

博士論文

アコヤガイ真珠のキズ・シミ形成抑制のための
新養生技術開発

Development of a new post-operative care method
to decrease the rate of deformities and blemishes
of Akoya pearls

平成 27 年 3 月

三重大学大学院生物資源学研究科

渥 美 貴 史

目次

第一章	総合緒言	・・・3
第二章	低塩分海水養生による 無キズ珠率向上効果の実証	・・・7
2-1	諸言	・・・7
2-2	材料および方法	・・・8
2-3	結果	・・・12
2-4	考察	・・・13
第三章	無キズ珠率に及ぼす 養生方法，挿核技術と母貝の影響	・・・16
3-1	諸言	・・・16
3-2	材料および方法	・・・17
3-3	結果	・・・20
3-4	考察	・・・22
第四章	低塩分海水養生期間短縮の検討	・・・24
4-1	諸言	・・・24
4-2	材料および方法	・・・24
4-3	結果	・・・28
4-4	考察	・・・30
第五章	複数個挿核した貝を用いた 低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果の比較	・・・32
5-1	諸言	・・・32
5-2	材料および方法	・・・33
5-3	結果	・・・36
5-4	考察	・・・37

第六章 低塩分海水養生による	
キズ・シミ形成抑制機構の解明	・・・39
6-1 諸言	・・・39
6-2 材料および方法	・・・40
6-3 結果	・・・45
6-4 考察	・・・47
第七章 総合考察	・・・50
要約	・・・61
謝辞	・・・63
引用文献	・・・64
特許	・・・70
図	
表	

第一章 総合諸言

日本国内のアコヤガイ真珠の生産量は、1991年には68tあったが、2001年には35t、2011年には20tとなり、この20年間で大きく減少した(農林水産省統計情報部、1995; 農林水産省大臣官房統計部、2013)。アコヤガイ真珠の生産量が減少した最も大きな要因として、1996年にアコヤガイ *Pinctada fucata* に発生した赤変病(黒川ら、1999; 永井、2004)の蔓延が挙げられる。赤変病はアコヤガイの軟体部が夏から秋にかけて赤変化し、急激に衰弱してへい死に至る感染症である。本疾病によるアコヤガイの大量へい死は、1996年から1998年にかけて発生し、日本の真珠養殖業は大打撃を受けた(永井、2004)。本疾病におけるアコヤガイのへい死対策の1つとして、中国産アコヤガイ(以下、中国貝)が導入され、育種素材や真珠核を挿入される貝(以下、母貝)として利用されている。現在では、真珠養殖において日本産アコヤガイ(以下、日本貝)のみを使用する養殖業者は少なく、日本貝と中国貝をはじめとする海外産アコヤガイとの交雑貝(以下、交雑貝)を母貝として使用することが主流となっている(岡本ら、2006a; 和田ら、2002)。しかしながら、交雑貝は日本貝よりもキズ・シミの形成率が高く、高品質真珠の出現率が低いとされている(青木ら、2008)。また、海外産真珠との国際競争において、日本産真珠の品質向上は急務である。

真珠は、結晶構造によって、真珠層真珠、稜柱層真珠、有機質真珠等に分類される(和田、1999)。これらの真珠の中で高品質真珠となり得るのは真珠層真珠のみである(和田、1999)。高品質真珠に求められる最低条件は、キズ・シミが無く真円であり、真珠層の厚さ(以下、巻き)も0.4 mm以上あることである(赤松、2003; Kripa et al., 2007; Matlins, 1996; 和田、1962; 和田、1999)。“キズ”は真珠表面の凸状または凹状の箇所を指し、“シミ”は有機質の沈着や

真珠層以外の稜柱層等により、真珠の外観が濃紺色や黒褐色に見える箇所を指す(赤松, 2003; Ogimura et al., 2012)。真珠の品質評価では真円性や色合いが重視され、凸状のキズや大きなシミのある真珠は、商品価値が極めて低い(赤松, 2003; 和田, 1999)。また、巻きが厚いほどアコヤガイ真珠独特の干渉色が現れやすいため、巻きは真珠品質を決定する重要な要素の一つである(赤松, 2003; 和田, 1999)。巻きが 0.3 mm 未満の真珠は“薄巻き真珠”と呼ばれ、商品価値が極めて低い(青木ら, 2007; 赤松, 2003; 和田, 1962; 和田, 1999)。

現行の真珠養殖においては、採取される真珠の 10%が高品質真珠であり、残りの 90%が低品質真珠あるいは商品価値のない真珠である(青木ら, 2007; 青木ら, 2008)。そのため、キズ・シミの形成を抑制し、かつ巻きを厚くすることが、現行の真珠養殖における大きな技術的課題とされている。

真珠養殖は大別すると 1)仕立て、2)挿核手術、3)養生、4)養成および浜揚げの 4 つの工程から成る(Southgate et al., 2008; 和田, 1999)。これらの工程のうち、挿核手術や養生方法を改良し、真珠品質を向上させた報告は多数存在する(林, 2008a; 林, 2008b; 林, 2010; Norton et al., 2000; Ruiz-Rubio et al., 2006; 植本, 1962)。仕立てとは、挿核手術前に貝を衰弱させることなく生殖巣内の卵や精子を除去し、また生理機能を低下させる工程をいう(和田, 1999)。仕立ては、挿核手術をしやすくすることと、挿核手術後に起こる生理状態の低下を防ぐために行う(植本, 1961; 植本, 1967a; 植本, 1967b; 和田, 1999)。挿核手術とは、アコヤガイの外套膜小片(以下、ピース)と真珠核を、母貝の生殖巣内に挿入する工程をいう(Cochennec-Laureau et al., 2010; 和田, 1999)。挿核手術は、ピースの外面上皮細胞が伸張し真珠核を包み込み、最終的には 1 層の連続した外面上皮細胞のシート、いわゆる“真珠袋”を人為的に

形成させるために行う(和田, 1999)。養生は, 挿核手術された貝(以下, 挿核貝)を目合いの細かな籠に入れ, 流れが穏やかで環境変化の少ない漁場で挿核手術後 1~2 週間飼育する工程をいう(赤松, 2003; 植本, 1962; 和田, 1999)。養生は, 挿核手術後に真珠核を体外に放出する“脱核”やキズ・シミ形成を抑えるために行う(赤松, 2003; 植本, 1962; 和田, 1999)。養生期間中には, ピースの外面上皮細胞が, 挿核手術により生じた傷口に沿って伸張し, 真珠袋を形成する(和田, 1989)。真珠袋形成過程において, 伸張する外面上皮細胞と真珠核の間に血球や生殖細胞等が挟み込まれると, 外面上皮細胞の炎症反応に伴うメラニン色素の沈着が起こり, その箇所にはキズ・シミが形成される(青木, 1961; Norton et al., 2000; Ogimura et al., 2012; 和田, 1999)。また, 養生は挿核手術後に生じる貝の急激な生体防御反応を抑える効果があるとされている(植本, 1962)。養成とは, 養生後の挿核貝を飼育して真珠を採取するまでの工程をいい, また浜揚げとは, 真珠を採取する工程をいう(和田, 1999)。

近年, キズ・シミ形成を抑制する新たな養生法が, 林(2008a; 2008b; 2010)により報告されている。林(2008a; 2008b; 2010)は, 低塩分海水(塩分 24.6~27.2 psu)を満たした水槽で挿核手術直後の貝を 10~14 日間養生(以下, 低塩分海水養生)させることにより, 通常海水による養生(以下, 通常海水養生)よりもキズ・シミの無い真珠(以下, 無キズ珠)の出現率が向上するとした。林の報告(2008a; 2008b)は, 異なる塩分条件下で養生を行い, 無キズ珠の出現率(以下, 無キズ珠率)を比較したものであったが, 試験毎の条件設定が一定でないという問題点がある。また, 無キズ珠率や真珠の巻きについて, 海上で行う現行の養生(以下, 海上養生)と水槽を用いた養生の比較はなされていない。そのため, 試験条件を明確にした上で, 低塩分海水養生による無キズ珠率を向上させる効果(以下,

無キズ珠率向上効果)を明らかにする必要がある。また、低塩分海水養生によるキズ・シミ形成抑制機構も解明する必要がある。

そこで本研究では、まず、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果の実証試験を行った。次に無キズ珠率と巻きの厚さを指標として低塩分海水養生の期間短縮を検討した。最後に低塩分海水養生によるキズ・シミ形成抑制機構を解明するための試験を行った。本研究内容は以下の5つにまとめられる。

1. 低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果を明らかにすることを目的として、低塩分海水養生、通常海水養生および海上養生における無キズ珠率の比較を行った。
2. 真珠品質に影響を与える要因の中で、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果がどれくらい大きいのかを明らかにすることを目的として、無キズ珠率に及ぼす養生方法、挿核技術、母貝の影響の大きさについて調査した。
3. 低塩分海水養生の期間短縮を図るため、無キズ珠率と巻きについて低塩分海水養生期間との関係を調べた。
4. 真珠核を複数個挿入した貝を用いた場合の低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果を明らかにするため、真珠核を2個ないし4個挿入した貝を用いて、低塩分海水養生と海上養生における無キズ珠率と巻きの厚さを比較した。
5. 低塩分海水養生によるキズ・シミ形成抑制機構を解明するため、低塩分海水養生、通常海水養生、海上養生における真珠袋形成に要する日数を比較した。また、塩分濃度の違いが血球の異物貪食能力に与える影響を明らかにした。

第二章 低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果の実証

2-1 諸言

林(2008a; 2008b)は、低塩分海水(塩分 24.6~27.2 psu)入りの水槽に挿核手術直後のアコヤガイを 10~14 日間収容し、養生させたところ、通常海水(塩分 32.4~35.0 psu)での養生よりも無キズ珠率が高くなったと報告している。しかしながら、これらの報告には試験毎の塩分濃度や養生期間等の試験条件の設定が一定でないという問題点がある。そのため、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果について、試験条件を同一にして検討する必要がある。また、実用性を評価する際に重要とされる無キズ珠率の比較が、低塩分海水養生と海上養生の間で行われていないため、低塩分海水養生によって無キズ珠率が現行法である海上養生よりもどの程度向上するかは不明である。

そこで本研究では、低塩分海水養生、通常海水養生および海上養生の無キズ珠率を比較し、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果を明らかにすることを目的とした。最初に、低塩分海水と通常海水をそれぞれ満たした水槽内で挿核貝の養生を行い、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果について実証試験を行った。次に、低塩分海水養生、通常海水養生および海上養生の無キズ珠率の比較を異なる時期に行い、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が養生の時期にかかわらず認められるかどうかを調べた。最後に、本技術の実用化を目的として、技術水準の異なる養殖業者 10 名に低塩分海水養生させた貝と海上養生させた貝を、通常の真珠採取時期である 12 月まで飼育してもらった後に無キズ珠率を比較し、低塩分海水養生の実用化の可能性を検討した。

2-2 材料および方法

2-2-1 低塩分海水養生と通常海水養生の

無キズ珠率の比較(試験 1)

1) 供試貝および挿核手術

供試貝には、全湿重量 42.5 ± 3.5 g(平均値±標準偏差)の満 2 歳の交雑貝を用いた。2009 年 6 月 17, 18 日に挿核手術者 1 名により計 800 個体に対して常法(和田, 1999)で挿核を行った。供試貝 1 個体に対し真珠核(直径 7.16~7.20 mm)1 個とピース 1 個を腸管迂曲部側の生殖巣内(以下, ふくろ)に挿入した(Fig.1)。ピースは、仕立てを行っていない 1 家系の貝から切り出したものを挿核手術に用いた。

2) 試験区

試験区は、低塩分海水区(塩分 24.7 ± 0.1 psu)と通常海水区(塩分 33.0 ± 0.1 psu)の 2 区とし、1.5 kL の長方形 FRP 水槽を各試験区 5 台ずつ用いた。塩分は、塩分計(Model 85, ワイエスアイ・ナノテック社製)で測定し、林(2008a)の方法を参考にして砂濾過海水(塩分 33~34 psu)を水道水で希釈して各試験区の設定塩分に調整した。水温は、 25.1 ± 0.3 °C に設定した。各水槽の海水は止水状態とし、微通気により絶えず攪拌した。挿核貝を 80 個体ずつ養生籠(ポリエチレン製, 縦 41.5 cm × 横 41.5 cm × 高さ 12.0 cm, 目合 0.4 cm)に入れ、各水槽に収容した。養生は、無給餌で 14 日間行った。養生終了後、生残貝をポケット籠(ポリエチレン製, 縦 72 cm × 横 36 cm, 5 段ポケット, 目合 3 cm)に入れ、英虞湾に設置した真珠筏に垂下して飼育(以下, 海上飼育)した。

3) 真珠採取および品質評価

キズ・シミ形成の多くは真珠形成の初期に生じることが知られている(青木, 1966)。本試験では真珠形成初期におけるキズやシミの形成に焦点を当てたため、通常の養殖期間(6 か月以上)よりも短い、海

上飼育開始から 60 日後に、供試貝から真珠を採取した。そのため、得られた真珠の巻きは薄かったものの、キズ・シミの有無の評価に問題はなかった。採取した真珠は、真珠層真珠とそれ以外の真珠（稜柱層真珠，有機質真珠，真珠核）（渥美ら，2011a）に目視で分類した（Fig.2）。真珠層真珠については、凸状の突起を“キズ”と定義して、キズの有無を目視にて判別した（Matlins, 1996）。さらにキズの無い真円の真珠については、濃紺色や黒褐色に見える箇所を“シミ”と定義した（赤松，2003；Ogimura et al., 2012）。シミの大きさの評価方法は、棟朝（1994）および Inoue et al.（2011）の方法を参考にして、以下の方法で行った。真珠層真珠をデジタルカメラで撮影し、画像編集ソフト（Photoshop, Adobe 社製）にてキズ・シミの面積を測定した。キズ・シミが無い真珠，および真珠表面積の 0.5 % 以下の微小なキズ・シミが 1 つある真珠を“無キズ珠”とした（Fig.3）。これは、業界では真珠を宝飾品に加工する際に 0.6～1.0 mm の穴をあけるため、微小なキズ・シミがあっても 1 つだけであれば、商品価値に影響しないことによる（武内，1994；和田，1999）。

水槽毎に得られた無キズ珠の個数を採取された真珠の個数で除し、これを百分率で表して“無キズ珠率”とした。また、水槽毎に採取された真珠の個数を挿核した貝数で除し、この百分率を“真珠採取率”とした。

