

(資料)

アカウニ種苗生産の現状と課題

野口浩介

(Material) The present conditions and problems on seedlings culture technology of the Sea Urchin *Pseudocentrotus depressus*

Kohsuke NOGUCHI

ウニ類は世界に約950種、日本には約160種が生息するとされている。これらのうち食用となるものは、漁獲量の少ないツガルウニ、ガンガゼなどを除くと、エゾバフンウニ、キタムラサキウニ、バフンウニ、ムラサキウニ、アカウニ、シラヒゲウニの6種である。これら6種については、経済的価値が高いことから、資源量増加のための様々な取組が行われ、その一つの柱である種苗放流を目的とした種苗生産が全国各地で行われている。

九州北部に位置する佐賀県玄海域には、この6種のうち主に暖水系のバフンウニ、ムラサキウニ、アカウニが分布しており、佐賀県では1976年からアカウニ、1978年からバフンウニ、1981年からムラサキウニの種苗生産技術開発に取り組み、現在は漁業者からの要望が強いアカウニとバフンウニの2種の生産を行っている。アカウニは佐賀県玄海水産振興センター（以下、当センター）で、バフンウニは（公益社団法人）佐賀県玄海栽培漁業協会で、年によって異なるが、殻径10mm程度の種苗をそれぞれ50～100万個体程度生産し、放流用種苗として供給している。なお、アカウニは一部を養殖用種苗としても配布している。

本報では、当センターで行っているアカウニの種苗生産技術を纏めた。なお、佐賀県におけるこれらの取組については、アカウニの種苗生産マニュアル¹⁾（当センターのHPよりダウンロード可能）などで過去に紹介している²⁻⁴⁾。基本的な種苗生産や養殖の技術はそれらと共に通しているが、それらから数十年経過し、技術的に進歩した部分もある。また、アカウニを取り巻く現状も若干変

化しているため、本報では、過去の紹介や既存のマニュアルと異なる部分、近年の取組状況等を中心に取り纏めた。

アカウニは暖水系のウニの中で最も経済的価値が高く、平成23年度は兵庫、福岡、佐賀、長崎、熊本、大分、鹿児島の7県で種苗生産が行われている。過去10年間の全国でのアカウニの生産量は300～400万個体程度、当県では50～100万個体程度で推移している（図1）。

アカウニ種苗生産の歴史は古く、基本的な生産技術は確立し、現在では概ね安定した生産が可能となっている。しかし、年によって通称「棘抜け症」と呼ばれる疾病による大量斃死が起こる場合がある。この「棘抜け症」は主に1～3月の低水温期に発症する細菌性の疾病で、発症から数日で数十万個体のアカウニ種苗が斃死するといった深刻な被害が出ることがある。そのため、当センターのアカウニ種苗生産の方法は、この「棘抜け症」対策を目的として改良を重ねてきたものである。以前に比べ発症する頻度は減少し、また発症した場合の対処方法も確立されつつあるが、未だ根本解決には至っておらず、この疾病からの完全防除がアカウニの種苗生産における最重要課題となっている。

当センターにおけるアカウニの種苗生産工程を表1に示した。当センターでは過去において春期生産（春に採卵）を行っていた時期もあるが、現在は秋期生産（秋に採卵）のみ行っている。

1. 親ウニ養成

当センターの生産方法の特徴の一つが、「親ウニ飼育水温の制御による産卵時期の前倒し」である。佐賀県の天然海域におけるアカウニの産卵期は10月下旬頃であるが、その時期は水温の下降期にある。アカウニの成長は、10～20℃の範囲であれば高い方がよく、飼育水温が成長に及ぼす影響は殻径の小さいものほど顕著である⁵⁾。また、先に述べた「棘抜け症」の発症リスクや発症後の斃死率は小型個体の方が高くなる傾向がある⁶⁾。このため、当センターでは、10月下旬よりも早い時期に採卵し、高水温時に飼育することで成長を早め、それによる飼育期間の短縮や「棘抜け症」のリスク低減を図っている。

親ウニは、最低水温期の2月から25℃に昇温して5月まで飼育し、6月からは採卵日まで20℃で飼育している。つまり水温を天然の海域よりも2ヶ月程度前倒しして変化させることで、天然よりも2ヶ月早く、8月下旬からの採卵が可能となる。一方、水温制御にはコストがかかるため、当センターでは恒温循環型の飼育水槽を用いて0.5回転/日程度の注水量で飼育を行っている。更に低コストで実施可能な水温制御の方法を開発することが今後の課題である。

親ウニの養成で重要な点は「良質の餌料を十分量与えること」である。餌料は、5月までは入手可能な天然の海藻（アラメ、クロメ、ヒジキ、ホンダワラ類等）を、6月以降は培養した不稔性のアナオサをそれぞれ十分量給餌し、ウニの飼育容器内に常に餌がある状態を維持している。養成期の餌料の質や給餌量によって産卵量や卵質が左右され、最終的にそれが種苗生産の成績を左右すると考えている。

2. 採卵

年によって若干異なるものの、採苗（浮遊幼生を付着珪藻板等の付着基質に着底させ稚ウニに変態させること）の際に水温が25℃以上になると採苗率が低下する⁷⁾ため、自然水温が25℃以下となる時期と浮遊幼生飼育期間（15～20日）から計算し、9月中旬～下旬に1回目の採卵を行っている。

ウニ類は雌雄異体であるが、アカウニは外見での雌雄判別はできない。このため、採卵の半年以上前の12～1月に0.5モルのKCLを0.1ml体腔内に注射し放卵・放精を行わせ、雌雄を判別して飼育すれば効率的な採卵

が可能となる。殻長50mm程度のアカウニの産卵量は、個体当たり300～1,000万粒程度であり、当センターでは1回の採卵で殻径50～70mm程度の親ウニを20個体程度用い、2,000万～5,000万粒程度の卵を得ている。

採卵は、生殖巣を収縮させる作用があるKCL（塩化カリウム）を用いて行っている。親ウニの口器を除去した後、殻内を海水で洗い（体腔液中にある生殖巣収縮を阻害する物質等を取り除くため）、0.5モルのKCLを0.5ml注入する。十分に成熟が進んでいれば、KCL注入後、1分以内に放卵・放精する（写真1）。卵は十分量（500～1,000万粒程度）産卵したもので、色が黄色っぽいもの、精子は多量に放精されたものを使用している。ここで、遺伝的な偏りをできるだけなくすため、できるだけ多くの親ウニを用いるようにしている。使用する卵と精子が決定したら、受精させ、卵数の計数、洗卵作業を行う。なお、未受精の卵は物理的な衝撃に弱いため、卵数の計数や洗卵等の作業は受精して受精膜形成が確認された後に行っている。

洗卵は多精受精による発生の異常（奇形）を防ぐ目的で行っており、卵を海水中に収容し、沈降させた後に上澄み液を捨てて、精子濃度を希釈する沈殿法と卵径より細かい目合のメッシュに収容し、海水を掛け流して行うメッシュ法がある。当センターではウニ類は卵の比重が高く、沈降にそれほど時間を要さないことから、前者を採用している。

