個体数を求めた。真菌感染の有無は、幼生を顕微鏡で観察し、その体内に菌糸が増殖しているか否かで判断した。なお、フラスコ内の海水には抗生物質を添加した。各試験

は2回ずつ行った。

#### 自然感染における感染防除効果

親ガザミ 1 尾からふ化した幼生を 15,000 尾ずつ 0.5m<sup>3</sup> 水槽に収容し、一方は飼育水の pH を 9.25 を目安に調整し、もう一方は調整しなかった (pH7.95~8.09)。飼育水へのナンノクロロブシスの添加や給餌は、ひょう豊協と同様の方法によった(第II章)。水温と pH の測定および幼生の生残数の計数は毎日行った。

### 結果

#### 実験感染に対する効果

飼育水の pH を自然海水とほぼ同じ pH8 に調整した区では、ZH93 株と ZH94 株のいずれの株でも 50% 以上の感染が認められ、それに伴う死亡も発生した。一方、飼育水の pH を 9.25 に調整した区では、ZH93 株では感染も死亡も認められず、また ZH94 株でも 1 回目の実験では感染率が 4%で死亡率も 4%だったが、2 回目は感染および死亡がみられなかった。一方、遊走子を添加しない対照区は、2 回目の実験の pH9.25 区で 4%の死亡が認められたが、pH9.25 区でもゾエアの活発な遊泳が観察され、死亡の見られなかった pH8 区と比較して、幼生の活力に差は認められなかった (Table 5-1-1)。

**Table 5-1-1.** Effect of pH on the mortality of swimming crab zoea-I experimentally infected with *H. okinawaensis* at 25°C

	Strain	pH	Number of used zoeae	Infection rate (%)	Mortality (%)
Trial 1	ZH93	8.00	24	58.3	37.5
		9.25	25	0.0	0.0
	ZH94	8.00	23	82.6	60.9
		9.25	25	4.0	4.0
	Control	8.00	25	0.0	0.0
		9.25	25	0.0	0.0
Trial 2	ZH93	8.00	21	61.9	57.1
		9.25	22	0.0	0.0
	ZH94	8.00	26	88.5	84.6
		9.25	24	0.0	4.2
	Control	8.00	24	0.0	0.0
		9.25	24	0.0	4.0

自然感染に対する防除効果

実験期間中の飼育水槽の水温と pH を Fig. 5-1-1 に、幼生の生残の推移を Fig. 5-1-2 に示した。pH を調整しなかった区では、試験開始 8 日後に幼生の体内に菌糸が認められた。菌糸が確認された翌日から大量減耗が始まり、10 日目には全滅した。一方、pH を 9.25 に調整した区では真菌症の発生は見られなかった。なお、罹病個体から真菌の分離を試みたが、分離に成功しなかったため、原因真菌を特定するには至らなかった。

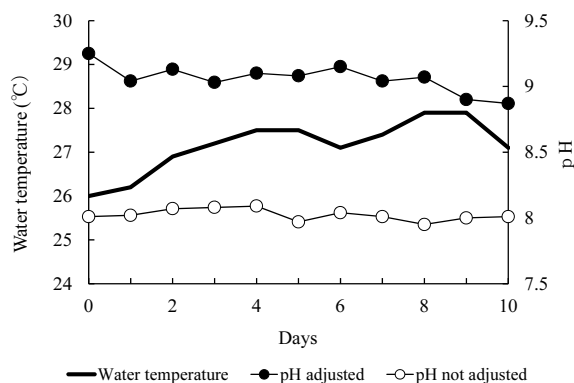


Fig. 5-1-1. Water temperature and pH of rearing water in the experimental tanks.

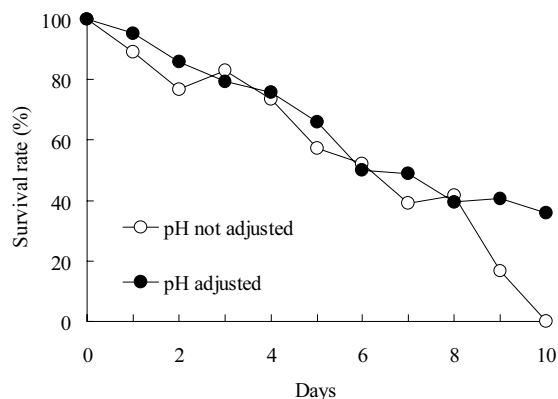


Fig. 5-1-2. Survival rates of swimming crab larvae in the pH adjusted and non-adjusted tanks. Hyphae were observed in swimming crab larvae in the pH non-adjusted tank. In the pH non-adjusted tank, hyphae in swimming crab zoea were observed from day 8.

考察

病原細菌あるいは病原ウイルスの生理学的な特性を利用し、飼育環境を調節することで魚介類の疾病の制御が可能な例を Table 5-1-2 に示した。環境調節の方法としては水温調整法が最も多く、ウイルス性疾病ではサケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (Amend, 1970), ヒラメラブドウイルス病 (大迫ら, 1988), コイのヘルペスウイルス性乳頭腫 (Sano *et al.*, 1993), ギンザケの赤血球封入体症候群 (EIBS) (田中ら, 1994) およびウイルス性血管内皮壊死症 (田中ら, 2008) がある。細菌性疾病ではウナギの赤点病 (室賀, 1978) や同じくウナギの非定型 *Aeromonas salmonicida* 感染症 (大塚ら, 1984) が、また寄生虫症ではアユのグルゲア症 (Takahashi and Ogawa, 1997) およびウナギのシュードダクチロギルス症 (田中ら, 2009) がある。これらは、いずれも飼育水温を上昇させることで疾病の抑制および防除に成功している。水温調節以外では、塩分を含まない飼育水を用いることでウナギの赤点病 (室賀, 1978) が、また、希釈海水を用いることでヨシエビ幼生の真菌症 (泉川ら, 1999) の発生が抑制され、あるいは、ウイルス性表皮増生症 (Iida *et al.*, 2008) は飼育水の酸素分圧を上げることで死亡率を低下させることが可能とされている。

本試験では、飼育水の pH を 9.25 に調整することで、*H. okinawaensis* 真菌症の発生を防除できることを実験感染および自然感染により証明した。魚介類の疾病で飼育水の pH を調整することによって疾病を防除した例はこれまでになく、世界的にも初めての試みである。本方法は、ふ化水槽だけでなく飼育水槽でも行えることから、ガザミ種苗生産現場における真菌症の防除対策として実用性が高いと考えられる。

Table 5-1-2. Prevention methods of infectious disease in cultured fish and shellfish by environmental manipulation

Prevention method	Disease	Causative agent	Host	Reference
Temperature rising of rearing water	Herpesviral papilloma of carp	Cyprinid Herpesvirus 1	Carp	Sano <i>et al.</i> , 1993
	Infectious hematopoietic necrosis	Infectious hematopoietic necrosis virus	Chinook salmon	Amend, 1970
	Hirame rhabdoviral disease	<i>Rhabdovirus olivaceus</i>	Japanese flounder	Oseko <i>et al.</i> , 1988
	Erythrocytic inclusion body syndrome	unclassified (Togaviridae ?)	Coho salmon	Tanaka <i>et al.</i> , 1994
	Red spot disease	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Japanese eel	Muroga, 1978
	Head ulcer disease	Atypical <i>Aeromonas salmonicida</i>	Japanese eel	Ohtsuka <i>et al.</i> , 1984
	Glugeosis	<i>Glugea plecoglossi</i>	Ayu	Takahashi and Ogawa, 1997
Rearing in fresh water with no influence of sea water	Pseudodactylogyrosis	<i>Pseudodactylogyrus</i> spp.	Japanese eel	Tanaka <i>et al.</i> , 2009
	Red spot disease	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Japanese eel	Muroga, 1978
Dilution of rearing seawater	Oomycosis	<i>Halocrusticida panulirata</i> <i>Haliphthoros milfordensis</i>	Greasyback shrimp	Izumikawa <i>et al.</i> , 1999
Hyperoxia	Viral epidermal hyperplasia	Flounder herpesvirus	Japanese flounder	Iida <i>et al.</i> , 2008

## 第2節 pHがガザミおよびその他の生物に及ぼす影響

前節において高 pH 調整によりガザミの *H. okinawaensis* 真菌症の感染防除が可能であることを明らかにした。しかし、この方法を実際のガザミ種苗生産に利用するには、ガザミ(卵・幼生)、餌料生物であるワムシやアルテミア、また飼育水に添加する植物プランクトンであるナンノクロロプシスに対する pH の影響を明らかにする必要がある。そこで本節では、これらに対する pH の短期的影響を、またガザミ幼生については長期間の pH 暴露の影響についても検討した。さらに、これらを総合して、事業規模での高 pH 調整の影響について検討した。

### 材料および方法

#### ガザミ幼生飼育に及ぼす pH の短期的な影響

ガザミ卵およびゾエア、餌料生物、ナンノクロロプシスの生残への高 pH の影響を以下の項目について試験した。ガザミゾエアおよび餌料生物に対する試験では、pH とアンモニア相互の影響についても検討した。なお、ガザミ卵については、抱卵ガザミを養成する場合には餌料を与えないか、与える場合でも生きアサリを与える程度であること、さらに換水

率も1時間当たり1回転以上で、アンモニア濃度が上昇するような環境にならないことから、アンモニアの影響については検討しなかった。また、ナンノクロロプシスについても、その培養には硫化アンモニウムを窒素源として添加しており、アンモニア濃度が高い状態で培養されることが通常であることから、アンモニアの影響については検討しなかった。

(1) **ガザミ卵** pH を 8~10 に調整した海水 30 mL に、産卵3日後の卵割期の卵および産卵14日後のふ化直前の卵をそれぞれ 100 粒収容した。無通気で、23℃、24 時間後に顕微鏡下で卵を観察し、卵膜や内部構造に異常が認められなかった卵を正常発生卵として正常発生率を調べた。

(2) **ガザミゾエア** pH を 8~10 の範囲で、またそれらを塩化アンモニウムでアンモニア窒素濃度を 0~8 μg/mL の範囲で組み合わせて調整した海水 500 mL を作製した。各試験海水にガザミゾエア I 期幼生を 20 個体ずつ収容し、無通気、無給餌で 23℃、24 時間後の生残率を調べた。

(3) **ナンノクロロプシス** 培養したナンノクロロプシスを  $1 \times 10^6$  細胞/mL になるように海水で希釈し、この液を 300 mL ずつ分配し、pH を 8~10 に調整した。温度 25℃、照度 1500 lx、明暗周期 12hL:12hD の条



件で通気しながら培養し、経時的に分光光度計（波長 560 nm）で吸光度を測定した。

(4) 餌料生物 上記と同様に pH を 8~10 に、アンモニア窒素度を 0~8 µg/mL に組み合わせて調整した海水 5 mL に、ワムシおよびふ化後 24 時間以内のアルテミア幼生を 19~24 個体収容し、無通気、無給餌で 23°C、24 時間後の生残率を調べた。なお、ワムシの場合は携卵個体が存在し、24 時間後には当初の個体数より増加することあるため、生残率は 24 時間後の全個体数に対する生残個体の割合として示した。海水には抗生物質を添加した。

#### ガザミ幼生飼育に及ぼす pH の長期的な影響

pH を調整しない自然海水あるいは pH9~10 に調整した海水 100 L にガザミふ化幼生を 3,500 個体収容し、事業生産に準じ、ナンノクロロプシス、ワムシ、アルテミア幼生および配合飼料を与えて 23°C で飼育を行い、経時的に生残数を容量法により計数した。なお、飼育期間はゾエア IV 期変態までとし、飼育水の pH は、毎朝、50%工業用水酸化ナトリウム溶液を水道水で 0.1~1%程度に希釈した液で調整した。

#### 事業生産規模での試験

ガザミ種苗生産事業規模での試験では 100 m<sup>3</sup>の屋内円形水槽を用い、幼生の飼育水にはナンノクロロプシスを 5~10×10<sup>5</sup> 細胞/mL となるように添加し、飼育水は 23°C に調整した。飼育水の高 pH 調整は、上述の希釈水酸化ナトリウム溶液を、飼育水槽の横に配置した 0.5 m<sup>3</sup> FRP 水槽から直径 6 mm のビニールチューブを用い、サイフォン方式で幼生飼育水槽に滴下することにより行った。毎朝、水酸化ナトリウム溶液を作製し、バッチ換水が主体の時（およそゾエア III 期まで）はその日の夕方に、終日流水飼育の時（ゾエア IV 期以降）には翌朝までに、全ての溶

液が滴下し終わるように滴下時間を調整した。高 pH 調整期間はゾエア IV 期もしくはメガロバ期までとした。ふ化幼生の収容密度は原則として 30,000 個体/m<sup>3</sup> とし、餌料としてワムシ、アルテミア幼生および配合飼料を与え、その後アサリミンチを適宜与えて第 1 齢稚ガニまで飼育した。

## 結果

#### ガザミ卵およびゾエアに及ぼす pH の短期的な影響

ガザミ卵に対する pH の影響を検討したが、産卵 3 日後の卵割期の卵には pH はほとんど影響せず、pH の上昇とともに卵の正常発生率が若干減少する程度であった。産卵 14 日後のふ化直前の卵では、付着肢からの剥離作業の影響と思われる正常発生率の全体的な低下が認められた。pH の上昇に伴う正常発生率の低下は pH9.5 までほとんど認められなかったが、それ以上では低下した (Fig. 5-2-1)。

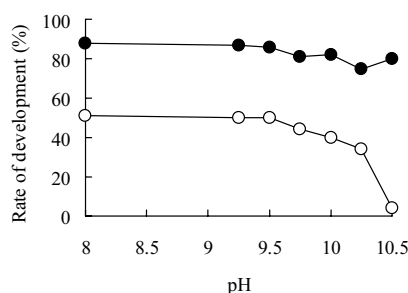
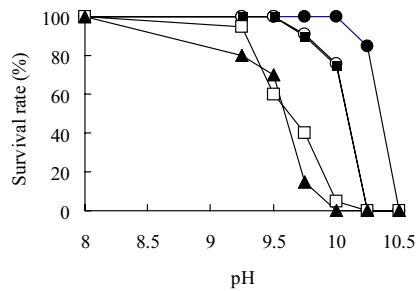


Fig. 5-2-1. Effect of pH on the development of swimming crab eggs. Closed circles indicate eggs at morula stage (3 days after spawning at 23°C). Open circles indicate eggs with purple point formation (14 days after spawning at 23°C).

ガザミのゾエア幼生に対する pH の影響を検討したところ (Fig. 5-2-2), アンモニア窒素濃度 8 µg/mL では pH9.25 での死亡率が 20%であった。また 4 µg/mL の場合も、pH9.25 では若干の死亡が認められた。しかし、アンモニア窒素 2 µg/mL 以下では pH9.50 まで幼生の死亡は認められなかった。

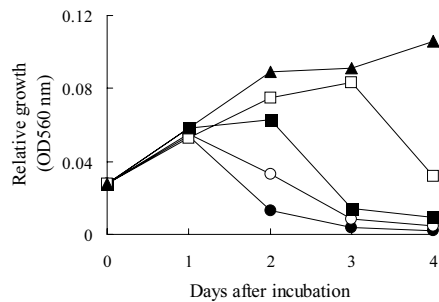


**Fig. 5-2-2.** Effect of pH on the toxicity of ammonia to swimming crab zoea-I at 23°C.

Survival rates were determined after 24 h incubation. Symbols indicate 0 (●), 1 (○), 2 (■), 4 (□) and 8 (▲) μg/mL ammonia-N concentrations.

### ナンノクロロプシスに対する pH の影響

ナンノクロロプシスに対する pH の影響を試験した結果 (Fig. 5-2-3), 培養 1 日目には, いずれの pH においても細胞数の増加が認められたが, 培養 2 日目には pH8 と pH9.25 で, 培養 3 日目には pH9.50 で, さらに培養 4 日目には pH9.75 で細胞数の減少が認められた。しかし, pH10 の場合, 細胞数は培養 4 日目においても増加する傾向を示した。



**Fig. 5-2-3.** Effect of pH on the growth of *Nannochloropsis oculata* at 25°C.

Incubation was performed under illumination of 1,500 lx with 12hL:12hD photo-cycle. Symbols indicate pHs 8 (●), 9.25 (○), 9.5 (■), 9.75 (□) and 10 (▲).

### 餌料生物に対する pH の影響

餌料生物であるワムシとアルテミアに対する高 pH とアンモニア濃度の影響を検討した結果, いずれにおいても生残率は 91.0% 以上であり, 高 pH, 高アンモニアによる生残率への影響はみられなかった。

また, ワムシとアルテミアの活力にも変化は認められなかった (Table 5-2-1)。

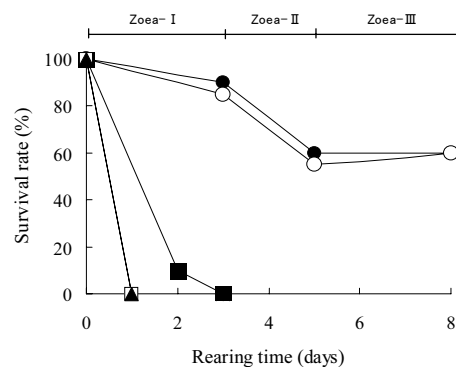
**Table 5-2-1.** Effects of pH on the survival rate of rotifer and brine shrimp at 23°C

pH	Survival rate(%)									
	Ammonia-N concentration (μg/mL)									
	0		1		2		4		8	
	Rotifer	Brine shrimp	Rotifer	Brine shrimp	Rotifer	Brine shrimp	Rotifer	Brine shrimp	Rotifer	Brine shrimp
8.00	100.0	97.5	100.0	97.5	98.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
9.00	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.0	98.0	100.0	100.0
9.25	91.0	91.0	100.0	100.0	92.0	92.0	100.0	100.0	97.0	100.0
9.50	98.0	98.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.0	100.0
9.75	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.5	100.0	95.0	90.0	97.5
10.00	100.0	97.5	100.0	97.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Survival rates were determined after 24 h incubation.

