成貝の付着誘引効果を用いたマガキ人工採苗技術の改良

平 田 靖

(1997年3月26日受付)

Effective Pretreatments of Spat-collectors for Induced Settlement of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*Yasushi Hirata^{*1}

The effects of pretreatment of scallop shell spat-collectors on oyster *Crassostrea gigas* larval settlement were studied. Spat-collectors were pretreated by immersion in 1 mM L-DOPA, filtered seawater, surface seawater, filtered seawater with oyster shells or live adult oysters for 4 days. An average of 84% spats were found on spat-collectors pretreated in seawater with the presence of live adult oysters after 3 days of the settlement experiment. This settlement-inducing effect was increased by extending the pretreatment period and by increasing the number of adult oysters. The settlement-inducing effect decreased considerably when such pretreated spat-collectors were soaked in hot (50°C) water and dried. The results of these experiments confirmed that the pretreatment with live adult oysters increased the ratio of larval settlement to spat-collectors, and enabled the setting period to be reduced. The pretreatment of spat-collectors with live adult oysters could be applied to the large-scale artificial setting of oyster larvae.

キーワード：マガキ，人工採苗，付着誘引，前処理

広島県では1988年から三倍体マガキ種苗の量産技術開発研究^{*2-*}を進めてきた。これに伴い，作出した三倍体マガキ幼生の人工採苗技術の確立が必要になり，研究規模の人工採苗技術^{*9-*}が検討されてきた。日本国内のマガキ養殖種苗は，もっぱら天然採苗によってまかなわれてきた¹⁾ため，量産規模での知見は乏しく，当初は，天然採苗に使用されるホタテガイ殻製の採苗器と2 kℓ容の角型水槽(1×2×1 m)を用いて人工採苗を試みた。この場合の付着率は数%から最高64%となり，毎回大きく変動した。^{*5-*} また，付着率が高い場合でも採苗器の一部に幼生が集中して付着し，少ないところと数百以上の差が生じる，いわゆる「ムラ付き」の傾向が強く，養殖用種苗として使用に耐える均質の付着を安定

して得ることはできなかった。

カキ幼生の変態や付着に関する既往の研究では，既に付着している同種の成貝あるいは稚貝，²⁻⁵⁾ カキの抽出物，^{6,7)} 基質表面のバクテリアフィルム⁸⁻¹⁰⁾などが幼生の付着行動を誘起することが明らかにされており，その機構は，貝およびバクテリアの代謝産物中に類似の付着誘引因子があるとする説，¹¹⁾ アンモニアが付着行動を誘起するという説^{12,13)}などがある。また，L-DOPA (L-3,4 dehydroxyphenyl-alanine) およびアドレナリンやノルアドレナリンなどの神経伝達物質によって，付着行動や変態が誘起される^{14,15)}ことも明らかにされており，化学物質が受容器を刺激した結果，神経伝達回路を介して付着変態が誘起される可能性が強く示されている。こうし

^{*1} 広島県水産試験場 (Hiroshima Prefectural Fisheries Experimental Station, Onoda, Hiroshima, 737-1207, Japan).

^{*2} 広島県水産試験場：カキ新品種育種開発事業 (量産技術開発試験)。昭和63年度広水試事報，24 (1989)。

^{*3} 広島県水産試験場：「特選広島かき」量産技術開発事業。平成元年度広水試事報，20-28 (1990)。

^{*4} 広島県水産試験場：「特選広島かき」量産技術開発事業。平成2年度広水試事報，19-27 (1991)。

^{*5} 広島県水産試験場：「特選広島かき」量産技術開発事業。平成3年度広水試事報，16-31 (1992)。

^{*6} 広島県水産試験場：「特選広島かき」量産技術開発事業。平成4年度広水試事報，17-35 (1993)。

^{*7} 広島県水産試験場：「特選広島かき」種苗生産事業 (付着稚貝配布事業)。平成5年度広水試事報，26-28 (1994)。

^{*8} 広島県栽培漁業協会：「特選広島かき」種苗生産。平成5年度広水試事報，59-65 (1994)。

^{*9} 広島県水産試験場：カキ生産安定化緊急対策研究 (カキ人工採苗)。昭和52年度広水試事報，26-28 (1978)。

^{*10} 広島県水産試験場：カキ生産安定化緊急対策研究 (カキ人工採苗)。昭和53年度広水試事報，28 (1979)。

^{*11} 広島県水産試験場：カキ生産安定化緊急対策研究 (カキ人工採苗研究)。昭和54年度広水試事報，36 (1980)。

た知見を基に、生産現場では、神経伝達物質を使って強制的に幼生を変態させる方法¹⁶⁾、マガキ抽出液による採苗器の処理¹⁷⁾などが試みられているが、量産規模で有効な付着誘起方法は確立されていない。また、カナダの人工採苗マニュアル¹⁸⁾に紹介されている、採苗器を海面に浸漬してから用いる方法を試みたが、人為的にマガキ幼生の付着をコントロールできるまでには至らなかった。

