

平成30年度卒業・修士論文発表要旨

日時 平成31年2月21日（木）9：30～11：20

場所 南予水産研究センター 2階 大会議室

（テレビ会議システム：農学部33番講義室）

愛媛大学農学部

南予水産研究センター

平成 30 年度卒業・修士論文発表会

海洋生産科学特別コース

(9 : 30 ~ 9 : 45)

1. サツキマス種苗の効率的な生産と優良個体の選抜

熊野 靖子 1

(9 : 45 ~ 10 : 00)

2. 愛南町御荘湾における有害赤潮プランクトン
Cochlodinium polykrikoides の挙動解析

田中 秀直 2

(10 : 00 ~ 10 : 15)

3. 養殖現場におけるマダイ感染症疾病の早期検出法の開発

宮田 高彰 3

(10 : 15 ~ 10 : 30)

4. スマの生殖腺保存プロトコルの確立に向けて

吉村 小輝 4

休 憩 10 分

大学院農学研究科環境保全学コース

(10 : 40 ~ 11 : 00)

5. 遺伝標識を用いた広島県東部海域におけるガザミ種苗放流の評価

相原 周一郎 5

大学院農学研究科食料生産経営学コース

(11 : 00 ~ 11 : 20)

6. 産官学連携による新規養殖魚種サツキマス創出に向けた取り組み

森 優輝 6

農学部（生物資源学科）

海洋生産科学特別コース

サツキマス種苗の効率的な生産と優良個体の選抜

海洋生産科学特別コース 熊野 靖子

【目的】愛南町では『サツキマス (*Oncorhynchus masou ishikawae*)』が養殖されている。河川残留型はアマゴと呼ばれ、スモルト化（銀毛）した降海型はサツキマスと呼ばれる。愛南町では、山出で種苗生産・養成されたアマゴを、冬期に御荘湾で海水馴致・養殖する。しかし、1) 現在の人工授精法では次世代への各種病原体の垂直感染の恐れがあるほか、2) 海水適応能が低い種苗の海面養殖での低成長が課題として挙げられている。そこで本研究では、授精前洗卵法による魚病フリー種苗の大量生産を試みるとともに、高性能親魚選抜のための海水馴致性能の簡易評価を検討した。

【方法】他のサケ科魚類で有効なイソジン消毒による授精前洗卵法を検討した。アマゴ未受精卵のイソジン処理適正時間を明らかにするため、イソジンへの浸漬時間を変えた各グループの受精率および発眼率を調べた。各個体の海水馴致能を定量化するために、海水馴致後 24 時間のアマゴの血中 Na^+ 濃度を測定した。銀毛アマゴを 70%海水に投入し、24 時間以内に 100%海水になるように換水を行った。血中 Na^+ 濃度の高い個体および低い個体をそれぞれ 20 個体選抜し、マイクロサテライトマーカーを用いた DNA 解析を行った。

【結果・考察】授精前洗卵法がアマゴ卵においても利用可能であると確認できた。また、海水馴致試験終了まで生残した個体は、海水馴致 24 時間後の血中 Na^+ 濃度が有意に低かった。このことは、馴致直後の血液検査で海水馴致能が評価できることを示唆している。DNA 解析の結果、解析に用いたサツキマスの遺伝的多様性は、海水馴致能の優劣にかかわらず低いと考えられた。本試験で用いたサツキマスの海水馴致能には、遺伝的要因よりも環境的要因が影響を与えている可能性がある。

愛南町御荘湾における有害赤潮プランクトン *Cochlodinium polykrikoides* の挙動解析

海洋生産科学特別コース 田中 秀直

有害赤潮プランクトンの増殖による赤潮の発生は養殖魚介類の大量斃死や品質劣化を招き、安定的で持続可能な養殖生産を行う上で、大きな問題となっている。*Cochlodinium polykrikoides* は愛南町御荘湾を中心に頻繁に赤潮を形成するプランクトンであり、平成 25 年には町内で約 4,700 万円の漁業被害を出した。本研究では、愛南町御荘湾における本種の赤潮発生機構を明らかにするために、愛南町海域で得られた約 10 年の環境条件のデータと発生状況を比較・解析するとともに、越冬状況の解析を行った。

