

持続的養殖推進対策フォローアップ事業 - 耐病貝作出のための親貝選抜方法の検討(1)

林 政博

目的

症状の軽度な貝の選抜方法として血リンパ液の粒度分布を検討した。

方法

1. 健常貝と病貝の血リンパ液の粒度分布

供試貝は種苗生産を行うために室内で加温飼育していた4種類のアコヤ貝()であり、飼育履歴を表1に示した。高へい死家系貝, 低へい死家系貝, 中国貝は英虞湾で育成されたもので, それまでの飼育状況等から病貝と

考えられた貝であり, 八丈島貝は平成13年10月に英虞湾に搬入したもので, 健常貝である可能性が高いと考えられた貝である。血リンパ液の採取は1mlツベルクリン用シリンジと23G x 1/4の注射針を使用して貝柱から行い, 濾過海水100ml中に血リンパ液を0.28~0.91g 測り採った。これを直ちにマルチサイザー3 (ベックマン・コールター製) にかけて100マイクロリットルを測定してから, 血リンパ液1gに換算して粒度分布を描いた。

表1 供試貝

	由来	測定月日
高へい死家系貝	平成12~13年の夏季のへい死率が高かった家系の貝(3年貝) 3/08から18℃で飼育を始め、4/23から23℃で飼育した♀	5/03-06
低へい死家系貝	平成12~13年の夏季のへい死率が低かった家系の貝(3年貝) 3/08から18℃で飼育を始め、4/23から23℃で飼育した♀	5/03-06
八丈島貝	平成13年10月に八丈島で採取した天然貝(年齢不明) 3/08から18℃で飼育を始め、4/23から23℃で飼育した♀	5/02
中国貝	平成11年に水産研究部が生産した中国貝(4年貝) 4/24から23℃で飼育した♀	4/30

2. a*値と小型粒子数の関係

雌雄一対交配で生産し, 英虞湾で育成した2年貝, 4組の各17~19個体について9月に血リンパ液中の小型粒子数(2.01~4.98ミクロンの範囲の粒子数), 閉殻筋の赤変度合い(a*値), グリコーゲン量(5段階評価), 貝柱重量比(貝柱重量/右殻重量×100)を調べた。血リンパ液の測定はマルチサイザー3の吸引量を1000マイクロリットルとした以外は1.と同じであり, a*値の測定方法は既報と同じであった。

3. 血リンパ液の粒度分布の変化(室内試験)

供試貝は国内産アコヤ貝(3年貝)10個体で, これを7月2日~8月2日の4週間, Pavlovaを与えて室内で飼育した。飼育は3トン水槽で行い, 供試貝は個体別に

提灯笼に收容して一週間毎に5回, 同一個体から連続して採血を行って最終回時にa*値等を調べた。採血量は0.37~0.60g(平均0.51g)で, 採血にあたっては, 粘液の混入に留意して貝柱の針刺位置周囲を綿棒で拭った。粒度分布の測定は2.と同様に実施した。

4. 血リンパ液の粒度分布の変化(野外試験)

試験は表2に示す日程で3回行い, は発症前期, は発症期, は終息期を想定した。供試貝は中国貝(3年貝), 交雑貝(3年貝), 日本貝(3年貝), 日本貝(2年貝)の4種類のアコヤ貝で, それぞれ17~18個体を段籠に並べて個体識別し, 2週間間隔で連続採血を行って, 各期の最後にa*値を測定した。供試貝は海面で飼育して採血時だけ研究室に持ち帰った。

表2 試験区と採血月日

試験区	年齢	採血月日										
		①期				②期				③期		
中国貝	3年貝	7/15	7/29	8/12	8/26	8/26	9/09	9/24	10/08	10/09	10/31	11/18
交雑貝	3年貝	7/15	7/29	8/13	8/27	8/27	9/09	9/24	10/09	10/09	11/01	11/19
日本貝	3年貝	7/18	8/01	8/13	8/28	8/28	9/10	9/25	10/10	10/10	11/01	11/19
日本貝	2年貝	7/19	8/02	8/14	8/29	8/29	9/10	9/26	10/11	10/11	11/02	11/20