洗卵終了後、孵化槽に収容し、翌日には孵化した幼生を収容している。なお、洗卵後、孵化槽を用いず、幼生飼育水槽に直接受精卵を収容し、孵化させる方法もあるが、その場合、作業の効率化が図られる一方、収容幼生



写真1 アカウニの採卵（右；メス、左；オス）

数を確実にはコントロールできないこと（孵化率に左右される）、孵化率や孵化幼生の動き、奇形率等で生産に使用する幼生の優先順位をつけることができないという短所もあり、当センターでは孵化水槽を使用する方法を採用している。水温 20°C であれば受精後 18～24 時間程度で孵化し、孵化率、孵化幼生の動き（動きが活発なもの）、奇形率等で優先順位をつけ、回収・計数後に幼生飼育水槽へ収容している。通常、孵化率は 90% 以上となっている。

なお、採卵から孵化、またその後の幼生飼育に用いる海水は、紫外線殺菌後、 $1\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、20°C に調温したものを使用している。

3. 幼生飼育

ウニ類の幼生は、胞胚期、囊胚期を経てプリズム幼生となりその後、四、六、八腕期プルテウス幼生を経て稚ウニへと変態する（写真2）。この期間の飼育を幼生飼育と呼び、当センターの飼育方法では 15～20 日間を要する。飼育容器は 1 kL の円形ポリカーボネイト水槽を用いており、幼生の収容密度は 1～1.2 個体/ml すなわち 100～120 万個体 / 水槽で飼育している。これ以上の飼育密度では生残率が低下するなど飼育成績が安定しないことがこれまでの経験から判明している。餌料にはキートセロス・グラシリス（最近はキートセロス・ネオグラシーレと呼ばれている）を単独給餌している。当センターでは自家培養したものを使用しているが、一般

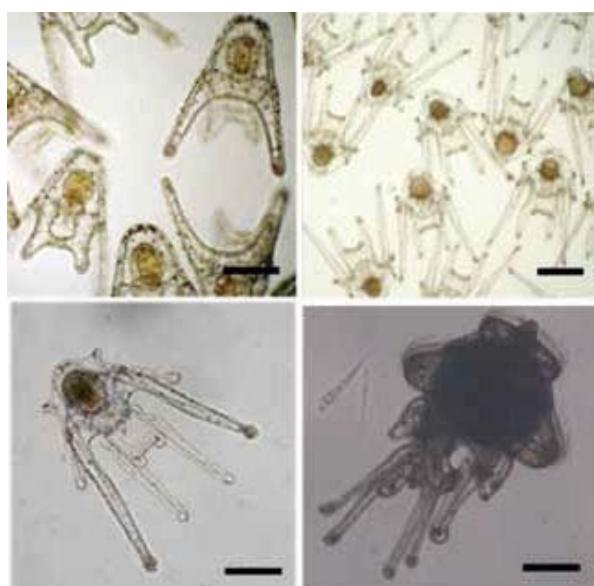


写真2 アカウニのプルテウス幼生
スケールバー：300 μm

に販売されている濃縮冷蔵品を用いても飼育は可能である。なお、グラシリスに加え緑藻類のドナリエラを給餌することにより幼生飼育期間が通常より 2～3 日短縮した事例はあるものの、培養の手間、コスト等を考え、現在はグラシリス単独給餌としている。

給餌は幼生収容日の夕方より開始し、幼生の成長に伴ってグラシリスを 0.5～5.0 万細胞 / ml の範囲で徐々に増加させながら与えている。餌料密度の増減は、当日の残餌量と過去の飼育事例を参考に判断している。給餌は前日からの残餌の確認、換水・底掃除が終了してから行い、5 万細胞 / ml の量を給餌する場合（500 万細胞 / ml のグラシリス 10L）でも、分割して給餌するのではなく、一度に全量を給餌しても問題ない。

換水方法は、幼生収容後 4 日目から 40～60% の飼育水を毎日一度に交換する、定期換水を採用している。この方法は、常に微量の注・排水を行う連続換水と比べ、餌料のロスが少ない、飼育水温の調整にかかるコストが少ない、飼育設備が単純等のメリットがある。一方で、残餌の状況や水質悪化に気をつけなければならないというデメリットもあるため、当センターでは、毎日の残餌チェックや必要に応じた底掃除を行っている。

残餌の量や底掃除による水槽底面の状態を把握することは、飼育状況を判断するためにも重要である。飼育が良好な場合は飼育期間を通して残餌が少なく（0.5 万細胞 / ml 以下）、水槽の底面は死骸や奇形個体が少ない清潔な状態である場合が多い。残餌が多い、水槽底面に死骸や奇形個体が多いといった場合は、たとえその時点で浮遊している幼生の状態が良好な場合でも、徐々に成長（変態）の遅れや斃死の増加等が起こることがある。このような場合は飼育経過をより注意深く観察し、状況によっては底掃除の頻度や換水率の増加等の対処を行うことが重要である。

通気は $\phi 50\text{mm}$ のエアストーン 1 個を水槽底面中央部に設置し、0.5～1.5L / 分程度の範囲で幼生の成長に応じて増加させていている。通気量が少ないと水槽底面に幼生や残餌、排泄物等が沈降しやすくなり、強すぎると幼生が物理的な損傷を受けるため、水槽内での幼生の浮遊状況を確認しながら調整している。

以上の飼育条件下での生残率は、通常 80% 以上で安定しているが、まれに幼生の奇形率が高い場合や、幼生が大量に水槽底面に沈降するといった飼育不良が発生す

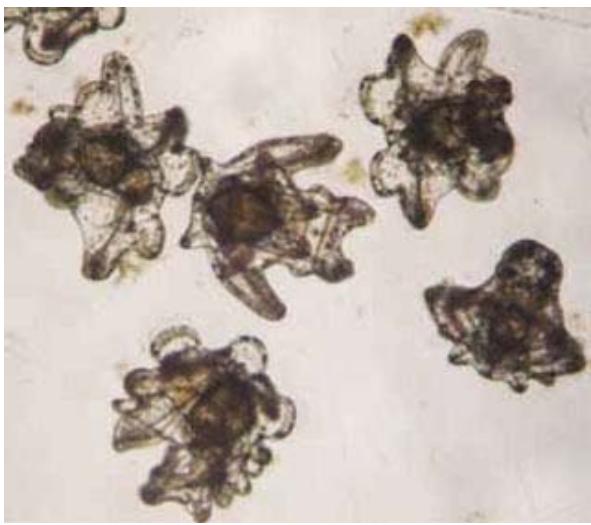


写真3 アカウニ幼生の奇形個体 (正常なものより腕が短い)

る(写真3)。この原因は今のところ特定できていないが、良質な卵・幼生が得られなかつた場合や培養不調の餌料を投与した場合が多いように思われる。このようなことから、アカウニの幼生飼育では、良質な幼生すなわち孵化率が高く、孵化直後の動きが活発で、奇形率の少ないものを用いること、良質な餌料すなわち原生動物や細菌類の混入が少なく、対数増殖期（増殖率がよい時期）のものを用いることが重要であり、それらを遵守すれば安定した飼育が可能なレベルまで技術は確立されている。