愛南町の環境データが揃う 2008～2018 年を対象とし、*C. polykrikoides* の注意濃度である 30 細胞/ml を基準にして、発生年と非発生年に区分した。御荘湾における *C. polykrikoides* 赤潮の主な発生時期は 5 月から 7 月であるため、冬季の前年 12 月から当年 7 月の各月の気象（降水量、気温、平均風速、最大風速、日照時間）および海象（水温（水深 0, 2, 5m）、塩分濃度（水深 0, 2, 5m）、溶存酸素（DO）（水深 0, 2, 5m））のデータについて、発生年と非発生年の差を Mann-Whitney U 検定を用いて解析した。

さらに、*C. polykrikoides* の越冬状態を詳しく知るために、2017 年 12 月および 2018 年 4 月に、御荘湾中浦、高畑、赤水、成川の 4 地点で採泥を行った。採取した底質の一部から DNA を抽出し、realtime PCR 法により各地点での本種の DNA 量を測定した。その後、高濃度で検出された底質をステンレスおよびナイロンメッシュで分画し、各分画での DNA 量を測定した。

発生年と非発生年の間で差が検出された環境要素は、2 月の日照時間、6 月の 0m および 2m 層 DO、7 月の 0m 層水温の 4 要素であった。その中で、発生年の海水中の DO および冬季の日照時間は、有意差がみられた月以外でも非発生年に比べて低い傾向であった。一方、発生年の 0m 層の水温は、7 月以外には大きな傾向は見られなかった。これらの環境条件が本種の初期発生および増殖に影響を与えている可能性が考えられ、今後はこれらのデータを用いた判別分析により発生予測につながると期待できる。

越冬細胞の探索については、各地点の底質に含まれる *C. polykrikoides* の DNA 量を測定した結果、12 月の成川の底質で本種の DNA が高濃度に検出された。さらに、成川の底質を、メッシュを用いて 20 μ m 以下、20～30 μ m、30～40 μ m、40～100 μ m に分画し、それぞれの DNA 量を測定したところ、30～40 μ m の画分に本種の DNA が集中することが明らかとなった。このことから、御荘湾成川の底質中に *C. polykrikoides* の冬季の越冬細胞が多く存在する可能性が示された。また *C. polykrikoides* の冬季の越冬細胞のサイズは 30～40 μ m であることが考えられた。

養殖現場におけるマダイ感染症疾病の早期検出法の開発

海洋生産科学特別コース 宮田 高彰

魚類養殖において、魚病被害は安定的な生産を妨げる大きな要因となるため、早期検出、早期対策が被害の低減に重要である。養殖現場では、病魚の遊泳や摂餌行動、外観などが変化することが知られているが、海上からの目視であるため、生簀内の把握が難しい。そこで、本研究では、環境データ及び行動観察からの養殖魚感染症疾病早期発見システムの開発を目的として、養殖環境中の病原体の挙動解析と、生簀内の動画撮影による行動解析を行った。

2018年4月～11月に、愛南町船越湾の養殖マダイ稚魚の養殖生簀にて、定期的に採水と生簀内の行動撮影を行った。採取した海水は、DNA抽出を行った後、real-time PCR法を用いてマダイエドワジエラ症の原因病原体である、*Edwardsiella tarda* の遺伝子量を測定した。行動解析に関しては、生簀に設置した水中カメラ、または水中ドローンを用いて、体表の変化や遊泳状態を撮影した。さらに、養殖マダイ2歳魚の健全魚または頭部膿瘍が見られた魚を、各6尾ずつ小型生簀にて飼育し、水中カメラを用いて行動を撮影し、両者の行動を比較した。

海水中の病原体解析では、*E. tarda* 遺伝子については、7月から増加しはじめ、9月にピークとなり、11月まで検出され船越地区の診断尾数と同様の傾向であった。このことから感染魚からの排出の可能性が示唆された。行動解析では、水中ドローンを用いて観察することで、生簀底で衰弱したマダイが観察された。また、4月～8月の間は、体表膿瘍を形成している魚は確認されなかったが、9月～11月には体表膿瘍が見られる魚や異常遊泳魚が確認された。さらに、健全魚は水面近くで遊泳する傾向が観察されたが、頭部膿瘍のマダイは網底付近など健康なマダイに比べて深い位置で遊泳している傾向が観察された。これらの結果から、生簀内の病原体遺伝子のモニタリングおよび水中ドローンやカメラを用いた行動解析が、マダイエドワジエラ症の早期検出に有効である可能性が示唆された。