### ガザミ幼生飼育に及ぼす pH の長期的な影響

水温 23°C において異なる pH 下でガザミのゾエア幼生を継続飼育し, 脱皮や変態への影響などについて検討したところ, 飼育水の pH を 9.75 および 10 に調整した区では, 飼育開始後 1 日目に, pH9.50 に調整した区では飼育開始後 2 日目に大量死亡が認められた (Fig. 5-2-4)。一方, pH9.25 に調整した区における生残率は, 自然海水を用いた通常飼育と同じように推移し, 幼生の活力や成長, および脱皮や変態についても通常飼育と変わらなかった。



**Fig. 5-2-4.** Survival rates of swimming crab larvae exposed to various pHs at 23°C. Larvae (zoea-I) were fed rotifer and brine shrimp in rearing water supplied with *Nannochloropsis oculata*. Symbols indicate untreated sea water (●), pH9.25 (○), pH9.5 (■), pH9.75 (□) and pH10 (▲).

事業生産規模での試験

1994 年度のひょう豊協のガザミ事業生産結果を Table 5-2-2 に示した。飼育 1～5 回次は、高 pH 調整を行わない従来の方法で種苗生産を行った。その際、真菌症防除対策としてふ化水槽でのホルマリン浴を行っていたが、全ての飼育回次でゾエアⅡ期で真菌症が発生した。そこで、真菌症発生水槽の飼育水の pH を 9.25 に調整したところ、ゾエアⅣ期には、真菌による死亡は認められなくなった。なお、1～4 回

次では高 pH 調整をメガロパ期まで行ったが、メガロパ変態後 2 日目で降稚ガニ変態期まで死亡が多く認められた。5 回次以降は高 pH 調整をゾエアⅣ期までとしたところ、メガロパ期の死亡はみられなくなった。6 回次からはふ化水槽からゾエアⅣ期までの間、高 pH 調整を継続して行った結果、真菌症の発生は認められず、稚ガニⅠ期までの生残率が 15～50%となった。

Table 5-2-2. Effect of pH adjustment in production of swimming crab larvae

Production trial	Appearance of zoeae with hypha	Period of pH adjustment	pH value before pH adjustment			pH value for pH adjusted period			Number of surviving juvenile crab- I (x 10 <sup>4</sup> )	Survival rate* <sup>1</sup> (%)
			min.	max.	mean	min.	max.	mean		
1	Z3	Z3～M	8.05	8.30	8.16	9.20	9.40	9.31	25.1	7.5
2	Z2	Z2～M	8.04	8.21	8.13	9.00	9.35	9.27	20.8	6.8
3	Z2	Z3～M	8.09	8.22	8.14	9.23	9.34	9.30	13.6	3.3
4	Z2	Z2～M	8.07	8.23	8.15	8.96	9.42	9.24	20.3	5.8
5	Z2	Z2～Z4	8.13	8.26	8.18	9.02	9.39	9.24	38.7	11.9
6	—	Hatching～Z4				9.08	9.33	9.20	57.8	15.2
7	—	Hatching～Z4				9.01	9.34	9.22	64.6	31.2
8	—	Hatching～Z4				9.24	9.35	9.28	105.5	50.0
9	—	Hatching～Z4				9.12	9.32	9.22	96.1	39.2
Total									442.5	17.1

\*1 Survival rate=(Number of surviving juvenile crab-I / Number of zoea-I)×100(%)

Water temperature : 19.4～26.1℃ Z: Zoea, M: Megalopa

考 察

屋外水槽における飼育水の pH は、珪藻、ナンノクロロプシスなどの植物プランクトンの光合成により通常 pH7.9～8.8 の範囲で推移しているが、日射量の多い時などは pH9.0 を超えることもある(和田・丹下, 1983)。植物プランクトンの光合成による酸素の発生で、溶存酸素量が 121～145%に達すると、ガザミゾエア幼生にガス病が発生することがある(今ら, 1968)。このように、飼育水の溶存酸素量と pH 値にはある程度相関性があるため(佐野, 1959)、ガス病防止策として飼育水の pH を 8.5 以下に保つ方法が

提案され(宇都宮, 1969)、種苗生産現場ではこれまで飼育水の pH を 8.2～8.6 に調整することが推奨されてきた(和田・丹下, 1983)。本研究では、これとは逆に、飼育水の pH を 9.25 に上昇させることにより真菌症を防除することに成功した。この方法では pH の調整は水酸化ナトリウムで行われるため、光合成による pH の上昇とは異なり、酸素の発生がないことから pH 上昇によるガス病の発生は起こらない。

一方、pH の上昇は、飼育水中に含まれるアンモニアの毒性を増加させる(田端, 1962)。ゾエアに対するアンモニアの急性毒性について pH8.2～9.0 の範

囲で検討されており、ゾエアI期幼生では、24時間半数致死濃度がアンモニア窒素として、pH9.0で5.9~6.2 µg/mLであり、ゾエアIV期幼生では12 µg/mLとなっている(柄多・丹下, 1978)。ひょう豊協における1994年度の種苗生産期間中の飼育水のアンモニア窒素濃度は、ゾエア期間で最高0.68 µg/mL、メガロバ期で最高1.82 µg/mLとやや高い値であったが、通常は0.5 µg/mL以下で推移することが知られている(和田・丹下, 1983)。本研究において、pHとアンモニアのガザミゾエアI期幼生に対する急性毒性を検討したが、アンモニア態窒素濃度2 µg/mLでは、pH9.25による急性毒性は現れないと判断された。しかし、ゾエア期間のアンモニア窒素が最高3.5 µg/mLに達する例もみられることから(野村ら, 1993)、飼育水のpHを9.25に調整する場合には、アンモニア窒素の濃度は2 µg/mL程度以下に保つ必要があると判断された。

ガザミ幼生飼育に及ぼす水温23°CにおけるpHの長期的な影響を調べたところ、pH9.25に調整した区とpHを調整しない通常の飼育水との生残率に差異は認められず、脱皮や変態への影響などがなかったことが明らかになった。一方で、脱皮以外の時期の場合、ゾエア幼生はpH6~9に調整した海水に24時間収容されても生残率に影響は認められないが、脱皮時期はpH7~8以外では急性毒性が現れ、生残率が低下することが確認されている(馬渡・平山, 1975)。これは、脱皮時期に飼育水のpHを急変させると急性毒性が現れることを示している。従って、ガザミゾエアにpH9.25処理を行う際は、pHを急変させないように行う必要がある。特に脱皮期間は注意する必要がある。

また、pH9.25処理は餌料生物であるワムシ、アルテミアや水質安定のために添加されるナンノクロロプシスに対しても悪影響を及ぼさないことから、実際の種苗生産において十分利用できることが明らかになった。さらに、ふ化直前の卵に対してもpH9.25

処理は影響を及ぼさないことから、ふ化水槽においてもpH9.25処理を行うことが可能である。これらの試験成績をもとに、ひょう豊協は、事業生産規模でふ化からゾエア期までの期間、連続してpH9.25処理を行った。その結果、真菌症の発生は認められず、第1齢稚ガニまでの歩留まりが15~50%となり、事業生産規模での有効性が確かめられた。

なお、本菌に対する感受性がガザミ幼生の発達段階が進むにしたがって低下するため真菌症の発症はゾエア期に限られていること、またメガロバ期までpH9.25処理を行うと幼生の活力低下が認められたことから、pH処理を行う期間はゾエア期に限って良いと判断された。

### 第3節 ガザミの生残に及ぼすpHと水温の相互作用

前節(第2節)において、飼育水中のアンモニア態窒素の濃度が2 µg/mL以下では、pH9.25でもガザミ幼生に対する短期的な影響は認められず、事業生産規模での長期飼育においてもガザミゾエアに影響がないことを確認した。しかしその際の実験水温はひょう豊協で通常行われている23°Cに設定したため、それ以外の水温でのpH9.25飼育の影響は不明である。

ガザミの種苗生産は全国的に行われており、一般に飼育時期は4月中旬から9月下旬にかけてであるが、その時期や期間については各機関さまさまである(水呉, 1997)。ガザミ種苗生産の適正飼育水温の上限は27°Cと報告されており(浜崎, 1996)、早期に種苗生産を行う場合は、24~26°Cの範囲を目標に加温している機関が多い(村上・清田, 1997)。しかし、7月下旬以降には、気温の影響により29°C前後で生産が行われている例もあることから、pH9.25で飼育される際のガザミ幼生に対する水温の影響を調べる必要がある。

そこで本節では、ガザミ幼生の生残に対する

pH9.25 調整飼育水の短期的および長期的影響を異なる水温で検討した。

材料および方法

ガザミゾエアに対する pH と水温の短期的影響

水酸化ナトリウムを用いて pH を 8 もしくは 9.25 に調整し、さらに塩化アンモニウムを添加してアンモニア態窒素濃度 0~8 μg/mL となるよう調整した海水 300 mL ずつを作製した。それらの各海水にガザミゾエア I 期幼生を 50 個体ずつ収容し、無通気、無給餌で 20℃、25℃および 30℃の各水温における 24 時間後の生残率を調べた。実験は 2 回行った。なお、本研究では砂濾過海水を用い、実験期間中の平均塩分濃度は 30.4±0.13 であった。

ガザミゾエアに対する pH と水温の長期的影響

pH を調整しない濾過海水 (pH8.07±0.01) および pH を約 9.2 に調整した海水 100 L にガザミふ化幼生を 3,500 個体収容し、事業生産に準じ (億, 1997), ナンクロロプシス, ワムシ, アルテミア幼生および配合飼料を与えて、異なる 3 段階の水温での飼育を 2 回行った (第 1 目平均水温 19.9±0.1℃, 25.3±0.1℃および 29.5±0.1℃, 第 2 回目平均水温 20.8±0.1℃, 27.3±0.1℃および 30.0±0.1℃)。飼育期間はゾエアIV期幼生への変態が完了するまでとし (7~14 日間), 生残数を容量法により調べた。なお、飼育水の pH は毎朝 50%工業用水酸化ナトリウム溶液を水道水で 0.1~1%程度に希釈した液で調整した。

結果

ガザミゾエアに対する pH の短期的影響

2 回行った実験の平均生残率を Fig. 5-3-1 に示した。なお、アンモニアは海水中ではアンモニウムイオンと非解離アンモニアの形で存在し、その毒性は

非解離アンモニアの方が強いとされている (田端, 1962)。そして、その割合は pH, 温度および塩分により異なるとから、Bower and Bidwell (1978) の方法により算出した非解離アンモニア態窒素濃度 (μg/mL) についても図中に示した。

pH8 に調整した試験区のうち 20℃および 25℃区は、アンモニア態窒素の増加に伴い生残率はわずかに低下したが、生残率はいずれも 89%以上であった。30℃区においてはアンモニア態窒素を添加しない区でも 16%の死亡が認められたが、アンモニア態窒素の増加に伴う生残数の明瞭な低下は認められず 80%前後で推移した。

pH9.25 に調整した試験区では、アンモニア態窒素濃度が高くなるに伴って生残率は低下し、特に 30℃の場合の生残率の低下は顕著であった。すなわち、20℃, 25℃区では pH8 区に比べ pH9.25 区は 20%前後の生残率の低下に留まったが、30℃区では 60%以上の低下を招いた。

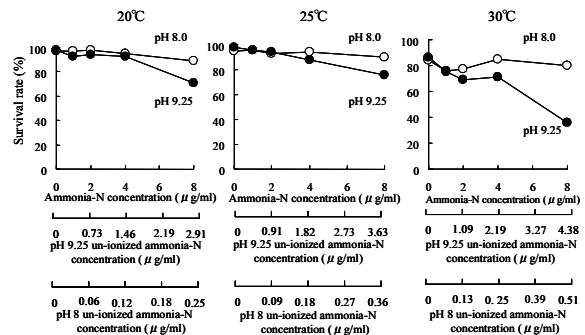
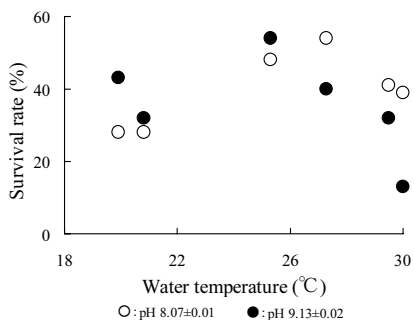


Fig. 5-3-1. Effect of pH and water temperature on the toxicity (survival rate in 24h) of ammonia to swimmig crab zoea- I .

ガザミゾエアに対する pH の長期的影響

2 回行った実験のゾエアIV期時点における生残率を Fig. 5-3-2 に示した。いずれの pH でも 20℃付近と 30℃付近で生残率が低く、pH8 区では 27℃, pH9.2 区では 25℃で生残率が高くなった。また、20℃未満では pH9.2 区が生残率は pH8 区のそれよりわずかに高かったが、27℃以上においては逆に pH9.2 区が生残率は pH8 区より低くなった。27℃以上の pH9.2

区の生残率の低下はゾエアⅡ期に現れ始め、発達ステージが進むにつれ、低下の度合いは大きくなった。なお、今回の試験でゾエアⅣ期に達するまでに要した日数は20℃設定区で12および14日、その他の区は7~8日であり、20℃区の変態成長は遅れたがその他の温度ではそのような異常は認められなかった。



**Fig. 5-3-2.** Effect of water temperature on the survival rate of swimming crab larvae reared at pH 8 and pH 9.2 during zoea I to zoea IV (7-14 days). Zoeae were fed rotifer, brine shrimp and artificial food, and *Nannochloropsis oculata* was introduced into the rearing water.

### 考 察

アンモニア態窒素濃度とガザミ幼生の生残率の関係を pH (9.25 と 8) と温度 (20℃, 25℃ および 30℃) 条件を変えて調べたところ (Fig. 5-3-1), pH でみれば pH 9.25 の場合が pH 8 より、水温でみれば 30℃ の場合が 20℃ あるいは 25℃ の場合より、短期的にはアンモニアの毒性が強くなることが確かめられた。ただし、30℃ 区についてアンモニア態窒素を添加しない区でも死亡が認められたことから、水温自体の影響も現れたと考えられた。

ひょう豊協で飼育水のアンモニア態窒素を測定した結果によると、ゾエアⅡ期で 0.27 μg/mL, ゾエアⅢ期で 0.66 μg/mL, ゾエアⅣ期で 0.68 μg/mL という結果が得られている (ゾエアⅣ期変態完了まで pH 9.2 に調整, 水温 23℃)。また、他の機関でも通常は 0.5 μg/mL 以下で推移することが知られている (和田・丹下, 1983)。本試験ではアンモニア態窒素 1

μg/mL 以下ではいずれの水温でも pH 9.25 と pH 8 の生残率に顕著な違いは認められなかった。このことから、通常の種苗生産におけるアンモニア態窒素濃度では pH 9.25 のガザミゾエアの生残に対する短期的な悪影響はないと考えられた。

一方、pH 9.25 のガザミゾエアの生残に対する長期的な悪影響は、水温 27℃ 以上において認められた (Fig. 5-3-2)。短期的な影響が無いにも関わらず水温 27℃ 以上で悪影響が現れた原因としては、まずアンモニア態窒素の影響が考えられる。pH 9.25 の 27℃ 以上ではゾエアⅡ期においてすでに生残率の低下が認められたが、ゾエアⅡ期の pH 9.25 の飼育水のアンモニア態窒素濃度は前述のように 0.27 μg/mL 程度である。このような低濃度のアンモニア態窒素でも長期間暴露されることによりアンモニアの毒性が現れたと考えられたが、さらに別の要因も関与していると考えられた。すなわち、中村ら (1996, 1997) はヤマトシジミの塩分耐性および硫化水素耐性は、水温の上昇により低下することを報告している。これと同じようにガザミゾエアの長期的な pH 耐性も、水温の上昇に伴って低下したのではないかと推測された。これらのことから、pH 9.25 の 27℃ 以上における生残率の低下はアンモニアの毒性と水温上昇によるガザミゾエアの pH 耐性の低下が複合的に作用したことによるものと考えられた。

なお、20℃ 付近ではいずれの pH でも生残率が低くなった。山口県内海水産試験場は、水温が低く、ガザミ幼生の変態成長が遅れると、生残率は低下する傾向があることを報告している (山口県内海水産試験場, 1973)。今回の試験でも 20℃ 区で変態成長が遅れており、山口県内海水産試験場の報告と同様、それが生残率の低下につながったと考えられる。また、水温の関係から脱皮間隔が長くなると体表の付着生物量が増加し、生残率が低くなることが報告されている (浜崎, 1997c)。

以上のことから、真菌症の防除対策として飼育水

の pH を 9.25 前後に調整するに当たっては、飼育水温が 27°C 未満であることが条件と考えられた。種苗生産期間の後半においては 27°C 以上でガザミの種苗生産を行っている機関があるため、それらの機関では高水温時の真菌症対策を早急に講じる必要がある。

#### 第 4 節 pH 調整が飼育水の細菌叢に及ぼす影響

pH を調整しない通常のガザミ種苗生産時の飼育水では、細菌叢として *Vibrio* 属細菌および *Pseudomonas* 属細菌が優占している (Suzuki *et al.*, 1990)。細菌には増殖至適 pH があるため、飼育水の pH が異なれば、細菌叢も異なる可能性がある。*Vibrio* 属細菌は pH10 という高 pH 環境下でも生存・増殖できる (楠田ら, 1979)。したがって、飼育水の pH を 9.25 に調整すると、*Vibrio* 属細菌がさらに優先する可能性がある。