本報では、付着期のマガキ幼生を採苗器に効率的に付着させる方法を模索するという目的で、採苗器の前処理法の有効性について検討した結果、実用化可能な若干の技術的知見が得られたので報告する。

実験方法

各種の溶液に採苗器を浸漬して前処理を行い、それらの採苗器をマガキ *Crassostrea gigas* 成熟幼生の入った付着水槽に入れ、各採苗器への幼生付着数を計数することによって前処理の効果を評価した。

採苗器 採苗器の材料としては天然採苗で広く用いられているホタテガイ殻を用いた。採苗器は付着状況が観察しやすいように白色のものを用いた。ホタテガイ殻は個体によって形状が大きく異なるので、面積をほぼ一定にするため4×5 cmの方形に削り4 cm 辺側に直径約2 mmの穴を開けたもの（以下これを採苗器とする）を試験に用いた。付着面はワイヤーブラシなどで丁寧に汚れを削り取った後、120℃の乾熱滅菌器で乾燥させた。付着試験使用時には採苗器の位置保持および移動のため穴に直径約0.8 mmのビニール被覆針金をくくり付けた。

幼生 付着試験に用いたマガキ幼生は、広島県水産試験場で採卵し飼育した二倍体被面子幼生で、目合224あるいは236 µmのプランクトンネットで選別した付着期の個体である。付着試験—1から4に用いたマガキ幼生の大きさをTable 1に示した。

試験区の設定 設定したそれぞれの試験区をTable 2に示した。各試験区の採苗器は3枚ずつとし、それぞれの前処理溶液に採苗器を浸漬した。各前処理は室温で行った。

1. 採苗器の前処理方法の違いによる付着誘引効果の比較（付着試験—1）採苗器の前処理液として次の7つの溶液を用意した。1. L-DOPA 1 mM 水溶液 500 ml (1-LDOPA), 2. カートリッジフィルター (1 µm) で濾過した海水（以下FSW）3 l (1-FSW), 3. 広島県水産試験場地先で採取した表層海水 3 l (1-SW), 4. 海から陸揚げ後ワイヤーブラシで付着物を落とし10日間屋外で乾燥した殻高約5 cmのカキ殻2個体分を2 lのFSWに入れたもの (1-FOS), 5. 同じく10日間屋外で乾燥したカキ殻2個体分をハンマーで細かく砕き、そ

Table 1. Larval size and density at start of each experiment

Exp. No.	Shell height (Mean±SD µm)	Larval density (No./ml)
1	343.6±16.0 (n=23)	0.5
2	332.4±18.3 (n=35)	0.5
3	330.8±12.2 (n=30)	0.4
4	333.9±11.7 (n=26)	0.5

の碎片を2 lのFSWに入れたもの (1-FCOS), 6. 陸揚げ後付着物を除去した殻高約5 cmの生きたマガキ1個体を軟体部ごとハンマーで粉碎した碎片をFSW7 lに入れたもの (1-FCWO), 7. 陸揚げ後付着物を除去した殻高約5 cmの生きたマガキ3個体をFSW7 lに入れたもの (1-FLWO)。前処理の期間は4日間として、前処理を行わない対照区 (1-NT) の採苗器とともに付着試験に供した。

2. 付着誘引効果の起因部位の検討（付着試験—2）マガキ成貝から得られた幼生の付着誘引効果の起因部位を検討するため、次の4種類の前処理を行った。殻高約8 cmのマガキ成貝4個体を海から陸揚げし、ワイヤーブラシで付着物を取り除き、1. 生きたまま2個体を7 lのFSWに入れたもの (2-F2LWO), 2. 軟体部2個体分を入れたもの (2-F2WMO), 3. カキ殻2個体分を入れたもの (2-F2OS), および、4. 何も入れないFSWのみのもの (2-FSW) を用意して、それぞれの前処理溶液に採苗器を浸漬した。これらの前処理は約30℃の室温で行ったので、カキ軟体部を入れた前処理溶液は2日目には白濁し腐敗臭を発していた。よって、前処理は2日間で終了させ、前処理を行わない対照区 (2-NT) と合わせ、計5種類の採苗器を付着試験に供した。