スマの生殖腺の保存プロトコルの確立に向けて

海洋生産科学特別コース 吉村 小輝

【目的】愛媛大学南予水産研究センターでは、優良形質をもつ小型マグロ類スマ (*Euthynnus affinis*) の大量生産に向けて、借腹生産による種苗生産技術の開発を進めている。借腹生産は、優良形質個体（ドナー）の生殖幹細胞を宿主に移植し、ドナー由来の配偶子を得る技術である。本技術を開発するためには、ドナーとなる生殖腺の適切な保存方法の確立が不可欠である。そこで本研究では、スマの生殖腺の短期保存法と凍結による長期保存法の開発を行った。

【方法】スマの生殖腺の短期保存には、異なる濃度のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）および牛胎児血清（FBS）の混合液を調整し、それらに雌雄それぞれの生殖腺断片を浸透した。生殖腺は保存後 1～3 日目にブアン氏液にて固定し、ヘマトキシリン・エオシン染色および免疫組織学的解析に供した。長期保存のためには、雌雄それぞれの生殖腺断片を市販の耐凍剤（Cell Banker1、ゼノアックリソース）に比率が 1:0.5、1:1 または 1:2 になるよう浸漬し、 -80°C にて凍結保存した。解凍後、密度勾配遠心法により生殖幹細胞を含む分画を回収し、生存率を計測した。

【結果】短期保存実験では、保存 3 日目において PBS 濃度が高い混合液ほど生殖腺内の細胞の顕著な脱水が認められた。また、保存 1 日目では PBS、FBS 濃度条件に関わらず生存状況の良い生殖幹細胞がみられたが、日にちが経過するごとに PBS、FBS 濃度が高いほど生殖幹細胞の生存状況が良い傾向にあった。

長期保存方法については、生殖腺断片および耐凍剤の比率が 1:1 で凍結保存した際に最も生殖幹細胞の生存率が高かった。（平均約 36.3%）

本研究より、スマの生殖腺の最適な短期・長期保存方法の基盤情報を得ることができた。今後はさらにサンプル数を増やし検討を重ねることで、スマ生殖腺保存方法の確立へと繋がることが期待される。

大学院農学研究科（修士課程）

環境保全学コース

食料生産経営学コース

遺伝標識を用いた広島県東部海域におけるガザミ種苗放流の評価

大学院農学研究科環境保全学コース 相原 周一郎

【目的】広島県ではガザミ (*Portunus trituberculatus*) 資源の増大を目指し、平成 28 年度から年間 100 万尾程度のガザミ種苗放流を県東部海域において行っている。ガザミは甲殻類の特性上、脱皮を繰り返して成長するため、外部標識による放流個体の追跡が困難であり、遺伝標識による放流個体の追跡および放流効果の把握が有効と考えられる。本研究では、平成 28、29 年度に小型底びき網で漁獲されたガザミと同期間に種苗生産に用いられた母ガニのマイクロサテライト DNA 多型を比較することで母子鑑定を行い、広島県東部海域におけるガザミ種苗放流の効果を評価することを目的とした。

【方法】種苗は交尾済みの野生雌ガザミを母ガニとして、(一社) 広島県栽培協会で生産された。種苗の放流は、4 つの海域 (松永湾海域、田島海域、田尻海域、因島海域) で 5 月から 8 月の間に行った。小型底びき網での漁獲は県東部海域を 6 つの海域 (A~F) に区分けして行った。平成 28 年度サンプルは、種苗生産に用いた母ガニ 19 個体と平成 28 年 10 月から平成 29 年 3 月にかけて県東部海域で漁獲された 856 個体を用いた。また、平成 29 年度サンプルとして、種苗生産に用いた母ガニ 22 個体と平成 29 年 10 月から平成 30 年 3 月にかけて県東部海域で漁獲された 420 個体を用いた。母ガニおよび漁獲された個体の DNA は第一歩脚指節の筋肉から抽出し、8 つのマイクロサテライトマーカー座 (C5, C6, C13, H11, E13, E20, E24, P04) によって各個体の遺伝子型を検出した。検出された遺伝子型から、親子鑑定ソフト PARFEX を用いて母子関係を推定し、放流種苗の再捕率を算出した。また、漁獲した海域と種苗放流海域の記録をもとに、放流種苗の移動について検討した。