結果及び考察

1. 健常貝と病貝の血リンパ液の粒度分布

採血後に行った貝柱のa*値の平均は、高へい死家系貝6.9、低へい死家系貝4.6、中国貝3.7、八丈島貝2.0であった。八丈島貝20個体の血リンパ液の平均粒度分布は図1に示すように、9ミクロンにモードを持つ高い峰と6ミクロンにモードのある低い峰で構成されている個体が多かった。2つの峰の構成員は主に無顆粒血球であったが、低い峰がはっきりせず1峰に見える個体や峰のモードがズレている個体もあり、さらに峰の大きさとして表される血球数(5.5~11.5ミクロン)の個体差も大きく、最小(574個/血リンパ液1mg)と最大(5951個/血リンパ液1mg)で、およそ10倍の違いが見られた。

八丈島貝を健常貝と見なしてその他の病貝と比較すると、病貝の血リンパ液中には健常貝に比べて小型粒子(図1の2~5μ)が多数見られ、しかも小型粒子数が多いほどa*値が高いという対応関係が認められた。

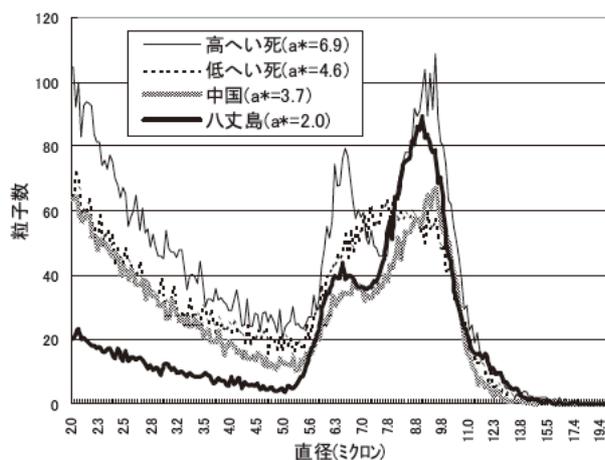


図1 血リンパ液の平均粒度分布
測定貝数
高へい死(♀7)・低へい死(♀16)
中国(♀21)・八丈島(♀20)

2. a*値と小型粒子数の関係

貝柱の赤変化は本疾病の特徴的な症状であり、赤変度合いの経時的な増加は病状の進行を示していると考えられる。1.で小型粒子数がa*値と関連していることが示唆されたことから両者の関連を雌雄一対交配で生産した4組(No1, No11, No15, No24)についてさらに検討した。

測定結果を表3に示した。a*値は8~10月に上昇し、本試験の4組のようにある時点のa*値が家系によって異なることはすでに報告した。本試験を実施した9月のa*値はNo15が最も高く、平均が7.19で全ての個体で明らかな着色が認められた。最も低かったNo24(a*=2.85)は肉眼で着色が認められないレベルであった。

表3 測定結果

	測定数	a*	小型 粒子数	*相関 係数	グリコー ゲン	柱/殻 (%)
No1	19	4.25	38300	0.85	1.6	18.0
No11	19	3.32	53600	0.76	1.9	18.8
No15	19	7.19	51200	0.75	1.9	20.4
No24	19	2.85	46300	0.15	2.5	21.6

* a*値と小型粒子数の相関係数

a*値と小型粒子数との関連を見ると、赤変化していなかったNo24を除く3組(No1, No11, No15)では両者の相関係数が0.75以上であり、特にNo1では図2に示すように直線的な強い相関が認められた。このように雌雄一対交配で生産した3組の兄弟で小型粒子数とa*値の間に強い相関が見られたと言うことは、小型粒子数の増加も病気の進行に伴って現れる症状であることを示している。しかし、小型粒子数とa*値の対応関係は組によって違いがあり、No24のように赤変化が進行していない状態でも小型粒子数の増加が認められたり、No11とNo15では同レベルの小型粒子数なのにa*値が大きく異なっていた。これは小型粒子数は病気の進行によ