3. マガキ成貝による付着誘引効果の性質（付着試験—3）マガキ成貝による付着誘引効果の性質を検討するため、次のような採苗器の処理を行った。まず、マガキ成貝10個体（殻高約10 cm）を入れた25 lの前処理海水に採苗器を3日間浸漬し、1. そのまま付着試験に供する区 (3-FLWO), 2. 付着試験の前に、1時間室温で乾燥した区 (3-DRY1H), 3. FSWの流水で1時間洗った区 (3-WASH1H), 4. 50℃の蒸留水に10秒間 (3-HEAT10S) 浸漬した区、5. 50℃の蒸留水に60秒間 (3-HEAT60S) 浸漬した区を設け、6. マガキ成貝による前処理を行わず、FSWに3日間浸漬した区 (3-

Table 2. Summary of the pretreatments of scallop shell spat-collectors in each settlemental experiment

Exp. No.	Type of pretreatment	Volume of pretreatment (l)	Period of pretreatment (days)	Details of pretreatment solution (Three collectors were pretreated by immersion in each solution)
1	1-LDOPA	0.5	4	L-DOPA 1 mM dissolved in DW
	1-FSW	3	4	Filtered seawater (1 μ m) (FSW)
	1-SW	3	4	Surface seawater
	1-FCOS	2	4	FSW with crushed oyster shells
	1-FOS	2	4	FSW with two sets oyster shells
	1-FCWO	7	4	FSW with crushed whole oyster
	1-FLWO	7	4	FSW with three live whole oyster
	1-NT	—	—	Control
2	2-F2LWO	7	2	FSW with two live whole oysters
	2-F2WMO	7	2	FSW with two whole meats of oysters
	2-F2OS	7	2	FSW with two sets of oyster shells
	2-FSW	7	2	FSW (1 μ m)
	2-NT	—	—	Control
3	3-FLWO	25	3	FSW with 10 live whole oysters
	3-DRY1H	25	3	Collectors were dried for 1 hr. after 3-FLWO treatment.
	3-WASH1H	25	3	Collectors were washed by running FSW for 1 hr. after 3-FLWO treatment.
	3-HEAT10S	25	3	Collectors were immersed in 50°C DW for 10 sec. after 3-FLWO treatment.
	3-HEAT60S	25	3	Collectors were immersed in 50°C DW for 60 sec. after 3-FLWO treatment.
	3-FSW	25	3	FSW (1 μ m)
	3-NT	—	—	Control
4	4-14O1D	25	1	FSW with 14 live whole oysters*1
	4-14O2D	25	2	FSW with 14 live whole oysters
	4-14O4D	25	4	FSW with 14 live whole oysters
	4-1O1D	25	1	FSW with a live whole oyster*2
	4-1O2D	25	2	FSW with a live whole oyster
	4-1O4D	25	4	FSW with a live whole oyster
	4-SS	—	2	Suspended 2 m depth at sea.
	4-NT	—	—	Control

*1 Average total weight $\pm$ SD: 56.4 $\pm$ 23.6 g.

*2 Total weight: 82.9 g.

FSW), および, 7. 前処理をしない区 (3-NT) と合わせ計 7 区の採苗器を付着試験に供した。

4. マガキ成貝飼育水浸漬法と海面浸漬法の付着誘引効果の比較 (付着試験—4) マガキ成貝の飼育水と養殖海面に浸漬した場合の付着誘引効果を比較するため, マガキ成貝の数と前処理期間の異なる 6 種類の試験区と, 海面に浸漬した区および前処理をしていない区の合計 8 種類の試験区を設けた。飼育海水に浸漬する区としては, ポリカーボネイト水槽に 25 l の FSW を入れ, ガラス管で軽く通気し, 陸揚げ後ワイヤーブラシで付着物を取り除いた平均重量 56 g (殻高約 9 cm) のマガキ

成貝 14 個体を収容し, この前処理液への採苗器の浸漬期間を 1 日 (4-14O1D), 2 日 (4-14O2D) および, 4 日 (4-14O4D) とした 4 区を設けた。さらに, 同様の水槽に収容するマガキ成貝を 1 個体 (重量 83 g, 殻高約 10 cm) とし, 前処理期間を 1 日 (4-1O1D), 2 日 (4-1O2D) および, 4 日 (4-1O4D) とした 4 区を設けた。また, 採苗器を海面に浸漬する区としては, 広島県水産試験場地先の海上筏から水深 2 m に 2 日間垂下した (4-SS)。以上の 7 区に加えて前処理をしていない区 (4-NT) の合計 8 種類の採苗器を付着試験に供した。

