

## アカウニ種苗生産時に発生する棘抜け症防除に関する研究

岡山英史・藤崎 博・青戸 泉\*

### Studies on the Removal Method of Winter Spine-detached Syndrome (Togenukesyo) on Rearing Sea Urchin *Pseudocentrotus depressus*

Hidefumi OKAYAMA, Hiroshi FUJISAKI and Izumi AOTO\*

We studied for the way to avoid the development of Winter Spine-detached Syndrome (Togenukesyo) during rearing sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. The survival ratio of the sea urchin reared in 60% diluted sea water was found higher than that in less diluted sea waters and control, as the causative organism of the syndrome cannot survive in the culture media made from 60% diluted sea water (20‰ of salinity). However, the upkeep for about two months led to the results that the sea urchin in 60% diluted sea water had serious feed intake reduction and deficient growth because of the weakness for low salinity. As it was supposed that the sea urchin with a thicker and harder shell, which is an infection site of the causative organism, could survive better, we made experiments about the disease resistance depending on foods such as seaweeds and compounded diets. As the results, the sea urchin reared with compounded diets, which must harden and thicken the shell, was found to be most strongly resistant to the disease. As it was known that water temperatures of more than 20 degrees Celsius restricted the growth of the causative organism and that those of about 13 degrees Celsius induced the development of the syndrome at a breeding site, we conducted infection-induced experiments depending on water temperatures. Those survival ratios of the sea urchin showed a significant difference; 100% at 18 degrees Celsius and around 10% at 12 and 9 degrees Celsius.

キーワード：アカウニ，種苗生産，棘抜け症，大量斃死

アカウニ *Pseudocentrotus depressus* は佐賀県玄海海域における有用な磯根資源である。このため，本県ではアカウニ資源の維持・増大を目的として，1976年からアカウニの種苗生産技術開発に着手した<sup>1)</sup>。種苗量産技術開発を行う中で，1981年に殻皮表面の黒斑，脱棘などの症状を特徴とする大量斃死が発生した<sup>2)</sup>。この脱棘症状を伴う疾病は，後に棘抜け症<sup>3, 4)</sup>と命名され，川原ら<sup>5, 6)</sup>や真崎<sup>7)</sup>の研究から，発症したアカウニを滅菌海水に漬けて作製した浸漬海水に感染力があること，0.45  $\mu\text{m}$  で濾過すると感染力がなくなること，病変部の

透過電顕像から多数の長桿菌が観察されることから，低水温期における細菌性疾病ではないかと考えられたが，原因細菌の分離・培養ができず，防除方法の確立には至らなかった。その後，年変動はあるものの，棘抜け症はアカウニ種苗生産に被害を及ぼしてきた。そして，2003年1月には，種苗生産現場だけでなく，養殖漁場や天然漁場においても，棘抜け症と疑われる大量斃死が発生した。

そこで，佐賀県玄海水産振興センターでは，2003年9月にアカウニ種苗生産において発生する疾病の原因究明

\* 現 佐賀県県土づくり本部河川砂防課

および防除技術を確立することを目的としたアカウニ種苗疾病対策研究会を発足させた。

この研究会において、棘抜け症研究の第一人者であり、研究会委員であった長崎大学水産学部金井欣也教授から、アカウニの棘抜け症に関して、研究報告がなされた。(以下、第1回アカウニ種苗疾病対策研究会、会議録)

#### ○ 棘抜け症原因細菌の性状

- ・棘抜け症原因細菌はグラム陰性細菌で、色素(-)、カタラーゼ試験(+), チトクロームオキシダーゼ試験(+), プドウ糖分解(-), デンプン分解(-), コンドロイチン硫酸(+w)である。
- ・細菌培養用に使用されるペプトン培地等には発育せず、ウニ抽出培地でのみ培養できる。
- ・細菌は2-6  $\mu\text{m}$   $\times$  0.4-0.6  $\mu\text{m}$  と細長く、屈曲性に富んでいる。
- ・培地の塩分を26% (海水(33%) : 淡水(0%)) = 8 : 2 に混合し作製した。以下、80%海水と標記する。) 以上の培地では通常の増殖を示すが、23% (70%海水培地) では発育が悪く、20% (60%海水培地) 以下では発育しない。
- ・培養した細菌では、アンピシリン、オキシテトラサイクリン、エリクロマイシン、オキソリン酸に薬剤感受性がある。