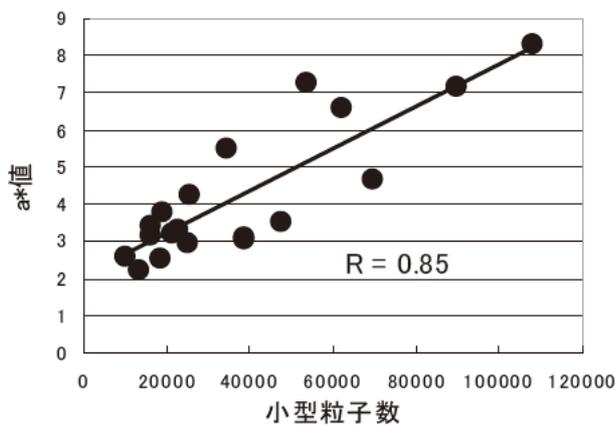


図2 小型粒子数とa*値の相関 (No1)

て増加する症状であるという点ではa*値と同じであるが、a*値との連動性は弱く、家系によって増加速度が異なっているためであろうと考えられた。

3. 血リンパ液の粒度分布の変化 (室内試験)

10個体の血リンパ液の粒度分布の変化を類似度合いによってA、B、Cの3グループに分けて図3に示した。AとBはともに開始時から第一週にかけて血球数の減少が見られた。7個体の減少率は49~86%、平均で68%であった。この間に水槽内で産卵を確認していて、血球数の減少原因として産卵が疑われた。Aではその後、第二週にかけて微増ないし横這いで経過し、第三週になって血球が急増した。Bでは第三週まで微増ないし横這いで経過し、第四週に血球数の増加が見られた。No5については一週間ずれるとAとよく似た変動であったと言える。

このように粒度分布は全体として類似した変動傾向を示す個体が多く、連続採血の影響は少ないようであったことから、粒度分布を連続して追跡すれば、病徴の進行に関連して1.で見た小型粒子数の増加以外の情報も読みとれるのではないかと考えられた。ただし、No7とNo9のようにA・Bとは違った経過を辿った個体もありさらに検討の必要があろう。

4. 血リンパ液の粒度分布の変化 (野外試験)

全体像を把握するために4試験区の平均粒度分布の推移と①期②期③期の終了時に測定したa*値の平均および累積へい死数を図4に示した。a*値と累積へい死数は中国貝<交雑貝<日本貝の順であり、これまでに得られている知見と矛盾しない結果であった。4試験区の粒度分布を比較すると、日本貝(2)が最も早くから小型粒

子数の増加とa*値の上昇が見られ、中国貝(3)、交雑貝(3)、日本貝(3)では②期(9/24-25)になって小型粒子数の増加が確認された。そして4試験区とも一旦増加した小型粒子数は試験終了時まで減少することはなかった。病状の進行が早かった日本貝(2)の個別事例を図5に示した。①期の8/14~8/29の間に小型粒子数が急増する個体が見られ、増加した個体では同時にa*値も上昇していた。一方、No14とNo16のようにa*値と小型粒子数は上昇しないが、血球数(9ミクロン)が増加した個体があり、日本貝(3)でもこの時期に18個体のうち12個体で血球数の増加が見られていて、疾病との関連が疑われた。

②期になると日本貝(2)ではへい死が始まって赤変化が急速に進んだ。粒度分布も乱れて個体差が大きくなり、No5、No6、No15のように血球数が異常に増加する個体やNo3、No4、No7のように血球組成を認めにくくなるもの、さらにNo8のように変化の少ない個体など様々な粒度分布が見られた。