付着試験 直径 30 cm, 深さ 15 cm のスチロール製

円形水槽にFSWを8 l入れ、マガキ幼生を約4,000個体(収容密度約0.5個体/ml)収容した。この水槽に、前処理した各採苗器をFSWで軽く共洗してから設置した。採苗器は4 cmの辺が水槽底に着くように直立させ、同じ試験区の採苗器が集中しないように配置した。また、1枚ずつ針金で水槽上部から垂下し、採苗器が互いに接しないように注意した。水温はウォーターバスで27°Cに保ち、通気と攪拌は行わなかった。幼生の付着数を計数する時以外は、水槽の上部を黒色のビニールシートで遮光して暗黒にした。採苗器は毎日取り上げ幼生の付着個体数を計数し再び試験水槽に戻した。餌料として、10 lのガラス瓶で室内培養した *Chaetoceros calcitrans* あるいは *C. gracilis* を $3\sim4\times10^4$ cells/ml の濃度で添加した。付着試験を開始してから2日後には1/2の飼育水の換水を行い、開始時と同濃度となるように餌料を追加した。付着試験は3日間を終了した。

統計解析 各付着試験における各採苗器への付着個体数は、一元配置分散分析(One way ANOVA)で平均値間の差の存在を確認した後、各試験区間の差をDuncanの多重比較法によって検定した。全ての統計解析はAbacus Concept社のパソコン用ソフトウェア「Super ANOVA」を用いて行った。

結 果

採苗器の前処理方法の違いによる付着誘引効果の比較(付着試験—1) 付着試験終了時(3日後)に最も多く幼生が付着していたのは、採苗器を生きたマガキ成貝を入れた海水で前処理した(以下マガキ成貝による前処理とする)場合で、3枚の採苗器に合計1,690個体(供試幼生の42.3%, 全付着個体の84.2%)が集中して付着した(1-FLWO)。次いで、粉砕カキ殻を入れた海水で前処理した場合の105個体(供試幼生の2.6%, 全付着個体の5.2%)であった(1-FCOS)。他の試験区は顕著な誘引効果はみとめられなかった。L-DOPA水溶液に浸漬して前処理した採苗器の表面は黒色に変色し2個体が付着したのみであった(1-LDOPA)。付着試験を終了した時点(3日後)で、供試した幼生の50%が付着し、そのうち96%が採苗器上に、また、4%が水槽壁面に付着した(Table 3)。

マガキ成貝による前処理をした区(1-FLWO)と無処理区(1-NT)の幼生付着数の変化をFig. 1に示した。マガキ成貝による前処理(1-FLWO)に対する採苗器1枚あたりの平均付着数は1日目の201個体から、2日目の420個体に増加し、3日目には563個体に達した。一方、無処理(1-NT)では3日後の平均付着個体数は3.7個体であった。

この試験により、試験開始1日後からすでに付着数

Table 3. Percentage of larval settlement in each experiment

Exp. No.	Settlement (%)			Unsettlement (%)		
	Collectors	Vessel	Total	Live	Dead	Total
1	48	2	50	—	—	50
2	31	12	43	—	—	57
3	73	9	82	16	2	18
4	58	6	64	30	6	36

Fig. 1. Changes in the number of settled larvae of the oyster *Crassostrea gigas* during 3 days in Experiment 1.

●, collectors were pretreated by immersion in filtered seawater with live whole oysters for four days (1-FLWO). ○, collectors were not pretreated (1-NT). Vertical bar: mean $\pm$ SEM ($n=3$).

に明確な差を認めることができ、観察期間を2日以上にした場合には、付着誘引効果が失われる可能性があることや、付着したマガキ稚貝が新たな幼生の付着を誘引することも考えられるので、付着誘引効果の比較は試験開始後1日目の付着個体数で行うこととした。各区の試験開始後1日目の平均付着個体数をFig. 2に示した。分散分析の結果8種の前処理の付着誘引効果はすべて等しいという帰無仮説は1%の危険率で棄却された。また、マガキ成貝による前処理(1-FLWO)は他のどの区よりも有意に大きな付着誘引効果を持つことがみとめられた($p<0.05$)。

付着誘引効果の起因部位の検討(付着試験—2) 次に、生きたマガキ成貝の、殻の部分あるいは軟体部のどちらが誘引効果の原因となっているかを明らかにするため、付着試験を行った。付着試験開始後1日目の各区の付着数をFig. 3に示した。最大の付着数を示したの

Fig. 2. Effects of pretreatment of collectors.