#### ○ 棘抜け症の発症

- ・浸漬感染試験では殻皮を傷つけたアカウニを使用すると有意に感染が成立し、傷つけた部分から黒色斑点が観察され、その部分から原因細菌が分離できる。
- ・ウサギ抗血清による免疫染色によると、菌体はウニ殻内部に多く分布していることから、ウニ殻皮に穿孔しているものと考えられる。
- ・水温12-20℃で作製した浸漬海水は起病力があり、細菌の発育適温は14-16℃であり、20℃以上では増殖は停滞する。また、16℃以上の感染試験では、ウニの斃死は少ない。これは、低水温によりウニの活性が落ちることが疾病発生の引きがねになっているのではないかと推測される。
- ・感染力を確認した浸漬海水を0.45  $\mu\text{m}$  フィルターによるろ過、若しくは紫外線照射すると起病力がなくなる。

この研究報告を受け、まず、培養した棘抜け症原因細菌は、60%海水ウニ培地では発育しなかったことから、アカウニを低塩分に調整した海水で飼育することにより、棘抜け症が防除できるか否かを検討した(実験1 塩分濃度別感染試験)。

次に、棘抜け症を発症したアカウニをウサギ抗血清による免疫染色を行うと、菌体はウニ殻内部に多く分布していることから、殻を穿孔していると考えられた。また、感染試験において、殻皮を傷つけたアカウニを使用すると有意に感染が成立し、傷つけた部分から黒色斑点が観察され、その部分から原因細菌が分離できる。これらのことから、アカウニの殻皮が厚く、固ければ細菌感染を防除できるのではないかと考えられた。そこで、海藻や配合餌料など異なる餌料を給餌することで、アカウニの殻皮強度が異なり、棘抜け症原因菌への耐病性が異なるか否かの試験を行った(実験2 餌料別感染試験)。

最後に原因細菌の培地上での発育適温は14-16℃であり、20℃以上では増殖しない。そこで、感染初期に一定時間昇温することで感染が防除できるか否かの検討を行った。また、種苗生産現場では13℃以下になる低水温時に発症する。これらのことから、飼育しているアカウニの活性が落ちることが、発症に繋がる引きがねとなっている可能性もある。そこで、飼育水温を加温し、アカウニの活力を高めることで、棘抜け症を防除できるか否かを検討した(実験3 水温別感染試験)。

以上のような実験設定をもとに、アカウニ種苗生産で発生する棘抜け症防除について考察した。

## 実験1 塩分濃度別感染試験

### 材料および方法

- (1) 実験には、同一条件下(水温13℃, 100%海水, ホンダワラを主とする給餌)で飼育したアカウニ(平均殻長12mm)を供試した。浸漬感染設定は、細菌濃度を $10^5$ cfu/mlとなるように調整した海水を入れた1L容器に、殻皮をメスで傷つけたアカウニを入れ、24時間浸漬した後、滅菌海水で換水した。浸漬感染後の飼育は、8L容器にアカウニ10個体ずつを収容し、異なる塩分濃度海水(60%海水, 80%海水, 100%海水)

で、通気有り、無給餌、同水温条件（13℃）、2日間に1回全換水で飼育した。生残状況を毎日観察し、付着力がなくなったアカウニを斃死ウニとして、その都度回収した。試験は各区2容器ずつ実施し、平均生残率を示した。

- (2) 異なる塩分濃度海水（60%海水、80%海水、100%海水）で約50日間飼育したアカウニ（平均殻長はそれぞれ15.6mm, 17.8mm, 18.4mm）を供試した。なお、この平均殻長の違いは、各塩分濃度飼育において、低塩分であればあるほど、アカウニが摂餌の減退が大きく、成長しなかったためである。浸漬感染試験方法や収容個数、経過観察は前述した方法で行い、各区2容器ずつ行った。