4. 採苗

採苗とは浮遊幼生を付着基質上で稚ウニへと着底・変態させる工程のことをいう。

幼生を飼育水槽から回収し、付着基質である付着珪藻



写真4 付着珪藻板 (塩化ビニール製波板 32 × 40cm)

板（以下、付着板）（写真4）を設置した水槽に収容し、稚ウニへ変態させる（写真5, 6）。



写真5 採苗作業風景



写真6 変態直後のアカウニ (殻径 0.5mm程度)

5. 採苗するタイミングの判断

採苗の工程に移るタイミングは、下記の方法で判断している。

当センターの飼育方法では、経験的に幼生飼育開始後20日目前後での採苗となる例が多いが、各水槽の採苗実施は、幼生の発達状況と簡易的な採苗試験の結果を考慮し、採苗当日の朝に判断している。

なお、幼生の発達状況とは、ウニ原基（幼生の体の中にある、稚ウニのもとになるもの）の大きさ、腕の長さ（発達が進むにつれ次第に短くなる）、幼生飼育水槽底面にいる管足を出している個体や稚ウニへ変態している個体の割合等を示す。また、採苗試験とは、幼生を採苗に使用する付着板が入ったシャーレ内に収容し、翌朝に稚ウニへ変態した割合を算出するという方法のことであ

る。幼生の発達が十分に進み、かつ採苗試験での変態率が70%以上となった日に採苗を行う。

6. 通気と注水

採苗時は、幼生が均一に付着するようにエアレーションで攪拌する。弱すぎると幼生の付着板への遭遇率の低下や、付着板間における付着数の偏りが生じるので、強めに（水槽の縁で1cm程度波立つ程度の強さ）行っている（写真5）。また、流水にすると排水側に付着が偏るため、大部分の幼生の変態が終了する。なお、収容後1～2日程度は止水としている。

7. 付着板の設置方向

付着板は、水槽底面に対して垂直方向に設置する。付着板当たりの付着数は水平方向に設置した方が多い傾向にあり⁸⁾、以前は水平に設置していたが、水平置きは、垂直置きに比べ付着板の上下で付着数が偏る、水槽当たりの付着板の設置数が減少する等の短所もあり、現在では、幼生飼育成績が安定し、十分な幼生数を収容できる状況であるため、垂直置きとしている。

8. 採苗率とその値に対する考え方

また、十分な幼生数を採苗に用いることが可能であるため、以前行っていた、採苗率を高める効果のある、ヒジキの投入⁹⁾やKCLを用いた変態誘起¹⁰⁾も行っていない。これらにより、採苗率は以前の50%前後から30%前後へと低下しているものの、30%前後で安定しているため、生産に大きな影響はない。

幼生は同一生産群でも、個体間で成長・変態にはらつきが生じる。そして、同じ生産群内での比較では、早い段階で稚ウニへ変態可能となった幼生の方が稚ウニ変態後の成長も良い傾向にある¹¹⁾。採苗率の低下は、効率的な生産には反するものの、大きな支障が無い範囲であえて低く維持することで、優良な形質をもつ個体のみを稚ウニへ変態させ、選抜している側面もある。ただし、これは、アカウニの幼生飼育成績が安定している場合のみ可能となるため、幼生飼育が不調である場合は、先に述べた採苗率を高める対応が必要となる。

なお、収容する幼生数は、付着数の目安を付着板あたり300個体としているため、採苗率30%として、付着板あたり1,000個体程度としている。

9. 付着珪藻培養

工程の順番が前後するが、付着珪藻の培養方法について説明する。

付着板に繁茂させた付着珪藻は、幼生から稚ウニへの変態促進（作用機序は解明されていないが、付着珪藻単体ではなく、付着細菌等が共存した微生物フィルムでの作用と考えられている¹²⁾）、およびその後の餌料としての役割がある。以前はアカウニに対して餌料価値が高い单一珪藻を使用していたが¹³⁾、培養に手間がかかることや採苗率が低い等の短所があり、現在では自然に増殖する天然の珪藻を使用している。

10. 当センターの培養方法の特徴

当センターの付着珪藻の培養方法の特徴は、止水培養であることと培養期間が比較的長いことが挙げられる。採苗に使用する1ヶ月半～2ヶ月前に培養を開始し、1～2週間に一度程度の定期的な換水・施肥・洗浄等の作業を行っている。

止水培養は、流水培養に比べ、種組成の季節変動が少なく安定的な培養が可能、付着珪藻を食害するシオダマリミジンコ（写真7）の注水からの侵入が少ない、取水ポンプの電力が抑えられる等の長所がある。長い培養期間を設けている理由としては、付着珪藻の細胞密度を高め（100万細胞/cm²以上）、稚ウニの高成長を図るためにある。アカウニは、付着板を用いてほぼ同様の方法で生産を行うアワビ類やマナマコと比べると、変態直後から付着珪藻に対する摂餌圧が高く、採苗後に付着珪藻を増殖させることは困難である。そのため、手間はかかるものの、初期の高成長を図るためにには、採苗前に十分に繁茂した付着珪藻を準備しておくことが重要と考えている。



写真7 シオダマリミジンコ *Tigriopus japonicas*

11. 採苗直前の処理

付着珪藻を食害し、アカウニにとって餌料の競合種となるシオダマリミジンコを、炭酸ガス¹⁴⁾ や KCL¹⁵⁾ での処理を行って、採苗水槽に付着板を収容する前に除去している。

12. 稚ウニ飼育

当センターでは、付着板上で付着珪藻を主の餌料とする、概ね採苗後 60 日間の飼育を 1 次飼育、その後トリカルネット製のカゴを飼育容器とし、海藻や配合飼料を主の餌料とする飼育を 2 次飼育としている。なお、飼育期間中は原因菌の注水からの侵入を防ぐため¹⁶⁾、紫外線を照射した海水を使用し、飼育を行っている。

13. 1次飼育

(1) 付着珪藻の維持

採苗から 1 ~ 2 日後に浮遊している幼生が減少した段階で流水とし、1 次飼育を開始する。1 次飼育においては付着珪藻が主の餌料となり、初期の高成長・高生残を図るため、付着珪藻の細胞密度の維持を主眼に置いた飼育管理を行っている。具体的には、照度管理、栄養塩の添加（施肥）、付着珪藻を食害するシオダマリミジンコの侵入防除を行っている。

(2) 照度管理

照度管理は、水槽の上面に設置する遮光幕（遮光率 70% と 50%）を用いて行っている。基本的には、採苗から 1 週間程度は 70%（晴天時で水面の照度が 5,000Lux 程度）、その後 2 週間程度は 50% の遮光幕を使用し（晴天時で水面の照度が 10,000Lux 程度）、それ以降は遮光幕を撤去した状態で飼育している。また、週に 1 回程度の反転（付着板の上下を入れ替える）作業を行い、均一に付着珪藻を繁茂させるよう努めている。

(3) 栄養塩の添加

栄養塩の添加は、以前は農業用肥料を飼育水中へ添加したが、現在は飼育水槽内に垂下設置するイオンカルチャーパック（不動テトラ社製）とゲルカルチャー（第一製鋼社製）を、1 水槽（15kL）当たり、それぞれ 2 kg ずつを目安として設置し、省力化している。