The number of settled larvae of the oyster *Crassostrea gigas* on each collectors in Experiment 1. The values are represented as mean $\pm$ SEM of three different collectors. The details of each pretreatment procedure are explained in Table 2. Treatment with common superscripts are not significantly different (ANOVA, $F(7, 16) = 5.49$, $p = 0.0023$, Duncun's multiple comparisons test, $p < 0.05$).

Fig. 3. Effects of pretreatment of collectors.

The number of settled larvae of the oyster *Crassostrea gigas* on each collectors in Experiment 2. The values are represented as mean $\pm$ SEM of three different collectors. The details of each pretreatment procedure are explained in Table 2. Treatment with common superscripts are not significantly different (ANOVA, $F(4, 10) = 4.90$, $p = 0.0190$, Duncun's multiple comparisons test, $p < 0.05$).

Fig. 4. Effects of pretreatment of collectors.

The number of settled larvae of the oyster *Crassostrea gigas* on each collectors in Experiment 3. The values are represented as mean $\pm$ SEM of three different collectors. The details of each pretreatment procedure are explained in Table 2. Treatment with common superscripts are not significantly different (ANOVA, $F(6, 14) = 3.27$, $p = 0.0318$, Duncun's multiple comparisons test, $p < 0.05$).

は、マガキ軟体部を入れた海水で前処理した区 (2-F2WMO) で、平均 112 個体が付着した。次いで、マガキ成貝を入れた海水に浸漬した区 (2-F2LWO) には平均 58 個体、殻のみを入れた FSW で前処理した区 (2-F2OS) には平均 12 個体が付着した。分散分析の結果、付着試験—2 の各試験区間に有意の差があった ($p < 0.05$)。マガキ軟体部で前処理した区 (2-F2WMO) は、殻のみで前処理した区 (2-F2OS) より有意に多く付着したことから ($p < 0.05$)、付着誘引効果は殻の部分ではなくマガキの軟体部に起因することが明らかとなった。付着試験終時 (3 日後) の付着幼生は供試幼生の 43% で、そのうち 72% が採苗器への付着、28% が水槽壁面への付着であった (Table 3)。

マガキ成貝による付着誘引効果の性質 (付着試験—3) マガキ成貝による前処理によって採苗器表面に付加された誘引効果の性質を検定した。付着試験開始後 1 日目の幼生付着個体数を Fig. 4 に示した。マガキ成貝による前処理後直ちに付着試験に供した採苗器には平均 209 個体が付着した (3-FLWO)。しかし、前処理後 1 時間乾燥した採苗器 (3-DRY1H) には平均 58 個体、前処理後 1 時間流水で洗浄した採苗器 (3-WASH1H) には平均 87 個体、前処理後 50°C、10 秒間の熱処理では 67 個体 (3-HEAT10S) および 50°C、60 秒間の熱処理では 49 個体 (3-HEAT60S) が付着し、どの区も有意

に付着数が少なかった ($p < 0.05$)。これらのことからマガキ成貝による前処理によって採苗器表面に付加された付着誘引効果は乾燥、熱によって減少し、海水で洗い流される性質を持つことが明かとなった。付着試験終時(3日後)の付着幼生は供試幼生の82%で、そのうち89%が採苗器への付着、11%が水槽壁面への付着であった (Table 3)。

マガキ成貝飼育水浸漬法と海面浸漬法の付着誘引効果の比較(付着試験—4) 付着誘引効果に対する前処理溶液中のマガキ成貝の個体数と処理期間の関係に加え、養殖漁場の海面への浸漬効果を比較した結果を Fig. 5 に示した。マガキ成貝 14 個体を入れた海水で前処理した採苗器には、前処理期間 1 日 (4-14O1D) では平均 53 個体、2 日 (4-14O2D) では平均 159 個体、4 日 (4-14O4D) では平均 147 個体が付着した。一方、マガキ成貝 1 個体を入れた海水で前処理した採苗器には、前処理期間 1 日 (4-1O1D)、2 日 (4-1O2D) では平均 2 個体、4 日 (4-1O4D) では平均 13 個体しか付着しなかった。14 個体のマガキ成貝を入れた海水で前処理した採苗器の付着個体数は、前処理期間が 1 日から 2 日にかけて飛躍的に増大した ($p < 0.05$)。また、前処理期間が 2 日および 4 日において比較した場合、マガキ成貝が 1 個体より 14 個体の方が有意に多く付着した ($p < 0.05$)。海面に 2 日間浸漬した採苗器 (4-SS) には平均 17 個体が付着し、無処理区 (4-NT) の約 5 倍となった。2 日間の前処理期間では、マガキ成貝 1 個体での前処理区 (4-1O2D) と海面浸漬による前処理区 (4-