## 結果

- (1) 生残率の推移を図1に示した。生残率の高い順に60%海水区、100%海水区、80%海水区であったが、各試験区間に有意な差はみられなかった。
- (2) 生残率の推移を図2に示した。60%海水区では1個

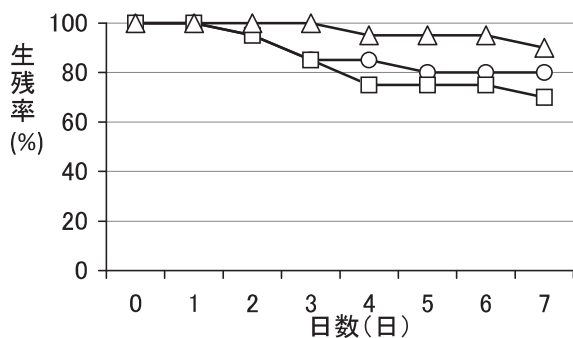


図1 浸漬感染後の塩分濃度別飼育による生残率の推移。

○, 100%海水区 (対照区); □, 80%海水区; △, 60%海水区。

体も斃死しなかったのに対して、100%海水区は生残率70%となった。

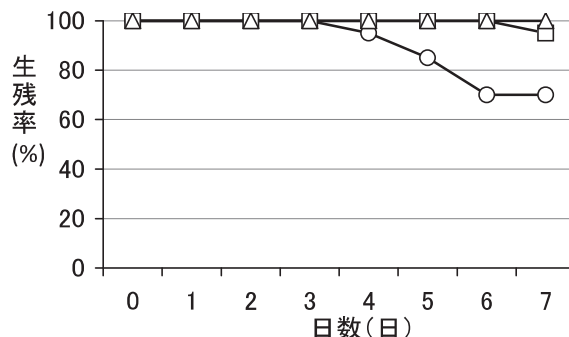


図2 塩分濃度別飼育による生残率の推移。

○, 100%海水区 (対照区); □, 80%海水区; △, 60%海水区。

## 実験2 餌料別感染試験

### 材料および方法

- (1) 実験には餌料別（アラメ、ヒジキ、ホンダワラ、ワカメ、オキアミ、ウニ用配合餌料）に約60日間飽食となるように給餌飼育したアカウニ（平均殻長10.5mm）を用いて、前述した方法で浸漬感染試験を行った。その後、10個体ずつ1L容器に収容し、各区2容器ずつ行い、平均生残率の推移をみた。
- (2) これまで、種苗生産で主な餌として使用していたホンダワラを給餌したアカウニを対照区として、ウニ用配合、エビ用配合、エビ用配合ペプチドグリカン含有の配合餌料を約60日間十分量給餌したアカウニ（平均殻長14.9mm）を使用した。浸漬感染試験は前述した方法で行い、各区5個体ずつ1L容器に収容し、各2容器ずつの平均生残率の推移をみた。

表1 ウニ用配合餌料の成分組成

	ウニ用配合 高タンパク質	ウニ用配合 中タンパク質	ウニ用配合 中タンパク質 βカロチン含	ウニ用配合 低タンパク質	エビ用配合	海藻アラメ
粗タンパク質	50.6	33.1	33.1	15	53	1.4
粗脂肪	6.1	3.4	3.4	2.2	5	0.1
粗繊維	0.4	2.4	2.4	3.8	3	-
粗灰分	15.4	13.7	13.7	21.7	18	4.5
カルシウム	4.4	2.3	2.3	2.3	-	-
リン	2.4	0.9	0.9	0.6	-	-

合計して100%にならないのは、炭水化物、水分が表示していないため。

(3) ウニ用配合を高タンパク・中タンパク・中タンパクβカロチン含有・低タンパクの4種類作製し、約60日間十分量給餌飼育したアカウニ（平均殻長16.1mm）を前述した方法で浸漬感染し、1L容器に5個体ずつ各区2容器実施し、平均生残率の推移をみた。対照区はホンダワラを主として給餌したアカウニ（平均殻長16.5mm）を用いた。なお、タンパク含量の異なる配合餌料の成分を表1に示した。