*Vibrio* 属細菌にはガザミ幼生に対して病原性を示すものもある (室賀ら, 1989)。また、ガザミゾエア初期幼生は、飼育水中の細菌を積極的に摂食する (Nogami and Maeda, 1992; 前田 1994)、*Vibrio* 属細菌が優先するとその餌料価値は下がると考えられている (Yasuda and Taga, 1980)。また、Nogami and Maeda (1992) はバイオコントロール法により *Vibrio* 属細菌数を減少させ、生残率の向上に成功している。このように、飼育水中の *Vibrio* 属細菌を減少させることでガザミ種苗生産が安定することが多いが、飼育水の pH を 9.25 に調整すると *Vibrio* 属細菌が優先することが懸念されることから、本節では通常飼育と高 pH 飼育における飼育水の一般細菌数と *Vibrio* 菌数を比較した。

#### 材料および方法

##### 高 pH 調整とガザミの飼育

種苗生産は 100 m<sup>3</sup> の屋内円形コンクリート水槽を用いて行われ、ナンクロロプシスを 50~100 万細胞

/mL になるように添加した飼育水 60m<sup>3</sup> にふ化ゾエア 300 万尾を收容し、餌料としてワムシ、アルテミア幼生、配合飼料 (協和発酵社製初期餌料 B250, C400, C700, C100 および理研ビタミン社製甲殻類用微粒子餌料カラゲナン 1~4 号)、アサリ、アミのミンチをガザミの発育に応じて与えた。收容時からゾエア II 期後半までは、10~35m<sup>3</sup> のバッチ換水をしなが水量を増加させる止水飼育、その後はおよそ 35 m<sup>3</sup> のバッチ換水と併用して 50~200% を換水する流水飼育を行った。また、加温処理により平均水温は 23.7~25.6°C の範囲にあった。pH 調整には pH メーターと定量ポンプを連動させた自動 pH 調整装置を用い (Fig. 5-4-1)、0.1~1% の水酸化ナトリウムで pH9.25 を目安に收容時のゾエア I 期からゾエア III 期まで pH を調整した。

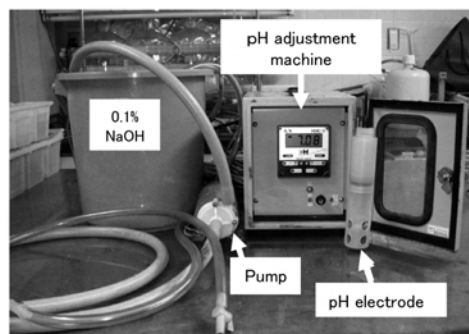


Fig. 5-4-1. Device of auto-pH adjustment used for the seed production of swimming crab.

##### 飼育水の細菌数検査

飼育水の細菌数の調査は、高 pH 調整をしなかった回数を 1 回、高 pH 調整をした回数を 2 回実施した。飼育水のサンプリングは、ふ化ゾエア收容から第 1 齢稚ガニまでのおよそ 20 日の間、原則として 1 日おきに行った。飼育水をプランクトンネット (目合 58 μm) でろ過し、これを原液として滅菌海水を用いた 10 倍希釈系列を作製した。その 0.1 mL を ZoBell's 2216e 培地および BTB ティポール寒天培地 (日水) に接種し、25°C で 2 日間培養後にコロニー数を計数した。前者を飼育水中の総菌数 (ZoBell 菌数)、後者を *Vibrio* 属菌数 (BTB 菌数) の指標とした。なお、BTB ティポー

ル寒天培地(日水)は現在、製造販売されていない。

### 統計処理

pHの異なるゾエアI~IV期までの菌数をマンホイットニーのU検定で有意差を検定した。

### 結果

飼育水のpH, ZoBell菌数およびBTB菌数の推移をFig. 5-4-2に示した。高pH調整をしない時は、ゾエアI~C1期までpH8前後で大きな変化は認められなかった。高pH調整を行った場合は、ゾエアIII期までpH9前後で推移し、高pH調整を停止したゾエアIV期でも高pH調整をしない場合よりやや高い値を示し、メガロパ期で高pH調整をしない場合とほぼ同じ値となった。

高pH調整をしない時のZoBell菌数は、ゾエアI, II期で $5.2\sim 6.0\times 10^3$  CFU/mLで、大きな変化はなかったが、ゾエアIII, IV期では $6.8\sim 8.1\times 10^4$ に増加した。その後は直線的に増加し、C1期で $3.4\times 10^6$  CFU/mLに達した。pHをゾエアIII期まで調整した時のZoBell菌数は、ゾエアI期で $2.5\times 10^5$  CFU/mLで、pH調整しなかった時のおよそ100倍の値を示し、その後ゾエアIV期までは横ばいで推移し、高pH調整をしない場合とほぼ同じpH値となったメガロパ期に増加して $2.2\times 10^6$  CFU/mLとなった。ゾエアIV期までのZoBell菌数にはpH調整と未調整間に有意差が認められた( $P<0.01$ )。

高pH調整をしない場合のBTB菌数は、ゾエアI期の $4.1\times 10^3$  CFU/mLからゾエアIV期まで直線的に増加し、ゾエアIV期には $4.2\times 10^4$  CFU/mLに達した。その後は、メガロパ期で一度減少するが、C1期で再び増加した。pHをゾエアIII期まで調整した場合のBTB菌数は、pH未調整の場合のそれよりゾエアIV期まで有意に低く推移したが( $P<0.05$ )、メガロパ期とC1期では、pH未調整とほぼ同じ値となった。

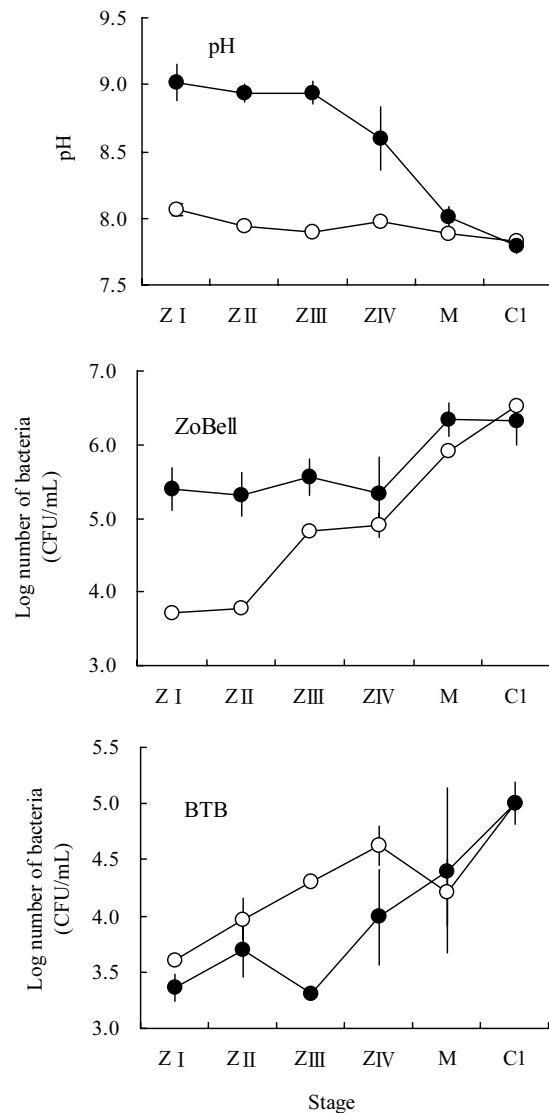


Fig. 5-4-2. The number of total bacteria with ZoBell agar and vibrios with BTB agar between pH-adjusted and non-adjusted rearing waters during zoeal developments (Z I to ZIV stages) of swimming crab. Closed circles (●) and open circles (○) indicate pH-adjusted and non-adjusted rearing water, respectively.

### 考察

通常のガザミ種苗生産におけるガザミ幼生、餌料、飼育水の細菌叢については Suzuki *et al.* (1990)が詳しく検討している。それによると、ガザミ幼生、飼育水および生物餌料のいずれにおいても *Vibrio* 属と *Pseudomonas* 属細菌が細菌叢の主体をなし、ミンチ肉や配合飼料では *Vibrio* 属細菌は少なく、総菌数も生物



餌料より低い。魚類の種苗生産における飼育水の細菌叢についてはマダイ、クロダイ (Muroga *et al.*, 1987), ヒラメ (Tanasomwang and Muroga, 1988), トラフグ、クロソイ、キジハタ (Tanasomwang and Muroga, 1989) など調べられており、クロダイを除きそれらの飼育水の細菌叢もまた *Vibrio* 属細菌と *Pseudomonas* 属細菌が優占している。

本試験では、飼育水の pH を 9.25 程度に調整すると、予想に反して pH 調整しない時より *Vibrio* 属細菌の数は少なくなった。この理由として、pH10 でも増殖可能な *Vibrio* 属細菌は多いが、それらの至適 pH は 9.25 よりも低いとみられる。すなわち、代表的な *Vibrio* 属細菌の至適 pH をみると、*V. anguillarum* は pH7 (Larsen, 1984), NAG *Vibrio* においては pH8 (山野井, 1980), 腸炎ビブリオの原因菌である *V. parahaemolyticus* は pH7 (Beuchat, 1973), コレラの原因菌である *V. cholerae* は pH8.5 (Huq *et al.*, 1984) で、いずれも pH9.25 よりも低い。通常の飼育海水の pH は 8 前後であることから、通常の飼育法の方が *Vibrio* 属細菌の増殖には適していると考えられる。これらのことから、飼育水中の *Vibrio* 属細菌は pH9.25 では増殖が抑制されるため、飼育水の *Vibrio* 属細菌数が通常法よりも減少したと考えられた。種苗生産期のガザミゾエアに大量死を引き起こす細菌性疾患としてビブリオ病が知られており、原因菌は未記載種であるが表現形では *Vibrio harveyi* との識別が困難であることから、*Vibrio* sp. Zoea とされている (室賀ら, 1989; Ishimaru and Muroga, 1997)。本菌は増殖至適 pH が 7 で、pH が 9 になると pH6~8 に比べて明らかに増殖が鈍化する (室賀ら, 1989; Muroga *et al.*, 1994)。このことから、高 pH 調整法は、ガザミ真菌症を防除するだけでなく、*Vibrio* sp. Zoea の増殖を抑制し、ビブリオ病の発生の軽減にもつながると推測された。

高 pH 調整法を実施して以来、ひょう豊協においては真菌症がほとんど発生していない。真菌症が発生しておらず、高 pH 調整を実施していなかった 2 カ年

(1990~1991 年) の生産成績と高 pH 調整法を確立した後の 2 カ年 (1995~1996 年) の生産成績を Fig. 5-4-3 に示した。全体としてみた場合、両者に有意差は認められないが、高 pH 調整法導入後は、極端に低い歩留まりになる回数が少ないことが分かる。これには高 pH が真菌の増殖を抑制していることに加えて、いくつかの要因が関わっていると考えられる。ひとつは、飼育水中の *Vibrio* 属細菌の減少である。ゾエア初期幼生は飼育水中の細菌を積極的に摂食するが (Nogami and Maeda, 1992; Maeda *et al.*, 1992; 前田, 1994), *Vibrio* 属細菌の栄養価は低いと考えられている (Yasuda and Taga, 1980)。また、ある種の菌をガザミ種苗生産の飼育水に直接添加するバイオコントロール法により *Vibrio* 属細菌数を減少させ、生残率の向上に成功している例もある (Nogami and Maeda, 1992)。高 pH 調整法もこれらと同様に *Vibrio* 属細菌を減少させることから、比較的安定した種苗生産成績を残すことができると考えられた。

次は、飼育水に添加されるナンノクロロプシスの安定維持である。pH を高めることによってナンノクロロプシスが良好に維持され (安信ら, 1997), 水中照度調節や窒素、リンの吸収がうまく行われ (村上, 1997), 飼育水の水質環境が改善されると考えられる。

最後にガザミ幼生の餌料であるワムシの栄養強化である。飼育水のナンノクロロプシスの安定維持はワムシへの n-3 系列高度不飽和脂肪酸 (以下 n-3HUFA) の供給も安定させる (吉松ら, 1995)。n-3HUFA が多いワムシの供給はアミメノギリガザミで生残率が向上することが確かめられており (Hamasaki, 2002), ガザミにおいても同様の傾向があるといわれている (深山, 1997b)。高 pH 調整は飼育水に添加されるナンノクロロプシスを安定的に維持するので、n-3HUFA が多いワムシを供給することにつながり、生残率の向上を図っていると考えられた。また、ワムシは細菌液に収容すると速やかにその細菌を取り込むことが明らかになっている (Muroga and Yasunobu, 1987)。す

なわち、飼育池に給餌された後にも、ワムシは海水中の細菌を取り込んでいると考えられる。ワムシのろ過速度は pH9 においても影響を受けないことから (Hirayama and Ogawa, 1972), pH を高くすることでワムシにとって栄養価が低い *Vibrio* 属細菌 (安田・多賀, 1980) が少なくなり、好アルカリ性の他の細菌が通常方法より増加するので、ワムシの栄養状態が良好になり、その結果としてワムシを摂餌するガザミゾエアの栄養状態も良くなると考えられる。以上のことが関係し合い、高 pH 調整はガザミ幼生にとって良好な環境を作り出していると思われる。

本研究では、総菌数および *Vibrio* 属細菌の種組成については検討していない。ある種の細菌 (PM-4 株) を飼育水に添加することにより、ガザミ幼生の生残率が向上することも認められていることから (Nogami and Maeda, 1992), pH を 9.25 に調整したときに優占してくる細菌について、それらのガザミ幼生への影響を調べることにより、高 pH 調整による安定生産の他の理由を明らかにすることができるかもしれない。今後の課題である。

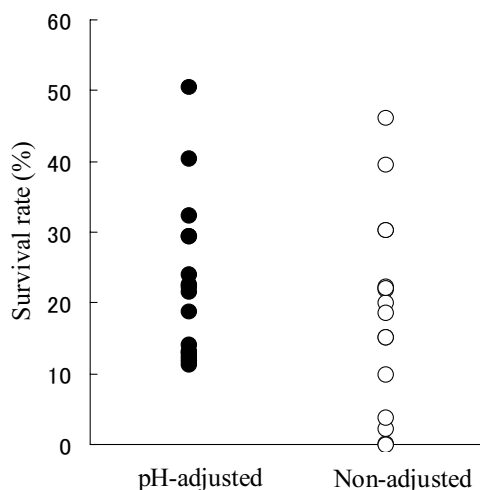


Fig. 5-4-3. Survival rates of seed production of swimming crab to C1 stage in pH-adjusted and non-adjusted rearing waters. Closed circles (●) and open circles (○) indicate pH-adjusted and non-adjusted rearing water, respectively.

## 第5節 *H. okinawaensis* の生物活性に対するpHの影響

*H. okinawaensis* の遊走子を pH9.25 の培地に添加すると菌糸の形成が認められないことが明らかになり (第III章), 飼育水の pH9.25 調整によりガザミ幼生に対する *H. okinawaensis* の感染が防除可能であることが明らかになった (第V章第1節)。*H. okinawaensis* の生活環は遊走子が放出され、休眠し、休眠胞子から2回目の遊走子が遊出し、その遊走子がガザミ幼生に付着して再び休眠し、休眠胞子が発芽して菌糸をガザミ体内に形成する (Nakamura and Hatai, 1995a : Fig. 3-7)。本節ではこの生活環に pH がどのように作用しているかを検討した。

### 第1項 遊走子および休眠胞子に対する影響

感染ステージである遊走子に pH9.25 がどのような影響を与えるのかについて検討した。ガザミ幼生に対する *H. okinawaensis* 感染に影響を与える要因としては、(1) 遊走子の遊出数 (浜崎・畑井, 1993a; 安信ら, 1997; Roza and Hatai, 1999a), (2) 遊走子の海水中での生残性, (3) 遊走子の運動性 (加治ら, 1991), さらに(4) 遊走子のガザミ甲殻への付着性などが考えられる。本項では、これらの感染要因に対する pH9.25 調整の影響について検討した。なお、遊走子は時間がたつと休眠胞子となるので、試験期間が長い試験については、最初に遊走子を添加したとしても休眠胞子に対する影響を調べたことになる。

### 材料および方法

#### 供試菌

1994年に分離された *H. okinawaensis* ZH94株をPYGS寒天培地で20℃で継代培養して保存したものをを用いた。

### 遊走子の遊出数への影響

PYGS 寒天培地で 10 日間培養 (25°C) した菌の集落をメスで直径 3 mm 程度切り取り、7 mL の滅菌海水に接種して 25°C に静置した。接種翌日に産出された遊走子を  $1.0 \times 10^2$  個/mL となるように 30 mL の PYGS 液体培地 (pH 無調整, pH7.50) を含む 50 mL 容バイアルチューブ 5 本に接種した。25°C で 5 日間静置培養した後、培養液を取り除き、菌体をそれぞれ 5 段階の pH (8.00, 9.00, 9.25, 9.50 および 10.00) に調整した滅菌海水 10 mL で 2 回洗浄した後、各 pH の滅菌海水 10 mL を添加した。25°C で 24 および 48 時間静置後、各 pH の海水中に遊出した遊走子を PYGS 寒天培地 (pH8.00) に 0.1 mL 接種し、25°C で 10 日間培養後、増殖した集落数から海水中に遊出した遊走子数を算出した。試験は 3 回行った。