4) 統計解析

無キズ珠率および真珠採取率のデータは、逆正弦変換を行った後、Student の *t* 検定 (Student's *t*-test) により解析した。

2-2-2 挿核手術時期による低塩分海水養生効果の比較（試験 2）

1) 供試貝および挿核手術

供試貝には、試験 1 と同じ家系の満 2 歳の交雑貝（全湿重量 47.7 ± 7.3 g）を用いた。挿核手術は、挿核手術者 1 名が常法により

行い、供試貝 1 個体に対し真珠核（直径 7.16～7.20 mm）1 個とピース 1 個を、ふくろの位置に挿入した（Fig.1）。ピースは、仕立てを行っていない 1 家系の貝から切り出したものを挿核手術に用いた。試験は、2008 年 7 月から 2009 年 1 月の間に 5 回行った。各試験の挿核手術日は、1 回目：7 月 29 日、2 回目：8 月 19 日、3 回目：9 月 9 日、4 回目：10 月 1 日、5 回目：10 月 23 日であった。

2) 試験区

試験区は、低塩分海水区（塩分 25.2 ± 0.1 psu）、通常海水区（塩分 33.2 ± 0.1 psu）、海上区の 3 区とした。低塩分海水区と通常海水区には、5 kL の長円形 FRP 水槽（飼育槽）と 3 kL の濾過槽からなる総容量 8 kL の大型循環濾過水槽を 1 台ずつ用いた。海上区には、英虞湾内に設置した真珠筏を 1 台用いた。各水槽の塩分調整は、試験 1 と同様の方法で行った。低塩分海水区と通常海水区の水温は、海上区の水温に近い水温（ $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ）、すなわち 1～3 回目は 28°C 、4 回目は 25°C 、5 回目は 22°C に設定した。挿核手術直後に供試貝を養生籠にほぼ同数個体ずつ入れ（1～3 回目：70 個体、4 回目：63～64 個体、5 回目：55 個体）、各水槽または真珠筏に垂下した。養生期間は 14 日間とし、水槽における養生は無給餌で行った。養生終了後、生残貝を試験区毎にポケット籠に入れ、英虞湾に設置した真珠筏にて海上飼育を行った。養生中の各水槽の塩分と水温は、多項目水質計（クロロテック AAQ1183, JFE アレック社製）で毎日 1 回測定した。海上区の水温は記録式水温計（Stow Away Tidbit Temp, Onset 社製）で測定し、塩分は英虞湾環境モニタリングシステム（<http://www.agobay.jp/agoweb/index.jsp>）の湾央観測局から得た水深 3 m のデータを用いた。

3) 真珠採取および品質評価

真珠形成初期におけるキズやシミの形成に焦点を当てたため、海上飼育開始から 60 日後に、供試貝から真珠を採取した。真珠品質

の評価は試験 1 と同様の方法により行った。また、各試験区の無キズ珠率と真珠採取率についても試験 1 と同様の方法で算出した。

4) 統計解析

無キズ珠率および真珠採取率のデータは、逆正弦変換を行った後、試験区と挿核手術日を要因として、繰り返しの無い二元配置分散分析 (two-way ANOVA) により解析した。解析の結果、試験区間に有意差が認められた場合は、Tukey HSD 法による多重比較 (Tukey HSD multiple comparison test) により、試験区間の無キズ珠率および真珠採取率の検定を行った。

2-2-3 複数の挿核手術者による低塩分海水養生効果の比較

1) 供試貝および挿核手術

真珠養殖業者 10 名 (A~J) の協力を得て、2008 年 5 月から 2009 年 1 月にかけて試験を行った。各業者が所有する日本貝あるいは交雑貝のどちらかを供試貝として用いた。供試貝の年齢は、満 1 歳あるいは満 2 歳のいずれかであった。挿核手術は各業者が行い、供試貝 1 個体につき真珠核 1 個とピース 1 個を、ふくろの位置に挿入した (Fig.1)。なお、ピースは業者毎に 1 家系の貝から切り出したものを挿核手術に用いた。各業者の挿核手術日は、業者 A, B, C: 5 月 28 日, 業者 D, E: 6 月 17 日, 業者 F, G, H, I: 7 月 9 日, 業者 J: 7 月 29 日であった。

2) 試験区

試験区は、低塩分海水区 (塩分 25.1 ± 0.1 psu) と海上区の 2 区とした。低塩分海水区には、試験 2 と同様に、大型循環濾過水槽を 1 台用いた。海上区には各業者が所有する英虞湾あるいは五ヶ所湾、阿曾浦の真珠筏を用いた。業者毎に挿核した供試貝を養生籠に 96 ~ 109 個体ずつ入れて、水槽または真珠筏に垂下した。養生期間は 14 日間とし、低塩分海水区では無給餌で養生を行った。養生終了

後、各業者が所有する英虞湾、五ヶ所湾、阿曾浦のいずれかの真珠筏において海上飼育を行った。

3) 真珠採取および品質評価

一般的な真珠採取時期まで飼育した場合において、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が得られるか明らかにするため、海上飼育を12月まで行った後に供試貝から真珠を採取した。真珠品質の評価は試験1と同様の方法で行った。また、各試験区の無キズ珠率と真珠採取率についても試験1と同様の方法で算出した。

4) 統計解析

無キズ珠率と真珠採取率のデータは、逆正弦変換を行った後、試験区と業者を要因として、繰り返しの無い二元配置分散分析(two-way ANOVA)により解析した。

2-3 結果

2-3-1 低塩分海水養生と通常海水養生の無キズ珠率の比較

無キズ珠率は、低塩分海水区が $21.3 \pm 3.1\%$ ($n=5$)、通常海水区が $10.8 \pm 2.8\%$ ($n=5$) となり、両区の間には有意差が認められた ($p < 0.01$, Table 1)。真珠採取率は、低塩分海水区が $47.8 \pm 4.7\%$ ($n=5$)、通常海水区が $48.5 \pm 5.3\%$ ($n=5$) となり、両区の間には有意差は認められなかった ($p > 0.05$, Table 1)。

2-3-2 挿核手術時期による低塩分海水養生効果の比較

無キズ珠率は、低塩分海水区が $45.8 \pm 7.8\%$ ($n=5$) と最も高く、次いで通常海水区の $32.4 \pm 11.1\%$ ($n=5$)、海上区の $21.0 \pm 13.0\%$ ($n=5$) の順となった (Fig.4, Table 2)。低塩分海水区の無キズ珠率は海上区よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。挿核手術日毎に低塩分海水区と海上区の無キズ珠率を比較したところ、低塩分海水区の無キズ珠率は海上区の平均 2.8 倍となり、有意に高かった。通常海水

区の無キズ珠率は、低塩分海水区、海上区のいずれの間においても有意差は認められなかった($p>0.05$)。また、各挿核手術日の無キズ珠率を比較したところ、有意差は認められなかった($p>0.05$)。

真珠採取率は、低塩分海水区が $57.5 \pm 19.1\%$ ($n=5$)と最も高く、次いで通常海水区の $48.9 \pm 19.6\%$ ($n=5$)、海上区の $45.7 \pm 17.2\%$ ($n=5$)の順となったが、各試験区の間で真珠採取率に有意差は認められなかった($p>0.05$, Fig.5, Table 3)。一方、各挿核手術日間の真珠採取率には有意差が認められた($p<0.01$)。

なお、養生中の塩分・水温は、低塩分海水区と通常海水区ではほぼ一定であったのに対し、海上区では大きな変動が見られた(Table 4)。

2-3-3 複数の挿核手術者による低塩分海水養生効果の比較

挿核手術者 10名のうち9名において、無キズ珠率は海上区よりも低塩分海水区で高く、両区の間には有意差が認められた($p<0.01$, Fig.6, Table 5)。業者 C, E, Iにおいて、海上区では無キズ珠が全く出現しなかったのに対し、低塩分海水区では無キズ珠率が 11.9～31.7%であった。業者 A, D, H においては、低塩分海水区の無キズ珠率が海上区の 4.5～11.2倍と顕著に高かった。一方、業者間で無キズ珠率を比較したところ、有意差は認められなかった($p>0.05$)。

なお、低塩分海水区と海上区の間で、真珠採取率に有意差は認められなかったものの($p>0.05$, Fig.7, Table 6)、業者間では有意差が認められた($p<0.01$)。

2-4 考察

真珠品質は、挿核手術の時期、挿核手術者の技術水準、貝の生理状態によって大きく影響される(青木, 1966; 青木ら, 2007; 林ら, 2005; 林, 2008a; 林, 2008b; 奥村ら, 2003; 植本, 1961)。

林 (2008b) は、止水式水槽を用いた低塩分海水養生と通常海水養生の無キズ珠率の比較を行っているが、この試験には条件設定が一定でないという問題点がある。具体的には、試験毎に挿核手術者および供試貝の種類 (日本貝, 交雑貝) が異なっていることが挙げられる。また、低塩分海水の設定塩分 (24.6~27.2 psu) は、試験によって 2 psu 以上の違いが認められる。供試貝の挿核手術までの飼育方法も試験によって異なり、低塩分海水と通常海水を満たした水槽内でそれぞれ飼育を行った後に挿核手術を行った場合もあれば、真珠筏で飼育した後に挿核手術を行った場合もみられた。

そこで、本研究では、挿核手術までの飼育は全て真珠筏で行い、さらに挿核手術条件 (挿核手術者は特定の 1 名, 供試貝は特定の 1 家系) と養生条件 (低塩分海水は塩分 25 psu, 養生期間は 14 日間) を統一して、低塩分海水養生と通常海水養生における無キズ珠率を比較した。その結果、同じ時期に挿核手術を行った貝を複数の水槽に収容して行った試験 (試験 1) では、低塩分海水区の無キズ珠率が通常海水区よりも有意に高かった (Table 1)。また、異なる時期に行った試験 (試験 2) では、低塩分海水区と通常海水区の間には有意差は認められなかったものの、全試験において低塩分海水区の無キズ珠率は通常海水区よりも高かった (Table 2)。これらの結果から、低塩分海水での養生には無キズ珠率を向上させる効果があることが明らかとなった。

挿核手術の時期を変えて低塩分海水養生と海上養生を行った結果、低塩分海水区の無キズ珠率は海上区よりも有意に高かった ($p < 0.05$, Fig.4)。さらに、複数の真珠養殖業者を対象にした試験においても、低塩分海水区の無キズ珠率が海上区よりも有意に高かった ($p < 0.01$, Fig.6)。特に業者 10 名のうち 6 名については、低塩分海水区の無キズ珠率が海上区の 4.5 倍以上となった (Table 5)。これらの結果から、低塩分海水養生には、海上養生と比較して、無キズ珠

率を顕著に向上させる効果のあることが明らかとなった。また、挿核手術日、業者の違いによる有意差はそれぞれ認められなかった($p>0.05$)。すなわち、挿核手術時期や業者(挿核技術や養殖法)の違いに拘わらず、低塩分海水養生により無キズ珠率が向上することが明らかとなった。このことから、低塩分海水養生は真珠品質向上のための有効な技術であると考えられる。

真珠採取率には、低塩分海水区と海上区の間で有意差は認められなかった($p>0.05$, Figs.5, 7)。このことから、低塩分海水養生は挿核貝のへい死や脱核に大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。一方、挿核手術日間で真珠採取率に有意差が認められた($p<0.01$, Table 3)。本研究では、Table 3 に示したとおり、8~9月の試験で各試験区ともに真珠採取率が低下する傾向が見られた。挿核手術後10日間のへい死率・脱核率は、7月下旬以降、急に高くなり、その後9月中旬頃まで高い状態が続くことが知られている(青木, 1966)。本研究においても、8~9月にへい死や脱核が増加した結果、真珠採取率が低下したと考えられる。また、業者間で真珠採取率に有意差が認められた($p<0.01$, Table 6)。このことについては、真珠養殖業者の挿核手術・飼育技術の差が理由として考えられる(林ら, 2005; 奥村ら, 2003)。これらのことから、真珠採取率には、養生方法よりも挿核手術時期の違いや業者の仕立て・挿核手術・飼育技術の差が大きく影響すると推測される。

第三章 無キズ珠率に及ぼす養生方法，挿核技術と母貝の影響

3-1 諸言

第二章では，低塩分海水養生が海上養生よりも無キズ珠率を顕著に向上させることを明らかにした。本章においては，低塩分海水養生が真珠品質に与える影響について評価を行う。真珠品質に影響を与える要因として，養生方法（渥美ら，2011a；林，2008a；林，2008b；植本，1962），母貝の閉殻力（青木ら，2010a），挿核技術の違い（渥美ら，2011a；Nava et al., 2000），母貝の軟体部ならびに母貝の大きさに対する真珠核の直径（船越ら，1991）の5つが挙げられる。

閉殻力は，貝の健康状態や生理状態の指標として有効であるとされる（Aoki et al., 2010b；青木ら，2012；岡本ら，2006a；岡本ら，2006b）。閉殻力は，貝の殻体を1 cm 開くのに必要な荷重値（キログラム重，1 kgf \approx 9.8 N）であり，青木ら（2010a）は，閉殻力 2.0～4.9 kgf の母貝は閉殻力が 1.0～1.9 kgf や 5.0～6.9 kgf の母貝よりも高品質真珠を多く生産することを報告している。このことは，母貝には高品質真珠の生産に適した生理状態があることを示している。挿核手術者は，挿核手術前に母貝の全湿重量を測定し，貝の重さに応じて挿入する真珠核の大きさを決定する。この際，挿入される真珠核が大きくなるほど，高品質真珠の生産率は低下する傾向があるとされている（船越ら，1991）。このように，これらの要因が真珠品質に影響を与えることは知られているものの，真珠品質に与える影響の大きさを定量化した知見はない。

そこで本研究では，これら 5 要因が真珠品質に与える影響の大きさを評価することを目的とした。具体的には，一般化線形モデル（GLM）を用いて，これら 5 要因が無キズ珠率に与える影響の大きさを比較した。

3-2 材料および方法

3-2-1 母貝の仕立て

5 要因(母貝の閉殻力, 母貝の全湿重量, 養生方法, 挿核手術者, 真珠核の直径)が無キズ珠率に与える影響の大きさを評価する試験を2回行った。試験1回目は2009年4~8月, 試験2回目は2009年5~9月に行った。母貝となる供試貝には, 満2歳の日本貝を用いた。仕立てから挿核手術, 養生までの試験手順の概要をFig.8に示した。仕立ては次の4つの工程とした。