## 結果

(1) 生残率の推移を図3に示した。アカウニ配合餌料区では生残率95%となったのに対して、オキアミ区では75%，ホンダワラ区では60%，ワカメ区では45%，ヒジキ区では35%，アラメ区では30%となった。なお、ウニ用配合区とその他試験区では有意な差がみられた ( $p < 0.05$ )。また、ウニ用配合区では、その他試験区と比べて、肉眼的にアカウニの殻皮の赤紫の色彩が強く感じられた。

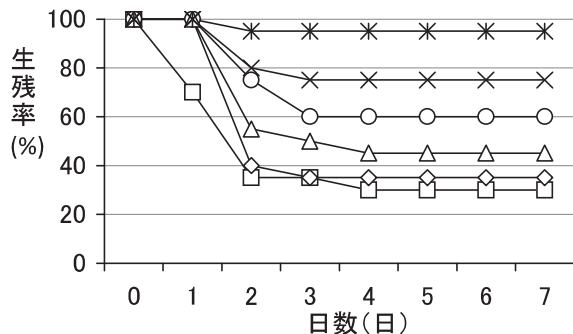


図3 餌料別給餌による生残率の推移。

□, アラメ区; ◇, ヒジキ区; ○, ホンダワラ区;  
△, ワカメ区; ×, オキアミ区; \*, ウニ用配合区。

(2) 生残率の推移を図4に示した。ホンダワラ区においては褪色、斃死が最も顕著であった。エビ用（無添加）区が最も斃死が少なく、次いでウニ用配合区、エビ用配合ペプチドグリカン含有区の順であった。なお、対照区と比べると全て有意な差がみられた ( $p < 0.05$ )。

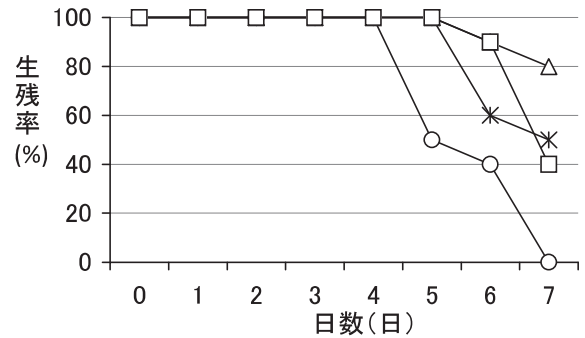


図4 配合餌料別給餌による生残率の推移。

○, ホンダワラ区 (対照区); \*, ウニ用配合区;  
△, エビ用配合区; □, エビ用配合区 (ペプチドグリカン含有)。

(3) 生残率の推移を図5に示した。配合餌料の各区に比べ、ホンダワラ区が最も早く斃死し殻表面の褪色も顕著であった。配合の各区の生残率は若干異なるものの、タンパク質含量、添加物等の違いはわからなかった。なお、対照区と比べると全て有意な差がみられた ( $p < 0.05$ )。

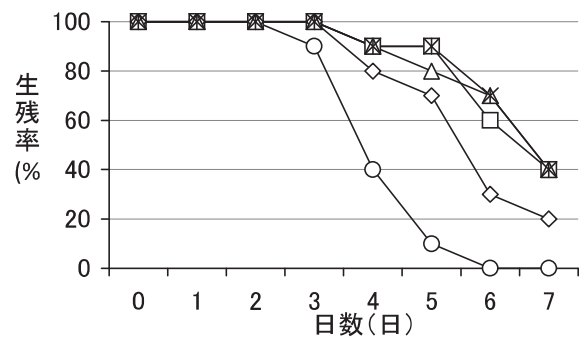


図5 タンパク質含有量別餌料給餌による生残率の推移。

○, ホンダワラ区 (対照区); □, 高タンパク配合区;  
◇, 中タンパク配合区; △, 低タンパク配合区。

## 実験3 水温別感染試験

### 材料および方法

(1) 実験には、水温13℃下で飼育したアカウニ（平均殻長15mm）を前述した方法と同様に浸漬感染を行った。浸漬感染後は、13℃の海水中に3時間収容した区、19℃の海水に3時間収容、25℃の海水に3時間収容または、24時間収容した4試験区を設定し、その後、試