SS) との間には有意な差はなかったが、マガキ成貝 14 個体で前処理した区との間には有意な差があり ($p < 0.05$)、使用するマガキ成貝の個体数が多ければ海面浸漬よりも付着誘引効果が大きいことを示した。付着試験終時 (3 日後) の付着幼生は供試幼生の 64% で、そのうち 91% が採苗器への付着、9% が水槽壁面への付着であった (Table 3)。

考 察

本試験の結果は、マガキ成貝飼育海水による採苗器の前処理によって、付着期のマガキ幼生を選択的に採苗器に付着させることが可能なことを示した。これは生きたマガキ成貝から幼生の付着を誘引する化学物質が放出され清浄なホタテガイ殻表面にその物質が付着したか、あるいはマガキ成貝の存在の条件下で採苗器表面に特異なバクテリアフィルムが形成されたことによってカキ幼生の付着が誘引されたものと考えられる。この現象は、Cole and Knight-Jones²⁾ および Bayne⁷⁾ が *Ostrea edulis* で、また、Crisp⁶⁾ および Hidu⁴⁾ が *Crassostrea virginica* で、さらに Pascual and Zampatti⁵⁾ が *Ostrea puelchana* で実験的に証明した同種の個体を持つ付着誘引因子によるもの、あるいは Fitt *et al.*^{8,9)} および Weiner *et al.*¹⁰⁾ が *Crassostrea gigas* を用いて示したバクテリアフィルムによるもの、あるいは、Tamburri *et al.*¹¹⁾ が *Crassostrea virginica* を用いて示したように両者が相互依存的に働いている場合のいずれかに相当すると考えられるが、今回の試験結果からはそのいずれに相当するかを示すこと

Fig. 5. Effects of pretreatment of collectors.

The number of settled larvae of the oyster *Crassostrea gigas* on each collectors in Experiment 4. The values are represented as mean $\pm$ SEM of three different collectors. The details of each pretreatment procedure are explained in Table 2. Treatment with common superscripts are not significantly different (ANOVA, F(7, 16) = 4.61, $p = 0.0054$, Duncan's multiple comparisons test, $p < 0.05$).

はできない。マガキ幼生の付着誘引因子はマガキ成員の軟体部に由来しており、浸漬に用いたマガキ成員の個体数の増加によって強度を増し、浸漬期間の長さが強度に影響を与えること、また、付加された効果は乾燥あるいは熱で減少することが明らかとなった。これらの結果は、付着誘引効果の強度をマガキ成員の個体数あるいは前処理期間によって人為的に制御できることを示している。Bayne⁷⁾はカキからの抽出物をスレート表面に処理してカキ幼生の付着誘引効果を調べ、抽出物の誘引効果は種特異性を持っており、乾燥、煮沸に安定であるが、タンパク質分解酵素によって直ちに効果が失われることを明らかにした。今回の試験結果では、付着誘引効果は乾燥と熱処理によって減少したので、マガキ成員由来の付着誘引効果はカキ軟体部からの抽出によるものとは異なる性質を持つと考える。

各付着試験を通じて、開始後1日目の無処理区の採苗器の付着数は計10個体以下であるのに対して、付着誘引効果のある採苗器には有意に多くの幼生が付着した。また、3日目までに水槽壁面に付着した幼生は、供試幼生の2%~12%にとどまり、極めて少ないことが示された。このことから、付着期幼生は採苗器表面の付着誘引因子に対する選択性が非常に高いことが明らかで、前処理を施した採苗器を用いることによって、幼生を優先的に採苗器表面に付着させることが可能になると考える。