- 1) 海上での仕立て: 抑制籠(ポリエチレン製, 縦 35.5 cm×横 42.0 cm×高さ 15.5 cm)を35個準備し, 籠1個あたり供試貝70個体を収容した。供試貝を英虞湾に設置された真珠筏に垂下した。垂下期間は, 試験1回目は10~13日間, 試験2回目は11日間とした。
- 2) 水槽での仕立て: 仕立て籠に収容したままの供試貝を海上から水温 25℃, 塩分 33 psu に調整した 9 kL 容水槽(以下, 水槽1)に移し, 試験1回目は4日間, 試験2回目は5日間, 水槽1に収容した。
- 3) 放精放卵誘導: 供試貝を水槽1から取り上げ, 仕立て籠1個につき丸籠1個に入れ換えた。その後, 丸籠に入れたままの供試貝をオゾン発生器(OA-1, 愛真産機社製)を用いてつくったオゾン海水入りの9kL容水槽(水温 25℃, 塩分 33 psu)に各試験7時間ずつ収容した。オゾン海水浸漬による放精放卵誘導終了後, 供試貝を再び丸籠から仕立て籠に入れ換え, 水槽1に各試験3日間ずつ収容した。
- 4) 供試貝の個体識別: 試験1回目は供試貝2022個体, 試験2回目は供試貝1599個体の閉殻力を測定し, その後に全湿重量を測定した。両方の測定終了後, 各供試貝の殻体に油性マーカーペンで番号を書き個体識別した上で, 各供試貝を閉殻力 2.0~

4.9 kgf と 5.0～7.9 kgf の 2 グループに分けた。各グループの供試貝を再び仕立て籠に入れ、挿核手術までの間（試験 1 回目 9～10 日間、試験 2 回目 10～11 日間）、水槽 1 に収容した。

3-2-2 挿核手術および養生

挿核手術は常法で行い、供試貝のふくろの位置に、小さい真珠核（直径 6.36～6.40 mm, 以下, 小核）あるいは大きい真珠核（直径 7.73～7.77 mm, 以下, 大核）のいずれか 1 個とピース 1 個を挿入した（Fig.1）。2 人の挿核手術者が、Fig.8 に示したように、ほぼ同数の母貝に対して挿核手術を行った。ピースは、仕立てを行っていない 1 家系の貝から切り出したものを挿核手術に用いた。試験 1 回目は、2009 年 5 月 25, 26 日に 966 個体（全湿重量の平均値±標準偏差：57.3±4.8 g, 範囲：43.2～73.5 g）の供試貝に対し、挿核手術を行った。試験 2 回目は、2009 年 6 月 15, 16 日に 961 個体（58.5±4.8 g, 範囲：26.8～77.1 g）の供試貝に対し、挿核手術を行った。

挿核手術直後に低塩分海水を満たした第二章と同じ大型循環濾過水槽 1 台に 14 日間収容し、低塩分海水養生を行った（Fig.8）。水槽の塩分濃度は 25 psu とし、水温を 25℃に調整した。水槽に収容しなかった挿核貝（試験 1 回目 474 個体、試験 2 回目 485 個体）は、英虞湾内に設置した真珠筏に 14 日間垂下し、海上養生を行った（Fig.8）。供試貝は養生籠に 80 個体ずつ入れて養生した。

養生終了後、生残貝をポケット籠に入れ、英虞湾に設置した真珠筏に垂下して海上飼育した。海上飼育開始から 60 日後に、供試貝から真珠を採取した。低塩分海水養生における塩分と水温は、1 回目が塩分 24.9±0.1 psu, 水温 25.2±0.3℃, 2 回目が塩分 25.0±0.0 psu, 水温 25.0±0.3℃であった。海上養生における塩分と水温は、1 回目が塩分 33.8±0.2 psu, 水温 21.6±0.8℃, 2 回目が塩分 32.9±0.3 psu, 水温 24.7±0.9℃であった。

3-2-3 真珠の採取およびキズ・シミの評価

試験 1 回目は 2009 年 8 月 10, 11 日に, 試験 2 回目は 2009 年 8 月 31 日と 9 月 1 日に供試貝から真珠の採取を行った。採取した真珠は, 真珠層真珠とそれ以外の真珠 (稜柱層真珠, 有機質真珠, 真珠核) に目視で分類した (Fig.2)。真珠層真珠については, 第二章のキズ・シミ評価方法と同様にキズの有無およびシミの大きさによる評価を行った (Fig.3)。

3-2-4 データ解析

各要因が無キズ珠率に与える影響の検討には, 一般化線形モデルを用いた (Crawley, 2005)。フルモデルは, 無キズ珠率を応答変数とした式 (1) を仮定した。

$$\log(H/(1-H)) = \beta_0 + \beta_1 PO + \beta_2 technician + \beta_3 SCS + \beta_4 weight + \beta_5 nucleus \quad (1)$$

β_0 は定数を表すパラメータ, $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5$ は各変数の無キズ珠率への影響度を表すパラメータである。 H は採取した真珠数に対する無キズ珠率である。 H を挿核貝数に対する無キズ珠率でなく, 採取した真珠数に対する無キズ珠率とした理由は, 挿核手術直後に起こることの多い脱核や飼育期間中のへい死による影響を除いた上で, 各要因が無キズ珠率に与える影響を評価するためである。 PO は名義変数で, 養生方法を示し, 低塩分海水養生を 0, 海上養生を 1 とした。 $technician$ は名義変数で, 挿核手術者を示し, $technician 1$ を 0, $technician 2$ を 1 とした。 SCS は名義変数で, 母貝の閉殻力を示し, 2.0~4.9 kgf を 0, 5.0~7.9 kgf を 1 とした。 $weight$ は連続変数で, 母貝の全湿重量とした。 $nucleus$ は名義変数で, 真珠核の直径を示し, 大核を 0, 小核を 1 とした。本研究には, 連結関数 (link function) を logit, 誤差構造を 2 項分布とした一般化線形モデルを用い, モデルへの各調査データの当てはめには, R ver.2.15.1

(<http://cran.ism.ac.jp/>) の glm を用いた。

試験 1 回目の閉殻力 5.0~7.9 kgf の貝の比率 (64%) は 2 回目 (50%) よりも高かったため (Table 7), 2 回行った試験は別々にデータ解析を行った。まず, 各変数による単変量モデルのパラメータ推定と, 全変数を考慮したフルモデルのパラメータ推定を行った。次に単変量モデルとフルモデルの各パラメータ推定値を用い, 交絡の有無を評価した。最後に, 変数増減法 (stepwise 法) で赤池情報量規準 (AIC) に基づく変数選択を行った。本研究では, AIC の最も小さなモデルを最適モデルとした。

3-3 結果

無キズ珠率に関して, 低塩分海水区は海上区よりも 4.9 倍以上高かった (Table 7)。閉殻力 2.0~4.9 kgf 区の無キズ珠率は, 閉殻力 5.0~7.9 kgf 区よりも 2.2 倍以上高かった (Table 7)。挿核手術者 2 区の無キズ珠率は, 挿核手術者 1 区よりも 1.4 倍以上高かった (Table 7)。大核区の無キズ珠率は, 小核区よりも 1.9 倍以上高かった (Table 7)。母貝の全湿重量の増加とともに, 無キズ珠率は低くなる傾向を示した (Table 7)。

真珠採取率に関して, 海上区は低塩分海水区よりも高い傾向を示した (Table 7)。閉殻力 2.0~4.9 kgf 区の実珠採取率は, 閉殻力 5.0~7.9 kgf 区とほぼ同じであった (Table 7)。挿核手術者 2 区の実珠採取率は, 挿核手術者 1 区よりも高い傾向を示した (Table 7)。大核区の実珠採取率は, 小核区とほぼ同じであった (Table 7)。母貝の全湿重量の増加とともに, 真珠採取率は高くなる傾向を示した。

両試験ともに, 各変数の推定値の正負は単変量モデル (モデル i ~v) とフルモデル (モデル vi) の間で一致した (Tables 8, 9)。試験 1 回目において, モデル vii は挿核手術者を除く 4 変数を説明変数に持ち, AIC が最も小さくなった (Table 8)。モデル vii の 4 変数全てに

において、無キズ珠率に対して有意な効果が認められた ($p < 0.05$, Table 10)。これに対して、試験 2 回目においては、全変数を説明変数に持つモデル vi の AIC が最も小さくなった (Table 9)。モデル vi の 3 変数 (養生方法や挿核手術者, 母貝の閉殻力) において、無キズ珠率に対して有意な効果が認められた ($p < 0.05$, Table 11)。最適モデルによる予測値は実測値とよく一致した。

試験 1 回目, 2 回目の最適モデルによる GLM 解析の結果を Tables 10, 11 に示した。本研究で評価した 5 要因うち、最も無キズ珠率に大きな影響を与えた要因は養生方法であり、次いで大きな影響を与えた要因は母貝の閉殻力であった。養生方法は、母貝の閉殻力よりも無キズ珠率を 2 倍以上向上させる効果が認められた (Tables 10, 11)。

養生方法の調整済みオッズ比 (以下, オッズ比) は、試験 1 回目が 0.181, 試験 2 回目が 0.046 であった。低塩分海水養生は海上養生よりも無キズ珠率を試験 1 回目で 5.52 倍, 試験 2 回目で 21.74 倍向上させると推定された。

挿核手術者のオッズ比は、試験 2 回目の場合 2.546 であった。挿核手術者 2 は、試験 2 回目において挿核手術者 1 よりも無キズ珠率を 2.55 倍向上させると推定された。

母貝の閉殻力のオッズ比は、試験 1 回目が 0.419, 試験 2 回目が 0.385 であった。閉殻力 2.0~4.9 kgf の母貝は閉殻力 5.0~7.9 kgf の母貝よりも無キズ珠率を試験 1 回目において 2.39 倍, 試験 2 回目において 2.60 倍向上させると推定された。

真珠核の直径のオッズ比は、試験 1 回目が 0.407, 試験 2 回目が 0.532 であった。大核は小核よりも無キズ珠率を試験 1 回目で 2.46 倍, 試験 2 回目で 1.88 倍向上させると推定された。

母貝の全湿重量のオッズ比は、試験 1 回目が 0.886, 試験 2 回目が 0.923 であった。母貝が 1 g 重くなる毎に無キズ珠率は試験 1 回目

で 1.13 倍，試験 2 回目で 1.08 倍低下すると推定された。供試貝の全湿重量は 40～70 g の範囲にあった (Table 7)。全湿重量 40 g の母貝は，70 g の母貝よりも無キズ珠率を試験 1 回目で 38.17 倍，試験 2 回目で 10.93 倍向上させると推定された。試験 1 回目では全湿重量 40～50 g の母貝に大核を挿入した場合に無キズ珠率が最も高くなった。試験 2 回目では全湿重量 50～60 g の母貝に大核を挿入した場合に無キズ珠率が最も高くなった。

3-4 考察

本研究の結果から，5 要因のうち養生方法が無キズ珠率に最も大きな影響を与え，次いで母貝の閉殻力が無キズ珠率に大きな影響を与えることが明らかとなった (Tables 10, 11)。本研究結果は，閉殻力 2.0～4.9 kgf の母貝に挿核手術を行った後，低塩分海水養生を行うことで，現行法よりも無キズ珠率の顕著な向上が期待できることを示している。

低塩分海水養生は海上養生よりも無キズ珠率を 5 倍以上向上させることが明らかとなった (Tables 10, 11)。この結果は，低塩分海水養生が海上養生よりも無キズ珠率を顕著に向上させるとした渥美ら (2011a) の報告と同様の結果を示した。本研究で用いたのは日本貝であったのに対し，渥美ら (2011a) の供試貝は交雑貝であった。したがって，低塩分海水養生は，母貝の種類に拘わらず無キズ珠率を向上させることが判明した。

閉殻力 2.0～4.9 kgf の母貝は，閉殻力 5.0～7.9 kgf の母貝よりも無キズ珠率を 2 倍以上向上させることが明らかとなった (Tables 10, 11)。この結果は，閉殻力 2.0～4.9 kgf の母貝の無キズ珠率が最も高いとした青木ら (2010) の報告と同様の傾向を示した。青木ら (2010a) の供試貝は交雑貝であったのに対し，本研究では日本貝であった。したがって，母貝の種類に拘わらず閉殻力 2.0～4.9 kgf の母

貝のみを挿核手術に使用することは、無キズ珠率の向上に有効な方法であると考えられる。

本研究の5要因のうち、挿核手術者の違いが無キズ珠率に与える影響は最も小さかった。一般的に挿核手術者の技術水準が無キズ珠率に大きな影響を与えると考えられている(渥美ら, 2011a; Nava et al., 2000)。しかしながら、試験1回目では、挿核手術者の要因は最適モデルから排除されたことから(Table 8)、本試験の挿核手術者の技術水準はほぼ同等であったと考えられる。

同じ大きさの真珠核を挿入した時に、母貝が真珠核に対して小さいほど無キズ珠率は向上することが明らかとなった。母貝の全湿重量が3.75 g(1匁)軽くなると、無キズ珠率が試験1回目で1.6倍、試験2回目で1.3倍向上すると推定された(Tables 10, 11)。先行研究(船越ら, 1991)において、大きな真珠核を挿入すると高品質真珠の出現率は低くなることが報告されている。これらのことから、高い無キズ珠率を得るためには、母貝の大きさと真珠核の大きさの間で最適な組み合わせが存在することが示唆された。今後、これら2要因の組み合わせと無キズ珠率との関係について詳細な調査を行う必要がある。

本研究の結果から、無キズ珠率を向上させるためには、まず養生方法を現行の海上養生から低塩分海水養生に変更することが重要である。また、挿核手術前に母貝の生理状態を制御して閉殻力2.0~4.9 kgfにした上で、全湿重量で貝の大きさを揃え、さらに軟体部の大きさに見合った適切な真珠核を挿入すべきである。本研究結果は、こうした操作により、無キズ珠率が現行法よりも顕著に向上する可能性を示している。

第四章 低塩分海水養生期間短縮の検討

4-1 諸言

第二章と第三章において、無キズ珠率を向上させるためには低塩分海水養生が有効であることが明らかとなった。三重県では挿核手術の時期になると、挿核手術者 1 人が 1 個挿核の場合であれば 1 日あたり数百個の貝に対し挿核手術を行う。したがって、多くの挿核貝を 14 日間水槽内で低塩分海水養生するためには大型ないしは多数の水槽が必要となる。また、低塩分海水養生は挿核手術直後から行うため、水槽を工場内に設置する事が望ましい。しかしながら、三重県の真珠養殖業者の多くは家族経営であり、大きな水槽の設置に要する土地と費用が、低塩分海水養生を導入する際の大きな障壁となっている。低塩分海水養生期間をさらに短縮できれば、水槽の小型化とコスト低減が可能となる。ただし、低塩分海水養生期間を既報の 14 日間よりも短くした場合の無キズ珠率や巻きに関する知見はなく、最適な低塩分海水養生期間は明らかにされていない。