験区ごとに滅菌海水を満たした8 L容器に、飼育水を13℃、通気あり、無給餌条件下で観察した。なお、各試験区10個体ずつ2容器実施し、平均生残率の推移をみた。

- (2) 水温別(9℃, 12℃, 15℃, 18℃)で30日間飼育したアカウニ(それぞれ水温別毎に平均殻長8.8mm, 9.3mm, 10.5mm, 11.2mm)を供試した。なお、低水温では摂餌が低下し、成長が滞るため、30日間の飼育によって、平均殻長に差がみられた。浸漬感染試験は、前述した方法で行ったが、浸漬感染中も水温は各々の水温別で行った。浸漬感染後の飼育は、各々水温で飼育し、その他の条件は同様として、各試験区10個体ずつ2容器実施し、平均生残率の推移をみた。

### 結果

- (1) 生残率の推移を図6に示した。25℃-24時間区および25℃-3時間区では、生残率100%であったのに対して、19℃-3時間区では生残率が5%と最も低くなった。13℃-3時間区では、生残率65%となった( $p < 0.05$ )。

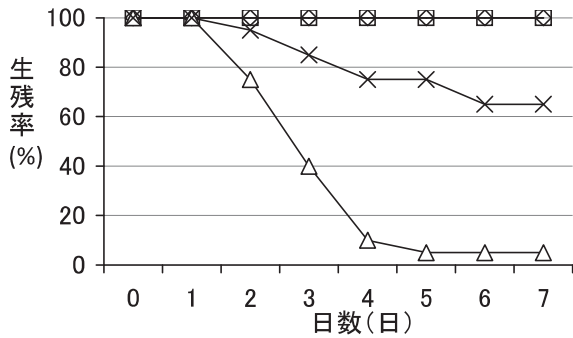


図6 感染初期の一定時間昇温による生残率の推移。

◇, 25℃-24h区; □, 25℃-3h区; △, 19℃-3h区; ×, 13℃-3h区。

- (2) 生残率の推移を図7に示した。18℃飼育区では100%であったのに対して、15℃区では70%、12℃区では15%、9℃区では0%となり、18℃飼育とその他の試験区では有意な差がみられた( $p < 0.05$ )。

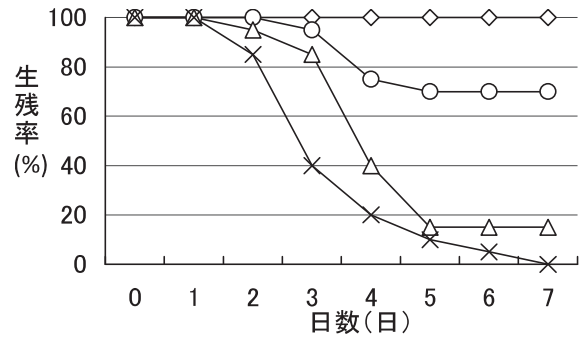


図7 水温別飼育による生残率の推移。

◇, 18℃区; ○, 15℃区; △, 12℃区; ×, 9℃区。

### 総合考察

塩分濃度の異なる飼育海水で感染試験を行った結果、60‰海水で飼育したアカウニのほうが、生残率が高い傾向がみられた。しかし、今回の試験で、約2ヶ月間低塩分下で飼育を行ったところ、アカウニは低塩分に弱く、摂餌の減退が大きく、成長が著しく滞ることが明らかになった。このため、種苗生産時の棘抜け症対策として低塩分海水による飼育を行うことは実用的ではないと考えられた。