(4) シオダマリミジンコの侵入防除

注水から侵入する、餌料競合種であるシオダマリミジンコは、大きさが最小で 50 μm 程度であるため、注水

に 25 μm 程度のカートリッジフィルターを設置して侵入を防いでいる。前述した採苗直前の処理とカートリッジフィルター設置により、採苗後 1 ヶ月程度は増殖を抑えることが可能である。

(5) 付着数の計数と飼育密度調整

採苗から 5 日後にウニ付着数の計数を行っている。抽出率 1 % で無作為に選んだ付着板の付着数を計数し、1 水槽当たりの付着数を推測している。具体的には付着板 10 枚 1 セットとして 100 セット収容（付着板 1,000 枚 / 水槽）しているため、無作為に選択した 10 枚を計数している。この結果をもとに飼育密度の調整を行っている。採苗時には付着板 1 枚に 300 個体を目安に付着させているが、その後の飼育では付着板 1 枚あたり 150 個体程度が適当であるため、差し替え・分槽作業（稚ウニが付着している付着板と、付着珪藻のみの付着板を 1 枚おきに交互に設置し、水槽数を 2 倍に増やす）を行っている。

(6) 稚ウニの成長と成長に応じた餌料系列

稚ウニの成長に応じて、付着珪藻以外の餌料の給餌を開始する。平均殻径が 2 mm を目安にアナアオサの給餌を（写真 8）、平均殻径 4 mm を目安にホンダワラ類などの天然海藻を給餌する。

以上の方法で飼育した場合の成長を図 1 に示す。採苗後 50 日で平均殻径は 5 mm 程度に成長する。なお、1 次飼育における生残率は概ね 80% 以上となっている。

14. 2次飼育

(1) カゴ飼育

採苗後 60 日頃から、カゴ飼育に移行する。カゴは、トリカルネット（N-598）製で、大きさは 75 × 75 × 35 cm、中にネトロン製のシェルターを設置して飼育している（写真 9）。

飼育密度は平均殻径が 5 ~ 10 mm で 3,000 個 / カゴ、それ以上の大きさでは 2,000 個 / カゴを目安とし、餌料は、海藻類や配合飼料を用いて、十分量となるよう給餌し飼育している。

(2) カゴ飼育の長所

カゴ飼育の長所は、付着板やモジ網生け簀での飼育に比べ、移動を容易に行えることである。カゴ底面や水槽が汚れた場合は近くの新しい水槽に移動すればよく、底掃除等が省力化となるだけでなく、飼育環境の悪化を気にすることなく、海藻類や配合飼料を給餌できる。



写真8 採苗後30日のアカウニ種苗（殻径3mm程度）



写真9 アカウニ2次飼育用のカゴ

また、移動が容易であることは棘抜け症が発症した場合にも利点がある。棘抜け症の原因である「棘抜け菌(通称)」は低水温下で活性が高く、飼育水温を上げることで活性が低下し、新たな発症や蔓延を防ぐことが可能である。当センターでは、ウニ種苗の大部分を昇温のできない屋外水槽で飼育しているため、棘抜け症の発症を確認後、速やかに昇温可能な屋内水槽へ移すことが可能となり、被害の拡大を防ぐことができる。

なお、昇温する際には、コスト低減のため3～5回転/日程度に注水量を減らさなければならず、それにより飼育環境の悪化が起こり、場合によっては別の疾病である滑走細菌症を併発すること¹⁷⁾があるが、カゴ飼育であれば、頻繁に水槽替えが可能であり、飼育環境の悪化を最小限に抑えることが可能となる。

(3) 2次飼育の餌料

2次飼育の主となる餌料は、当センター付近の海岸に打ち上げられたホンダワラ類を中心とした寄り藻(以下、

天然海藻)とアワビ用の配合餌料(日本農産社製)である。また、補助的に、培養したアナアオサ、養殖ワカメ、ヒジキ、乾燥チガイソ等を使用している。

(4) 2次飼育の餌料が備えるべき条件

2次飼育に使用する餌料が備えるべき条件は、供給の面から、大量に、安定的に、安価に供給可能であることで、給餌の面からは餌料価値が高い(アカウニの成長や生残に有効な栄養成分が多い)、嗜好性が高い、給餌により飼育環境を悪化させないことも重要である。それらを、これまでの知見^{5,18)}や飼育経験をもとに、餌料種類毎に4段階で評価すると表2のとおりとなる。アカウニの殻径10mmサイズを100万個体生産するためには大量の餌料(天然海藻は10トン、配合餌料は0.5トン程度)が必要となるので、各餌料の特徴をふまえた上で、状況に応じながらそれらを上手く併用し、常に十分量の給餌を行うことが大切である。

(5) 餌料価値

アカウニの栄養要求には未解明な部分があるが、各餌料の餌料価値(栄養特性)を評価する栄養成分として、餌料中のタンパク質とカロテノイド色素が重要と考えている。

(6) 餌料中のタンパク質

アカウニ餌料の至適タンパク量は、カゼインをタンパク質源とした精製飼料では20%であることが知られている¹⁹⁾。また、作用機序は不明であるが、餌料中のタンパク質が多い(15%以上)と、棘抜け症の発症が抑えられる傾向があることも判明している²⁰⁾。主の餌料である天然海藻のタンパク質含量は概ね10%程度(乾燥重量比)であり、それだけではタンパク質が不足するため、タンパク含量が30%程度と高い、アワビ用配合餌料を併用給餌している。

また、タンパク質はその量だけでなく、それを構成するアミノ酸のバランスも重要と考えられている^{21, 22)}。アカウニの必須アミノ酸は未解明であるが、タンパク質含量の高い配合餌料にはそれを構成するアミノ酸も多く含まれている²³⁾ので、配合餌料を併用給餌することは、アミノ酸バランスを保つためにも有効と考えている。なお、配合餌料および天然海藻を各々与えたアカウニの成分分析結果を表3に示した。

(7) カロテノイド

カロテノイドとは緑黄色野菜や海藻類(褐藻類に多い)に多く含まれる色素で、ウニ類では生殖巣に大部分が存在

しており、成熟、産卵、発生だけでなくウニ類の免疫機能に大きな役割を果たしていることが知られている^{24, 25)}。具体的には、ウニ類の免疫機能の一つである食作用の貪食活性には餌料中のカロテノイド、特に、 β カロテンとその代謝物である β エキネノンが重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。

当センターの β カロテン含有量の分析結果では、アワビ用の配合飼料が0.1mg/100g程度であるのに対し、天然海藻類は1～1.5mg/100g程度と配合飼料の10倍以上の含有量がある。

棘抜け症をはじめとした疾病を防除するためには、種苗の免疫力を高めることが重要である。よって天然海藻は、免疫力を高める効果のあるカロテノイドを供給するという点でも重要な餌料であると考えている。ただし、至適な種類や量に関しては不明な点が多くあり、それらを解明することは今後の課題であろう。