③期の40日間は粒度分布はあまり大きな変化はなかったが、No4とNo7では血球数の増加とともに泡状物(病員の血リンパ液中にあり、位走差顕微鏡で泡状に見える物)が減少していて回復の兆候のように見えた。

日本貝(2)に見られた病気の進行に伴う粒度分布の変化を整理すると、①期の8/2までは2峰性を示す個体が多く、①期の後半になると短期間(2週間以内)に赤変化を伴いながら小型粒子数が増加する個体と赤変化の進行は遅いが、血球数が増加する個体が出現する。一方、感受性が低いためか、粒度分布に変化が見られない個体もある。発症期の②期になるとさらに小型粒子数が増えて2峰性が乱れる個体や血球数が異常に増加する個体が現れる一方で変化の少ない個体も認められる。多くの個体では②期の状態が11月下旬まで継続するが、中には血球数が増加して回復に向かうように見える個体も現れる。

血リンパ液の粒度分布と血球組成の関連については今後検討する予定であるので、今回は顆粒血球と大きさの異なる無顆粒血球が多く見られた個体の顕微鏡写真とその粒度分布を図6に示した。

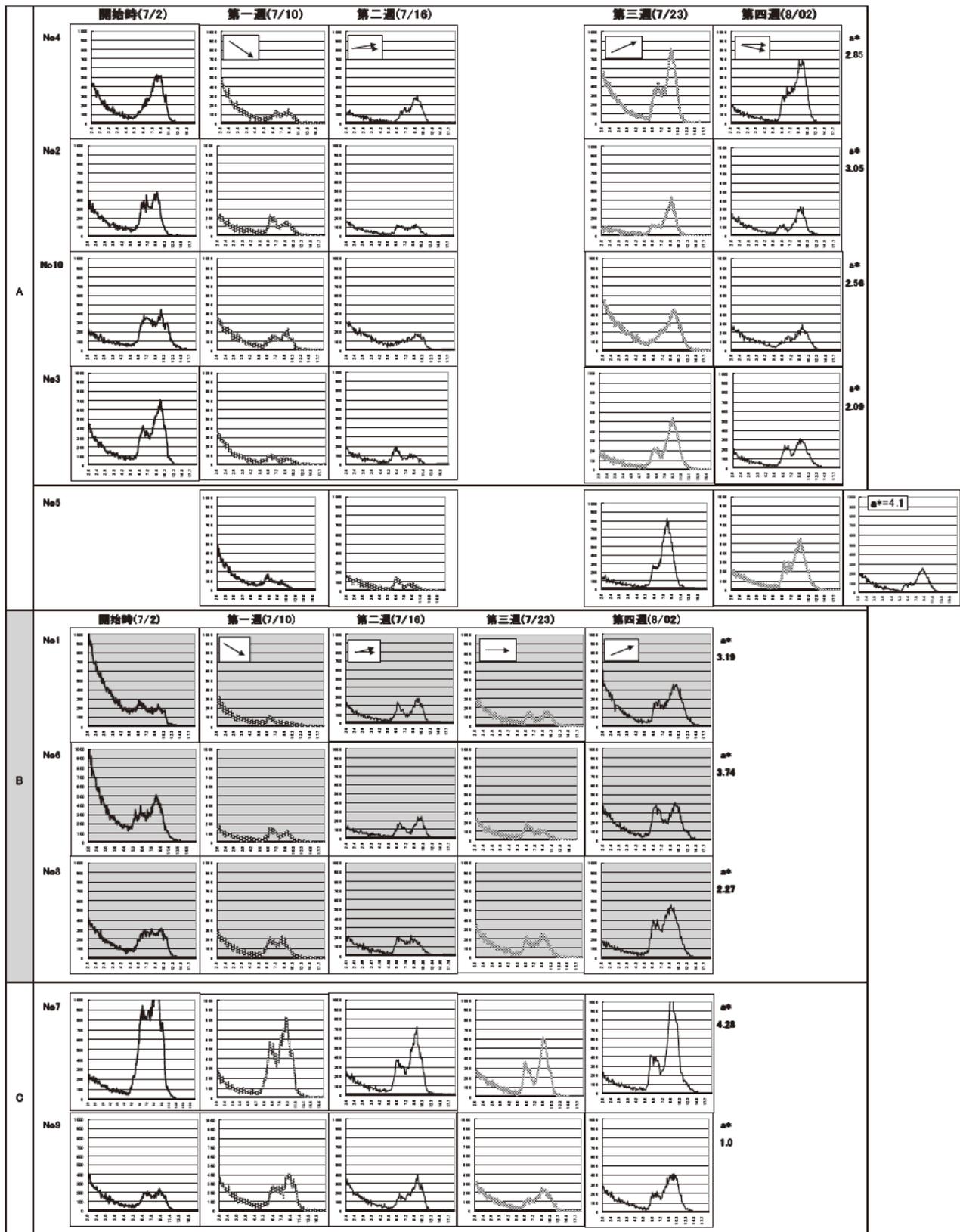


図3 血リンパ液の粒度分布の変化 (室内試験)