餌料別感染試験については、海藻類(アラメ、ヒジキ、ホンダワラなど)のみ投与したアカウニに比べ、配合飼料を投与したアカウニの生残率は有意に高い結果となった。海藻類のみを給餌した区では、棘抜け症感染部位の殻皮の黒斑点が配合飼料区と比べ大きい傾向がみられた。配合飼料を給餌したアカウニは、殻皮の色が赤紫の色彩が強くなることが肉眼的に感じられた。

当センターにおけるアカウニ種苗生産では、給餌用餌料のほとんどを天然海藻に依存しているが、海藻のみでは何らかの成分が不足していることも考えられた。次にウニ用配合飼料やエビ用配合飼料の違いやタンパク質の含有量の感染に影響を及ぼすかの試験を行ったが、生残率の違いに差はみられず、タンパク質含量は15%以上あれば十分であることが考えられた。しかし、感染試験に用いた棘抜け症原因菌の病原性が強い場合は、図5のように配合飼料を給餌しても、疾病を完全には防除できず、棘抜け症の防除法の確立には至らないものと考えられた。

浸漬感染後すぐに昇温した飼育水温に3時間および24

時間収容する試験を行った結果、水温25℃に移したアカウニでは、24時間および3時間ともに斃死がみられず、感染防除効果があるように思われた。しかし、13℃区より19℃区の方が多く斃死する結果となり、不明瞭な点もみられた。感染が成立するかしらないかの時点での昇温は防除効果がある可能性が示された。しかしながら、種苗生産現場で原因菌が付着直後の未発症個体を確認することができず、現状では短期昇温処理による防除は困難であると考ええる。

各水温別に飼育したアカウニを用いて、棘抜け症感染試験を行ったところ、18℃ではアカウニの生残率が100%であったのに対して、12℃、9℃では生残率10%程度となり、有意な差がみられた。この結果から、アカウニ種苗生産において、水温を18℃以上に昇温すると、棘抜け症の発生を防除することができるものと考えられた。

以上の結果から、配合餌料を与えることで一定の防除効果が示されたが、疾病防除までは至らず、種苗生産の量産規模での飼育では、飼育水温を昇温することで防除できると考えられた。しかし、疾病が発生する時期の飼育水は11℃付近であり、その海水を18℃以上に昇温することは、多大な経費がかかるだけでなく、昇温に伴う注水量を抑制することによる飼育環境の悪化も懸念され、現に環境悪化が引きがねと考えられる滑走細菌症による

斃死も報告されている<sup>8)</sup>。このため、今後は棘抜け症原因菌の性状をより詳細に研究することで、新たな防除方法の開発を行っていく必要がある。

## 文 献

- 1) 伊東義信・山田 徹・有吉敏和・野田進治・伊藤史郎(1985):ウニ類(アカウニ, バフンウニ, ムラサキウニ)の種苗生産の現状と問題点. 佐裁セ事報 昭和55~58年度, 79-96.
- 2) 真崎邦彦・野口弘三・金丸彦一郎(1988):アカウニの種苗生産過程における稚ウニの大量斃死について. 西海区ブロック藻類・介類研究会報, 5, 45-59.
- 3) 金井欣也(1994):日本水産学会秋季大会シンポジウム要旨II-1, 7.
- 4) 金井欣也(2007):アカウニ・細菌病・棘抜け症, 緑書房, 新魚病図鑑, 275.
- 5) 川原逸朗・後藤政則・真崎邦彦(1993):種苗生産過程にみられるアカウニ稚ウニの大量斃死を防ぐ飼育方法の検討-I(予報). 佐裁セ研報, 2, 45-50.
- 6) 川原逸朗・後藤政則・野口弘三(1995):罹病バフンウニ浸漬海水によるアカウニ稚ウニへの感染実験. 佐裁セ研報, 4, 109-110.
- 7) 真崎邦彦(1994):棘抜け症(仮称)に罹病したアカウニ稚ウニの病変部位から観察された細菌について. 佐裁セ研報, 3, 105-106.
- 8) 浜口昌巳・川原逸朗・薄 浩則(1993):夏期に発生したアカウニの細菌感染症. 水産増殖, 41(2), 189-193.