### 遊走子の運動性への影響

上述のように、5 段階の pH に調整した滅菌海水 5 mL の入ったウェルに遊走子を  $5.0 \times 10^3$  個/mL となるよう添加し、25°C で静置した。0, 30, 60 および 180 分後に倒立顕微鏡下で各試料中の遊走子の運動性を観察した。倒立顕微鏡の倍率が 100 の時に、その 1 視野で運動性を有する個体が 1 個体以上認められた場合を運動性有り と判定した。

### 遊走子および休眠胞子の海水中での生残への影響

5 段階の pH に調整した滅菌海水 10 mL を 6 穴プレートにウェルに入れ、そこに前述の方法で得られた遊走子を  $1.5 \times 10^3$  個/mL となるように添加した。25°C で 0, 24, 48, 72 および 96 時間静置後に各ウェルから 0.1 mL を PYGS 寒天培地 (pH8.00) に接種した。25°C で 10 日間培養後、増殖した集落数を計数し、海水中で生残していた休眠胞子数を算出した。

### 遊走子および休眠胞子の付着への影響

全甲幅 14.6 cm のガザミの甲殻を乾燥させ、およ

そ  $1 \text{ cm}^2$  に切り出し、画像処理装置 (日本アビオニクス株式会社製 EXCEL) で面積を算出した。この甲殻片を高圧蒸気滅菌し、pH8.00 と 9.25 に調整した 50 mL 滅菌海水に入れた後、前述の方法で得られた遊走子を  $1.0 \times 10^3$  個/mL となるように各 pH の海水に添加した。水平振盪機 (タバイエスペック社製 NR-1) で 25°C, 3 時間振盪 (70 回転/分) した後、ピンセットで甲殻片を取り出し、10 mL の滅菌海水 (pH 無調整, pH8.38) 中で 10 秒間上下させて洗浄し、新たな滅菌海水でさらに同様の洗浄を 2 回繰り返した。この甲殻片を 10 mL の PYGS 液体培地 (pH 無調整, pH7.50) に接種した。25°C で 6 日間培養した後、甲殻に発育した集落数を計数し、 $1 \text{ cm}^2$  の甲殻に付着した遊走子数 (休眠胞子数) を算出した。

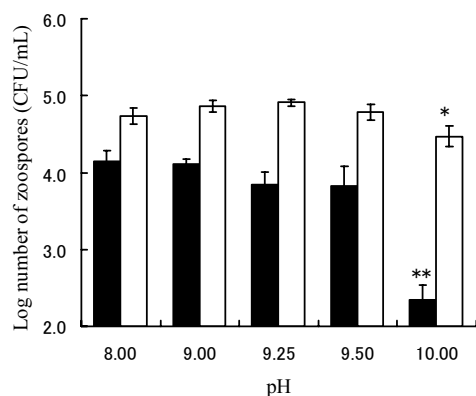
### 統計検定

遊走子の遊出数に及ぼす pH の影響、および遊走子の海水中での生残に及ぼす pH の影響をみた実験の値はウィリアムズの方法 (Williams' test) で検定した。また、遊走子 (休眠胞子) のガザミ甲殻への付着に及ぼす pH の影響には t 検定を行った。

## 結果

### 遊走子の遊出数への影響

いずれの pH の海水でも 24 時間後までに遊走子の遊出が観察された (Fig. 5-5-1)。pH8.00~9.50 の範囲では pH が高くなるにしたがって遊出数は極めて緩やかに減少するに過ぎなかったが、pH10.00 で顕著に減少した。なお、pH10.00 の遊出数にのみ有意差 (Williams' test;  $P < 0.005$ ) が認められた。48 時間後までにはいずれの pH でも 24 時間後より多数の遊走子が遊出した。遊出数は pH10.00 でやや少なく、他の pH では同程度の遊出数であった。



**Fig. 5-5-1.** Effect of pH on discharge of zoospores of *H. okinawaensis* ZH94 strain. Closed columns (■) and open columns (□) represent the zoospores discharged for 24 h and 48 h inoculation, respectively. Vertical bars show standard deviations. \*\*: Significantly different from pH8 ( $P < 0.025$ ) \*: Significantly different from pH8 ( $P < 0.05$ )

#### 遊走子の運動性への影響

各 pH 海水に遊走子を添加して経時的に運動性を観察したところ、30 分後には pH9.25 以上の区で遊走子の運動は認められなくなった (Table 5-5-1)。また、60 分後には pH9.00 以上で、180 分後には pH8.00 以上で遊走子の運動が認められなくなった。

**Table 5-5-1.** Effect of pH on motility of zoospores of *H. okinawaensis* ZH94 strain at 25°C

pH	Exposure time (min)			
	0	30	60	180
8.00	+	+	+	-
9.00	+	+	-	-
9.25	+	-	-	-
9.50	+	-	-	-
10.00	+	-	-	-

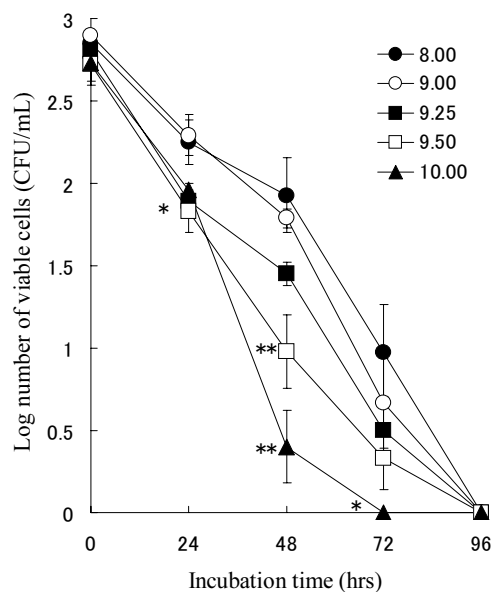
+: Motility was observed.

-: Motility was not observed.

#### 遊走子および休眠胞子の海中での生残に及ぼす pH の影響

海水に添加した遊走子はいずれの pH においても時間の経過とともに生残数が減少した (Fig. 5-5-2)。pH8.00 での生残数に比べて 24 時間後の pH10.00 での生残数は有意に低く (Williams' test;  $P < 0.025$ ), 48

時間後には pH9.50 および pH10.00 で有意差 ( $P < 0.005$ )が認められた。有意差は認められなかったものの 48 時間後においては pH9.25 での生残数は pH8.00 に比べ 33%減少した。72 時間後においても 48 時間後と同様の傾向が認められ、72 時間後には pH10.00 で、96 時間後にはすべての pH で休眠胞子の生残は認められなくなった。



**Fig. 5-5-2.** Survival of zoospores of *H. okinawaensis* ZH94 strain in sea water with different pHs (8.00~10.00) at 25°C. Vertical bars show standard deviations. \*: Significantly different from pH8.00 (Williams' test,  $P < 0.025$ ). \*\*: Significantly different from pH8.00 ( $P < 0.005$ ).

#### 遊走子および休眠胞子の付着への影響

pH8.00 と 9.25 の海水中において 1 cm<sup>2</sup> のガザミ甲殻に付着した遊走子の数はほぼ同じ 30 個程度であり、両区間で差は認められなかった (Table 5-5-2)。

**Table 5-5-2.** Effect of pH on the adherence of zoospores of *H. okinawaensis* ZH94 strain at 25°C

pH	No. of adhering zoospores per 1cm <sup>2</sup> carapace* (Mean ± SD)
	8.00
9.25	29.3 ± 7.1

\*carapace of swimming crab

## 第 2 項 菌糸に対する影響

本項では菌糸の増殖に対する pH の影響について検討した。

### 材料および方法

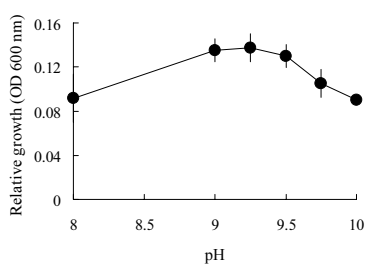
#### 菌糸の増殖に及ぼす pH の影響

pH8.00 に調整した PYGS 液体培地に前述の方法で得られた遊走子を接種し (10<sup>3</sup> 個/mL), 25°C で 4 日間培養して菌糸を形成させた後, 培養液を pH5~10 のカナマイシン加 PYGS 液体培地で置換して, 更に 6 日間培養して, 第 III 章で述べた方法で増殖量を比較した。

### 結 果

#### 菌糸の増殖に及ぼす pH の影響

pH8.00 で 4 日培養後は培養液中に菌糸体が確認され, 吸光度は 0.018 を示した。その後, 各 pH で培養を継続したところ, すべての pH で吸光度が 0.018 を上回り, 新たな菌糸の増殖が認められた。菌糸の増殖は pH8.00 より pH9.00~9.25 で大きく, pH10.00 でも pH8.00 とあまり変わらない増殖を示した (Fig. 5-5-3)。



**Fig. 5-5-3.** Effect of pH on the growth of mycelium of *H. okinawaensis* ZH94 in PYGS broth. OD was measured after 6 days incubation at each pH, following 4 days incubation at pH8. Incubation temperature was 25°C. The vertical bars show standard deviations.

### 考 察

ガザミ幼生に対する *H. okinawaensis* の感染率は,

攻撃遊走子数が多いほど高くなることから (IV 章), 遊走子のうから海水中に遊出される遊走子の数は感染の成立に影響を与える要因の一つと考えられる。遊走子の遊出数については, 菌体を各 pH の海水に接種後 24 時間では, pH8.00 の海水中に遊出した遊走子数と pH9.25 の海水のそれとは同程度であった。また, 接種後 48 時間においても同様に両 pH 間で有意差は認められなかった。このことから pH9.25 処理は, 遊走子のうから遊出される遊走子数には影響を与えない。

遊走子は遊泳することでガザミ幼生に接触してその甲殻に付着すると考えられる。従って, ガザミ幼生に接触する機会を増加させることになる遊走子の運動性は感染に影響を与える要因の一つと考えられる (加治ら, 1991)。本試験から pH9.25 処理は遊走子の運動能力の消失をもたらすことが明らかになった。この運動能力の消失とは遊走子の死滅を示すのではなく, 休眠孢子への移行である。このことは遊走子の生残性を調べた試験において pH9.25 の海水に遊走子を添加しても, 少なくとも 72 時間は生残することからも明らかである。すなわち, 遊走子は pH9.25 下では速やかに運動性を持たない休眠孢子に移行して生残する。

海水中に添加した遊走子の生残性試験については, 遊走子が pH8 でも数時間で休眠孢子に移行することから, 実質は休眠孢子的生残性試験といえる。各 pH の *H. okinawaensis* の休眠孢子は時間の経過とともに死滅したが, その死滅速度は pH が高いほど速かった。特に, pH9.50 および 10.00 ではその傾向が顕著であった。しかし, pH9.25 海水では pH8.00 に比べ, 休眠孢子的生残数の差は 48 時間後でも 1/3 程度であることから, 感染防御に与える影響は少ないと判断された。なお, 休眠孢子は通常の海水の pH である 8 でも 96 時間後には死滅したことから, 休眠孢子的耐久性は低いと考えられた。

ガザミ甲殻への付着性において, pH8.00 と pH9.25

で遊走子の付着数に差が認められなかったことから、pH9.25 処理は遊走子の付着性には影響を与えていないと考えられる。ただし、今回の試験ではガザミ成体の甲殻を用いていることから、幼生に対する付着に pH9.25 処理が影響していないとは言い切れない。

第1項の実験で検討した *H. okinawaensis* の遊走子に対する4つの要因のうち、顕著に高 pH 調整の影響を受けるのは遊走子の運動性であり、顕著ではないが影響を受けるのは海水中での休眠孢子の生残性と判断された。遊走子の運動性では pH8.00 と 9.25 で差が認められているにもかかわらず、甲殻への付着性に差が認められなかった理由として、休眠孢子的甲殻への付着が考えられる。Tharp and Bland (1977) は休眠孢子的付着性について報告している。本実験においては、振盪することによって遊走子はもとより休眠孢子もいずれの pH でも甲殻に付着した可能性があり pH9.25 の影響が不明瞭になったのかもしれない。飼育水の攪拌がなされているガザミ種苗生産現場においては、pH8.00 でも pH9.25 でも同じように遊走子や休眠孢子が甲殻に付着するであろうから、pH9.25 の果たす役割として運動性の消失の重要性は低いと判断された。

pH9.25 調整による *H. okinawaensis* 感染防除の機序として、第III章で明らかにした *H. okinawaensis* の遊走子を pH9.25 の培地に添加しても菌糸の形成が認められないことの他に、休眠孢子的海水中での生残時間の短縮が作用していると推測された。しかし、休眠孢子的 pH9.25 海水中での生残は 48 時間後でも pH8.00 のおよそ 1/3 程度は認められたことから、遊走子の海水中での生残時間の短縮は補助的に作用していると考えられた。

*H. okinawaensis* の遊走子を pH9.25 の培地に添加しても菌糸の形成が認められない現象について以下に述べる。*H. okinawaensis* の生活環は、遊走子が休眠し、休眠孢子から2回目の遊走子が遊出し、その遊

走子が再び休眠し、休眠孢子が発芽して、菌糸を形成するものである (Nakamura and Hatai, 1995a : Fig. 3-7)。このうち、遊走子から菌糸の形性に至る段階のいずれかを pH9.25 処理が阻害するために菌糸の形性が認められない。pH9.25 では、遊走子は pH8 に比較して速やかに休眠孢子になるが、休眠孢子を殺滅していないことが明らかになった(第1項)。また pH9.25 は菌糸に対しては逆に増殖促進効果を示す(第2項)。したがって、休眠孢子から2回目の遊走子が遊出する段階と休眠孢子が発芽する段階のいずれか、もしくは両者とも阻害していると考えられる。いずれも休眠孢子を次の段階に進ませない効果である。pH9.25 の培地に休眠孢子を接種し、経時的に観察し、1回目の休眠孢子ならば再び遊走子が遊出するか否か、2回目の休眠孢子ならば細いフィラメントが形成されるか否かを直接確認すべきであったが、先述したとおり本菌は2回遊泳性で、休眠孢子も1回目的のものか、2回目的のものか、または混合したものかは区別できなかったこともあって、その試験は実施していない。休眠孢子からの遊走子の遊出も発芽と呼ばれることがある(玉田, 1994 ; 村上ら, 2004 ; 篠田ら, 2005)。したがって、休眠孢子を用いた試験はしておらず、休眠孢子的発芽抑制の直接的な証明はできなかったものの、現段階では遊走子を pH9.25 の培地に添加すると菌糸の形成が認められない要因は pH9.25 による休眠孢子的発芽抑制にあると推測された。

以上のことから、pH9.25 調整による *H. okinawaensis* 感染防除機構は、pH9.25 による休眠孢子的発芽抑制がその中核をなし、遊走子の生残時間の短縮が補助的に作用していると考えられた。

## 第VI章 pH 調整防除法の応用

### 第1節 クサリフクロカビ目真菌に対する効果

第Ⅲ章で述べたように、ガザミ類の種苗生産過程では様々なクサリフクロカビ目の菌が分離されている。本章では *Halocrusticida okinawaensis* 以外の病原菌に対する pH9.25 調整法の有効性を明らかにすることを目的として、*Halocrusticida* 属、*Haliphthoros* 属、*Lagenidium* 属から遊走子産生が活発な 4 種類の真菌を選び、各真菌の休眠胞子の発芽に及ぼす pH の影響を検討した。また、ガザミ幼生およびアルテミアを宿主として pH9.25 調整法による感染防除試験を行った。

#### 材料および方法

##### 供試菌

日本獣医生命科学大学畑井喜司雄教授より分与を受けた *Halocrusticida parasitica* NJM9537 (ヨシエビ *Metapenaeus ensis* 幼生由来株)、*Haliphthoros* sp. NJM8986、*Haliphthoros milfordensis* NJM9434 (以上ガザミ幼生由来株)、および *Lagenidium callinectes* NJM9831 (ノコギリガザミ *Scylla serrata* 幼生由来株) の合計 4 種類のクサリフクロカビ目菌を試験に用いた。

##### 増殖に及ぼす pH の影響

PYGS 寒天培地上で 25°C、5~10 日間培養した各供試菌の集落をメスで直径 3 mm 程度切り取り、10 mL 容試験管の 7 mL 滅菌海水に接種し、25°C で培養した。接種翌日に放出された遊走子を pH8, 9, 9.25, 9.5, 9.75 および 10 に調整した 10 mL の PYGS 液体培地に、遊走子数が *Lagenidium callinectes* については 10<sup>1</sup>/mL、*Halocrusticida parasitica* と *Haliphthoros* sp. については 10<sup>2</sup>/mL、*Haliphthoros milfordensis* については 10<sup>3</sup>個/mL となるように接種した。25°C で *Halocrusticida parasitica* は 6 日間、その他の菌については 4 日間静置培養した。これらを超音波破碎機 (日本精機製作所 US-300) により 300 μA で 1 分間

処理した後、分光光度計 (波長 600 nm) で吸光度を測定して、増殖量を求めた。

##### 感染防除試験

*Halocrusticida parasitica*、*Haliphthoros* sp. および *Haliphthoros milfordensis* の pH 9.25 におけるガザミゾエア I 期幼生に対する感染防御効果を調べた。後日 *Lagenidium callinectes* を入手したが、感染試験に用いるガザミ幼生が入手できなかったため、ガザミ幼生に代わってアルテミアを宿主として実施した。その際は上記 3 種も同時に供試した。