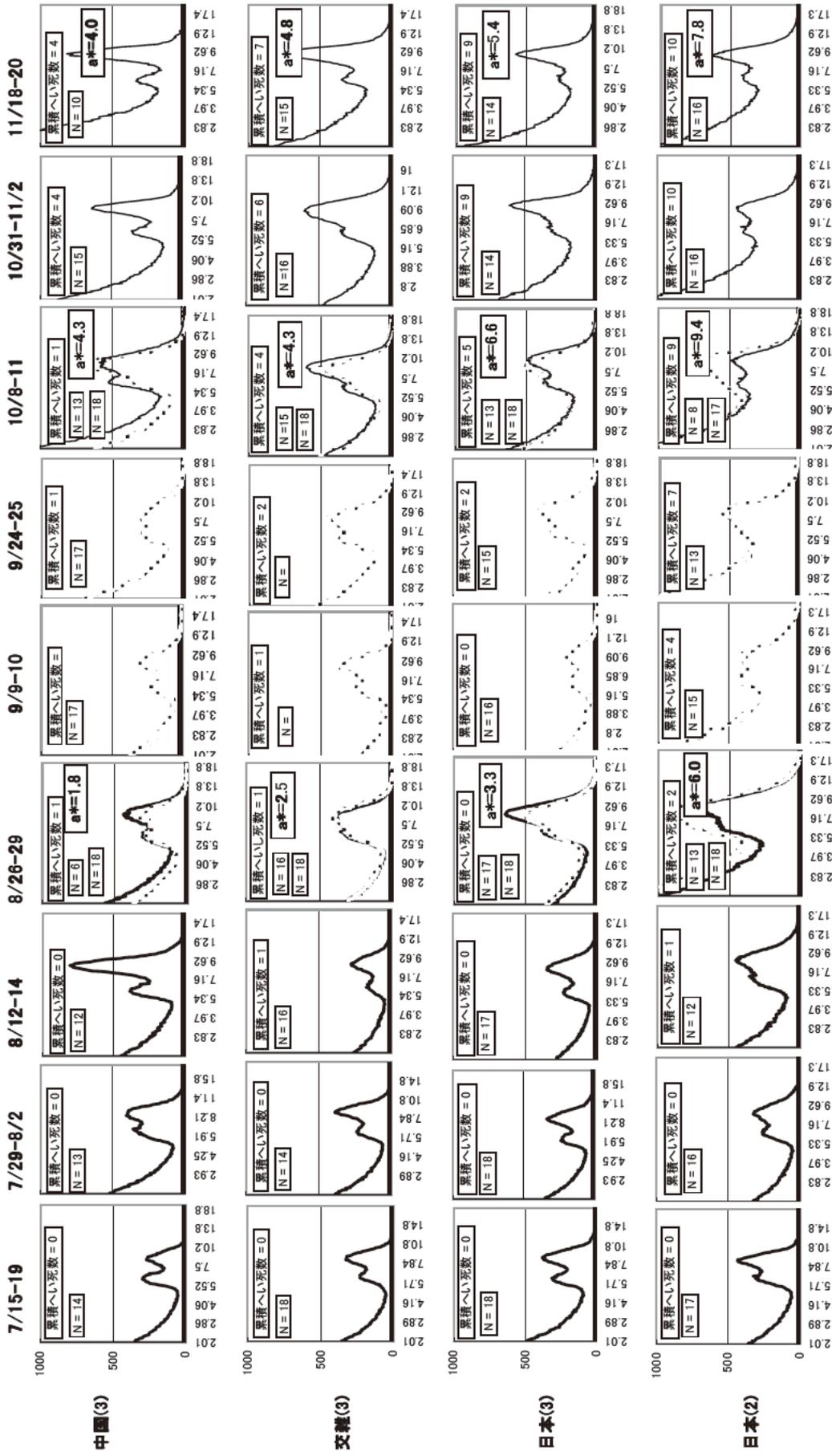


図4 血リンパ液の粒度分布の変化 (野外試験)