(8) 2次飼育における成長・生残

2次飼育における成長は、採苗後90日で平均殻径10mm、採苗後120日で平均殻径15mm程度である。このため、当センターの標準的なスケジュール（9月下旬採卵、10月上旬採苗）における10mmサイズの出荷作業は、採苗後90日前後の1月の上旬頃より開始している。なお、2次飼育における生残率は、棘抜け症の発症が無ければ90%以上で安定している。

15. 取り上げ・出荷

出荷の際には、剥離後、ステンレス金網の篩い（10mmサイズでは対角線14～16mmを使用）で選別し、各漁協、漁業者に配布している（写真10）。

棘抜け症は、殻皮への物理的損傷があると発症しやすいため、剥離・選別作業では種苗の取り扱いに十分注意している。また罹病した種苗により、天然海域に棘抜け菌を持ち込むことがないよう、剥離・選別後に1週間程度飼育し、異常が無いことを確認してから出荷している。

このように、棘抜け症の防除方法を確立することがアカウニ種苗生産の最重要課題であり、当センターにおけるアカウニ種苗生産は、主にこの「棘抜け症」対策を目的として生産技術の改良を重ねてきたものである。そこで「棘抜け症」について現時点で判明していることを纏めておく。



写真10 配布直前のアカウニ種苗

16. 棘抜け症の歴史

当センターでは今から37年前の1976年度にアカウニの種苗生産を開始した²⁶⁾。1978年度には殻径3～7mmサイズのアカウニを約100万個体生産できるようになったが、1981年度の冬季に殻皮表面の黒斑形成、脱棘などを病徵とする大量死が発生した⁶⁾。これが、当センターにおける「棘抜け症」の始まりである。この「棘抜け症」は、1981～1992年度までは発症に差はあるものの毎年発生したが、その後1999年度まで発生しなくなっている。そして2000年度から2005年度まで、再び棘抜け症が猛威を振るうようになった。特に2002年度には、アカウニ種苗の約95%が死亡し、また種苗生産現場だけなく、海上で養殖されているアカウニならびに天然アカウニが死亡するほどの被害が発生した²¹⁾。最近では2012年度、約7年ぶりにアカウニ種苗生産において棘抜け症による死亡が発生した（写真11）。



写真11 棘抜け症により大量死したアカウニ

なお、(公社)佐賀県栽培漁業協会が種苗生産を行っているバフンウニでは、2008年度より棘抜け症が発生するようになり、種苗生産の大きな障害となっている。

17. 棘抜け症の原因

棘抜け症については、川原ら²⁷⁾や真崎²⁸⁾の研究で、発症したアカウニを滅菌海水に漬けて作製した浸漬海水に起病力があること、浸漬海水を孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過するとその起病力が失われること、および病变部の透過型電顕像に多数の長桿菌が観察されることから、細菌性疾病ではないかと考えられたが、原因菌の分離・培養ができなかつたため、原因を特定するには至らなかつた。

その後、長崎大学の金井教授の研究により、ウニの殻抽出液を成分とする寒天培地（以下、ウニ培地）を用いることで、初めて罹病アカウニから屈曲性に富むグラム陰性桿菌が分離され、疾病の再現試験および病变部の免疫組織化学観察から本疾病は細菌性疾病であることが明らかとなつた²⁹⁾。なお、当センターにおいて、棘抜け症

原因菌の 16S r RNA 遺伝子 918 塩基対について解析を行った結果、*Oleispira antarctica* (AJ426420) と 98.6% と最も高い相同意を示した。相同意が高かつた細菌は全て *Oleispira* 属の細菌のものであり、本菌の分類学的位置についてはさらなる検討が必要であるが、棘抜け症原因菌も *Oleispira* 属細菌あるいはその近縁種と考えている。そして、この塩基配列は 1980 年代に長崎県海域の罹病アカウニより分離された棘抜け症原因菌 NUF615 株と 918 塩基対全て同じものであった（図 1）。

18. 棘抜け症原因菌の性状

棘抜け症原因菌は $2 \sim 6 \mu\text{m} \times 0.4 \sim 0.6 \mu\text{m}$ と細長く（写真 12）、色素（-）、カタラーゼ産生（+）、チトクロームオキシダーゼ産生（+）、ブドウ糖分解（-）、デンプン分解（-）、コンドロイテイン硫酸（+ 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、現在のところ、ウニ培地およびウニ液体培地でのみ培養できる。ウニ培地上では、平面に増殖する特徴的なコロニーを形成する（写真 13）。発育適温は 14 ~

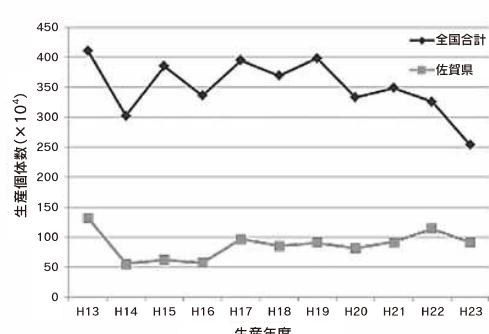


図 1 過去10年間のアカウニ生産数量の推移(栽培漁業種苗生産、入手・放流実績(全国)より)

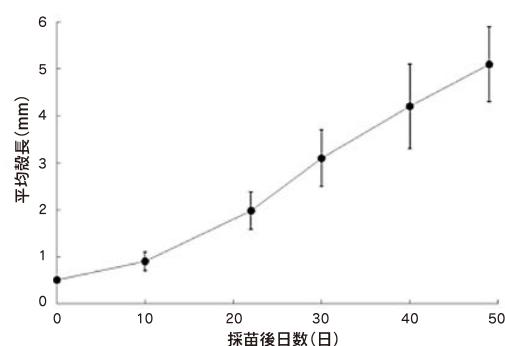


図 2 一次飼育におけるアカウニの成長 (H21 年度生産)

表1 アカウニの種苗生産工程

月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	概要
親ウニ養成													100個体程度(殻径 50~70mm)
付着珪藻培養													10×32cmの付着板を 20,000枚
採卵													2,000万粒以上
幼生飼育													開始時 1,000万個体、終了時 800万個体
採苗													採苗直後で 200万個体
稚ウニ飼育													最多で 25水槽(15m³水槽) 使用
種苗配布													