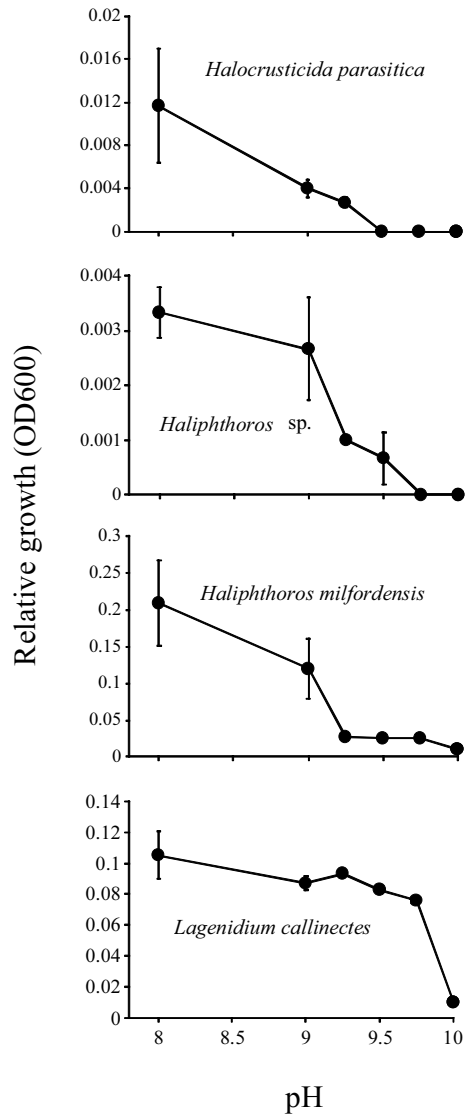
pH8 および 9.25 に調整した滅菌海水 9 mL を入れた 6 穴プレート各ウェルに幼生をガザミの場合は 23~27 個体、アルテミアの場合は 10~20 個体収容し、試験区には遊走子浮遊液を 1 mL、また対照区には海水 1 mL を添加した。遊走子数は、*Halocrusticida parasitica*、*Haliphthoros* sp. および *Haliphthoros milfordensis* では 10<sup>3</sup>個/mL、*Lagenidium callinectes* では 10<sup>2</sup>個/mL とした。試験は無給餌、無通気で 25°C の恒温器内で行い、ガザミ幼生の場合は 3 日後、アルテミア幼生の場合は 6 日後に真菌感染の有無を判定した。なお、海水には抗生物質を添加した。真菌感染の有無は、幼生体内に菌糸が増殖しているかどうかで判断した。各試験はガザミ幼生の場合は 1 回、アルテミア幼生の場合は原則として 2 回行った。

#### 結果

##### 増殖に及ぼす pH の影響

各供試菌の遊走子から菌糸の増殖に至るまでの pH の影響を Fig. 6-1-1 に示した。各供試菌の増殖は *Halocrusticida parasitica* では通常海水の pH8 で最良の増殖を示し、pH が高くなるにつれ増殖程度は直線的に低下し、pH9.5 では増殖が認められなくなった。*Haliphthoros* 属菌は pH の上昇に伴い増殖が不良となり、特に pH9.25 以上では顕著に増殖が抑制された。

一方、*Lagenidium callinectes* の増殖は pH9.25 から 9.75 の範囲では顕著には抑制されなかったが、pH10 で著しく抑制された。



**Fig. 6-1-1.** Effect of pH on the growth of four species of Lagenidiales in PYGS broth. OD was measured 6 days (*Halocrusticida parasitica*) or 4 days (the other 3 species) after incubation at 25°C. Vertical bars show the standard deviation.

**感染防除試験**

*Halocrusticida parasitica* および *Haliphthoros* 属 2 株のガザミ幼生に対する感染試験はいずれの菌も

pH8 区で高い感染率を示した。pH9.25 区では *Halocrusticida parasitica* は pH8 区の場合の 1/3 程度の感染率であったが、*Haliphthoros* 属の 2 株は感染が全く認められないか、わずかであった (Table 6-1-1)。 *Lagenidium callinectes* のアルテミア幼生に対する感染試験は、いずれの pH でも 100 %の感染率を示し、感染防除効果は全く認められなかった (Table 6-1-2)。また、*Halocrusticida parasitica* および *Haliphthoros* 属の 2 株についてはアルテミア幼生でも感染試験を行ったが、pH8 でも感染率が低かった。また、pH9.25 区でも *Halocrusticida parasitica* を除き、pH8 区の 1/2 程度の感染がみられた。

**Table 6-1-1.** Infection of swimming crab zoea- I with three species of Lagenidiales under different pH conditions

Strain	Species	Source	Infection rate (%)	
			pH 8	pH 9.25
NJM9537	<i>Halocrusticida parasitica</i>	Greasyback shrimp	100	33.3
NJM8986	<i>Haliphthoros sp.</i>	Swimming crab	72.0	0
NJM9434	<i>Haliphthoros milfordensis</i>	Swimming crab	84.0	4.0
Control			0	0

A group of 23~27 swimming crab zoeae in each well was exposed to zoospores (10<sup>3</sup> zoospores /mL) and the infection rate was determined 3 days after inoculation at 25°C.

**Table 6-1-2.** Infection of brine shrimp with four species of Lagenidiales under different pH conditions

Strain	Species	Source	Infection rate (%)	
			pH 8	pH 9.25
NJM9831	<i>Lagenidium callinectes</i>	Mud crab	100	100
NJM9537	<i>Halocrusticida parasitica</i>	Greasyback shrimp	30.0	0
NJM8986	<i>Haliphthoros sp.</i>	Swimming crab	20.6	12.5
NJM9434	<i>Haliphthoros milfordensis</i>	Swimming crab	50.0	22.5
Control			0	0

A group of 10-20 brine shrimp in each well was exposed to zoospores (10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> zoospores /mL) and the infection rate was determined 6 days after inoculation at 25°C.

**考 察**

前述したように、*Halocrusticida okinawaensis* の休眠胞子は pH9.25 ではほとんど発芽せず、ガザミ幼生の飼育水の pH を 9.25 に調整することにより、本真菌感染の防除が可能であった(第V章)。H.



*parasitica* および *Haliphthoros* 属菌の 2 株の遊走子を pH9.25 の培地に接種した場合、*Halocrusticida okinawaensis* ほどではないもの菌糸体の発現は、pH8 に比べ抑制された。ガザミ幼生を用いた感染防除試験においても *H. parasitica* では pH9.25 の感染防除効果 pH8 の 1/3 程度であったが、*Haliphthoros* 属菌の 2 株に対しては pH9.25 での感染はほとんどなく、*H. okinawaensis* と同程度の大きい感染防止効果が認められた。

一方、*Lagenidium callinectes* においては、pH10 では著しい増殖阻止が認められたが、pH9.25 でも pH8 と同程度の増殖を示し、また、アルテミア幼生を用いた pH9.25 処理での感染防除効果は全く認められなかった。ガザミ幼生の pH 耐性は pH9.5 以上では著しく低下することから（第 V 章）、*L. callinectes* の感染を防除するために飼育水の pH をさらに上昇させることはできない。したがって、*L. callinectes* の感染防除に関しては pH9.25 調整法以外の対策を講じる必要がある。

アルテミア幼生を用いた感染試験は *L. callinectes* の他に *H. parasitica* および *Haliphthoros* 属菌 2 株についても行った。pH8 区と比べて pH9.25 区で感染率が低下する傾向はガザミ幼生を用いた感染試験と同じであったが、pH9.25 での感染の傾向がガザミ幼生の場合と異なり、*H. parasitica* では感染がなく、*Haliphthoros* 属菌の 2 株で pH8 区と比べて 1/2 程度の感染率となった。これは各菌のアルテミア幼生に対する感染性の違いと考えられた。

ガザミ類の種苗生産においては、*H. okinawaensis* の他に様々な菌が分離されている。今回供試したクサリフクロカビ目真菌 4 株について、それらの各 pH8 における菌糸の増殖量を 100 とした場合の pH9.25 における菌糸増殖量と、pH9.25 における各菌のアルテミアに対する感染率との間には高い相関が得られた ( $r = 0.937$ )。従って、pH9.25 防除法が利用できるか否かは、これらの遊走子の pH9.25 での発芽

の有無を検討することにより推定できると考えられる。なお、著者が 1997 年に pH9.25 調整法の有効性を報告して以来（安信ら、1997）、これまで西日本を中心に 6 機関で本防除法が利用されガザミ種苗の安定生産に寄与していることから、本法は *Lagenidium* 属真菌は別として、*H. okinawaensis* 以外の複数種の真菌に対しても防除効果を発揮していると推測される。

## 第 2 節 *Lagenidium callinectes* の防除法の検討

第 1 節で示したように、*L. callinectes* は pH9.75 でも通常の海水とあまり変わらず増殖するため、pH9.25 調整による感染防除はできなかった。実際、ひょう豊協では *Lagenidium* 属の真菌症が高 pH 調整下でも散発的に発生している（東ら、2007）。現在のところは壊滅的な被害はもたらしていないが、*Lagenidium* 属真菌症は高水温下で発生しやすいため（畑井、2004）、飼育期間が長引いたときなど被害が拡大する恐れがある。本節では *Lagenidium* 属真菌対策に資するため、*L. callinectes* を供試してその生理学的性状（pH、温度、塩分）をあらためて調べることにした。

## 材料および方法

### 供試菌

日本獣医生命科学大学畑井喜司雄教授より分与を受けた *L. callinectes* NJM9831（ノコギリガザミ *Scylla serrata* 幼生由来株）を用いた。

### 増殖に及ぼす低 pH の影響

PYGS 寒天培地上で 25°C、5~10 日間培養した供試菌の集落をメスで直径 3 mm 程度切り取り、10 mL 容試験管の 7 mL 滅菌海水に接種し、25°C で培養した。接種翌日に放出された遊走子を pH4~8 に調整

した 10 mL の PYGS 液体培地に遊走子を  $10^1/\text{mL}$  になるよう接種し 25°C で 8 日間静置培養した。これらを超音波破砕機（日本精機製作所 US-300）により 300  $\mu\text{A}$  で 1 分間処理した後、分光光度計（波長 600 nm）で吸光度を測定する方法により、増殖程度を測定した。試験は 3 回行った。

### 増殖に及ぼす温度の影響

培養液の pH を 8, 培養温度を 10~45°C とし、8 日間静置培養した後、前述と同様の方法により増殖程度を測定した。試験は 3 回行った。

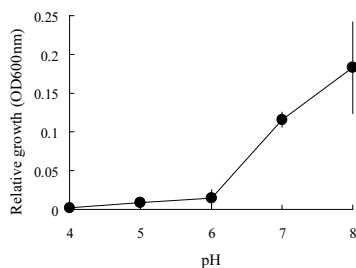
### 増殖に及ぼす塩分の影響

培養液に使用する海水を蒸留水で希釈し、無希釈海水（塩分 31.2）、3/4 海水（塩分 24.2）、1/2 海水（塩分 17.2）、1/4 海水（塩分 10.1）、蒸留水のみ（PYG 培地）として培養液を作製した。なお、培養液の pH は 8 とし、25°C で 4 日間静置培養して前述と同様の方法で増殖量を比較した。試験は 3 回行った。

## 結果

### 増殖に及ぼす低 pH の影響

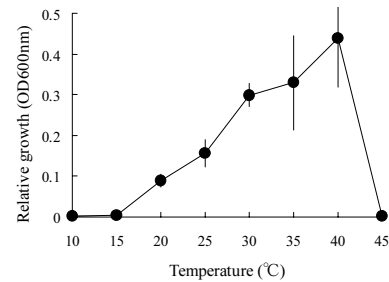
pH4~8 における増殖の結果を Fig. 6-2-1 に示した。pH が低くなるにつれ増殖量は低下し、pH6 ではほとんど増殖しなかった。



**Fig. 6-2-1.** Effect of pH on the growth of *L. callinectes* NJM9831 in PYGS broth. OD was measured after 8 days inoculation at 25°C. The vertical bars show standard deviations.

### 増殖に及ぼす温度の影響

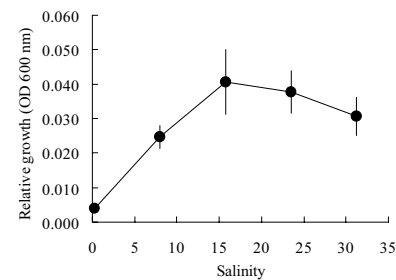
10~45°C における増殖の結果を Fig. 6-2-2 に示した。10°C では増殖せず、15°C でごくわずかに増殖し、以降 40°C までほぼ直線的に増殖量が増加し、45°C では増殖しなかった。



**Fig. 6-2-2.** Effect of temperature on the growth of *L. callinectes* NJM9831 in PYGS broth (pH8.00). OD was measured after 8 days inoculation. The vertical bars show standard deviations.

### 増殖に及ぼす塩分の影響

海水の塩分と増殖の結果を Fig. 6-2-3 に示した。1/4 海水（塩分 10.1）を用いた培地でやや増殖量が減少したが、蒸留水を用いた培地（PYG 培地）でもごくわずかな増殖が見られた。



**Fig. 6-2-3.** Effect of salinity on the growth of *L. callinectes* NJM9831 in PYGS broth (pH8.00). OD was measured after 4 days inoculation at 25°C. The vertical bars show standard deviations.

## 考察

*Lagenidium* 属真菌は種々のエビ、カニ類の感染卵および幼生から分離されている (Table 1-1)。それらのうち、*L. callinectes* NJM9433 (Nakamura and Hatai, 1995a)、*L. thermophilum* NJM0031 (Muraosa et

al., 2006), *L. scyllae* (Bian et al., 1979) および *Lagenidium* sp. (Nilson et al., 1976) について生理学的性状が報告されている。

*Lagenidium* 属真菌の増殖に及ぼす pH の影響は、上記の菌株のうち *L. scyllae* でのみ報告されている (Bian et al., 1979)。 *L. scyllae* は本節で供試した *L. callinectes* と同様に高い pH でも十分に増殖するが、 *L. callinectes* よりも増殖 pH 範囲が広く pH7 および 8 を極大として pH5~10 で良好な増殖が認められている。わずか 2 種についての結果であるが *Lagenidium* 属真菌は広い pH 範囲で増殖でき、 pH6 以下での増殖量は種により異なるようである。 pH5 はガザミゾエア I 期幼生の生育に適さないうえ (馬渡・平山, 1975)、餌料であるワムシが生存できない (Hirayama and Ogawa, 1972)。一方、 pH6 であればガザミ幼生にも (馬渡・平山, 1975)、またワムシにも (Hirayama and Ogawa, 1972) 影響は無いので、 *H. okinawaensis* とは逆に低 pH 調整により *L. callinectes* 感染を防除できる可能性がある。

*Lagenidium* 属真菌の増殖に及ぼす温度の影響についてみると、既報の *L. callinectes* NJM9433 は今回使用した *L. callinectes* NJM9831 の試験とほぼ同じ増殖温度域を有し (Nakamura and Hatai, 1995a)、それらは 15°C~40°C までほぼ直線的に増殖量が増加し、45°C では増殖しなかった。*L. thermophilum* は 30°C を極大として 35°C まで増殖し、40°C でも増殖する株がある (Muraosa et al., 2006)。*L. scyllae* は 16.0°C~31.8°C まで増殖量が増加し、それ以降は徐々に減少して 44°C で増殖しなかった (Bian et al., 1979)。*Lagenidium* sp. については 22.5~39°C でよく増殖し、42°C まで増殖が見られている (Nilson et al., 1976)。このように *Lagenidium* 属真菌には 25°C 以上の温度で良く増殖する種が多い。実際に、抱卵ガザミの卵の真菌感染を調査した研究によると、 *Lagenidium* 属真菌は 7 月中旬 (水温はおよそ 23°C) 以降の抱卵ガザミの卵に認められ、特に 26°C 以上で顕著に多い

(浜崎, 1994)。一方、22°C で管理された抱卵ガザミの卵からは *Lagenidium* 属真菌は認められていない (浜崎, 1994)。種苗生産は通常の種苗生産開始時期である 5 月には飼育水の水温は約 20°C である。この水温 20°C は、飼育水温としては低く、ガザミ幼生の変態成長が遅れ、生残率は低下する傾向があるため (山口県内海水産試験場, 1973)、ひょう豊協では水温 23°C に加温して種苗生産を行っている。実際に、第 II 章で述べたように、23°C 近辺で種苗生産成績が良い。以上のことから、 *Lagenidium* 属真菌の発生を防除するには低水温時には加温して水温 22~23°C とし、外気温が高くなるに伴って飼育水温が 23°C 以上になる前に種苗生産を終えるという生産方式が有効であろう。

*Lagenidium* 属真菌の増殖に及ぼす塩分の影響に関しては、今回使用した *L. callinectes* NJM9831 と同様、上述したいずれの菌株も NaCl 濃度 0% でも増殖し、NaCl 濃度 2% でも良好な増殖が認められている。岩本ら (1973) はガザミ幼生の塩分耐性について検討し、試験水温 19.8~22.9°C の比較的低温でのゾエア I 期の塩分耐性試験では、比重 16.3 (15°C 換算塩分: 22.4) が限界値と報告している。一方、福井県水産試験場 (1968) で実施した、25~29°C の高温時での塩分耐性試験では、比重 15.20~18.70 (15°C 換算塩分: 20.9~25.4) で生残率が高かったことを報告している。ガザミ幼生にとって低温、高温時ともに少なくとも塩分 20 以上は必要である。ヨシエビの真菌症防除対策に希釈海水が有効とされているが (池田・高見, 1997; 泉川ら, 1999)、 *Lagenidium* 属真菌の希釈海水による防除はできないと判断される。

以上のことから、 *Lagenidium* 属真菌の飼育環境制御による効果的な防除は非常に難しい。しかし、 *Lagenidium* 属真菌による真菌症が多発する場合は、飼育水の pH を 6 程度に調整する方法および 22~23°C の水温で生産する方法は検討に値するである