註) 粒度分布の測定数は採血を失敗した個体があるため生残数とは一致していない。

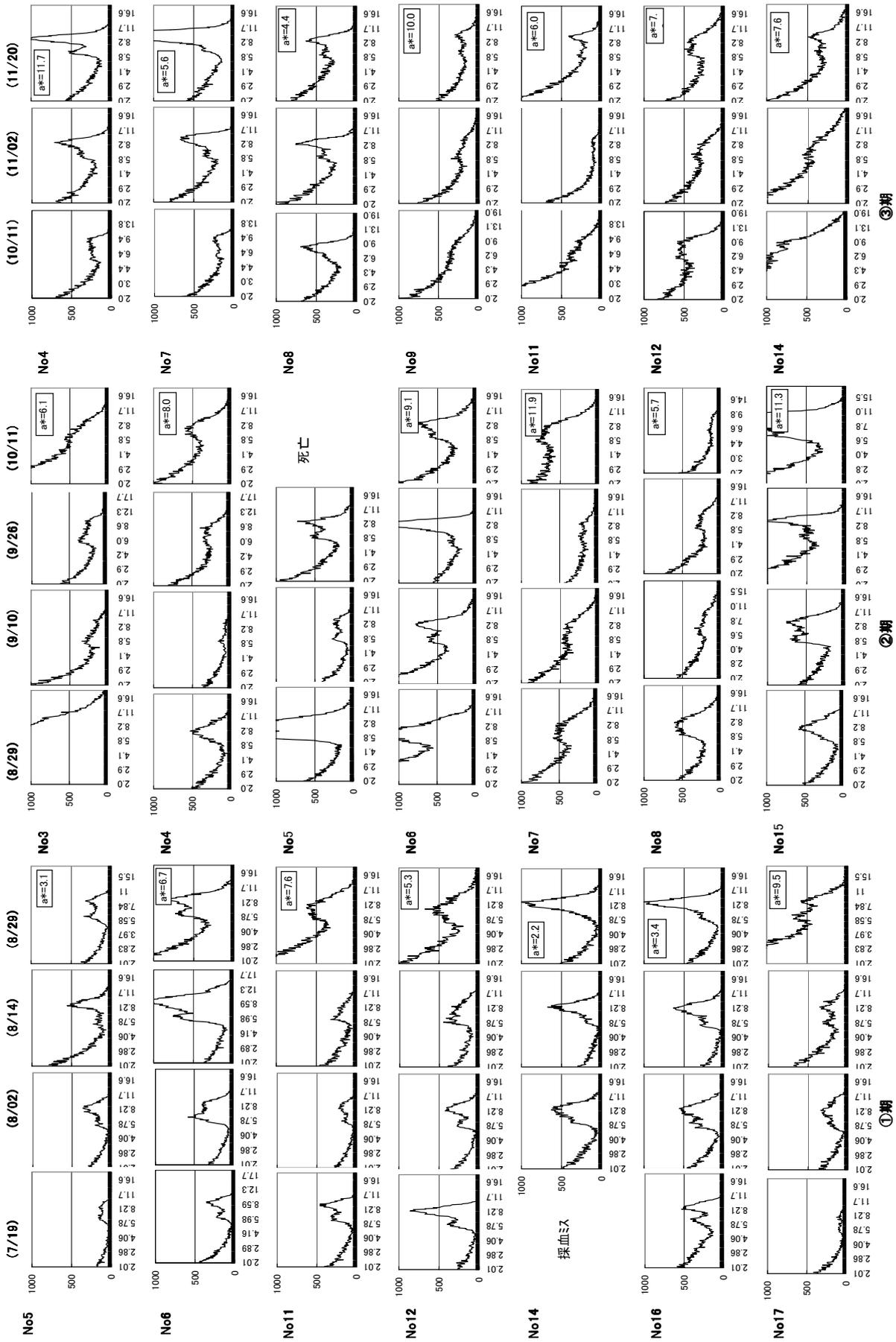