そこで本研究では、低塩分海水養生期間の短縮を図るため、低塩分海水養生期間と真珠品質を左右するキズ・シミの有無ならびに巻きの関係を明らかにすることを目的とした。

4-2 材料および方法

4-2-1 供試貝および挿核手術

試験は、2011 年 5～11 月の間に 5 回（以下、2011 試験）、2012 年 6～12 月の間に 4 回（以下、2012 試験）行った。2011 試験には、全湿重量 22.0 ± 2.9 g の満 1 歳の交雑貝を用いた。2012 試験には、全湿重量 41.1 ± 3.2 g の満 2 歳の交雑貝を用いた。挿核手術は 2011 試験と 2012 試験で異なる 1 名の挿核手術者が常法により行い、供試貝 1 個体あたり真珠核 1 個とピース 1 個をふくろの位置に挿入

した(Fig.1)。真珠核は2011試験と2012試験でほぼ同じ大きさのものを用いた(2011試験:直径6.55~6.58 mm, 2012試験:6.50~6.55 mm)。ピースは、各試験において仕立てを行っていない1家系の貝から切り出したものを挿核手術に用いた。2011試験の各挿核手術日は、1回目:5月19日, 2回目:6月9日, 3回目:6月30日, 4回目:7月14日, 5回目:7月28日であった。2012試験の挿核手術日は、1回目:6月14日, 2回目:6月21日, 3回目:7月5日, 4回目:7月12日であった。

4-2-2 養生

低塩分海水養生には、第二章と同じ大型循環濾過水槽(以下、低塩分水槽)を1台用いた。水槽の塩分調整は第二章と同様の方法で行い、 25.1 ± 0.1 psuとした。水槽の水温は挿核手術日における海上養生海域とほぼ同じ水温に設定した。2011試験の水槽水温は1回目20℃, 2回目22℃, 3回目25℃, 4回目および5回目27℃とした。2012試験の水槽水温は1回目および2回目24℃, 3回目25℃, 4回目26℃とした。低塩分水槽に供試貝を収容した間は無給餌とした。海上養生には、英虞湾内に設置した真珠筏1台を用いた。

4-2-3 試験区および真珠採取

2011試験では、挿核手術後の養生期間を12日間とし、その12日間のうち低塩分水槽に収容する期間を0, 1, 4, 8日とする4区を設定した。すなわち“低塩分0日区(海上区)”は低塩分水槽に収容せずに海上で12日間養生した区である。また、“低塩分1日区”は低塩分水槽に1日間収容し、その後海上で11日間養生した区である。各試験区の供試貝数は59~61個体とし、養生籠に入れて養生させた。養生終了後、試験区毎にポケット籠に入れ、英虞湾に設置され

た真珠筏で海上飼育した。2011 試験では、真珠形成初期におけるキズ・シミ形成と真珠層形成を観察するため、海上飼育開始から 60 日後に供試貝から真珠を採取した。

2012 試験では、挿核手術後の養生期間を 14 日間とし、その 14 日間のうち低塩分水槽に収容する期間を 0, 4, 8, 14 日とする 4 区を設定した。すなわち“低塩分 0 日区(海上区)”は低塩分水槽に収容せずに海上で 14 日間養生した区である。また、“低塩分 4 日区”は低塩分水槽に 4 日間収容し、その後海上で 10 日間養生した区である。各試験区の供試貝数は 60 個体とし、養生籠に入れて養生させた。これら 4 区は、養生終了後、2011 試験と同様に、海上飼育開始から 60 日後に供試貝から真珠を採取した。

また、一般的な真珠採取時期である 12 月まで海上飼育(和田, 1999)した挿核貝の無キズ珠率と巻きの違いを見るため、低塩分 8 日区、海上区と同様の養生を行った供試貝を 60 個体ずつ別に用意し、さらに 2 試験区を設けた。これらの 2 区については養生終了後、英虞湾に設置された真珠筏で海上飼育し、12 月 6 日に真珠を採取した。これら 2 区は、“低塩分 8 日 12 月採取区”、“海上 12 月採取区”とした。

4-2-4 キズ・シミの評価

採取した真珠は、真珠層真珠とそれ以外の真珠(稜柱層真珠, 有機質真珠, 真珠核)に目視で分類した(Fig.2)。真珠層真珠については、第二章のキズ・シミ評価方法と同様にキズの有無およびシミの大きさにより評価を行った(Fig.3)。試験区毎に、無キズ珠数を採取した真珠数で除し、これを百分率で表したものを無キズ珠率とした。また、試験区毎に採取した真珠数を挿核貝数で除し、これを百分率で表したものを真珠採取率とした。

4-2-5 真円度および巻きの評価

採取した真珠のうち真珠層真珠(シミが真珠表面のほぼ全面にある真珠, 突起キズのある真珠も含む)については, 棟朝(1994)の方法を参考に測定した3か所の直径の比率から真円度を評価した。目視にて突起やコブが認められる真珠については, 突起やコブの頂点を通る直径と目視にて最も小さいと考えられた2か所の直径の計3か所の直径をデジタルノギス(CD67-S20PM, Mitutoyo 社製)で測定した。突起やコブが認められない真珠については, 無作為に3か所の直径を測定した。本研究では, 最大直径と最小直径の差が3か所の平均直径の2%未満である真珠層真珠を“真円真珠”とした。真円真珠の直径は測定した3か所の直径の平均値とし, これを真円真珠の巻きの指標とした。

4-2-6 統計解析

2011試験のデータと2012試験の養生終了後60日間飼育した4区のデータおよび12月まで飼育した2区のデータは, 別々に統計解析を行った。無キズ珠率および真珠採取率は, 逆正弦変換を行った後, 試験区と挿核手術日を要因として, 繰り返しの無い二元配置分散分析(two-way ANOVA)により解析した。解析の結果, 試験区間に有意差が認められた場合は, Tukey HSD法による多重比較(Tukey HSD multiple comparison test)により, 試験区間の無キズ珠率および真珠採取率の検定を行った。また, 真円真珠直径は, 試験区と挿核手術日を要因として, 繰り返しの無い二元配置分散分析(two-way ANOVA)により解析した。解析の結果, 試験区間に有意差が認められた場合は, Tukey HSD法による多重比較(Tukey HSD multiple comparison test)により, 試験区間の真珠直径の検定を行った。

4-3 結果

4-3-1 低塩分海水養生期間と無キズ珠率の関係

2011 試験の無キズ珠率は、低塩分 8 日区が $45.7 \pm 7.7\%$ ($n=5$) と最も高く、次いで低塩分 4 日区 $28.0 \pm 10.8\%$ ($n=5$)、低塩分 1 日区 $20.8 \pm 11.3\%$ ($n=5$)、海上区 $16.2 \pm 11.2\%$ ($n=5$) の順となり (Fig.9, Table 12)、試験区間に有意差が認められた ($p < 0.01$)。挿核手術日毎に 4 試験区間の無キズ珠率を比較したところ、低塩分 8 日区の無キズ珠率が海上区よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。5 回目の試験では、海上区の無キズ珠率が 0% であった。そのため、5 回目を除く 4 回の試験における低塩分 8 日区と海上区の無キズ珠率を比較したところ、低塩分 8 日区の無キズ珠率は海上区の平均 2.7 倍高かった。また、低塩分 8 日区の無キズ珠率は低塩分 1 日区の平均 2.7 倍となり、有意に高かった ($p < 0.01$)。また、挿核手術日間の無キズ珠率にも有意差が認められた ($p < 0.05$)。

2012 試験の養生後 60 日間飼育した場合の無キズ珠率は、低塩分 8 日区が $31.9 \pm 9.2\%$ ($n=4$) と最も高く、次いで低塩分 14 日区 $25.2 \pm 6.2\%$ ($n=4$)、低塩分 4 日区 $17.6 \pm 8.4\%$ ($n=4$)、海上区 $7.0 \pm 6.0\%$ ($n=4$) の順となり (Fig.10, Table 13)、試験区間に有意差が認められた ($p < 0.01$)。挿核手術日毎に 4 区の無キズ珠率を比較したところ、低塩分 8 日区の無キズ珠率は海上区の平均 7.8 倍となり、有意に高かった ($p < 0.01$)。低塩分 14 日区の無キズ珠率は海上区の平均 6.0 倍となり、有意に高かった ($p < 0.01$)。低塩分 4 日区の無キズ珠率は海上区の平均 3.4 倍となり、有意に高かった ($p < 0.05$)。また、挿核手術日間の無キズ珠率にも有意差が認められた ($p < 0.05$)。

2012 試験の養生後 12 月まで飼育した場合の無キズ珠率は、低塩分 8 日 12 月採取区 $26.8 \pm 6.7\%$ ($n=4$)、海上 12 月採取区 $10.6 \pm 5.9\%$ ($n=4$) の順となった (Fig.11, Table 14)。低塩分 8 日 12 月採取区の無キズ珠率は、海上 12 月採取区よりも有意に高かった

($p < 0.01$)。挿核手術日毎に両区の無キズ珠率を比較したところ、低塩分 8 日 12 月採取区の無キズ珠率は海上 12 月採取区の平均 3.9 倍高かった。一方、挿核手術日間の無キズ珠率には有意差が認められなかった($p > 0.05$)。

4-3-2 低塩分海水養生期間と真珠採取率の関係

2011 試験の真珠採取率は、低塩分 4 日区が $68.0 \pm 17.1\%$ ($n=5$) と最も高く、次いで低塩分 1 日区 $64.9 \pm 15.4\%$ ($n=5$)、海上区 $64.7 \pm 11.9\%$ ($n=5$)、低塩分 8 日区 $63.7 \pm 14.2\%$ ($n=5$) の順となったが (Fig.12, Table 15)、試験区間に有意差は認められなかった($p > 0.05$)。一方、挿核手術日間の真珠採取率には有意差が認められた($p < 0.01$)。

2012 試験の養生後 60 日間飼育した場合の真珠採取率は、低塩分 4 日区が $80.4 \pm 4.8\%$ ($n=4$) と最も高く、次いで低塩分 14 日区 $75.4 \pm 5.7\%$ ($n=4$)、海上区 $75.0 \pm 3.8\%$ ($n=4$)、低塩分 8 日区 $74.6 \pm 6.3\%$ ($n=4$) の順となったが (Fig.13, Table 16)、試験区間に有意差は認められなかった($p > 0.05$)。また、挿核手術日間の真珠採取率にも有意差は認められなかった($p > 0.05$)。

2012 試験の養生後 12 月まで飼育した場合の真珠採取率は、海上 12 月採取区 $71.7 \pm 6.2\%$ ($n=4$)、低塩分 8 日 12 月採取区 $69.2 \pm 4.8\%$ ($n=4$) の順となったが (Fig.14, Table 17)、試験区間に有意差は認められなかった($p > 0.05$)。また、挿核手術日間の真珠採取率にも有意差は認められなかった($p > 0.05$)。

4-3-3 低塩分海水養生期間と真円真珠直径の関係

2011 試験の真珠直径は、低塩分 1 日区 ($n=147$)、低塩分 4 日区 ($n=156$)、海上区 ($n=142$) がいずれも 6.93 ± 0.17 mm となり、低塩分 8 日区は 6.91 ± 0.18 mm ($n=162$) となった (Fig.15, Table 18)。

試験区間の真珠直径に有意差は認められなかった($p>0.05$)。一方、挿核手術日間の真珠直径には有意差が認められた($p<0.01$)。また、試験区と挿核手術日の間に交互作用は認められなかった($p>0.05$)。

2012 試験の養生後 60 日間飼育した場合の真珠直径は、海上区が 7.12 ± 0.26 mm ($n=96$) と最も大きく、次いで低塩分 4 日区 7.11 ± 0.21 mm ($n=106$) と低塩分 8 日区 7.11 ± 0.23 mm ($n=111$) は同値となり、低塩分 14 日区が 6.99 ± 0.19 mm ($n=115$) と最も小さかった (Fig.16, Table 19)。低塩分 14 日区の真珠直径は他の 3 区よりも有意に小さかった($p<0.01$, Fig.16)。また、挿核手術日間の真珠直径にも有意差が認められた($p<0.01$)。試験区と挿核手術日の間には交互作用が認められなかった($p>0.05$)。

2012 試験の養生後 12 月まで飼育した場合の真珠直径は、海上 12 月採取区 7.36 ± 0.26 mm ($n=101$)、低塩分 8 日 12 月採取区 7.32 ± 0.29 mm ($n=111$) の順となったが (Fig.17, Table 20)、試験区間に有意差は認められなかった($p>0.05$)。一方、挿核手術日間の真珠直径には有意差が認められた($p<0.01$)。また、試験区と挿核手術日の間に交互作用は認められなかった($p>0.05$)。

4-4 考察

本研究結果から、最も高い無キズ珠率が得られる低塩分海水養生期間は 8 日間であることが明らかになった。また、低塩分海水養生期間を 4 日間まで短縮した場合においても、無キズ珠率は海上養生より高くなることが示された (Figs.9, 10)。

Fig.10 に示した養生後 60 日間飼育した場合の結果と同様に、養生後 12 月まで (130 日間以上) 飼育した場合においても、低塩分海水養生を 8 日間行った場合の無キズ珠率は、海上養生よりも有意に高かった (Fig.11)。Figs.10, 11 において各供試貝の試験条件で異

なるのは、養生後の飼育期間の長さだけであった。したがって、キズ・シミの多くは養生後 60 日までに形成されることが判明した。

2011 試験では供試貝として満 1 歳貝を用い、2012 試験では満 2 歳貝を用いた。8 日間までの低塩分海水養生を行った場合において、各試験の無キズ珠率とその期間の関係は、いずれも同じ傾向を示した(Figs.9, 10)。このことから、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果は母貝の年齢に拘わらず得られることがわかった。

挿核手術者は 2011 試験と 2012 試験で異なったものの、同様の傾向が得られた(Figs.9, 10)。この結果は、第二章、第三章の結果(Fig.6, Table 10)と同様に、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が挿核手術者の違いに拘わらず得られることを意味する。

挿核貝のへい死や挿入した真珠核が貝の体外に出る“脱核”は、真珠採取率を低下させる主要因子として考えられる(渥美ら, 2011b)。本研究の結果、真珠採取率に関して、試験区間に有意差は認められなかった(Figs.12~14, Tables 15~17)。したがって、低塩分水槽への収容が 14 日間までの場合、低塩分海水養生は挿核貝のへい死や脱核に大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。

低塩分海水養生を 14 日間行った場合の真珠直径は、期間を 8 日間までにした場合より顕著に小さくなることが明らかになった(Fig.16)。低塩分海水養生期間が 8 日間までの場合には、真珠直径に顕著な差異はなかった(Figs.15~17)。また、12 月に採取した真珠直径は、低塩分海水養生と海上養生の間で顕著な差はなかった(Fig.17)。したがって、14 日間の低塩分海水養生は、厚巻き真珠の生産には長すぎると判断された。一方、8 日間までの低塩分海水養生の真珠の巻きは、海上養生とくらべて遜色ないことが判明した。