う。なお、*H. okinawaensis* においても pH6 では通常の海水に比べて増殖量は 60%程度に低下するため、pH6 は *H. okinawaensis* の発生抑制にもなると考えられる。

## 第七章 総合考察

本章ではガザミ種苗生産における真菌症の発生機構について論じるとともに、飼育水槽で実施できる高 pH 防除法の意義について述べる。

ひょう豊協では、1992～1993 年のガザミ種苗生産において、ふ化幼生を飼育水槽に収容した 2 日後(ふ化後 2 日)のゾエア I 期幼生が全滅したケースが 4 例ある。感染試験で *H. okinawaensis* の感染幼生からの遊走子の再放出は攻撃 5 日後に認められた。また、浜崎・畑井 (1993a) は *Lagenidium* 属真菌で遊走子の再放出が 2～4 日目に見られたことを報告している。従って、ふ化後 2 日目に全滅した 4 例においては、感染個体からの遊走子の放出により新たな感染が起こり、大量斃死に至ったのではないことは明らかである。感染試験後に幼生内に菌糸が認められるのは早くとも攻撃 2 日後であった。浜崎・畑井 (1993a) は攻撃後 1～3 日であったと報告していることから、ふ化幼生を収容した 2 日後に全滅させるためには、ふ化水槽内もしくは飼育水槽収容直後に感染している必要がある。当時、ふ化水槽では 25～30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のホルマリン浴を実施していたにもかかわらず、飼育水にふ化幼生を収容して 2 日後に全滅した。

in vitro におけるふ化幼生への真菌感染に対するホルマリン浴の効果については *Haliphthoros* 属 2 株、*Lagenidium* 属 2 株、*Sirolopidium* 属 1 株、*Halocrusticida* 属 1 株について感染防除効果が認められている(加治ら, 1991; 浜崎・畑井, 1993b)。 *H. okinawaensis* の休眠胞子の発芽および増殖はホルマリン 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で抑制されることが確認されている(安信, 2006)。 in vivo においても、ふ化水槽内でホルマリ

ン 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浴をおこなった試験区のふ化幼生をシャーレに収容し、無給餌で観察した結果、試験区では真菌症の発生が見られなかったのに対し、対照区では真菌感染が高い確率で観察されている(浜崎・畑井, 1994)。以上の実験結果から、ふ化水槽内でホルマリン 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浴を実施すれば、ふ化幼生に対する真菌感染を防除できると考えられる。しかし、事業規模で実際に種苗生産すると真菌症が多発する。この矛盾は、ホルマリン浴が終わった後のふ化幼生に対して、試験ではワムシなどの餌料を与えていないのに対し、種苗生産では餌料を添加していることから生じると考えられる。

培養不調のワムシから *Halocrusticida parasitica* が分離され、この真菌はガザミ幼生に病原性を示すことが報告された(Nakamura *et al.*, 1994b; Nakamura and Hatai, 1994c)。1992 年のひょう豊協においてガザミ幼生真菌症が多発した際にも、罹病ガザミ幼生からこの *H. parasitica* が分離されている(畑井, 私信)。また、これらのガザミ種苗生産機関においてワムシとガザミ幼生の真菌症発生の時期が一致することも報告されている(浜崎, 1997b)。本研究および浜崎・畑井(1993a)が明らかにしたように、ふ化後 3 日でほとんどのガザミ幼生が真菌症に感染するには、少なくとも  $10^3$  個/mL の遊走子液にさらされる必要がある。100  $\text{m}^3$  飼育水槽で  $10^3$  個/mL の遊走子濃度になるには、数十個の感染卵がふ化水槽から飼育水槽に混入したとしても、そのような濃度にはなり得ない。一方、ワムシは 5 個体/mL になるよう飼育水槽に添加されることから、ワムシが真菌に感染していた場合は、ガザミ飼育水槽で  $10^3$  個/mL の遊走子濃度になることは十分に考えられる。これらのことから、ふ化幼生をふ化槽から飼育水槽に収容して直ぐに、ほぼ全部の個体が真菌に感染するような場合は、餌料として与えられているワムシが病原真菌を持ち込んでいる可能性が高いと推測される。

ゾエア II 期以降に真菌症が確認されるような場合

は、上述した以外の感染経路もあり得る。ひとつはふ化水槽から飼育水槽への感染死卵の混入であり、もうひとつは、取水海水からの遊走子の侵入である。抱卵した親ガニは卵の発生状況や真菌感染の有無を調べるために、検卵と呼ばれる作業が複数回行われる。検卵して真菌の寄生が観察されなくても、ふ化後の水槽には真菌に感染した死卵が、特に7月中旬以降に高い確率で観察されている（浜崎・畑井，1994）。ふ化水槽でのふ化が確認されると、通気を止めて夾雑物を沈下させ、底掃除を行って夾雑物を除去した後、サイフォンで海水ごと幼生を飼育水槽に移槽する。その際に、真菌に感染した死卵が飼育水槽に混入することが考えられる。この場合には、初期の感染個体数は多くはないが、感染幼生から放出される遊走子により、対数的に感染個体が増加するものと考えられる。このように、水平感染により感染が拡大するため、飼育水槽への収容後に感染が広がるまでにはある程度の時間がかかると考えられる。

次に、取水海水からの遊走子の侵入について述べる。クサリフクロカビ目に属する菌類は宿主特異性が強くないことから（Tharp and Bland, 1977; 加治ら，1991），天然海域においても種々の生物を宿主として生存している可能性がある。親ガニを購入した時に、既にほとんどの個体が真菌に感染した卵を持っていることがあり（五利江，1995），それらから、大量の遊走子が放出されることにより、それが種苗生産施設のある海域の他の甲殻類幼生に感染して、常在化することが考えられる。そうした海域から採取した海水を飼育水に使用すれば、遊走子が混入するのは必然である。この取水海水はワムシの培養水としても使用されるため、これがワムシとガザミ幼生の真菌症発生の時期が一致する一因になっていると考えられる。このようにふ化水槽に配慮するだけでは真菌病の発生を防止することが困難であるため、全国のガザミ種苗生産機関で高頻度に真菌症が

発生するに至ったと考えられる（Fig. 7-1）。従って、飼育水槽でも実施できる真菌感染防除法の開発が是非とも必要であった。

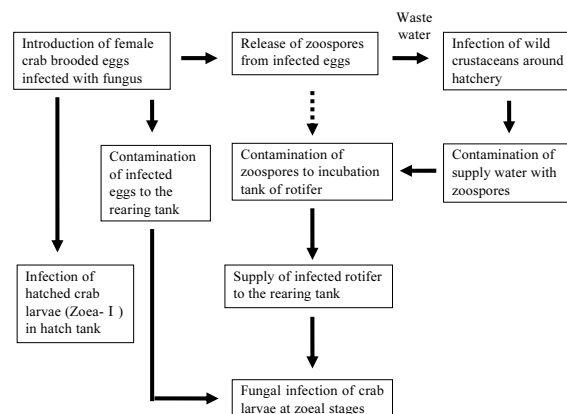


Fig. 7-1. Infection routes of *Halocrusticida okinawaensis* to swimming crab larvae in the rearing tank.

本研究で開発した飼育水の高 pH 調整によるガザミ幼生の真菌症の防除法は、上述の問題を一定の条件付きであるが解決するものである。一定の条件とは 1) 飼育水温が 27°C 未満であること、2)

*Lagenidium* 属真菌には効果がないことである。飼育水温 27°C 未満という条件は、生産期間が長い、あるいは沖縄県のような南方の地域で問題となる。著者が開発した飼育水の高 pH 調整によるガザミ幼生真菌症の防除法は、一般には pH 調整法または pH コントロール法と呼ばれている。本法が実施されて以降、ひょう豊協では真菌症の大きな被害は無くなり、生産目標も 300 万尾から 500 万尾に上方修正された。また、西日本を中心としたガザミ種苗生産機関で広く利用され、好成績が得られている。

最後に、本研究の成果の要点を述べると以下のようになる。1) 種苗生産期のガザミ幼生に多発した真菌症の原因真菌を分離同定し、原因真菌である *Halocrusticida okinawaensis* の生理学的性状を明らかにし、その生理学的特性を利用して、水温 27°C 未満において、飼育水の pH を 9.25 に調整することで *H. okinawaensis* 真菌症が防除できることを明らかにし

た。2) pH9.25 処理の感染防除機構として、原因真菌の休眠孢子の発芽抑制がその主体であることを明らかにした。3) 飼育水の pH9.25 処理はガザミ幼生をはじめ、餌料生物にも悪影響を与えず、むしろガザミ幼生の生育環境を良好にする効果を持ち合わせていることを明らかにした。更に、4) pH9.25 処理は *H. okinawaensis* 以外の真菌についても有効であることを明らかにした。しかしこの方法は、*Lagenidium* 属真菌には全く効果がないため、5) *Lagenidium* 属真菌症の感染防除法としては、飼育水の pH を 6 程度に調整するか、もしくは 22~23℃ の水温での種苗生産が有望であることを示唆した。

今後の課題としては、実用的な *Lagenidium* 属真菌の防除法を確立すること、また、高 pH 調整した時の細菌叢を詳細に検討することにより、ガザミ幼生の生産における有用細菌の有無を明らかにすることである。

#### 引用文献

- Amend, D. F. (1970) : Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevation the water temperature. *J. Fish. Res. Bd Can.*, **27**, 265-270.
- 新崎盛敏(1947) : アサクサノリの腐敗菌に関する研究. 日水誌, **13**, 74-90.
- 新崎盛敏(1960) : アマノリ類に寄生する壺状菌について. 日水誌, **26**, 543-548.
- 有山啓之(2000) : 大阪湾におけるガザミの生態と資源培養に関する研究. 京都大学農学研究科, 131pp.
- Armstrong, D. A., D.V. Buchanan, and R. S. Caldwell (1976) : A mycosis caused by *Lagenidium* sp. in laboratory-reared larvae of the Dungeness crab, *Cancer magister*, and possible chemical treatments. *J. invertebr. Pathol.*, **28**, 329-336.
- 東 大輔・南浦達也・甲斐裕行(2007) : ガザミ種苗生産. 平成 17 年度兵庫海協事報, pp.50-56.
- Beuchat, L. R. (1973) : Interacting effects of pH, temperature, and salt concentration on growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. microbiol.*, **25**, 844-846.
- Bian, B. Z., K. Hatai, G. L. Po and S. Egusa (1979) : Studies on the fungal diseases in Crustaceans. I. *Lagenidium scyllae* sp. nov. isolated from cultivated ova and larvae of the mangrove crab (*Scylla serrata*). *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **20**, 115-124.
- Bower, C.E. and J.P. Bidwell (1978) : Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity. *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**, 1012-1016.
- Couch, J. N. (1942) : A new fungus on crab eggs. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **58**, 158-164.
- Couch, J. A. (1974) : An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp : Ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invertebr. Pathol.*, **24**, 311-331.
- 江草周三・益田信之(1971) : 養殖アユに見られた新しいカビ病. 魚病研究, **6**, 41-43.
- Fisher, W.S., E.H. Nilson, L.F. Follett, and R.A. Shleser (1976) : Hatching and rearing lobster larvae (*Homarus americanus*) in a disease situation. *Aquaculture*, **7**, 75-80.
- 五利江重昭・石飛博敏・楽 敦司・吉川孝司(1995) : ガザミ種苗量産事業. 平成 4・5 年度兵庫県栽培セ事報, pp.66-69.
- 池田善平・高見純一(1997) : 希釈海水飼育によるヨシエビ真菌症の防除. 岡山水試報, **12**, 12-14.
- 岩本哲二・宇都宮 正・陣之内征竜・中村雅人・立石 健(1973) : ガザミの種苗生産・幼生に関する研究(総括). ガザミ種苗生産技術研究報告書(総括), 山口県内海水産試験場, pp.10-11.

- 浜崎浩幸・畑井喜司雄 (1993a) : ガザミおよびノコギリガザミの卵と幼生から分離された卵菌類の病原性について. 日水誌, **59**, 1059-1066.
- 浜崎浩幸・畑井喜司雄 (1993b) : ガザミおよびノコギリガザミの卵とふ化幼生の真菌症に対するホルマリン浴の効果. 日水誌, **59**, 1067-1072.
- 浜崎浩幸・畑井喜司雄 (1994) : ガザミ卵寄生菌類の特性およびふ化幼生のホルマリン浴による真菌症防止効果. 栽培技研, **22**, 99-108.
- 浜崎浩幸 (1995) : III-3 種苗生産技術の開発, L-7 のこぎりがざみ類, (1)ノコギリガザミ. 平成5年度日本栽培漁業協会事業年報, pp.221-222.
- 浜崎浩幸 (1996) : ガザミの生殖と発育に関する研究. 特別研究報告 8 号, 日本栽培漁業協会, 東京, 124pp.
- 浜崎浩幸 (1997a) : III 疾病と対策, 2 細菌性疾病. ガザミ種苗生産技術の理論と実践 (ガザミ種苗生産研究会), 日本栽培漁業協会, 東京, pp.121-125.
- 浜崎浩幸 (1997b) : III 疾病と対策, 3 真菌症. ガザミ種苗生産技術の理論と実践, 日本栽培漁業協会, 東京, pp.125-132.
- 浜崎浩幸 (1997c) : III 疾病と対策, 4-4 付着生物. ガザミ種苗生産技術の理論と実践 (ガザミ種苗生産研究会), 日本栽培漁業協会, 東京, pp.138-142.
- Hamasaki, K., M. A. Suprayudi and T. Takeuchi (2002) : Effects of dietary n-3HUFA on larval morphogenesis and metamorphosis to megalops in the seed production of the mud crab, *Scylla serrata* (Brachyura: Portunidae). *Suisanzoushoku*, **50**, 333-340.
- 畑井喜司雄・江草周三 (1976) : 魚類寄生ミズカビ. 魚病研究, **11**, 45-56.
- Hatai, K., B. Z. Bian, M. C. L. Baticados, and S. Egusa (1980) : Studies on the fungal diseases in crustaceans. II. *Haliphthoros philippinensis* sp. nov. isolated from cultivated larvae of the jumbo tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **21**, 47-55.
- Hatai, K. and O. Lawhavinit (1988) : *Lagenidium myophilum* sp. nov., a new parasite on adult northern shrimp (*Pandalus borealis* Krøyer). *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **29**, 175-184.
- Hatai, K., W. Rhoobunjongde and S. Wada (1992) : *Haliphthoros milfordensis* isolated from gills of juvenile kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) with black gill disease. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **33**, 185-192.
- 畑井喜司雄 (1996) : 第5章真菌病. 魚病学概論, 恒星社厚生閣, 東京, pp.70-82.
- 畑井喜司雄 (1998) : 甲殻類種苗生産における真菌病. 月刊海洋号外, **14**, 37-41.
- 畑井喜司雄 (2004) : 第VI章真菌症. 魚介類の感染症・寄生虫病, 恒星社厚生閣, 東京, pp.263-284.
- Hawksworth, B. L., B. C. Sutton and G. C. Ainsworth (1983) : Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 7<sup>th</sup> ed., CMI, Kew, Surrey, 445 pp.
- Hawksworth, B. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton and D. N. Plegler (1995) : Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 8<sup>th</sup> ed., CAB International, Oxon, 616 pp.
- Hirayama, K. and S. Ogawa (1972) : Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture- I. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **38**. 1207-1214.
- 藤田雄二, 銭谷武平 (1977) : 有明海のり漁場から分離したあかぐされ病原菌 *Pythium* に関する研究-I 一般菌学的性状. 日水誌, **42**, 1183-1188.
- 深山義文 (1997a) : II 幼生飼育, 5-6-1 撰餌. ガザミ種苗生産技術の理論と実践 (ガザミ種苗生産研究会), 日本栽培漁業協会, 東京, pp.96-102.
- 深山義文 (1997b) : II 幼生飼育, 5-6-2 栄養 (n-3HUFA) 要求. ガザミ種苗生産技術の理論と実践. 日本栽培漁業協会, 東京, pp.88-96.