今回の一連の付着試験の温度設定は27°Cであったが、付着試験—3では最初の1日で収容幼生の約46%が、2日後には69%が採苗器に付着し、27°Cでも良好な付着を得ることができることを示した。これに対し、楠木・平田¹⁹⁾は、マガキ人工採苗の適水温が30~32°Cであると推定している。しかし、実際の大量採苗の現場では、30°Cの温度に維持することは真夏を除いては困難である。また、高水温での維持は、飼育水の急激な悪化を招き易く未付着の成熟幼生の大量へい死を引き起こす可能性が高い。一方、カナダの人工採苗マニュアル¹⁸⁾では30°Cで採苗した場合付着の初期には好成績をもたらすが、その後この水温を維持した場合ストレスを受けるので20~25°Cに水温を保つよう示している。従って、25°C以下の水温で採苗を行うことが安全であるが、この場合の付着には長時間を要し、付着率も低下することが知られている。¹⁹⁾本試験の結果を用いることにより、この点を補うことができる可能性が考えられる。

「ホタテガイ殻に、人工的にしかも低コストに量産に対応できる方法で幼生付着誘引効果を付加する」目的を達成するためには、まず、マガキ軟体部から誘引物質を抽出し採苗器に付着誘引効果を付加する方法が考えられよう。例えば Gillmor and Arakawa¹⁷⁾は概ね Crisp⁹⁾が

Crassostrea virginica で用いた方法に準じ、マガキ *Crassostrea gigas* (約150個)のむき身を海水を張った10 lの容器に入れ、0~2°Cに保って48時間放置し、むき身を取り出して残った液の中に採苗器を24時間(0~2°C)浸漬した後、採苗器を取り上げ陰干して用いている。この方法は、今回の付着試験—2においてカキ軟体部で前処理した区(2-F2WMO)が最大の付着数を示したことから高い誘引効果を示すものと推測される。しかし、腐敗を防ぐため低温に維持する必要があることから、採苗器を大量処理するにはコストが問題になり、マガキ成員の飼育海水に浸漬する本法の方が有効であると考えられる。また、誘引物質を純粋な形で取り出す、あるいは、人工的に合成し何らかの方法によって採苗器にそれを付加する方法が考えられるが、今後の研究を待たねばならない。

Coon *et al.*¹⁴⁾はL-DOPAがマガキ *Crassostrea gigas* 成熟幼生に付着行動および変態を引き起こすことを示した。この場合に、L-DOPAは海水に溶解させ幼生に直接作用させている。今回の試験では1 mMのL-DOPA水溶液に採苗器を浸漬し誘引効果を付加させるを試みたが、前処理溶液および採苗器は黒色に変色し採苗器表面に誘引効果が付与されることはなかった。その後、L-DOPAはマガキ *Crassostrea gigas* 体内のドーパミン作動性の神経系に直接関与することが示されており、¹⁵⁾L-DOPAは自然界における付着変態誘引因子ではなく、この物質を用いて特定の部位に幼生を付着させることはできないと考えられる。神経伝達物質を用いて強制的に付着変態させる方法は、極めて小粒の質粒に付着させるカルチレスの一粒採苗¹⁶⁾により、引き続き養殖を一粒単位で行って殻付きのまま市場に出される場合には有効であると考えられる。カキを採苗器に付着させ収穫するまで筏から垂下するという広島県などの養殖形態には、有効な方法であるとはいえない。

大規模な人工採苗において、ホタテガイ殻に幼生付着誘引効果を付加する方法として、次に、バイオフィルムを応用する方法が考えられる。バイオフィルムの人為的コントロールは、カナダのカキ人工採苗で行われており、「コンディショニング」¹⁸⁾と称された、採苗器を海面に浸漬する作業によって行われている。この作業によって採苗器表面に付着期のカキ幼生を引き付けるといわれるバクテリアや微細付着生物の被膜が形成されるとされるが詳しい機構は示されていない。採苗器を海面へ浸漬することによって付着効果を高めるという方法は、広島県においても試みられ、²⁷⁾その効果はわずかであることが確認されている。今回の付着試験—4の結果においても、海面に浸漬することによって付着数は無処理区より若干増加したが、マガキ成員による前処理のほうが明

らかに高い付着数を示した。実際の人工採苗では海面に採苗器を浸漬し、再び人工採苗水槽に収容することは煩雑であり、採苗器に付着した雑多な生物も混入することになり好ましくない。これに対して、マガキ成貝による前処理ではマガキ成貝の殻表面さえ清浄にすれば他生物の混入は最小限に抑えられるすぐれた方法であると思われる。また、マガキ成貝の使用数量および前処理期間によって誘引効果を人為的に調節できる利点が考えられる。

以上のことから、生きたマガキ成貝による採苗器の前処理法は以下の点で有効である。(1)マガキ成貝は養殖地域で比較的簡単に入手でき再利用が可能で低コストである。(2)マガキ成貝の数および前処理期間によって誘引効果の強度の調節が可能である。(3)前処理時に腐敗などが起こらず採苗水槽での悪影響が少ない。(4)前処理水槽の大型化、マガキ成貝個体数の増加によって簡便に採苗規模の拡大調節ができる。この採苗器の前処理技術の応用によってマガキ人工採苗の効率化が図れるものと思われる。