以上の結果から、真珠の巻きが従来の養生法と同等で、かつ最も高い無キズ珠率が得られる低塩分海水養生期間は 8 日間であることが明らかとなった。

第五章 複数個挿核した貝を用いた低塩分海水養生による 無キズ珠率向上効果の比較

5-1 諸言

アコヤ真珠はその直径により、厘珠（5 mm 未満）、小珠（5 mm 以上 6 mm 未満）、中珠（6 mm 以上 8 mm 未満）、大珠（8 mm 以上）に区分される（農林水産省大臣官房統計部，2013）。国内における大きき別の真珠生産量をみると、1985年には直径6 mm以上の真珠（以下、大中珠）の生産割合が全体の61%を占めたが、1987年以降、生産する真珠の大珠化が進み、2012年には96%を占めるまでになっている（農林水産省統計情報部，1995；農林水産省大臣官房統計部，2013）。大中珠を生産する場合の挿核手術の主流は1個挿核によるものである。三重県においても真珠の大珠化は進み、2012年には大中珠の生産割合が県全体の85%となっている（農林水産省大臣官房統計部，2013）。一方で、三重県は、母貝1個体に対し直径6 mm未満の真珠核を2個以上挿入する“複数個挿核”を行い、小厘珠を生産する養殖業者が国内の他の主要産地にくらべて多いという特徴がある。このため、三重県は国内の小厘珠生産量の80%以上を占めるに至っている。（農林水産省大臣官房統計部，2013）。

第二章および第三章において、無キズ珠率を向上させるためには低塩分海水養生が有効であることを明らかにした。第四章では、低塩分海水養生期間を8日間まで短縮しても、無キズ珠率向上効果が得られ、しかも真珠の巻きも劣らないことが判明した。これらの試験には、直径6 mm以上の真珠核を1個挿入した貝を供試貝として用いた。一方、直径6 mm未満の真珠核を挿入した貝を供試貝とした場合、低塩分海水養生が無キズ珠率や巻きに与える影響については十分に検討されていない。

そこで本研究では、直径 6 mm 未満の真珠核を 2 個あるいは 4 個挿入した貝（以下、2 個挿核貝、4 個挿核貝）を低塩分海水養生した場合の無キズ珠率向上効果と巻きの違いを明らかにすることを目的とした。

5-2 材料および方法

5-2-1 2 個挿核貝における低塩分海水養生効果の把握

1) 供試貝および挿核手術

2 個挿核貝を用いた試験（以下、2 個挿核試験）の供試貝は、全湿重量 18.5 ± 2.6 g の満 1 歳の交雑貝とした。挿核手術は、2 個挿核に熟練した 1 名の挿核手術者により行った。2 個挿核試験では、供試貝 1 個体に対し、ふくろの位置と消化盲囊の外側を覆う生殖巣内（以下、どう）に真珠核 1 個とピース 1 個を 1 組としたものを計 2 組挿入した（Fig.18, 和田, 1999）。真珠核は直径 4.27~4.51 mm のものを用いた。ピースは仕立てを行っていない 1 家系の貝から切り出したものを挿核手術に用いた。2 個挿核試験は、2013 年 6~12 月の間に 5 回行った。挿核手術日は、1 回目：6 月 24 日、2 回目：7 月 2 日、3 回目：7 月 9 日、4 回目：7 月 16 日、5 回目：7 月 23 日であった。

2) 試験区

試験区は、低塩分海水区と海上区の 2 区とした。低塩分海水区には、第二章と同じ低塩分水槽を 1 台用いた。海上区には、英虞湾内に設置した真珠筏を 1 台用いた。水槽の塩分調整は第二章と同様の方法で行い、 24.9 ± 0.1 psu とした。水槽の水温は挿核手術日の海上養生海域とほぼ同じ水温に設定した。水温は 1 回目 25℃、2 回目 26℃、3 回目 27℃、4 回目および 5 回目 28℃とした。各回、挿核手術直後に供試貝を 50 個体ずつ養生籠に入れ、低塩分水槽に収容または真珠筏に垂下した。低塩分海水区は低塩分水槽に 8 日間収容した後、海上区と同じ筏に移してさらに 6 日間養生した。海上

区は真珠筏で14日間養生した。低塩分水槽に貝を収容した期間は無給餌とした。養生終了後、生残貝を試験区毎にポケット籠に入れ、英虞湾に設置した真珠筏で両区とも同様の飼育を行い、2013年12月16日に真珠を採取した。

3) キズ・シミの評価

採取した真珠は、真珠層真珠とそれ以外の真珠(稜柱層真珠、有機質真珠、真珠核)に目視で分類した(Fig.2)。真珠層真珠については、第二章の評価方法と同様にキズの有無およびシミの大きさによる評価を行った(Fig.3)。試験区毎に無キズ珠個数を採取した真珠個数で除し、これを百分率で表したものを無キズ珠率とした。また、試験区毎に採取した真珠個数を真珠核の挿入数で除し、これを百分率で表したものを真珠採取率とした。

4) 真円度および巻きの評価

採取した真珠のうち真珠層真珠については、第四章の評価方法と同様にして真円度を評価した。また、真珠直径の測定も第四章と同じ方法で行った。

5) 統計解析

無キズ珠率および真珠採取率は、逆正弦変換を行った後、試験区と挿核手術日を要因として、繰り返しの無い二元配置分散分析(two-way ANOVA)により解析した。また、真円真珠直径は、試験区と挿核手術日を要因として、繰り返しのある二元配置分散分析(two-way ANOVA)により解析した。

5-2-2 4個挿核貝における低塩分海水養生効果の把握

1) 供試貝および挿核手術

4個挿核貝を用いた試験(以下、4個挿核試験)の供試貝は、全湿重量 21.1 ± 2.8 gの満1歳の日本貝とした。挿核手術は、4個挿核に熟練した1名の挿核手術者により行った。4個挿核試験では、

供試貝 1 個体に対し、左右それぞれのふくろとどうの位置に真珠核 1 個とピース 1 個を 1 組としたものを計 4 組挿入した (Fig.19)。真珠核は直径 2.50~2.67 mm のものを用いた。ピースは仕立てを行っていない 1 家系の貝から切り出したものを挿核手術に用いた。4 個挿核試験は、2013 年 7~12 月の間に 5 回行った。挿核手術日は、1 回目:7 月 2 日, 2 回目:7 月 9 日, 3 回目:7 月 16 日, 4 回目:7 月 23 日, 5 回目:7 月 30 日であった。

2) 試験区

試験区は、低塩分海水区と海上区の 2 区とした。低塩分海水区の水槽と海上区の真珠筏は、2 個挿核試験と同じものを用いた。水槽の塩分調整は第二章と同様の方法で行い、 24.9 ± 0.1 psu とした。水槽の水温は挿核手術日の海上養生海域とほぼ同じ水温に設定した。水温は 1 回目 26°C , 2 回目 27°C , 3 回目および 4 回目 28°C , 5 回目 29°C とした。各回、挿核手術直後に供試貝を 40 個体ずつ養生籠に入れ、低塩分水槽または真珠筏に垂下した。養生期間は挿核手術直後から 14 日間とし、低塩分海水養生および海上養生はともに 2 個挿核試験と同じ方法で行った。養生終了後、生残貝を試験区毎にポケット籠に入れ、英虞湾内の真珠筏で海上飼育し、2013 年 12 月 19 日に真珠を採取した。

3) キズ・シミ, 真円度および巻きの評価

採取した真珠は、2 個挿核試験と同様の方法でキズ・シミの評価を行い、無キズ珠率と真珠採取率を算出した。また、採取した真珠の真円度と巻きについても、2 個挿核試験と同じ方法で評価ならびに測定を行った。

4) 統計解析

無キズ珠率, 真珠採取率および真円真珠直径については、2 個挿核試験と同じ方法で解析を行った。

5-3 結果

5-3-1 2個挿核貝における低塩分海水養生効果の把握

無キズ珠率は、低塩分海水区が $19.5 \pm 10.9\%$ ($n=5$)、海上区が $14.4 \pm 7.7\%$ ($n=5$)となり、低塩分海水区の無キズ珠率は海上区よりも有意に高かった ($p < 0.05$, Fig.20, Table 21)。挿核手術日毎に無キズ珠率を比較したところ、低塩分海水区の無キズ珠率は海上区の平均 1.4 倍となった。また、挿核手術日間の無キズ珠率にも有意差が認められた ($p < 0.01$, Table 21)。

真珠採取率は、海上区が $74.2 \pm 8.6\%$ ($n=5$)、低塩分海水区が $71.2 \pm 7.4\%$ ($n=5$)となり、試験区間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$, Fig.21, Table 22)。一方、挿核手術日間の真珠採取率には有意差が認められた ($p < 0.01$, Table 22)。

真珠直径は、低塩分海水区が 5.43 ± 0.33 mm ($n=211$)、海上区が 5.33 ± 0.31 mm ($n=201$)となり、低塩分海水区の真珠直径は海上区よりも有意に大きかった ($p < 0.01$, Fig.22, Table 23)。また、挿核手術日間の真珠直径にも有意差が認められた ($p < 0.01$, Table 23)。試験区と挿核手術日の間に交互作用は認められなかった ($p > 0.05$)。

5-3-2 4個挿核貝における低塩分海水養生効果の把握

無キズ珠率は、低塩分海水区が $36.7 \pm 14.8\%$ ($n=5$)、海上区が $30.5 \pm 12.3\%$ ($n=5$)となった (Fig.23, Table 24)。5 回行った試験のうち 4 回において、低塩分海水区は海上区よりも無キズ珠率が高かったものの、試験区間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$, Fig.23)。挿核手術日毎に無キズ珠率を比較したところ、低塩分海水区の無キズ珠率は海上区の平均 1.2 倍となった。

真珠採取率は、低塩分海水区が $74.3 \pm 9.0\%$ ($n=5$)、海上区が $73.9 \pm 4.5\%$ ($n=5$)となり、試験区間に有意差は認められなかった

($p>0.05$, Fig.24, Table 25)。また、挿核手術日間の真珠採取率にも有意差は認められなかった($p>0.05$, Table 25)。

真珠直径は、低塩分海水区が 3.41 ± 0.29 mm ($n=311$)、海上区が 3.41 ± 0.29 mm ($n=283$)となり、試験区間に有意差は認められなかった($p>0.05$, Fig.25, Table 26)。挿核手術日間の真珠直径に有意差は認められたものの($p<0.05$, Table 26)、試験区と挿核手術日の間に交互作用が認められた($p<0.05$)。

5-4 考察

2個挿核試験において、低塩分海水区は海上区よりも無キズ珠率が有意に高かった($p<0.05$, Fig.20)。この結果、直径 4.27~4.51 mm の真珠核を2個挿入した貝でも、低塩分海水養生を行うことによって無キズ珠率が向上することが明らかとなった。

一方、4個挿核試験では、低塩分海水区の方が海上区よりも無キズ珠率が低い場合(試験3回目)もあり、試験区間の無キズ珠率に有意差は認められなかった(Fig.23)。また、4個挿核試験では、低塩分海水区の無キズ珠率が海上区の平均1.2倍となり(Fig.23)、2個挿核試験の平均1.4倍よりも低かった。これらの結果から、直径 2.50~2.67 mm の真珠核を4個挿入した貝では、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が得られにくいことが判明した。

本研究では、2個挿核貝に挿入した真珠核は直径 4.27~4.51 mm、表面積にすると $18.2\pi \sim 20.3\pi$ mm² であり、4個挿核貝に挿入した真珠核は直径 2.50~2.67 mm、表面積にすると $6.3\pi \sim 7.1\pi$ mm² であった。一方、2個挿核貝に挿入したピースの面積は 2.23~3.65 mm² であり、4個挿核貝に挿入したピースの面積は 3.04~5.92 mm² であった。一般的なピースの大きさは 4~9 mm² とされていることから(小竹ら 1957, 和田 1999)、2個挿核試験に用いたピースは一般的なものよりやや小さめであった。すなわち、2個挿核試験の供試貝は

4 個挿核試験よりもピースの大きさに対して大きな真珠核が挿入されたことになる。これらのことから、挿入するピースの大きさに対し大きな真珠核を挿入した場合に、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果は得られやすいと考えられる。したがって、本研究のようにピースの大きさがほぼ一定の場合には、直径 2.50～2.67 mm の真珠核を挿入した 4 個挿核試験よりも、直径 4.27～4.51 mm の真珠核を挿入した 2 個挿核試験の方が低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が得られやすいと推測される。そのため、4 個挿核試験においてもピースの大きさをさらに小さくすれば、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が得られやすくなると考えられる。

真珠採取率は、各試験ともに試験区間に有意差が認められず、両試験の値はほぼ同値であった (Figs.21, 24)。したがって、低塩分海水養生は複数個挿核した貝に対してもへい死や脱核に大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。

真珠の巻きに関して、2 個挿核試験では低塩分海水養生の方が海上養生よりも真珠直径が有意に大きくなった (Fig.22)。4 個挿核試験においては、低塩分海水養生と海上養生の間で真珠直径に有意な差異は認められなかった (Fig.25)。したがって、低塩分海水養生は、真珠の巻きに悪影響を及ぼさないことが判明した。なお、2 個挿核試験において、低塩分海水養生の真珠の巻きが海上養生よりも厚くなった理由については現在のところ不明である。

本研究結果から、挿入する真珠核の大きさとピースの大きさの組み合わせにより、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が異なることが明らかとなった。すなわち、直径 4 mm 以上の真珠核と 3.65 mm² 以下のピースを挿入した場合には、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が得られることが判明した。一方、直径 4 mm 未満の真珠核と 3 mm² 以上のピースを挿入した場合には低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が得られない可能性があり得る。

第六章 低塩分海水養生によるキズ・シミ形成抑制機構の解明

6-1 諸言

第二章，第三章，第四章において，直径 6 mm 以上の真珠核を 1 個挿入した貝を低塩分海水養生すると，無キズ珠率が向上することが明らかになった。第五章においては，挿入するピースの大きさがほぼ同じ場合，大きな真珠核を挿入した貝を低塩分海水養生させた方が，無キズ珠率の向上効果が得られやすいことが判明した。これらのことから，ピースの大きさに対して挿入する真珠核が大きいほど低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が得られる可能性が高い。

第二～五章の結果から，低塩分海水養生は真珠生産現場で有効な技術であると考えられる。しかしながら，低塩分海水養生によりキズ・シミがどのような機構で抑制されるのかは全くわかっていない。低塩分海水養生をより効率的な技術にするためには，キズ・シミ形成抑制機構の解明が重要である。