- 福井県水産試験場(1968): 昭和42年度指定調査研究事業種苗生産技術研究報告書(ガザミ), pp.8-11.
- Huq, A., P. A. West, E. B. Small, M. I. Huq. and R. R. Colwell (1984): Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 420-424.
- Iida, Y., J. Hiroi, K. Namba and T. Nakai (2008): Dysfunction in respiration and osmotic regulation of larval Japanese flounder affected by viral epidermal hyperplasia. *Fish pathol.*, **43**, 72-78.
- 池田善平・高見純一(1997): 希釈海水飼育によるヨシエビ真菌症の防除. 岡山水試報, **12**, 12-14.
- 檜 秀隆・森田純人・永山博敏(1997): ガザミ種苗生産事業. 平成6・7年度兵庫県栽培漁業センター事報, pp.260-265.
- Ishimaru, K. and K. Muroga (1997): Taxonomical re-examination of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab. *Fish pathol.*, **32**, 59-64.
- 岩本哲二・宇都宮 正・陣之内征竜・中村雅人・立石 健(1973): ガザミの種苗生産・幼生に関する研究(総括). ガザミ種苗生産技術研究報告書(総括), 山口県内海水産試験場, pp.10-11.
- 泉川晃一・尾田 正・山野井英夫・畑井喜司雄(1999): ヨシエビ幼生から分離した卵菌類の希釈海水における感染率の低下. 日水誌, **65**, 661-664.
- 加治俊二・兼松正衛・手塚信弘・伏見 浩・畑井喜司雄(1991): ノコギリガザミの卵およびふ化幼生のハリフトロス症に対するホルマリン浴の効果. 日水誌, **57**, 51-55.
- 柄多 哲・丹下勝義(1978): 有機性懸濁物によるガザミの種苗生産研究-IV ゴエア幼生に対するアンモニアの急性的毒作用. 兵庫水試研報, **18**, 67-69.
- Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathi, I. Karunasagar (1994): Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, **128**, 203-209.
- Karunasagar, I., I. Karunasagar and R. K. Umeshia (2004): Microbial Diseases in Shrimp Aquaculture. Microbiology: Facets & Opportunities; Ramaiah, N (Ed.), *National Institute of Oceanography*, Goa, 121-134.
- 勝俣亜生・玉城英信(1987): 魚病対策事業. 昭和62年度沖縄県水産試験場報告. pp.191-197.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, D. W. Minter and J. A. Stalpers (2008): Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10<sup>th</sup>ed, CAB International, Wallingford, 771pp.
- Kitancharoen, N. and K. Hatai (1995): A marine oomycete *Atkinsiella panulirata* sp. nov. from philozoma of spiny lobster, *Panulirus japonicus*. *Mycoscience*, **36**, 97-104.
- 北田修一(1984): ガザミの種苗放流効果II 瀬戸内海における漁獲増加現象と効果の広がり. 栽培技研, **13**, 35-59.
- 今 攸・山本 巖・石田信一(1968): 溶存酸素の過飽和によるガザミ幼生のガス病. 水産増殖, **16**, 73-80.
- 楠田理一・佐古 浩・川合研児(1979): 病魚から分離された *Vibrio* 属細菌の分類学的研究-I 形態学的, 生物学的ならびに生化学的性状による検討. 魚病研究, **13**, 123-137.
- Larsen, J. L. (1984): *Vibrio anguillarum*: Influence of temperature, pH, NaCl concentration and incubation time on growth. *J. Appl. Bacteriol.*, **57**, 237-246.
- Lightner, D. V. and C. T. Fontaine (1973): A new fungus disease of the white shrimp *Penaeus setiferus*. *J. invertebr. Pathol.*, **22**, 94-99.



- Lightner, D. V., R. M. Redman and T. A. Bell (1985) : Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **45**, 47-53.
- Lightner, D. V. and R. M. Redman (1985) : A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **45**, 47-53.
- Maeda, M., K. Nogami and N. Ishibashi (1992) : Utility of microbial food assemblages for culturing a crab, *Portunus trituberculatus*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, **21**, 31-38.
- 前田昌調 (1994) : 水産増養殖における微生物バイオテクノロジー. 養殖研報, **23**, 1-15.
- Manivannan, S., S. K. Ota, I. Karunasagar and I. Karunasagar (2002) : Multiple viral infection in *Penaeus monodon* shrimp postlarvae in an Indian hatchery. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 233-236.
- 馬渡健二・平山和次 (1975) : 水産生物幼生の無機態窒素に対する抵抗力の成長にともなう変化. 長崎大水産研報, **39**, 1-6.
- 三宅貞祥 (1983) : 原色日本大型甲殻類図鑑 (II), 保育社, 大阪, pp.82-83.
- 水呉 浩 (1997) : II 幼生飼育, 4 飼育時期. ガザミ種苗生産技術の理論と実践 (ガザミ種苗生産研究会), 日本栽培漁業協会, 東京, pp.49-51.
- 村上圭一・篠田英史・中村文子・後藤逸男 (2004) : アブラナ科野菜根こぶ病の発病に及ぼす土壌の種類と pH の影響. 日本土壤肥科学雑誌, **75**, 339-345.
- 村上啓士 (1997) : II 幼生飼育, 5-2-1 植物プランクトン. ガザミ種苗生産技術の理論と実践. 日本栽培漁業協会, 東京. pp.55-60.
- 村上啓士・清田圭一郎 (1997) : II 幼生飼育, 5-4-7 水質. ガザミ種苗生産技術の理論と実践 (ガザミ種苗生産研究会), 日本栽培漁業協会, 東京, pp.69-72.
- Muraosa, Y., O. Lawhavit and K. Hatai (2006) : *Lagenidium thermophilum* isolated from eggs and larvae of black tiger shrimp *Penaeus monodon* in Thailand. *Fish pathol.*, **41**, 35-40.
- Muraosa, Y., K. Morimoto, A. Sano, K. Nishimura and K. Hatai (2009) : A new peronosporomycete, *Haliotica noduliformans* gen. et sp. nov., isolated from white nodules in the abalone *Haliotis* spp. from Japan. *Mycoscience*, **50**, 106-115.
- 室賀清邦 (1978) : ウナギの赤点菌. 魚病研究, **13**, 35-39.
- Muroga, K., M. Higashi and H. Keitoku (1987) : The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, **65**, 79-88.
- Muroga, K. and H. Yasunobu (1987) : Uptake of bacteria by rotifer. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **53**, 2091.
- 室賀清邦・鈴木康二・石橋矩久・野上欣也 (1989) : ガザミ幼生に発生したビブリオ病. 水産増殖, **37**, 133-141.
- Muroga, K., K. Suzuki and K. Ishimaru (1994) : Vibriosis of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture. *J. World Aquacult. Soc.*, **25**, 50-54.
- 室賀清邦 (1998) : 海産無脊椎動物の種苗生産における疾病. 月刊海洋号外, **14**, 31-36.
- Nakamura, K., S. Wada, K. Hatai and T. Sugimoto (1994a) : *Lagenidium myophilum* infection in the coonstripe shrimp, *Pandalus hypsinotus*. *Mycoscience*, **35**, 99-104.
- Nakamura, K., M. Nakamura and K. Hatai (1994b) : *Atkinsiella* infection in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Mycoscience*, **35**, 291-294.
- Nakamura, K. and K. Hatai (1994c) : *Atkinsiella parasitica* sp. nov. isolated from a rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Mycoscience*, **35**, 383-389.

- Nakamura, K. and K. Hatai (1995a) : Three species of Lagenidiales isolated from the eggs and zoeae of the marine crab *Portunus pelagicus*. *Mycoscience*, **36**, 87-95.
- Nakamura, K. and K. Hatai (1995b) : *Atkinsiella dubia* and its related species. *Mycoscience*, **36**, 431-438.
- Nakamura, K., M. Nakamura, K. Hatai and Zafran (1995) : Lagenidium infection in eggs and larvae of mangrove crab (*Scylla serrata*) produced in Indonesia. *Mycoscience*, **36**, 399-404.
- 中村幹雄・安木 茂・高橋文子・品川 明・中尾 繁 (1996) : ヤマトシジミの塩分耐性. 水産増殖, **44**, 31-35.
- 中村幹雄・品川 明・戸田顕史・中尾 繁 (1997) : ヤマトシジミの硫化水素耐性. 水産増殖, **45**, 17-24.
- 日本栽培漁業協会 (1983) : 日本栽培漁業協会 20 年史. 日本栽培漁業協会, 東京, 95pp.
- 日本組織培養学会 (1990) : 組織培養の技術, 2-3 培地および各種の溶液類. 日本組織培養学会, 朝倉書店, 東京, pp.21-22.
- Nilson, E. H., W. S. Fisher, and R. A. Shleser (1976) : A new mycosis of larval lobster (*Homarus americanus*). *J. Invertebr. Pathol.*, **27**, 177-183.
- 西岡豊弘・古澤 徹・水田洋之介 (1997) : 種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況(1989~1994年). 水産増殖, **45**, 285-290.
- Nogami, K. and M. Maeda (1992) : Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **49**, 2373-2376.
- 野村祐美・神野芳久・水野 豊 (1993) : 特産高級魚種種苗生産試験 (ガザミ-X). 平成3年度鹿児島県栽培漁業センター事業報告, pp.46-52.
- 尾田 正 (1983) : II 種苗生産, I 技術開発の経過. ガザミ種苗の量産技術, 日本水産資源保護協会, 東京, pp.39-41.
- 小川泰樹 (1997) : 広島県田尻地先のイシガニの資源生態. 第3回瀬戸内海資源海洋研究会報告, pp.31-38.
- 大迫 典・吉水 守・木村喬久 (1988) : *Rhabdovirus olivaceus* (HRV)人工感染に及ぼす水温の影響. 魚病研究, **23**, 125-132.
- 大塚弘之・中井敏博・室賀清邦・城 泰彦 (1984) : ウナギ病魚から分離された非定型 *Aeromonas salmonicida*. 魚病研究, **19**, 101-107.
- Roza, D. and K. Hatai (1999a) : Pathogenicity of fungi isolated from the larvae of the mangrove crab, *Scylla serrata*, in Indonesia. *Mycoscience*, **40**, 427-431.
- Roza, D. and K. Hatai (1999b) : *Atkinsiella dubia* infection in the larvae of Japanese mitten crab, *Eriocheir japonicus*. *Mycoscience*, **40**, 235-240.
- 佐野和生 (1959) : 養鰻池の水質. 水産増殖, **6**, 61-71.
- Sano, N., M. Moriwake and T. Sano (1993) : Herpesvirus cyprinid: Thermal effect on pathogenicity and oncogenicity. *Fish pathol.*, **28**, 171-175.
- Sano, T. T. Nishimura, K. Oguma, K. Momoyama and N. Takeno (1981) : Baculovirus infection of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish pathol.*, **15**, 185-191.
- 佐藤 純・虫明敬一・森 広一郎・有本 操・今泉 圭之輔・西澤豊彦・室賀清邦 (1999) : クルマエビの種苗生産における PAV の発生状況. 魚病研究, **34**, 33-38.
- Scott, W.W. and A. H. O'bier (1962) : Aquatic fungi associated with diseased fish and fish eggs. *Prog. Fish-Cult.*, **24**, 3-15.
- 篠田英史・村上圭一・後藤逸男 (2005) : 土壌の酸性改良とアブラナ科野菜の連作が根こぶ病の発病および休眠孢子密度に及ぼす影響. 日本土壌

- 肥料学雑誌, **76**, 891-896.
- Srivastava, R. C. (1979) : Fungi parasitizing the egg of certain fresh water fishes. *Micopathologia*, **68**, 167-169.
- 水産庁・独立行政法人水産総合研究センター・(社) 全国豊かな海づくり推進協議会 (2009) : 平成 19 年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績(全国). pp.38-40.
- Suzuki, K., K. Muroga, K. Nogami and K. Maruyama (1990) : Bacterial flora of cultured swimming crab (*Portunus trituberculatus*) larvae. *Fish pathol.*, **25**, 29-36.
- 田端健二 (1962) : 水産動物に及ぼすアンモニアの毒性と pH, 炭酸との関係. 東海水研報, **34**, 67-74.
- 高橋伊勢雄・松井芳房 (1971) : ガザミの種苗生産について. 兵庫水誌研報, **11**, 7-10.
- 高橋伊勢雄・松井芳房 (1972a) : ガザミの種苗生産に関する研究-I. 兵庫水誌研報, **12**, 41-46.
- 高橋伊勢雄・松井芳房 (1972b) : ガザミの種苗生産に関する研究 有機懸濁物を利用した高密度飼育について. 栽培技研, **1**, 1-14.
- Takahashi, S., and K. Ogawa (1997) : Efficacy of elevated water temperature treatment of ayu infected with the microsporidian *Glugea plecoglossi*. *Fish pathol.*, **32**, 193-198.
- 玉田哲男 (1994) : かびが媒介するウイルス遺伝子の多様性. 化学と生物, **32**, 348-349.
- 田中 真・岡本信明・鈴木基生・五十嵐保正・高橋清孝・J. S. Rohvec (1994) : EIBS 自然発病淡水飼育ギンザケの昇温飼育 (16°C) による治療試験. 魚病研究, **29**, 91-94.
- 田中 真・佐藤孝幸・馬 文君・小野信一 (2008) : ウナギのウイルス性血管内皮壊死症に対する昇温処理および無給餌の効果. 魚病研究, **43**, 79-82.
- 田中 真・佐藤孝幸・松山 創 (2009) : *Pseudodactylogyrus* spp. のウナギ寄生に対する高水温処理の効果. 魚病研究, **44**, 133-138.
- Tanasomwang, V. and K. Muroga (1988) : Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish pathol.*, **23**, 77-83.
- Tanasomwang, V. and K. Muroga (1989) : Intestinal microflora of Rockfish *Sebastes schlegeli*, Tiger Puffer *Takifugu rubripes* and Red grouper *Epinephelus akaara* at their larval and juvenile stages. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **55**, 1371-1377.
- Tharp, T. P. and C. E. Bland (1977) : Biology and host range of *Halophthoros milfordensis*. *Can. J. Bit.*, **55**, 2936-2944.
- Tiffney, W. N. (1939) : The identity of certain species of the Saprolegniaceae parasitic to fish. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **55**, 134-151.
- Tiffney, W. N. and F. T. Wolf (1939) : *Achlya flagellata* as a fish parasite. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **53**, 298-300.
- 宇都宮 正 (1969) : ガザミ種苗生産に関する研究-I 飼育水の pH・溶存酸素量の変化と幼生の歩留り. 山口内海水試研業, **18**, 39-48.
- 和田 功・丹下勝義 (1983) : II 種苗生産, 3 幼生飼育. 水産増養殖叢書 32, ガザミ種苗の量産技術 (ガザミ種苗生産研究会), 日本水産資源保護協会, 石崎書店, 東京, pp.55-112.
- 山口県内海水産試験場 (1973) : 昭和 45~47 年度指定調査研究総合助成事業. ガザミ種苗生産技術研究報告書 (総括), p.10.
- 山野井英夫・室賀清邦・高橋 誓 (1980) : アユから分離された NAG ビブリオの生理学的性状および病原性. 魚病研究, **15**, 69-73.
- 安田治三郎 (1956) : 内湾におけるエビ類の資源生物学的研究(II). 内海水研報, **9**, 1-81.
- Yasuda, K. and N. Taga (1980) : Microbial flock

produced by the Imamura and Sugita method. *La mer*, **18**, 17-22.

安田公昭・多賀信夫(1980): 餌料細菌を用いるシオミズツボワムシの培養. 日水誌, **46**, 933-939.

安信秀樹・永山博敏・中村和代・畑井喜司雄(1997): 飼育水の pH 調整によるガザミ幼生真菌症の防除. 日水誌, **63**, 56-63.

安信秀樹(2006): *Halocrusticida okinawaensis* に対するホルマリンの殺遊走子効果. 兵庫農技総セ研報(水産), **39**, 23-24.

吉松隆夫・林 雅弘・戸田享次・古市政幸・北島 力(1995): メナダ仔魚の必須脂肪酸要求と飼育槽へのナンノクロロプシスの添加効果. 日水誌, **61**, 912-918.

## 要 約

ガザミ *Portunus trituberculatus* の栽培漁業は1960年代の漁獲量の減少を回復させるべく実施され, その効果が認められて全国で盛んに種苗放流事業が行われるようになった。しかし, 頻発する疾病による大量斃死が, 種苗の安定生産を図る上での最大の阻害要因となってきた。特に, 真菌症は多くの生産機関で報告され, 発生した機関での総飼育例数に対する真菌症の割合は50%以上の飼育例にのぼり, 壊滅的な被害を受けて生産不能になった機関もある。

本研究は, ガザミ幼生に発生する真菌症の防除対策として, 原因真菌の生理学的特性を利用した防除法を開発すべく, 種々の検討をおこなったものである。得られた結果は以下のように要約される(第I章: 序論, 第VII章: 総合考察)。

### ガザミ真菌症の発生状況(第II章)

ひょうご豊かな海づくり協会(以下, ひょう豊協)における真菌症の発生状況を調査した。真菌症は1990年に初めて発生したが, その年の被害は軽微であっ

た。しかし, 1992年および1993年には, 真菌症の発生防除を目的として, 当時全国的に行われていたふ化水槽でのホルマリン薬浴を実施していたにもかかわらず, 真菌症が多発して壊滅的な被害を受けた。飼育環境をみると水温と真菌症発生数について一定の傾向は見られなかったが, 飼育水槽の pH が高い時には真菌症で全滅することがなく, また, 真菌症の発生はガザミ幼生の発育段階が早い時期に多発する傾向があり, メガロパでの発生がないことが明らかとなった。

### 原因真菌の分離, 同定および生理学的性状(第III章)

1993年および1994年のひょう豊協におけるガザミ種苗生産において, 真菌症発生時に感染個体から真菌を分離した。いずれも形態学的特徴から卵菌綱, クサリフクロカビ目の *Halocrusticida okinawaensis* に同定された。本菌の感染ステージである遊走子を培地に接種すると休眠胞子が発芽して菌糸が伸張するので, 遊走子を各種培地に接種する方法で生理学的性状を調べた。本菌は, 15~35°Cの範囲で増殖可能であったが, 35°Cでの増殖は極めて微弱であった。また, 塩分濃度が低くなるにしたがい増殖量は減少し, 3/4海水で有意に低下した。pH5~9の範囲で増殖が認められたが, pH9.0を超えると増殖は認められなかった。このことから, 幼生の飼育に3/4海水もしくはpH9.25海水を用いることにより, 真菌症を防除できる可能性が考えられた。

### *Halocrusticida okinawaensis* の病原性(第IV章)

分離菌はガザミゾエアI期およびIII期幼生に対して病原性を示したが, 発育が進んだゾエアIII期幼生では感受性は低下した。感染個体からは供試菌が再分離されたことから, 1993年および1994年のひょう豊協における真菌被害は *H. okinawaensis* が原因であることが明らかになった。感染実験において, 分離菌はガザミ以外にも供試した5種類の甲殻類すべてに感染性

を示したことから、*H. okinawaensis* の宿主特異性は低いと考えられた。実験感染では水温 15°C～30°C まで感染がみられ、水温が高いほど感染率も高くなった。