謝 辞

本論文をまとめるのに際し、数々の貴重な助言をいただいた東京大学農学部付属水産実験所助教授黒倉 寿博士に心から厚く御礼申し上げます。また、本研究の機会を与えて下さった広島県水産試験場村上恭祥場長をはじめ、統計処理にご協力いただいた飯田悦左研究員、材料の提供あるいは助言をいただいた職員の皆様に対し深く感謝します。

文 献

- 1) 大泉重一：種ガキ生産、「改訂版浅海完全養殖」(今井丈夫監修)、恒星社厚生閣、東京、1976、pp. 155-169.
- 2) H. A. Cole and E. W. Knight-Jones: The setting behavior of larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* L. and its influence on methods of cultivation and spat collection. *Fish. Invest., Lond. Ser. II*, 17(3), 1-39 (1949).
- 3) E. W. Knight-Jones: Reproduction of oysters in the Rivers Crouch and Rouch, Essex, during 1947, 1948, and 1949. *Fish. Invest., Lond. Ser. II*, 18(2), 1-48 (1952).
- 4) H. Hidu: Gregarious setting in the American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Chesapeake Sci.*, 10, 85-92 (1969).
- 5) M. S. Pascual and E. A. Zampatti: Evidence of a chemically mediated adult-larval interaction triggering settlement in *Ostrea puelchana*: applications in hatchery production. *Aquaculture*, 133, 33-44 (1995).
- 6) D. J. Crisp: Chemical factors inducing settlement in *Crassostrea virginica* Gmelin. *J. Animal Ecol.*, 36(2), 329-335 (1967).
- 7) B. L. Bayne: The gregarious behavior of the larvae of *Ostrea edulis* L. at settlement. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 49, 327-356 (1969).
- 8) W. K. Fitt, M. P. Labare, W. C. Fuqua, M. Walch, S. T. Coon, D. B. Bonar, R. R. Colwell, and R. M. Weiner: Factors influencing bacterial production of inducers of settlement behavior of larvae of the oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.*, 17, 287-298 (1989).
- 9) W. K. Fitt, S. L. Coon, M. Walch, R. M. Weiner, R. R. Colwell, and D. B. Bonar: Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. *Mar. Biol.*, 106, 389-394 (1990).
- 10) R. M. Weiner, M. Walch, M. P. Labro, D. B. Bonar, and R. R. Colwell: Effect of biofilms of the marine bacterium *Alteromonas colwelliana* (LST) on the set of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *C. virginica* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish Res.*, 8, 117-123 (1989).
- 11) M. N. Tamburri, R. K. Zimmer-Faust, and M. L. Tamplin: Natural sources and Properties of Chemical inducers mediating settlement of oyster larvae: a re-examination. *Biol. Bull.*, 183, 327-338 (1992).
- 12) S. L. Coon, M. Walch, W. K. Fitt, R. M. Weiner, and D. B. Bonar: Ammonia induces settlement behavior in oyster larvae. *Biol. Bull.*, 179, 297-303 (1990).
- 13) W. K. Fitt and S. L. Coon: Evidence for Ammonia as a natural cue for recruitment of oyster larvae to oyster beds in a Georgia Salt Marsh. *Biol. Bull.*, 182, 401-408 (1992).
- 14) S. L. Coon, D. B. Bonar, and R. M. Weiner: Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 94, 211-221 (1985).
- 15) S. L. Coon, W. K. Fitt, and D. B. Bonar: Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.*, 106, 379-387 (1990).
- 16) S. L. Coon, D. B. Bonar, and R. M. Weiner: Chemical production of cultchless oyster spat using epinephrine and norepinephrine. *Aquaculture*, 58, 255-262 (1986).
- 17) R. B. Gillmor and K. Y. Arakawa: Some field experiments on setting in *Crassostrea gigas* (Thunberg) (preliminary report). *Bull. Hiroshima Fish. Exp. Sta.*, 6•7, 37-51 (1976).
- 18) G. G. Jones and B. L. Jones: Advances in the remote setting of Oyster larvae, Aquaculture Association of British Columbia, Canada, 1988.
- 19) 楠木 豊・平田貞郎：マガキ人工採苗の適水温。広水試研報, 17, 11-19 (1992).