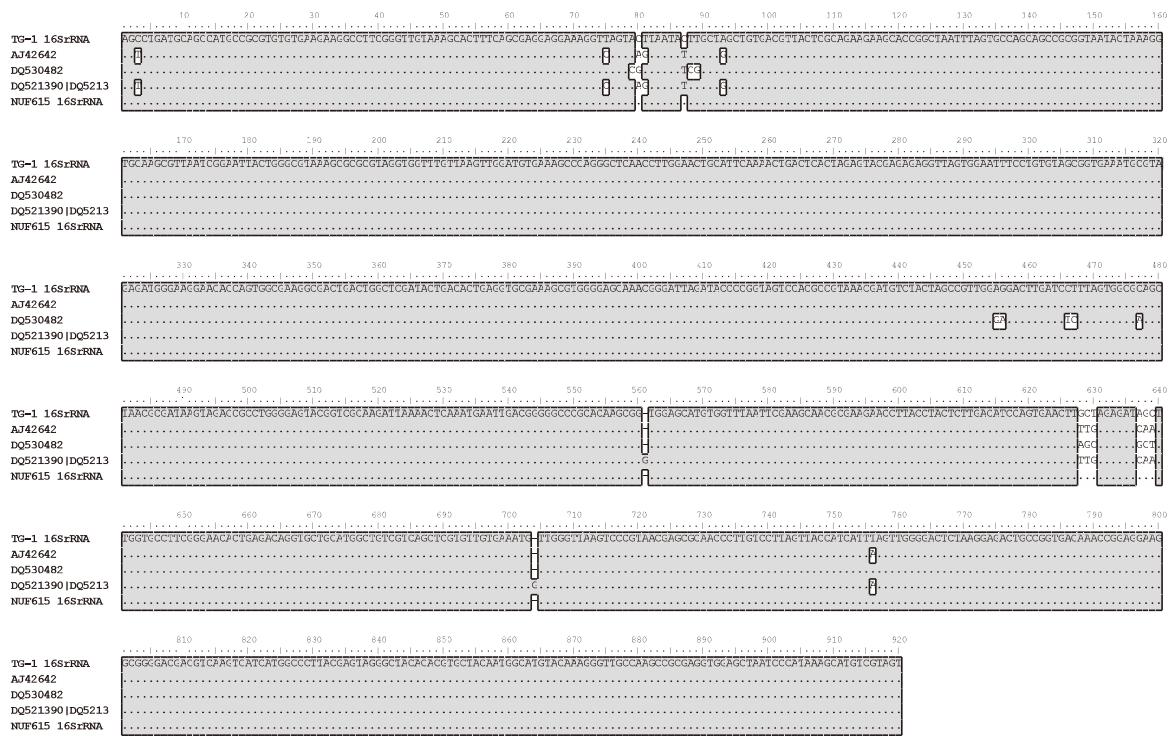


図3 棘抜け症原因菌 (TG-1 株) の 16S r RNA 遺伝子の相同性解析
AJ426420, *Oleispira antarctica*; DQ530482, *Oleispira* sp.; DQ521390, *Oleispira* sp.; NUF615, アカウニ棘抜け症原因菌株

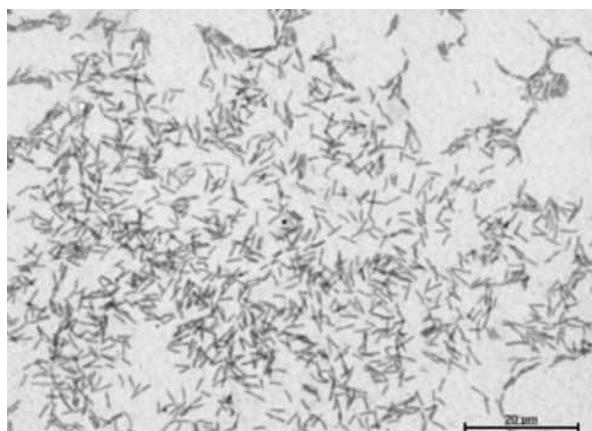


写真 12 棘抜け症原因菌

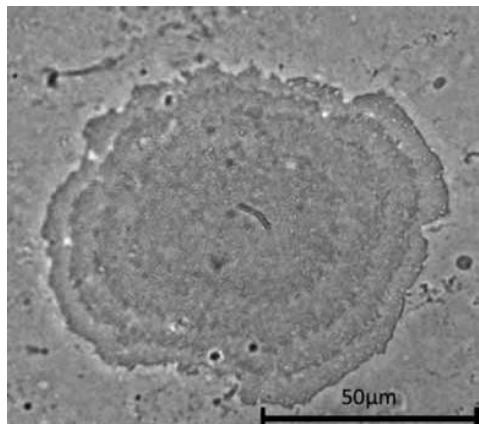


写真 13 ウニ培地上に発育した棘抜け症原因菌のコロニー

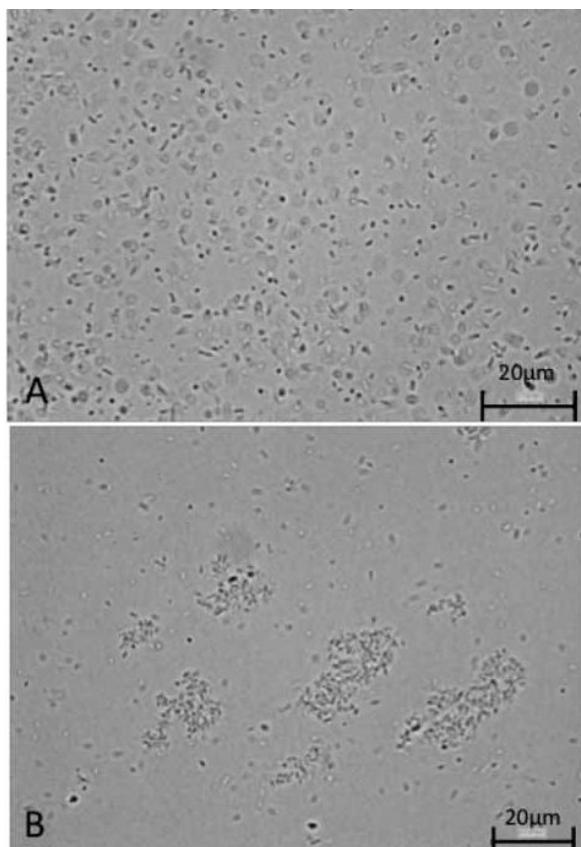


写真 14 培養温度別棘抜け症原因菌の形状
A ; 13℃培養, B ; 22℃培養

表2 アカウニ2次飼育に用いる餌料種毎の評価（4段階）

餌料種類	供給面		給餌面			備考
	供給量	供給の安定性	コスト	餌料価値	嗜好性	
天然海藻	◎	○	◎	◎	○	全体的に評価が高く、主餌料として使用。シェルターとしての効果もある。
アワビ用配合飼料	◎	○	△	○	○	コスト以外は、評価は高い。特にタンパク質の供給源として重要。
生アナオサ	△	○	◎	○	○	低水温期(15°C以下)は増殖しないため、夏場にストックしておく必要有り。
養殖生ワカメ	○	△	△	○	△	嗜好性は低いが、タンパク質含量が高く、餌料効率は高い。
生ヒジキ	○	△	△	△	○	嗜好性は高いが、餌料効率は低い。
乾燥チガイソ	○	○	△	△	×	全体的に評価は低い。使用頻度は低く、他の餌料が不足する際の餌料。

表3 異なる餌料を給餌した場合におけるアカウニの遊離アミノ酸量

	No.1	No.2	No.3
タウリン	18.2	85.9	48.4
アスパラギン酸	22.7	29.1	16
スレオニン	27.7	32.8	18.7
セリン	29.3	29.1	16.5
グルタミン酸	43.3	63.9	38.9
プロリン	23.8	22.2	13.7
グリシン	461.3	360.2	684.7
アラニン	61	84.4	57.3
シスチン	3.8	4.8	2.9
バリン	50.9	41.8	32.4
メチオニン	21.2	19.3	11.8
イソロイシン	35.5	28.8	19.1
ロイシン	71.3	61.2	35.5
チロシン	49.2	31.8	24
フェニルアラニン	35.4	31.2	18
β - アラニン	1.6	2.3	4
ヒスチジン	19.1	12.6	10.8
リジン	48.1	52.7	36.5
アルギニン	63.7	64.5	48.4
遊離アミノ酸量計	1087.1	1058.6	1137.6