図5 個別事例 日本員(2)

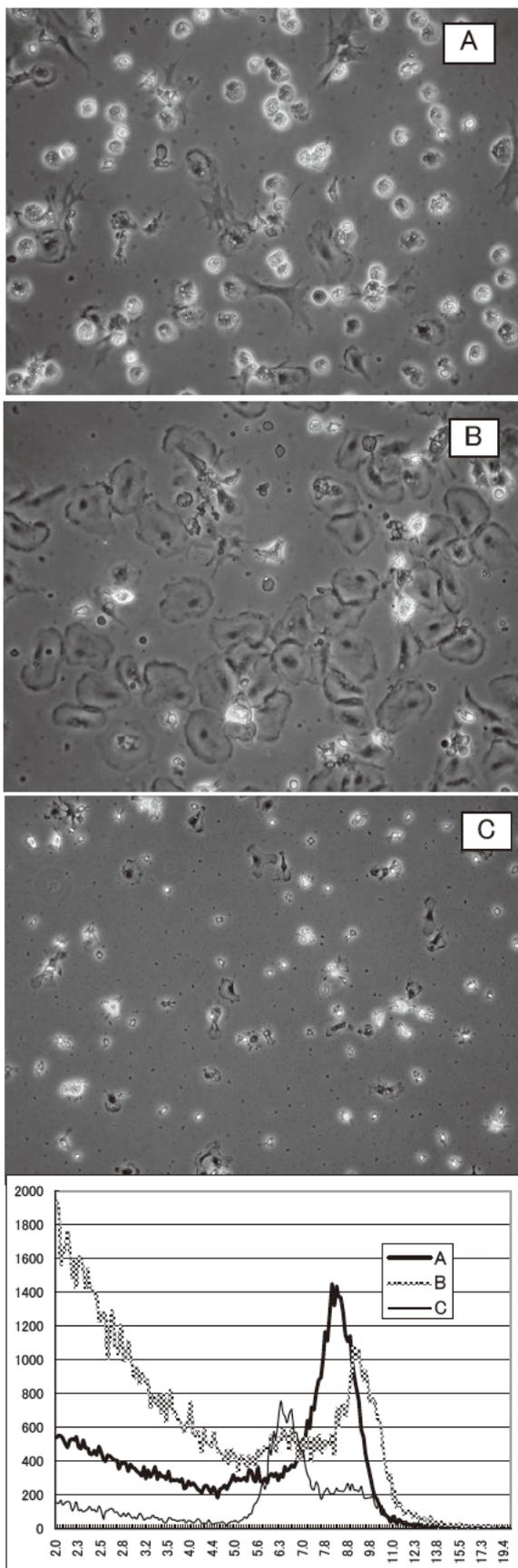


図6 血リンパ液の粒度分布と血球写真