真珠袋形成過程において，ピースから伸張する外面上皮細胞と真珠核の間に血球や生殖細胞等が挟み込まれると，それらの腐敗や外面上皮細胞の炎症反応に伴うメラニン色素沈着が起こり，その箇所にはキズ・シミが形成される(青木，1961；青木，1966；Norton et al., 2000；Ogimura et al., 2012；和田，1999)。このことから，外面上皮細胞が伸張する際，血球や生殖細胞等が外面上皮細胞と真珠核の間に挟み込まれなければ，キズ・シミは形成されないと考えられる。また，低塩分海水養生においてキズ・シミの形成が抑制されるのは，真珠袋となる外面上皮細胞と真珠核の間に血球や生殖細胞等が挟み込まれにくくなることによるものと考えられる。しかしながら，低塩分環境下において，真珠袋の形成に必要な日数を調べた研究はない。また，二枚貝の血球には異物の貪食や創傷治癒等の機能が知られているが(高橋ら，2008)，低塩分環境がアコヤガイの血球数や異物

貪食率に与える影響についての知見は乏しい。

そこで本研究では、低塩分環境下における真珠袋形成に要する日数と血球の貪食能を明らかにすることを目的とした。具体的には、低塩分海水養生、通常海水養生および海上養生における真珠袋形成に要する日数、血球の数ならびに異物貪食率を調査し、比較を行った。

6-2 材料および方法

6-2-1 異なる養生方法による真珠袋形成日数の相違

1) 供試貝および挿核手術

試験は、2012年5～8月の間に3回行った。試験には全湿重量 42.6 ± 3.9 g の満2歳の交雑貝を用いた。挿核手術日は、1回目:5月31日、2回目:6月27日、3回目:7月17日であった。挿核手術は3回ともに同一の挿核手術者1名により行い、供試貝1個体に対し真珠核1個とピース1個をふくろの位置に挿入した(Fig.1)。真珠核は直径6.44～6.50 mm のものを用いた。ピースは仕立てを行っていない1家系の貝から切り出したものを挿核手術に用いた。

2) 試験区

試験区は、低塩分海水区(塩分 25.1 ± 0.1 psu)、通常海水区(塩分 33.0 ± 0.0 psu)および海上区(塩分 32.6 ± 0.7 psu)の3区とした。低塩分海水区と通常海水区には、第二章と同じ大型循環濾過水槽を1台ずつ用いた。海上区には、英虞湾内に設置した真珠筏を1台用いた。各水槽の塩分調整は、第二章と同様の方法で行った。低塩分海水区と通常海水区の水温は、3水温(22, 24, 28℃)の中から海上区の水温に最も近い水温とし、1回目は22℃、2回目は24℃、3回目は28℃に設定した。各回の試験では、挿核した供試貝を養生籠に80個体ずつ入れ、各水槽に収容あるいは真珠筏に垂下した。低塩分海水区と通常海水区は、挿核手術後、水槽に8日

間収容し、その後海上区と同じ筏に垂下した。水槽に収容中は無給餌飼育とした。

3) サンプルング

1回目の試験のサンプルングは、挿核手術後 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 日目に行った。2回目の試験のサンプルングは、挿核手術後 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20 日目に行った。3回目の試験のサンプルングは、挿核手術後 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 日目に行った。サンプルング時には各区の供試貝を 7~10 個体ずつ水槽からとりあげ、軟体部を固定した。軟体部は閉殻筋と外套膜、鰓を切除した後、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した。

4) 真珠袋組織の観察

ホルマリン固定した軟体部から、ピンセットとメスを用いて挿入した真珠核の中心線付近を通るように組織を 2 分し真珠核を摘出した (Fig.26)。真珠核の摘出後、Fig.26 に示す斜線部の組織を切り出し、常法によりパラフィン包埋した。パラフィン包埋した組織を、真珠核の入っていた中心側から 180 μ m 間隔で薄切し、厚さ 6 μ m の連続切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、顕微鏡観察に供した。

光学顕微鏡 (BH2, オリンパス社製) で、真珠袋が完成しているか否かについて観察を行った。作製した組織切片の観察において、真珠袋が形成されていた個体を真珠袋完成個体とした (Fig.27)。試験区毎に真珠袋完成個体数を組織観察個体数で除し、これを百分率で表したものを“真珠袋完成個体率”とした。

5) データ解析

真珠袋形成に及ぼす養生方法の影響の検討には、一般化線形モデルを用いた (Crawley, 2005)。フルモデルは、真珠袋完成個体率を応答変数とした式 (1) を仮定した。

$$\log(S/(1-S)) = \beta_0 + \beta_1 PO1 + \beta_2 PO2 + \beta_3 WT + \beta_4 Day \quad (1)$$

β_0 は定数を表すパラメータ, $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ は各変数の真珠袋完成個体率への影響度を表すパラメータである。 S は真珠袋完成個体率である。 $PO1$ は名義変数で, 挿核手術後, 通常海水水槽(通常海水区)に供試貝を収容した場合は 1, それ以外は 0 とした。 $PO2$ は名義変数で, 挿核手術後, 低塩分海水水槽(低塩分海水区)に供試貝を収容した場合は 1, それ以外は 0 とした。 WT は連続変数で, 養生時の水温を示す。 Day は連続変数で, 挿核手術後からサンプリングまでの日数を示す。本研究には, 連結関数(link function)を logit, 誤差構造を 2 項分布とした一般化線形モデルを用い, モデルへの各調査データの当てはめには, R ver.2.15.1 (<http://cran.ism.ac.jp/>) の glm を用いた。

まず, 各変数による単変量モデルのパラメータ推定と, 全変数を考慮したフルモデルのパラメータ推定を行った。次に, 変数増減法(stepwise 法)で赤池情報量規準(AIC)に基づく変数選択を行った。

6-2-2 血球の貪食能に及ぼす低塩分の影響

1) 供試貝

仕立てをしていない供試貝(以下, 無仕立て貝)を用いて, 2014 年 6 月 9~17 日の間に試験(以下, 無仕立て貝試験)を行った。また, 仕立てをした供試貝(以下, 抑制貝)を用いて, 2014 年 7 月 18~26 日の間に試験(以下, 抑制貝試験)を行った。供試貝は, 両試験ともに満 2 歳の交雑貝(無仕立て貝:全湿重量 35.8 ± 1.8 g, 抑制貝: 36.9 ± 3.1 g)を用いた。無仕立て貝は, 提灯籠(ポリエチレン製, 縦 35.0 cm×横 35.0 cm×高さ 23.0 cm, 目合い 0.9 cm)に入れて試験開始日まで飼育した。抑制貝は, 2014 年 6 月 6 日に抑制籠に 120 個体ずつ入れ, 英虞湾に設置した真珠筏に垂下して試験開始日まで仕立て処理を行った。なお, 両試験には挿核手術を施してい

ない供試貝を用いた。

2) 試験区

無仕立て貝試験は、塩分 25 区 (塩分 24.8 ± 0.0 psu) と塩分 33 区 (塩分 33.1 ± 0.1 psu) の 2 区で行った。抑制貝試験は、塩分 25 区 (塩分 24.8 ± 0.1 psu), 塩分 33 区 (塩分 33.3 ± 0.1 psu), 海上区の 3 区で行った。塩分 25, 33 区には、第二章と同じ大型循環濾過水槽を 1 台ずつ用いた。海上区には、英虞湾内に設置した真珠筏を 1 台用いた。各水槽の塩分調整は、第二章と同様の方法で行った。無仕立て貝試験の水温は 25°C に設定した。抑制貝試験の塩分 25, 33 区は 27°C とし、海上区 (27.9°C) とほぼ同じ水温に設定した。各試験では、供試貝を養生籠に入れ、各水槽に収容あるいは真珠筏に垂下した。水槽に収容中は無給餌飼育とした。

3) 貪食反応および貪食率

無仕立て貝試験では、2014 年 6 月 9 日に供試貝を各水槽に収容し、6 月 17 日に採血を行った。抑制貝試験では、2014 年 7 月 18 日に供試貝を各水槽に収容ないしは真珠筏に垂下し、7 月 26 日に採血を行った。各試験区の供試貝 (無仕立て貝: 5 個体, 抑制貝: 6 個体) から 25G の注射針付ツベルクリンシリンジを用いて、閉殻筋より血リンパ液を $400 \sim 600 \mu\text{l}$ 採取した。そのうち $50 \mu\text{l}$ をスライドガラス上に滴下し、室温 24°C に設定した恒温室 (以下, 暗室) で 20 分間静置し、血球をスライドガラスに接着・伸展させた。血リンパ液を捨てた後、ガラス繊維ろ紙 (GF/F, ワットマン社製) にて濾過した海水を水道水で希釈し、塩分調整した各試験区と等調の海水 (pH7.84 ~ 7.97) でスライドガラスを 2 回 (1 ml/回) 洗浄し、接着していない血球を除去した。

スライドガラス洗浄後、血球が貪食すると明るい赤色の蛍光を発する pHrodoTM 標識大腸菌 (Molecular Probes 社製) を各塩分濃度に調整した海水にて 10 倍希釈した懸濁液 $50 \mu\text{l}$ を重層した。暗室

で 60 分間静置した後，同じ塩分濃度の海水で 2 回 (1 ml/回) 洗浄し，貪食されなかった大腸菌を除去した。洗浄後，同じ塩分濃度の海水 50 μ l を滴下し，暗室で 15 分間静置し，pHrodoTM の発色を促進させた。最後に海水を捨て，塩分調整した海水で 200 倍に希釈したヘキスト染色液 (Hoechst 33342, Lonza 社製) を 30 μ l 滴下し，カバーガラスをかけて暗室で 20 分以上静置した。その後，落射蛍光顕微鏡および微分干渉装置 (BX51, オリンパス社製) を用いて，一視野につき微分干渉像と蛍光像 2 種類 (pHrodoTM: WIG 励起，ヘキスト: WU 励起) の計 3 種類の写真を 400 倍で撮影した。撮影は供試貝毎に 10~14 視野について行った。

撮影した同一視野の写真 3 枚を画像編集ソフト (Photoshop, Adobe 社製) にて重ね合わせ，血球による貪食の有無を確認した (Fig.28)。ヘキスト染色において青色の蛍光が観察できた粒子を血球とした。また，血球のうち pHrodoTM 標識大腸菌を貪食し赤色の蛍光が観察できた血球を“貪食血球”とした。試験区毎に貪食血球数を血球数で除し，これを百分率で表して“貪食率”とした。なお，川本ら (1957) はアコヤガイの血球を無顆粒白血球，顆粒白血球，色素顆粒白血球，特殊白血球の 4 種に大別している。一方，船越 (1974, 2000) は無顆粒血球と顆粒血球の 2 種に大別している。このように，アコヤガイの血球の分類および機能については統一見解が存在しないため (高橋ら，2008)，本研究においては，血球を形態や大きさで分類せず，観察を行った。

4) 血球数

各試験区の供試貝から採取した血リンパ液のうち 50 μ l をヘキスト染色液 50 μ l と混合し，細胞計数盤 (ワンセルカウンター，バイオメディカルサイエンス社製) に入れて，室温 24°C の暗室で 20 分以上静置した。血球の計数は常法により行い，貪食血球の観察・撮影と同様に，落射蛍光顕微鏡と微分干渉装置を用いて，計数盤の一區画

(0.25 mm×0.25 mm)につき微分干渉像と蛍光像(ヘキスト:WU 励起)の2種類の写真を100倍で撮影した。撮影した同一視野の写真2枚を画像編集ソフト(Photoshop, Adobe 社製)にて重ね合わせ、ヘキスト染色による青色蛍光が観察できる粒子を血球として計数した。

5) データ解析

無仕立て貝の貪食率データは、逆正弦変換を行った後、Studentの*t*検定(Student's *t*-test)により解析した。抑制貝の貪食率データは、逆正弦変換を行った後、試験区を要因として、一元配置分散分析(one-way ANOVA)により解析した。無仕立て貝の血球数データは、Studentの*t*検定(Student's *t*-test)により解析した。抑制貝の血球数データは、試験区を要因として、一元配置分散分析(one-way ANOVA)により解析した。

6-3 結果

6-3-1 異なる養生方法による真珠袋形成日数の相違

挿核手術後、真珠袋完成個体が確認されたのは、22℃では3区ともに12日目、24℃では低塩分海水区が12日目、通常海水区と海上区が10日目、28℃では低塩分海水区が10日目、通常海水区と海上区が8日目であった(Fig.29)。真珠袋完成個体の出現は、海上区で最も早く、次いで通常海水区となり、低塩分海水区が最も遅かった。また、真珠袋完成個体の出現は水温が高いほど早くなる傾向を示した。

各変数の推定値の正負は単変量モデル i および iii とフルモデル iv において一致したのに対し、単変量モデル ii とフルモデル iv では、変数の推定値の正負は一致しなかった(Table 27)。変数選択を行った結果、フルモデル iv が選択された。

モデル iv による GLM 解析の結果を Table 28 に示した。低塩分海水養生、水温、および挿核手術後の日数において、無キズ珠率に対

する有意な効果が認められた ($p < 0.01$, Table 28)。PO2 のオッズ比より、海上養生は低塩分海水養生よりも真珠袋完成個体率を 2.752 倍上昇させると推定された。PO1 のオッズ比より、海上養生は通常海水養生よりも真珠袋完成個体率を 1.663 倍上昇させると推定された。また、通常海水養生は低塩分海水養生よりも真珠袋完成個体率を 1.655 倍上昇させると推定された。水温のオッズ比より、水温が 1℃ 高くなる毎に真珠袋完成個体率が 1.238 倍上昇すると推定された。挿核手術後の日数のオッズ比より、日数が 1 日長くなる毎に真珠袋完成個体率が 1.583 倍上昇すると推定された。

6-3-2 血球の貪食能に及ぼす低塩分の影響

無仕立て貝試験における血球の貪食率は、塩分 33 区が $69.0 \pm 11.8\%$ ($n=5$)、塩分 25 区が $57.0 \pm 23.5\%$ ($n=5$) となり、試験区間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$, Fig.30)。

抑制貝試験における血球の貪食率は、塩分 25 区が $61.8 \pm 10.4\%$ ($n=6$) と最も高く、次いで海上区 $59.3 \pm 7.8\%$ ($n=6$)、塩分 33 区 $58.7 \pm 20.8\%$ ($n=6$) の順となったが、試験区間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$, Fig.31)。

無仕立て貝試験における血球数は、塩分 25 区が 337.0 ± 175.7 細胞/ μl ($n=5$)、塩分 33 区が 241.0 ± 104.6 細胞/ μl ($n=5$) となり、試験区間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$, Fig.32)。