### 飼育水の pH 調整による *H. okinawaensis* 感染防除対策 (第 V 章)

1) まず、ガザミ幼生への実験感染に対する「飼育水の pH9.25 調整」の感染防除効果について検討し、次に、自然感染に対する効果をみた (第 1 節)。実験感染に対して、pH 8 では感染および死亡が確認されたが、pH 9.25 では感染、死亡とも全く認められないか、わずかに認められる程度だった。同じガザミ親由来のふ化幼生を pH 調整しない水槽と pH を 9.25 に調整した水槽で飼育し、真菌症の自然発生を調べたところ、pH を 9.25 に調整した水槽では真菌症の発生はなかったが、pH を調整しなかった水槽では真菌症が発生して全滅した。

2) 飼育水の pH9.25 調整法を実際のガザミ種苗生産に利用するため、ガザミ(卵・幼生)、飼育水に添加するナンクロロプシス、および餌料生物に対する pH の影響をみた (第 2 節)。産卵後間もないガザミ卵では pH の上昇に伴う発生率の低下はほとんど認められず、ふ化間近の卵も pH 9.25 下での悪影響はなかった。アンモニアの毒性は pH の上昇により高まるが、通常の種苗生産の飼育水のアンモニア濃度 (0.5µg/mL) では pH9.25 下でのガザミ幼生に対する毒性はみられなかった。ナンクロロプシスには、pH の上昇とともに逆に細胞数が増加するという好影響を与えた。餌料生物であるワムシとアルテミアは pH8～10 では悪影響は受けなかった。ガザミ幼生は pH 9.25 では長期的にも悪影響を受けなかったため、事業生産規模で飼育水の pH を 9.25 にした試験を実施した結果、真菌症は発生せず、また幼生の活力にも問題なく順調に生産することができた。

3) ガザミの種苗生産は高水温時にも行われることがあることから、幼生の生残に対する pH 9.25 調整飼

育水の短期的および長期的影響を異なる水温で検討した(第 3 節)。アンモニア濃度 (0～8µg/mL) とガザミ幼生の生残率の関係を pH (9.25 と 8)と温度 (20°C, 25°Cおよび 30°C)条件を変えて調べたところ、pH でみれば pH 9.25 の場合が pH 8 より、水温でみれば 30°C の場合が 20°Cあるいは 25°Cの場合より、短期的 (24 時間) にはアンモニアの毒性が強くなった。しかし、通常の飼育水のアンモニア濃度では pH9.25 のガザミゾエアの生残に対する短期的な悪影響はなかった。一方、長期的 (ゾエア I～ゾエア IV 期, 7～14 日) には、pH9.25 の悪影響が通常の飼育水のアンモニア濃度であっても水温 27°C以上において認められたことから、高 pH による真菌症の防除方法は水温 27°C未満で実施する必要があると考えられた。

4) 飼育水の pH が異なれば、飼育水の細菌叢も異なる可能性がある。ガザミゾエア初期幼生は飼育水中の細菌を摂食することが知られていることから、通常飼育と高 pH 飼育における飼育水の総菌数と *Vibrio* 属菌数を比較した (第 4 節)。pH を 9.25 に調整している間、総菌数は pH 9.25 調整した方が有意に高かった。一方、ガザミに対して栄養価が低いとされる *Vibrio* 菌数は有意に低かった。この現象に加えて高 pH ではナンクロロプシスが良好に維持されることが作用して、pH を 9.25 に維持する飼育方法は、通常飼育より好成績をもたらすと考えられた。

5) *H. okinawaensis* に対する pH 9.25 の感染防御機構について検討した。pH9.25 は感染ステージである遊走子の放出数には影響しなかったが、休眠孢子の生残時間をわずかに短縮した。pH9.25 は遊走子の運動性に影響を与えたが、ガザミの甲殻に対する付着には影響しなかった (第 5 節第 1 項)。これらの結果から、pH9.25 の感染防御は *H. okinawaensis* の遊走子以降の増殖抑制が主たる役割を果たし、遊走子の生残時間の短縮が補助的に作用していると考えられた。この pH9.25 の *H. okinawaensis* の遊走子以降の増殖抑制の機構について検討したところ、発芽した菌糸に対しては pH9.25

の増殖抑制効果が全くないことが明らかになり(第5節第2項), 遊走子が pH9.25 でほとんど増殖しない要因は休眠孢子からの発芽抑制であると考えられた。以上のことから, pH9.25 による *H. okinawaensis* 感染防御機構は休眠孢子の発芽抑制が中核をなし, 休眠孢子の生残時間の短縮が補助的に作用していると考えられた。

#### pH 調整防除法の応用 (第VI章)

1) ガザミ類の種苗生産過程では様々なクサリフクロカビ目の菌が分離されているので, *H. okinawaensis* 以外のガザミ幼生病原菌に対する pH9.25 調整法の有効性を調べた(第1節)。*Halocrusticida parasitica* および *Haliphthoros* 属2株は pH9.25 下では, 増殖が抑制され, ガザミ幼生およびアルテミアを用いた感染試験でも pH9.25 で 100%感染が抑えられる場合や, pH 8 の場合の 1/2 程度になる場合もあったが, pH9.25 調整法は *Halocrusticida parasitica* および *Haliphthoros* 属2株の感染を軽減する効果はあると判断された。これらに比べて *Lagenidium callinectes* では pH 9.25 でも pH 8 と同程度の増殖で, pH9.25 処理での感染防除効果は全く認められなかったため, *L. callinectes* に関しては pH9.25 調整法以外の対策を講じる必要がある。

2) ひょう豊協では *Lagenidium* 属の真菌症が高 pH 調整下でも散発的に発生しているため, *Lagenidium* 属真菌対策に資するため, その生理学的性状 (pH, 温度, 塩分) をあらためて調べた(第2節)。*L. callinectes* は pH が低くなるにつれ増殖量は低下し, pH6 ではほとんど増殖しなかった。本真菌は高水温ほどよく増殖し, 塩分を含まない培地でも増殖が認められた。これらのことから, *Lagenidium* 属真菌による真菌症が多発する場合は, 飼育水の pH を 6 程度に調整する方法および高水温を避けた 22~23°C の水温で生産する方法が検討に値すると考えられた。

なお, *H. okinawaensis* 防除のために開発した pH9.25 調整法は, これまで西日本を中心に各地の生

産機関で利用され, ガザミ種苗の安定生産に寄与している。従って, 本法は *Lagenidium* 属真菌は別として, *H. okinawaensis* 以外の複数種の真菌に対しても優れた防除効果を有していると考えられる。

#### 謝 辞

本研究をまとめるにあたり, ご指導, ご鞭撻を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科中井敏博教授に深く謝意を表します。また本論文に関して種々の有益なご指導をいただいた長澤和也教授, 植松一眞教授, 大塚 攻教授および河合幸一郎准教授に感謝の意を表します。魚介類真菌学について多くのご指導, ご協力いただき, 本論文の校閲の労を賜りました畑井喜司雄博士(日本獣医生命科学大学獣医学部名誉教授)に深謝します。魚病研究を基礎からご指導いただき, 多くの関係公表論文のご校閲を賜りました室賀清邦博士(広島大学名誉教授)に心から感謝します。ガザミの種苗生産事業における試験では, ひょうご豊かな海づくり協会の永山博敏主幹兼海洋保全課長並びに檜 秀隆主査に事業生産の大変忙しい中にご協力いただき, ガザミの種苗生産事業生産成績の集計には東 大輔主任にお世話になりました。日本獣医生命科学大学獣医学部の倉田 修講師には貴重な菌株をご分与いただき, 中村和代氏には真菌の同定にご協力いただきました。心より感謝申し上げます。

本研究は兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センターの多くの方々のご協力を得て進めることができました。反田 實所長には学位論文をまとめるきっかけと, 終始励ましを賜りました。五利江重昭主任研究員には有意義なご助言を賜りました。魚住香織研究員(現淡路県民局洲本農林水産振興事務所課長補佐)には実験にご協力いただきました。心よりご礼申し上げます。

最後に, 本研究をまとめる際に, 様々なご助言を

賜った広島県立総合技術研究所水産海洋技術センター  
水産研究部飯田悦左副部長に深く感謝します。

#### 関係公表論文

安信秀樹・永山博敏・中村和代・畑井喜司雄(1997) :  
飼育水の pH 調整によるガザミ幼生真菌症の防  
除. 日水誌, **63**, 56-63.

安信秀樹(2001) : 飼育水 pH 調整による病原真菌のア  
ルテミア幼生における感染防除効果. 魚病研究,  
**36**, 79-82.

安信秀樹(2001) : 5 種類の甲殻類幼生に対する  
*Halocrusticida okinawaensis* の病原性. 水産増

殖, **49**, 115-116.

安信秀樹・永山博敏・榎 秀隆(2001) : pH9.25 で  
飼育した時のガザミ幼生の生残に及ぼす水温  
の影響. 水産増殖, **49**, 181-184.

安信秀樹(2006) : 飼育水の pH 調整によるガザミ幼生  
真菌症の感染防除機構. 水産増殖, **54**, 531-535.

安信秀樹(2006) : *Halocrusticida okinawaensis* に対  
するホルマリンの殺遊走子効果. 兵庫農技総セ  
研報(水産), **39**, 6-10.

安信秀樹(2008) : ガザミ種苗生産における  
*Halocrusticida okinawaensis* 真菌症の希釈海水に  
よる防除の可能性. 兵庫農技総セ研報(水産),  
**40**, 97-99.

#### Abstract

Sea farming fishery of the swimming crab *Portunus trituberculatus* has been conducted to increase the fishery resources. Because release of artificially reared juvenile swimming crab has been effective for the increase of the catch, it has been conducted in various areas of Japan. However, the consistent seed production of this species was inhibited by frequent disease occurrences. Especially, occurrence of fungal disease was reported in many seed production facilities. It damaged more than 50 percent of the production in the facilities that fungal disease occurred. Some facilities could produce no seeds of swimming crab due to severe occurrences of the fungal disease.

The objective of this study was to develop the method for prevention of the fungal disease based on physiological properties of the causative agent. The results of the present study are summarized as follows.

#### 1. Occurrence of fungal disease in larvae of swimming crab at Hyogo Prefectural Mariculture Center

The occurrence of fungal disease in larvae of swimming crab at Hyogo Prefectural Mariculture Center (HPMC) was examined. The initial outbreak in 1990 damaged lightly. In successive 1992 and 1993, however, despite the bath treatment with 25 ppm formalin, which was previously suggested as an efficacious method to control fungal diseases, heavy mortalities due to fungal infection occurred frequently, resulting in destructive damages on the seed production of swimming crab at HPMC. When fungal disease occurred, no relationship between the rearing water temperature and the disease occurrence were found, but the mortality was less severe in zoeal larvae of rearing tanks showing high

pH levels. Epizootiological investigations also revealed that the disease occurs at zoeal stage of swimming crab but not at the megalopal stage.

## 2. Isolation, characterization and identification of causative fungus

Fungi were isolated from infected swimming crab zoeae at HPMC in 1993 and 1994. Two fungal isolates obtained, ZH93 in 1993 and ZH94 in 1994, were identified as *Halocrusticida okinawaensis* (Oomycetes: Lagenidiales) based on the morphological characteristics. Zoospore of *H. okinawaensis*, which is infectious stage to the swimming crab zoea, encysts with time, germinates from cyst and then produces hyphae. Physiological characteristics of the fungal isolates, i.e. temperature, salinity and pH, were investigated by culturing the zoospores. The fungi grew well in the range of 15–35°C, but growth at 35°C was slight. The growth rate of the fungi decreased with the decrease of salinity, and significantly reduced in 3/4 (25%) sea water. They grew in PYGS broth at pH5–9, but the growth was remarkably reduced at pH9.25. From these characteristics, it was suggested that the seed production using diluted (3/4 dilution) or pH adjusted (pH9.25) sea water will be effective to prevent this fungal infection.

## 3. Pathogenicity of *H. okinawaensis*

In the experimental infection using zoeal swimming crab, the fungal isolates produced mortality against swimming crab both at zoea- I and zoea-III stages, but the susceptibility of crab to the fungus decreased at zoea-III stage. Moreover, from the fact that the inoculated fungus was re-isolated from infected zoea, the fungus was proved to be the causative agent of mass mortalities at HPMC in 1993 and 1994. Infection experiments also demonstrated that the fungus has low host specificity because the isolate showed pathogenicity to five shellfish species other than swimming crab. The infection established under water temperatures ranging from 15°C to 30°C, and the infection rate increased with the increase of water temperature.

## 4. Prevention of the fungal infection in swimming crab larvae by pH adjustment method

1) The preventive effect of keeping the pH of rearing water at 9.25 was first examined against experimental infection and then against spontaneous infection. In the experimental infection, both infection and mortality were observed in larvae under pH8 condition, but not under pH9.25 condition.

The spontaneous infection, where zoeae from the same brood stock were reared separately either in pH9.25-treated or non-treatment sea water, resulted in mortality with fungal disease only under non-treated sea water condition.

2) Effects of pH on swimming crab (eggs, larvae), a phytoplankton *Nannochloropsis oculata* to be added to rearing water and live diets (rotifer and brine shrimp) were examined. pH9.25 gave no negative effects on the developmental rate of eggs at early stage after spawning and almost hatching



eggs. Toxicity of ammonia to larvae of the swimming crab increased with the increase of pH value, but ammonia at normal concentrations (lower than  $0.5 \mu\text{g/mL}$ ) was not toxic to larvae. Concentration of *N. oculata* in culture increased with the increase in pH. Negative effects of pH8-10 to survival and activity of rotifer and brine shrimp were not observed. Because the swimming crab larvae was also unaffected by long term rearing at pH9.25, the seed production keeping the pH of rearing water at 9.25 was operated. As a result, occurrence of fungal disease and negative effects to survival and activity of the swimming crab were not observed, and thus the seed production was successfully practiced.

3) Influence on the swimming crab larvae of pH9.25 under high water temperature was examined. In the experiments of the short-term (24 h) influence, high water temperature ( $30^{\circ}\text{C}$ ) has little influence on the survival of larvae under ammonia concentration of  $1 \mu\text{g/mL}$  in the rearing water (Ammonia concentration of the normal rearing water was about  $0.5 \mu\text{g/mL}$ ). However, the survival rate in the long-term (7-14 days) above  $27^{\circ}\text{C}$  decreased even in normal ammonia concentration. These results indicate that the prevention method by high pH (pH9.25) of rearing water should be performed when water temperature is lower than  $27^{\circ}\text{C}$ .

4) Since a lot of the genus *Vibrio* species can grow even at pH10, pH9.25 adjustment of rearing water may change the bacterial flora of the rearing water. It is known that the swimming crab at early larval stage eat the bacteria in water and the nutritive value of *Vibrio* is comparatively low. However, when the number of total bacteria and *Vibrio* was compared between pH-adjusted (pH9.25) and non pH-adjusted rearing waters, the pH-adjusted rearing water was higher in the total bacterial number but lower in *Vibrio* number than non pH-adjusted rearing water. In addition, number of *N. oculata*, which is added as a water stabilizer, increased in the pH9.25 rearing water. Therefore, the dietary condition of zoeal swimming crab zoea is kept well in the pH9.25 rearing water.

5) The mechanism to prevent fungal infection by adjusting pH of rearing water to 9.25 was investigated. There were no difference in the number of zoospores discharged in water between pH9.25 and pH8. Survival rate of zoospores at pH9.25 water was about 1/3 of that at pH8 water. Zoospores were actively motile for 60 min in pH8 water, but motility was not observed after 30 min in pH9.25. No different was found in adherence of zoospores on carapace of adult swimming crab between pH9.25 and pH8 sea waters. These results, coupled with previous findings, indicate that inhibition of the germination of encysted zoospores and reduction of the number of surviving zoospores are important to prevent fungal infection with *H. okinawaensis* in the pH9.25 method.

## 5. Application of pH adjustment method to other fungal infections

1) The availability of the pH 9.25 method developed for *H. okinawaensis* infection of swimming crab larvae was examined against four fungal species of the Lagenidiales. These fungi, all pathogenic to crustaceans, were *Halocrusticida parasitica* isolated from greasyback shrimp (*Metapenaeus ensis*),

*Haliphthoros* sp. and *Haliphthoros milfordensis* both isolated from swimming crab, and *Lagenidium callinectes* isolated from mud crab (*Scylla serrata*). The in vitro growth of *H. parasitica*, *Haliphthoros* sp. and *H. milfordensis* was reduced at pH 9.25. The infection rates to the swimming crab zoea-I and brine shrimp exposed to zoospores in the sea water at pH9.25 were reduced significantly compared with those at pH8. In contrast, the growth of *Lagenidium callinectes* was not arrested at pH 9.25 and the infection rate to brine shrimp at pH 9.25 was 100%. Therefore, the pH9.25 method can be used to prevent infections with *H. parasitica* and two *Haliphthoros* species in swimming crab larvae, but not for the infection with *L. callinectes*.

2) Fungal diseases caused by *Lagenidium* spp. sometimes have occurred even under pH adjustment of rearing water to 9.25 at HPMC. To find the prevention method for *Lagenidium* infection, the biological properties (pH, temperature, salinity) of *L. callinectes* were investigated again. Growth of *L. callinectes* decreased with the decrease in pH, and the growth was hardly observed at pH6. It grew well at higher temperature up to 40°C and even on PYG medium prepared with distilled water. From the these results, it is recommended that swimming crab larvae were reared at about pH6 or at lower water temperature (22-23°C) for prevention of *Lagenidium* infection.

The present pH adjustment method (the pH9.25 method) for prevention of fungal disease in swimming crab is now commonly used at many facilities in western Japan and has greatly contributed to a stable seed production of swimming crab. Therefore, it is supposed that the pH9.25 method is beneficial against multiple pathogenic fungi other than *H. okinawaensis*, except for *Lagenidium*.