【結果】平成 28 年度において解析した 856 個体のうち、36 個体が放流種苗と推定され、各月の再捕率は 0~7.61%、漁期を通した再捕率は 4.21%であった。平成 29 年度においては、解析した 420 個体のうち 7 個体が放流種苗と推定され、各月の再捕率は 0~2.41%、漁期を通した再捕率は 1.67%であった。再捕された種苗は田尻海域で放流された個体が最も多く、その割合は平成 28 年度では 83%、平成 29 年度では 52.8%であった。また、漁獲海域別に漁期を通した再捕率をみると、平成 28 年度の D 海域における 5.43%が最も高かった。一方、放流種苗と推定された個体の漁獲海域と種苗放流海域の記録から、放流海域から約 4 ヶ月で東西に 20 km 程度移動する個体の存在が明らかとなった。以上のことから、田尻海域で種苗放流を行い、10 月から 12 月にかけて D 海域で操業することが、ガザミ種苗放流個体の漁獲効率が低いと考えられる。

産官学連携による新規養殖魚種サツキマス創出に向けた取り組み

大学院農学研究科食料生産経営学コース 森 優輝

近年、水産物の消費量が減少傾向にある中、サケ・マス類は例外的に横ばい傾向で推移している。これは養殖によって可能になったサケ・マス類の生食需要の増加が大きな要因である。こうしたサケ・マスの生食需要を背景に、国内でも各地でサケ・マス類の海面養殖が始まり、「ご当地サーモン」としてブランド化が図られている。魚類養殖が盛んな愛媛県愛南町では、新規養殖魚開発として「サツキマス」の養殖に2014年より取り組んでいる。

種苗生産から海面養殖までを同町内にて行い、町、漁協、大学、生産者がそれぞれ連携する「産官学連携」の形を取り開始から約2年の2016年3月に試験出荷を実現した。町内一貫生産を目指すサツキマス創出は、愛南町の基幹産業である水産業をもとにした地域活性化に繋がることが期待される取り組みである。

このサツキマスを生産するうえで重要になる種苗のアマゴを生産するのは、同町内山間部にある小さな養鱒場である。この養鱒場は、前経営者の高齢化を理由に閉業しかけたものを福祉事業所が引き継ぎ、身障者等の就労支援を行う場として再活用されることになった。従来、身障者等の就労支援施設としては、加工場等の閉鎖的環境で水産物を利用した就労支援の事例はあるものの、生産現場を利用した施設や事例はほとんどない。これは水産業が慢性的に抱える従事者不足問題の解決、就労支援を行う場の多様化による身障者との共生に繋がると考えられ、その基礎情報の集積をした。

地域の様々な人の手により生産されたサツキマスは2016年より出荷を始め2018年、生産技術向上により右肩上がりに販売尾数を増やしていった。このサツキマスはプロジェクトの司令塔である愛南漁協がプラットフォームとなり販売している。販売尾数は増加傾向にあるものの、サツキマスのサイズ、ロットが実需者のニーズとズレが生じ、円滑な販売ができていなかった。愛南町産の他の養殖魚に紐づけした販売が主となっており、販路、販売方法の最適化が求められた。そこでサツキマスの本来持つ希少性や食味評価に加え、AEL認証を取得し安全性という付加価値を全面的に押し出し、主力販路も変更と様々な販売戦略を展開している。

サツキマスが、愛南町の地域商材として、盤石な地位を得るには、まだ残された課題も多いが、愛南町において福祉事業の新たな参入のような未来志向の地域活性化を果たす商材として成長することが期待されるゆえ、今後も検討していきたい。