抑制貝試験における血球数は、塩分 33 区が 509.2 ± 201.7 細胞/ μl ($n=6$) と最も高く、次いで塩分 25 区 345.0 ± 71.9 細胞/ μl ($n=6$)、海上区 305.8 ± 139.5 細胞/ μl ($n=6$) の順となったが、試験区間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$, Fig.33)。

6-4 考察

真珠袋形成に関して、海上養生は低塩分海水養生よりも真珠袋完成個体率を 2.752 倍、通常海水養生は真珠袋完成個体率を 1.655 倍上昇させる結果となった (Table 28)。すなわち、真珠袋の完成は海上養生が最も速く、次いで通常海水養生であり、低塩分海水養生が最も遅いことが判明した。また、水温は 1℃高くなる毎に真珠袋完成個体率を 1.238 倍上昇させることが明らかとなった (Table 28)。本研究結果は、水温が高いほど真珠袋が速く形成されるとする Kawakami (1953)、青木 (1956)、町井ら (1957) の報告と同様の傾向を示した。

血球の貪食能に関して、無仕立て貝における血球の貪食率と血球数は試験区の間で有意差は認められなかった (Figs.30, 32)。また、抑制貝においても有意差は認められなかった (Figs.31, 33)。船越 (2000) は、仕立てをしていないアコヤガイを塩分 32.18 psu と塩分 23.50 psu の海水にそれぞれ 24 時間収容した場合、血球数に差は見られなかったとしている。Kuchel et al. (2010) は、仕立てをしていない *Pinctada imbricata* の血球数は塩分 25 psu 海水に収容しても対照区との間に有意差は認められなかったとしている。本研究の結果は、これらの報告と同じ傾向を示した。したがって、アコヤガイの血球の貪食率や血球数は、塩分 25 psu 海水に 8 日間収容しても大きく変化しないことが明らかとなった。また、アコヤガイの血球の貪食率や血球数は、塩分濃度が 24 psu まで低下しても大きく変化しないことが示された。

血球の機能として、異物の貪食の他に創傷治癒が挙げられる (高橋ら, 2008)。二枚貝における創傷治癒の過程は、1) 創傷部に血球が遊走、浸潤、2) 凝集した血球による傷口の封鎖、3) 損傷部の組織が血球に置換、4) 繊維細胞からコラーゲン分泌、5) 貪食細胞による組織残渣の処理、6) 組織の修復の 6 段階からなる。アコヤガイの挿

核手術における創傷部への血球の浸潤・集積は、4月に挿核手術を施した場合は手術後5～7日後までに、8月の場合は手術後1～2日の間に起こるとされている(町井ら, 1957)。また、外套膜を切除した1時間後には傷周辺に血球の集積が起こり、6時間後には血球と結合組織が傷面を覆うことが報告されている(Acosta-Salmón et al., 2006)。淡水産真珠の養殖に用いられるイケチョウガイの場合、ピースの移植手術から数時間後には傷周辺の組織中に血球が増加し、手術5日後には血球が幾重にもなった層(以下, 血球層)を形成して傷の表面を覆うとともに、ピースは血球により完全に包囲される(和田, 1989)。

ピースから伸張した外面上皮細胞は、傷口に形成された血球層を足場にして広がり、傷の表面に沿って真珠袋を形成する(和田, 1989)。真珠袋を形成する際、真珠袋内に血球や生殖細胞等が挟み込まれるとキズ・シミが形成される(青木, 1961; 青木, 1966; Norton et al., 2000; Ogimura et al., 2012; 和田, 1999)。本研究の結果、低塩分海水養生により真珠袋形成速度が海上養生や通常海水養生よりも遅くなることが明らかになった。また、25 psu程度の低塩分は血球による貪食能に大きな影響を及ぼさないことが判明した。したがって、低塩分海水養生によるキズ・シミ形成抑制効果は、真珠袋形成を遅らせることから生じると考えられる。すなわち、低塩分海水養生では、まず創傷部へ侵入した血球が血球層を形成し傷口を封鎖するとともに挿核手術時の混入物や組織残渣の処理を行う。また、血球層を形成しない血球も互いに網目状につながり、結合組織化する(青木, 1961)。このような血球による創傷治癒が進行した後、ピースの外面上皮細胞が真珠袋を形成する。そのため、真珠袋と真珠核の間に血球や組織残渣等を挟み込む可能性が低くなると考えられる。一方、通常海水養生や海水養生の場合、創傷治癒と真珠袋形成はほぼ同時に進行する。そのため、創傷部に浸潤してき

た血球や配偶子,組織残渣等を真珠袋と真珠核の間に挟み込む可能性が高くなり,キズ・シミ形成が多くなると考えられる。今後は,低塩分海水養生による真珠袋形成の遅延機構を解明する必要がある。

第七章 総合考察

第二章と第三章において、低塩分海水養生により無キズ珠率が向上することが明らかになった。第四章において、真珠の巻きが従来の養生法と同等で、かつ最も高い無キズ珠率が得られる低塩分海水養生期間は8日間であることが判明した。また、第五章において、2個挿核貝と4個挿核貝を8日間の低塩分海水養生させても、巻きに遜色ないことが明らかになった。しかしながら、2個挿核貝の方が、4個挿核貝よりも低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が高かった。第六章においては、低塩分海水養生によりキズ・シミ形成が抑制される機構の解明として、低塩分海水養生が真珠袋形成日数に与える影響と、塩分が血球の貪食率および血球数に与える影響を明らかにした。本章では以上の結果および本技術の今後の養殖現場への展開について考察する。

7-1 低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果

真珠品質は、養生方法(渥美ら, 2011a; 渥美ら, 2014; Atsumi et al., 2014; 林, 2008a; 林, 2008b; 林ら, 2010; 植本, 1962), 母貝の生理状態(青木ら, 2010a; Atsumi et al., 2014), 挿核手術の時期(青木, 1966), 挿核手術者の技術水準(渥美ら, 2011a; Nava et al., 2000), 母貝の軟体部の大きさに対する真珠核の直径(Atsumi et al., 2014; 船越ら, 1991)といった様々な要因の影響を受けるとされている。林(2008a; 2008b; 2010)は、低塩分海水(塩分 24.6~27.2 psu)を満たした水槽で挿核手術直後の貝を10~14日間養生させることにより、通常海水(塩分 32.4~35.0 psu)の養生よりも無キズ珠率が向上することを報告した。しかしながら、林の報告(2008a; 2008b)には、試験の条件設定が一定でないという問題点がある。また、水槽を用いた養生と現行法である海上養生との間で無

キズ珠率や巻きについて比較を行っていない。そのため、本研究では低塩分海水養生が通常海水養生よりも無キズ珠率を向上させることができるかどうかを明らかにする必要があった。

そこで本研究では、まず、1名の挿核手術者が同一日に挿核手術を行った供試貝を塩分 25 psu と 33 psu の海水入りの水槽に収容し、無キズ珠率を比較した。その結果、低塩分海水区の無キズ珠率が、通常海水区よりも有意に高かった (Table 1)。このことから、養生時の塩分濃度を 25 psu まで低下させることには、無キズ珠率を向上させる効果があることが明らかになった。

次に、低塩分海水養生が海上養生よりも無キズ珠率を向上させるかどうかを明らかにするため、低塩分海水養生、通常海水養生、海上養生区における無キズ珠率を、異なる時期にて比較する試験を行った。その結果、低塩分海水区の無キズ珠率は海上区よりも高く、試験区間に有意差が認められた ($p < 0.05$, Fig.4, Table 2)。このことから、低塩分海水養生は、海上養生よりも無キズ珠率を顕著に向上させることが明らかとなった。また、低塩分海水養生と通常海水養生の比較では、全試験において低塩分海水区の無キズ珠率が通常海水区よりも高かったものの、低塩分海水区と通常海水区の間では有意差は認められなかった (Fig.4)。低塩分海水養生を行った場合の無キズ珠率が最も高く、次いで通常海水養生となり、海上養生が最も無キズ珠率が低かった (Fig.4)。低塩分海水養生では水槽の海水を低塩分にしたことに加え、塩分と水温 (Table 4) の変動を抑え、また水槽収容中は無給餌にした。したがって、低塩分以外に環境変動や餌料環境の違いが、海上養生よりも顕著に無キズ珠率を向上させたと考えられる。

技術水準の異なる挿核手術者が低塩分海水養生を行った場合において、低塩分海水養生による無キズ珠率の向上効果が得られるかどうかを明らかにするため、のべ 17 名の挿核手術者を対象に、低

塩分海水養生と海上養生における無キズ珠率の比較を行った。その結果、低塩分海水養生において無キズ珠率は著しく向上した (Figs.4, 6, 9, 10, 11, 20, 23, Tables 10, 11)。これらの結果から、挿核技術の水準の違いに関係なく、低塩分海水養生においては無キズ珠率向上効果が得られることがわかった。

低塩分海水養生に供する母貝について、日本貝 (Fig.23, Tables 10, 11) と交雑貝を用いた試験 (Figs.4, 6, 9, 10, 11, 20) はいずれも、低塩分海水養生の無キズ珠率が海上養生よりも高くなった。したがって、低塩分海水養生は、母貝の種類に拘わらず無キズ珠率を向上させることが明らかとなった。

満 1 歳貝 (Figs.9, 20, 23) と満 2 歳貝を用いた試験 (Figs.4, 6, 10, 11, Tables 10, 11) はともに、低塩分海水養生の無キズ珠率が海上養生よりも顕著に高かった。したがって、母貝の年齢に拘わらず低塩分海水養生により無キズ珠率は向上することがわかった。岩永ら (2008) は越物真珠 (飼育 2 年目の挿核貝から採取した真珠) を生産するには満 1 歳貝に挿核手術した方が従来の満 2 歳貝よりも生残率および真珠品質が高くなるとしている。満 1 歳貝に挿核手術を行った後、低塩分海水養生を行えば、当年物真珠 (飼育 1 年目の挿核貝から採取した真珠) と越物真珠のいずれを生産するとしても、従来の養殖方法よりも高品質真珠の生産ができる可能性が高い。

本研究では、真珠品質に影響を与えるとされる養生方法 (渥美ら, 2011a; 渥美ら, 2014; Atsumi et al., 2014; 林, 2008a; 林, 2008b; 植本, 1962), 母貝の閉殻力 (青木ら, 2010a; Atsumi et al., 2014), 挿核手術者の技術水準 (渥美ら, 2011a; Nava et al., 2000), 母貝の軟体部の大きさに対する真珠核の直径 (Atsumi et al., 2014; 船越ら, 1991) の 5 要因について、無キズ珠率に及ぼす影響の大きさを比較した。その結果、養生方法と母貝の閉殻力が、無キズ珠率に最も大きな影響を及ぼすことが明らかとなった (Tables

10, 11)。低塩分海水養生は海上養生よりも無キズ珠率を5倍以上向上させ(Tables 10, 11), 閉殻力 2.0~4.9 kgf の母貝は, 閉殻力 5.0~7.9 kgf の母貝よりも無キズ珠率が2倍以上高かった(Tables 10, 11)。

低塩分海水養生の期間の長さについて検討した結果, 低塩分海水養生期間が8日間までの場合, 期間が長くなるにつれ無キズ珠率は高くなった(Figs.9, 10)。しかしながら, 低塩分海水養生期間を14日間にした場合, 無キズ珠率は8日間よりも低かった(Fig.10)。これらのことから, 最も高い無キズ珠率が得られる低塩分海水養生期間は8日間であることが明らかになった。また, 低塩分海水養生期間を4日間まで短縮した場合でも, 無キズ珠率は海上養生より高いことが示された(Figs.9, 10)。

真珠核を複数個挿入した貝を低塩分海水養生した場合でも無キズ珠率向上効果が得られるかどうかを検討したところ, 直径 4.27~4.51 mm の真珠核を2個挿入した貝でも, 無キズ珠率向上効果が認められた($p<0.05$, Fig.20)。一方, 直径 2.50~2.67 mm の真珠核を4個挿入した貝では, 無キズ珠率向上効果が, 直径 4.27~4.51 mm の真珠核を2個挿入した貝よりも低く, 両区の間には有意差は認められなかった(Fig.23)。さらに, 本研究において, 同じ大きさの真珠核を挿入した貝を用いて, 複数回行った試験結果について, 低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果と真珠核の直径の関係を Fig.34 に示した。その結果, 真珠核の直径が大きくなるほど, 低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が大きくなる傾向が認められた(Fig.34)。これらの結果から, 低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果は, 挿入する真珠核の大きさにより異なることが示された。

真珠採取率には, 低塩分海水区と海上区の間で有意差は認められなかったが, 挿核手術日と業者間においてはそれぞれ有意差が認められた($p<0.01$, Figs.5, 7, 12~14)。また, 複数個挿核した貝を用

いた試験の真珠採取率においても、試験区間に有意差は認められなかった(Figs.21, 24)。したがって、低塩分海水養生は挿入する真珠核の大きさや挿入する数に拘わらず、挿核貝のへい死や脱核には影響しないことが明らかになった。貝のへい死や脱核が多くなると、真珠採取率は低くなる。青木(1966)は、挿核手術後10日間のへい死率・脱核率は、7月下旬以降に急に高くなり、その後9月中旬頃まで高い状態が続くとしている。本研究でも、Table 3に示したとおり、8~9月の試験でいずれの試験区においても真珠採取率が低下する傾向が見られた。また、真珠養殖業者の技術差によっても真珠採取率は異なるとされている(奥村ら, 2003; 林ら, 2005)。これらのことから、真珠採取率は、養生方法よりも挿核手術時期の違いや真珠養殖業者による養殖技術(仕立て、挿核手術、飼育)の差に大きく影響されると推察された。

真珠の巻きに関して、低塩分海水養生期間が8日間までの場合には、真珠直径が海上養生とほぼ同じであった(Figs.15~17, 22, 25)。一方、低塩分海水養生を14日間行った場合には、真珠直径が海上養生よりも著しく小さくなった(Fig.16)。これらの結果から、低塩分海水養生期間が8日間までの場合、真珠の巻きは悪影響を受けないことが明らかとなった。これに対し、14日間の低塩分海水養生は、巻きが薄くなるため長すぎると判断された。

真珠形成に用いられるカルシウムの供給源は、主として水中に溶解しているカルシウムイオンであり、カルシウムイオンは鰓や外套膜内面等の上皮細胞から吸収される(和田, 1999)。真珠形成に利用される炭酸イオンの供給源は、アコヤガイが呼吸した際に生じる二酸化炭素である(和田, 1999)。低塩分海水養生は無給餌で行うため、低塩分水槽収容中の挿核貝は絶食状態となる。アコヤガイは低塩分海水環境下におかれると濾過水量の低下(Alagarwami et al., 1976; 宮内, 1962)、桿晶体重量の減少(Wada K.T., 1969)、血清蛋白質