No.1 配合餌料のみ給餌

No.2 天然海藻のみ給餌

No.3 配合餌料および天然海藻を給餌

- 稚ウニは屋外 15t 水槽で飼育したもので、それぞれの餌料で約 2ヶ月飼育した。
- それぞれ湿重量で 200g 程度を取り上げ、5 日間絶食させて消化管内容物を排出させた。
- このウニの口器を上にしてキムタオル上に括げ、1 時間放置して殻表の水分を除き、その後プラスチック容器に入れ、ビニールの袋で包んで冷蔵して分析に用いた。

16°Cであり、20°C以上では増殖は停滞する。なお、ウニ液体培地に原因菌を接種し 14°Cで培養した後、20°C以上の条件下で培養すると菌塊を形成し、運動性も低下することが判っている（写真 14）。また塩分を 26‰ [海水 (33‰) : 淡水 (0‰) = 8 : 2] に混合した塩分濃度、80%海水培地] 以上の塩分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) 以下では発育できなくなる。

19. 棘抜け症の発症

殻皮表面の黒斑形成や脱棘が主な症状であるが、それらの病徵が出る前に殻皮が退色する、付着力が弱くなるなどの症状が観察される。また、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形成され、その部分から原因細菌が分離できる。なお、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ている。

水温 12 ~ 20°Cで作製した浸漬海水は起病力があり、原因菌の発育適温は 14 ~ 16°Cであるにもかかわらず、種苗生産現場では 13°C以下になる低水温時に発症することが多い傾向にある。これは飼育しているアカウニの活性が低水温期に落ちることが、発症の引きがねとなっている可能性がある。

20. 棘抜け症の診断方法

アカウニ種苗生産において低水温期に殻皮表面の黒斑形成、脱棘などを病徵とする大量死が発生した場合には棘抜け症を疑うが、現在、正確な診断には罹病ウニから前述のウニ培地を用いて病巣部より原因菌を分離、培養後、原因菌様の菌から DNA を抽出し、PCR による診断を行っている。しかし、この方法では、ウニの殻皮表面に多くの雑菌が存在し、かつ原因菌の増殖速度がその他雑菌よりも遅い傾向にあるため、原因菌が分離できない場合も多く、また分離できたとしても PCR 診断までに数日を要する現状にある。そこで、現在、市販の DNA 抽出キットを用いて罹病個体の病変部（黒斑形成部）から直接検出する方法や滅菌海水中に罹病個体を一晩浸漬し、海水を 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、フィルター上の懸濁物から DNA を抽出し、検出できる

方法を検討している。まだまだ研究段階ではあるが、迅速に検出できる結果を得ており（未発表）、今後はより精度を高めていき、実用化できればと考えている。

21. 棘抜け症の防除方法

当センターにおける棘抜け症の防除方法は、①飼育環境中へ原因菌を入れないこと、②原因菌が存在していても罹病しない抵抗力のある種苗を生産すること、そして最後に③発症した場合に被害を最小限に止めることの三段構えにより行っている。

（1）紫外線照射による原因菌の侵入防止策

種苗生産現場での疾病対策として、クロアワビの筋萎縮症やエゾバフンウニの斑点病では、紫外線照射によって殺菌した海水による飼育の有効性が知られている^{30, 31, 32)}。

一方、前述したように棘抜け症は、*Oleispira* 属細菌あるいはその近縁種と考えられるグラム陰性の桿菌によって引き起こされることが判明している。グラム陰性細菌は、その細胞壁の特性上グラム陽性細菌やカビなどと比較して紫外線照射により不活化されやすいと言われていることから³³⁾、棘抜け症においても紫外線照射海水による飼育が有効ではないかと考えられる。しかしながら、紫外線照射海水による疾病的防除については、紫外線ランプの経年劣化など機械的エラーにより効果が発現しない場合があるため、注意が必要である。なお、一度原因菌が侵入した水槽では、その後紫外線照射により殺菌した海水で飼育しても、発症することが判明している（未発表）。このため、防除方法を確立するためには紫外線照射による飼育水の殺菌だけではなく、他の侵入経路の検討、例えば餌料として用いる海藻の殺菌を行うなど種苗生産にかかる工程の防疫体制を見直し、構築することが重要である。

（2）アカウニの耐病性の強化策

棘抜け症の防除対策の一環として、与える餌によって耐病性を強化できるか否かを検討するために、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、棘抜け症原因菌の浸漬感染試験を行った。

その結果、アカウニ配合餌料区では生残率95%となつたのに対して、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%となり（p<0.05）、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、配合餌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。

前述したように、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ている。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斑点が観察され、その部分からのみ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、固ければ細菌が感染を防除できるのではないかと考えられる。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餌料区と比べ大きい傾向がみられた。また、配合餌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²⁰⁾。以上のことから、配合餌料区の生残率が高かった理由の一つとして、配合餌料を摂餌したことにより殻皮の強度が高まった可能性もある。

なお、玄海海域で営まれているアカウニ養殖では、海上養殖という特性上、紫外線殺菌などの防除方法は不可能なことから、このような、耐病性を高める成分を含む餌を与えて斃死を軽減する研究や耐病性の高いアカウニの選抜育種などについては、今後も研究を進めていかなければならぬ重要な課題である。

（3）飼育水温の制御による対応策

先にも述べたように原因菌の培地上での発育適温は14～16°Cであり、20°C以上では増殖しない。

当センターではこれまで、幾度となく飼育水の昇温により棘抜け症を防除できるか否かを試験してきた。その結果を列挙すると、16°Cへの昇温で感染しなかつた例、^{21, 27)}、また15°Cや16°Cへの昇温で発症しなかつた現場データ³⁴⁾および18°Cまで昇温しても全滅してしまった現場データ³⁵⁾など実に様々である。これらの結果は、おそらくその時の原因菌とアカウニの抵抗力とのバランスにより、もたらされたものであると推測されるが、原因菌の増殖限界温度を踏まえ、20°C以上に飼育水を昇温していれば、棘抜け症を防除できていたものと考えられる。

しかし、疾病が発生する11～13°C付近の海水を20°C以上に昇温するためには、多大な経費がかかるこ

と、また注水量を通常よりも大幅に絞る必要があり、滑走細菌症が発生しやすい環境悪化を招く恐れがあったことから、20℃以上の昇温が行われなかつた。特に、当時の昇温飼育の方法が一度棘抜け症が確認されたら、自然水温が上がつてくる春先まで継続して昇温を行つていたため、経費増大や滑走細菌症発生のリスクは、大変大きなものであつた。

そこで、疾病確認後、迅速に22℃へ昇温し、症状が治まつた段階で元の水温に戻す方法（以下、一時昇温飼育法）について、バフンウニの種苗生産において検証を行つた結果、昇温後、元の水温に戻して再び発症しても、すぐに昇温し、それを繰り返すことで、症状が悪化することなく、飼育を継続することができた。

この一時昇温飼育法は、従来よりも昇温にかかる経費を抑えることができ、かつ環境の悪化が少なく、滑走細菌症も出にくく利点がある。

今後の課題としては、この一時的に昇温するタイミングをいち早く察知する方法を確立することが重要である。現在、この課題解決のため、罹病個体がみられない水槽の飼育水から原因菌を検出す研究を続けている。近い将来、この検出法が確立することができれば、科学的根拠に基づいて、予防対策として飼育水を効率的に昇温すること可能となり、安定した種苗生産技術が確立するものと考えている。

以上のように、まだまだ課題のある棘抜け症防除方法であるが、今後も効果的かつ効率的な防除方法を構築し、安定したアカウニ種苗生産を確立できるよう研究を続けていきたいと考えている。

参考文献

- 1) 谷 雄策 (1978) : アカウニの種苗生産と増殖, 養殖 10月号, 緑書房, 72 ~ 74 頁.
- 2) 伊東義信 (1982) : ウニの種苗生産とその増養殖, 養殖 3月号, 緑書房, 44 ~ 49 頁.
- 3) 川原逸朗 (1995) : 魚種別種苗生産マニュアル&上手な種苗の選び方 ウニ, 「養殖」臨時増刊号「種苗ベストガイド」, 緑書房, 187 ~ 193 頁.
- 4) 川原逸朗 (1996) : ウニ類の種苗生産, 佐賀県栽培漁業センターにおける種苗生産マニュアル, 佐賀県栽培漁業センター, 45 ~ 68 頁.
- 5) 真崎邦彦・野口弘三 (1993) : アカウニ稚ウニの餌料別、水温別飼育試験, 佐賀県栽培漁業センター研究報告, 2, 65 ~ 70.
- 6) 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.
- 7) 野口弘三・川原逸朗 (1993) : アカウニ幼生の変態着底と水温の関係について, 佐賀県栽培漁業センター研究報告, 2, 57 ~ 60 頁.
- 9) 伊東義信・伊藤史郎・金丸彦一郎 (1987) : アカウニ幼生の採苗法-II 採苗時の付着版の設置方法および飼育水の攪拌方法, 佐裁漁セ研報, 1, 19 ~ 24 頁.
- 8) 伊藤史郎・小早川淳・谷 雄作・中村展男 (1991) : バフンウニ、アカウニ幼生の変態促進に及ぼす付着珪藻とヒジキの併用効果, 栽培技研 19 (2), 61 ~ 66.
- 10) 川原逸郎・平瀬茂・伊藤史郎・北村等 (1994) : 塩化カリウムを用いたアカウニの採苗方法の検討(予報), 佐裁漁セ研報第3号, 85 ~ 89 頁.
- 11) 伊東義信 (1987) : アカウニ幼生の採苗法-I 幼生の発育および変態後の稚ウニの発育から検討した採苗適期, 佐裁漁セ研報, 1, 13 ~ 18 頁.
- 12) 北村 等 (2005) : アカウニ、ムラサキウニ幼生の変態誘起物質について, 日本付着生物学会誌, 22 (2), 29 ~ 34.
- 13) 伊東義信・伊藤史郎・金丸彦一郎・真崎邦彦 (1987) : 付着珪藻 *Navicula ramosissima* のアカウニ稚ウニ期生産餌料としての効果, 日水誌, 53 (10), 1735 ~ 1740.
- 14) 野口浩介・野田進治 (2013) : 炭酸ガス通気海水を用いたコペポーダ除去法の開発, 佐玄水振セ研報, 6, 15 ~ 20.
- 15) 酒井勇一・近田靖子 (2007) : 稚ナマコを食害するオダマリミジンコの分離方法について, 試験研究は今, No.596.
- 16) 川原逸郎・後藤正則・真崎邦彦・野口弘三 (1993) : 種苗生産過程に見られるアカウニ稚ウニの大量斃死を防ぐ飼

- 育方法の検討—I（予報）各処理海水による飼育実験と量産飼育事例、佐賀漁セ研報、2, 51～55.
- 17) 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.
- 18) 角田信孝・水津洋志・由良野範義（1995）：アカウニに対する褐藻類3種の餌料価値、山口県外海水水産試験場研究報告、25, 30～34.
- 19) Akiyama, T., T. Unuma, and T. Yamamoto (2001): Optimum protein level in the purified diet for young red sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. Fisheries Sci., 67(2), 361-363.
- 20) 岡山英史・藤崎博・青戸泉（2013）：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、佐玄水振セ研報、6, 25～30.
- 21) Akiyama, T., T. Unuma, T. Yamamoto, H. Furuita, and K. Konishi (1997) : An evaluation of amino acid sources andbinders in semipurified diet for red sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. Fisheries Sci., 63(6), 881-886.
- 22) 秋山敏男・山本剛史・鶴沼辰哉・篠原直哉（2001）：アカウニ餌料としてのアラメ栄養価の季節、海域および葉体部位による変化、水産増殖 49 (4), 475～482.
- 23) 佐藤 勉（1986）：アワビ配合飼料の特徴と使用法、月刊養殖臨時増刊号、23 (12), 154～159.
- 24) Kawakami, T., M. Tsushima, Y. Kattabami, M. Mine, A. Ishida and T. Matsuno (1998) : Effect of β -carotene, β -echinenone, astaxanthin, fucoxanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 226: 165-174.
- 25) 津島己幸・松野隆男（1999）：動物におけるカロテノイド代謝とその生理作用:特にウニ類について、FFI ジャーナル 183, 13～19.
- 26) 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、佐賀県栽培漁業センター事業報告書昭和 55～58 年度、79-96.
- 27) 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）、佐賀セ研報、2, 45-50.
- 28) 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、佐賀セ研報、3, 105-106.
- 29) 金井欣也（2006）：棘抜け症、「新魚病図鑑」（小川和夫・畠井喜司雄編）、緑書房、東京、275.
- 30) 柴田利治・中本崇・永島孝之・渡辺健二・入江英男（1999）：アワビ種苗生産について、福岡県栽培漁業公社、平成 9 年度業務報告書、30-35.
- 31) 柴田利治・中本崇・永島孝之・渡辺健二・入江英男（2000）：紫外線照射海水を用いたクロアワビ種苗生産について、福岡県栽培漁業公社、平成 10 年度業務報告書、30-35.
- 32) 田島研一・平野敬洋・藤本さおり・伊藤慎悟・絵面良男（1998）：エゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius* の斑点病の防除法、日水試、64 (1), 65-68.
- 33) 木村喬久・吉水守・田島研一・絵面良男・坂井稔（1976）：養魚用水の紫外線殺菌について—I. 魚病原因菌ならびに養魚水中生存菌の紫外線感受性について、日水試、42 (2), 207-211.
- 34) 藤崎博・岡山英史・青戸泉（2004）：種苗量産技術開発事業（2）アカウニの種苗生産、平成 15 年度佐玄水振セ業報、127-130.
- 35) 藤崎博・岡山英史・青戸泉（2003）：種苗量産技術開発事業（2）アカウニの種苗生産、平成 14 年度佐玄水振セ業報、119-120.