量の減少(船越, 1987)が生じることがわかっている。また, 本研究により低塩分海水養生は真珠袋完成に要する期間を海上養生よりも長くすることがわかった。これらのことから, 低塩分海水の入った水槽に収容中の挿核貝は, ほとんど真珠形成を行っていないと推察される。町井ら(1957)は, 6~7月に海上養生を行った挿核貝の場合, 真珠形成の早い個体では挿核手術後12日目で真珠核へのカルシウム沈着が確認されたことを報告している。したがって, 低塩分海水養生を14日間行った場合の真珠直径が, 海上養生より小さくなった原因として, 長期間の低塩分海水への浸漬による真珠核へのカルシウム沈着の遅れが考えられた。

以上のことから, 低塩分海水養生期間は8日間とし, 挿核手術には閉殻力2.0~4.9 kgfの母貝のみを用いることにより, 現行の海上養生とほぼ同等の巻きをもつ無キズ珠の出現率が顕著に向上することが明らかになった。また, 挿入する真珠核が大きいほど, 低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果は大きくなることが判明した。

7-2 低塩分海水養生によるキズ・シミ形成抑制機構の解明

キズ・シミ珠の断面観察において, キズやシミのある部分には真珠核の表面に黒褐色になった血球, 生殖細胞, 種々の組織から脱落した細胞および細菌が挟みこまれていたことが報告されている(青木, 1966; Ogimura et al., 2012)。また, 突起のある真珠の観察において, すべての突起の内側には多くの死んだ血球が挟まれていることが確認されている(青木, 1966; Norton et al., 2000)。さらに突起は, 挿核手術用のメスで切開した際に生じた傷口に沿って, 多く形成されていたことも観察されている(青木, 1966)。このように, キズ・シミ形成は血球や生殖細胞等の挟み込みとそれらの死亡による黒褐色化を伴うことが明らかになっている(青木, 1966; Ogimura et al., 2012)。また, キズ・シミの多くは真珠核の表面に形成されていることが判明し

ている(青木, 1966; Norton et al., 2000)。

本研究では、養生後 60 日間と 140 日間以上の海上飼育のどちらの場合においても低塩分海水養生の無キズ珠率が海上養生よりも高かった(Figs.4, 6, 10, 11)。長く海上飼育を行ってもキズ・シミ珠が顕著に増加しなかったことから、海上飼育中にキズ・シミはほとんど形成されないことが明らかとなった。

キズ・シミの形成は真珠袋と真珠核の間に血球, 生殖細胞, 種々の組織から脱落した細胞等の有機物が挟み込まれることにより生じる(青木, 1966; Norton et al., 2000; Ogimura et al., 2012)。本研究による組織学的観察の結果, 真珠袋の完成はどの水温においても海上養生が最も速く, 次いで通常海水養生となり, 低塩分海水養生が最も遅いことが明らかになった(Fig.29, Table 28)。また, 水温が高い時ほど, いずれの養生方法においても真珠袋の形成は速くなった(Fig.29, Table 28)。海上養生を行った場合の真珠袋完成に要する日数と水温の関係は, Kawakami(1953), 青木(1956), 町井ら(1957)の報告と同様の傾向を示した。

アコヤガイにおける血球の創傷治癒は, 挿核手術後, 一週間以内に創傷部に血球が集積することから始まる(町井, 1957)。また, アコヤガイの外套膜を切除した 1 時間後には傷周辺に血球の集積が起こり, 6 時間後には血球と結合組織が傷面を覆うとする報告もある(Acosta-Salmón et al., 2006)。淡水産真珠の養殖に用いられるイケチョウガイではピースの移植手術から数時間後には手術による傷の周辺に血球が集まり, 5 日後には血球層を形成して傷の表面を覆うことにより, ピースは完全に包み込まれる(和田, 1989)。

本研究において, 仕立ての有無に拘わらずアコヤガイの血球数は, 塩分 25 psu 海水に 8 日間収容しても大きく変化しなかった(Figs.32, 33)。船越(2000)も, 仕立てをしていないアコヤガイを塩分 32.18 psu と塩分 23.50 psu の海水に 24 時間収容した場合の血球数は差がな

かったとしている。また、本研究では、アコヤガイの血球の貪食率も、塩分 25 psu 海水に 8 日間収容しても大きく変化しなかった (Figs.30, 31)。これらの結果から、アコヤガイの血球の貪食能力は、塩分濃度が 25 psu まで低下しても大きく変化しないことが明らかとなった。したがって、低塩分海水養生を行った場合においても、通常海水養生や海水養生と同様に、血球は創傷部に素早く集積し傷口を塞ぐとともに、挿核手術時の混入物や組織残渣を貪食することが示された。

低塩分海水養生は、真珠袋形成速度を海上養生や通常海水養生よりも遅くするが、血球による貪食や創傷治癒には影響しないことが判明した。したがって、低塩分海水養生による真珠袋形成の遅延が、キズ・シミ形成の抑制に関与している可能性が高く、その理由は挿核手術の一手法である「後付け法」(山口, 1959)で説明できる。

アコヤガイの真珠養殖における挿核法には「同時付け法」と「後付け法」の二通りがある(山口, 1959)。「同時付け法」とはピースを挿入する直前あるいは直後に真珠核を挿入し、ピースと接着させる方法で、現在一般的に行われている。「後付け法」は母貝に真珠核のみを挿入してから、4~10 日後に、新たに真珠核周辺の軟体部を切開してピースを挿入し、真珠核に接着させる方法である。同時付け法は母貝に対し 1 回手術を行うのに対し、後付け法は母貝 1 個体に対し 2 回手術を行う。そのため、手間のかかる後付け法は現在行われていない。しかしながら、後付け法は同時付け法よりも、無キズ珠率が高くなることが知られている(山口, 1959)。真珠核のみを挿入した場合、挿入から 7~15 日後には、真珠核周囲を血球が完全に覆う(町井, 1961; 山口, 1961; 山口, 1964)。この時期にピースを挿入すると、ピースの外面上皮細胞が真珠袋を形成する際に血球や生殖細胞等を真珠袋内に挟み込みにくく、キズ・シミ珠になる可能性は低くなることが知られている(青木, 1961; 山口, 1961; 山口, 1964)。すな

わち、後付け法とは真珠核のみを挿入し、真珠核周囲を血球が完全に覆い、真珠核周辺組織を安定させた後、ピースを挿入することによりキズ・シミの形成を抑制する挿核技術と言える。したがって、低塩分海水養生とは「同時付け法」による挿核手術の効率の良さと「後付け法」による血球等の挟み込みにくさの両方の利点を併せ持つ技術であると言える。つまり、低塩分海水養生は、「同時付け法」で行うものの、真珠袋形成を現行の海上養生よりも遅らせることにより、真珠核周辺の組織を安定させた後に真珠袋を完成させることでキズ・シミ形成を抑制させる技術である。ただし、低塩分海水養生による真珠袋形成の遅延が生じる原因は現在のところ不明である。低塩分海水への浸漬は、アコヤガイの濾過水量 (Alagarswami et al., 1976; 宮内, 1962)、桿晶体重量 (Wada K.T., 1969)、血清蛋白質量 (船越, 1987) 等の様々な生理学的形質に影響を与える。そのため、低塩分海水への浸漬がピースの外面上皮細胞の伸張あるいは分裂頻度にも何らかの影響を与えている可能性は高い。今後は、低塩分海水養生による真珠袋形成の遅延機構について調査することにより、キズ・シミ形成抑制機構の解明が進むとともに、高品質真珠の生産率を向上させる新たな技術の開発にも繋がると考えられる。

7-3 低塩分海水養生の導入と今後の課題

低塩分海水養生を導入することで、現行法よりも無キズ珠率が顕著に向上することが明らかとなった。低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果は、真珠袋形成の遅延から生じる可能性が高いことが判明した。また、真珠核の直径が大きいほど、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が大きくなる傾向が認められた (Fig.34)。そのため、特に直径 6 mm 以上の大中珠を生産する真珠養殖業者にとって、低塩分海水養生は高品質真珠の生産率を向上させる有効な技術と考えられる。

町井(1958)は、ピースの大きさに差がない場合(ピースの大きさ $1 \sim 2.3 \text{ mm}^2$), 直径 4 mm の真珠核の方が直径 8 mm の真珠核よりも真珠袋形成に要する日数は短いとしている。このことから、ピースの大きさが一定の場合、挿入に用いる真珠核が小さいと、低塩分海水養生を行っても真珠袋形成の遅延効果が得られにくいと推察された。また、町井(1958)は、直径 8 mm の真珠核に対して 1 mm^2 ないしは 9 mm^2 のピースを挿入した場合、 9 mm^2 のピースの方が 1 mm^2 のピースよりも真珠袋形成に要する日数は短いとしている。このことから、挿核手術に用いるピースは小さいほど、真珠袋形成の遅延が期待できる。したがって、低塩分海水養生を導入する際には、現行よりもピースを小さくすれば、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果がさらに高まる可能性がある。また、直径 4 mm 未満の真珠核を複数個挿入した貝を用いて真珠生産を行う場合、ピースの大きさを 2 mm^2 以下にすると低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果が安定して得られる可能性が高い。したがって、直径 6 mm 未満の小厘珠を生産する場合においても、ピースを現行よりも小さくすれば、低塩分海水養生は高品質真珠の生産率を向上させるための有効な技術になると考えられる。

低塩分海水養生を導入する際の課題として、大型循環濾過水槽の購入費用と水槽設置に要するスペースが挙げられる。こうした課題の解決策の一つとして、本研究では低塩分海水養生期間の短縮を検討した。本研究の結果、低塩分海水養生期間は、技術開発当初の14日間(渥美ら, 2011a; Atsumi et al., 2014)から8日間まで短縮しても、同等以上の無キズ珠率向上効果が得られるだけでなく、真珠の巻きも劣らないことが明らかになった(渥美ら, 2014)。このことは、14日間での低塩分海水養生を2回行うのに要する期間(28日間)で、8日間の低塩分海水養生が3回(24日間)行えることを意味している。また、低塩分海水養生期間を8日間にした場合には、14日間

の場合よりも小さな水槽で同数の挿核貝を処理することも可能となる。水槽の小型化は、初期設備投資の軽減にも繋がると考えられる。

本研究の結果、低塩分海水養生は海上養生よりも無キズ珠率を顕著に向上させることが明らかになった。しかしながら、本研究で行った多くの試験において、挿核手術日間の無キズ珠率に有意差が認められた(Tables 12, 13, 21, 24)。このことは、挿核手術前の母貝の生理状態の違いや養生中の環境(水温, 塩分, 餌料環境等)の違いによって生じたと推察される。今後、さらに高品質真珠の生産率を向上させるためには、挿核手術に用いる母貝の生理状態と真珠品質の関係、養生中の環境と真珠品質の関係について調査する必要がある。また、挿核手術前の母貝の生理状態をコントロールする新たな技術の開発も必要である。

要約

本研究では、アコヤガイ真珠養殖における高品質真珠の生産性向上を図るため、キズ・シミ形成を抑制し、無キズ珠率を向上する新しい養生技術を開発することを目的とした。現行の養生は挿核貝を目合いの細かな籠に入れ、流れの穏やかで環境変化の少ない漁場で挿核手術後 1～2 週間行うものである。本研究では、この養生を低塩分海水（塩分 25 psu）入りの循環濾過水槽で行う“低塩分海水養生”という新しい養生技術を開発した。

- 1) 低塩分海水養生は、現行法である海上養生よりも有意に無キズ珠率を向上させることが明らかになった。
- 2) 挿核手術および養生に係わる五つの要因のうち養生方法と母貝の閉殻力が、無キズ珠率に最も大きな影響を与えることが明らかとなった。低塩分海水養生は海上養生よりも無キズ珠率を 5 倍以上向上させることが判明した。また、閉殻力 2.0～4.9 kgf の母貝は、閉殻力 5.0～7.9 kgf の母貝よりも無キズ珠率を 2 倍以上向上させることも判明した。
- 3) 海上養生と同等の真珠の巻きを有し、かつ無キズ珠率が最も高くなる低塩分海水養生期間は 8 日間であることが明らかになった。低塩分海水養生期間は、これまで 14 日間とされてきたが、6 日間の期間短縮ができることが判明した。
- 4) 真珠核を 2 個挿入した貝では、低塩分海水養生により無キズ珠率が向上することが明らかになった。一方、4 個挿核した貝では、無キズ珠率向上効果が得られにくいことが示された。2 個挿核貝と 4 個挿核貝は低塩分海水養生においても、巻きに遜色ないことが明らかになった。
- 5) 真珠袋の完成は海上養生が最も速く、次いで通常海水養生となり、低塩分海水養生が最も遅いことが判明した。また、塩分濃度が

25 psu まで低下しても血球の異物貪食率および血球数は大きく変化しないことが明らかになった。したがって、低塩分海水養生によるキズ・シミ形成の抑制は、真珠袋形成の遅延から生じることが推察された。

6) 閉殻力 2.0～4.9 kgf の母貝を挿核手術に用い、術後に 8 日間の低塩分海水養生を行うことにより、現行の海上養生とくらべて遜色ない巻きをもつ無キズ珠の出現率が有意に向上することが明らかになった。また、挿入する真珠核が大きいほど、低塩分海水養生による無キズ珠率向上効果は大きくなることが判明した。

謝辞

本研究をとりまとめるにあたり、懇切なご指導とご校閲を賜った三重大学大学院生物資源学研究科の古丸明教授に深く感謝申し上げます。また、同じくご助言とご校閲を賜った同大学大学院の神原淳教授、吉松隆夫教授ならびに河村功一教授に感謝申し上げます。

独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所の石川卓博士、井上誠章博士ならびに地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所の石橋亮博士には、研究の計画と実施、結果の解析、論文の作成等すべての面で甚大なご指導とご協力を頂いた。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究は、三重県水産研究所職員の方々の長年にわたる温かい励ましとご協力によるところが大きかった。林政博氏、中島博司元所長、紀平正人前所長、遠藤晃平所長ならびに山田浩且研究管理監には、本研究の機会を与えて頂いた。青木秀夫博士、田中真二博士、神谷直明氏、阿部久代氏には、研究の計画と実施、結果の解析、論文の作成等全ての面で甚大なご指導とご協力を頂いた。大田幹司主任技術員、谷水享子氏には、飼育試験の実施にあたり多大なご協力を頂いた。また、松田浩一博士、羽生和弘博士には、研究の計画、結果の解析、論文の作成にあたり多くの有益なご助言を頂いた。これらの方々に厚く御礼申し上げます。

三重県内の真珠養殖業者の方々には、試験貝への挿核手術や試験貝の飼育を行って頂いた。また、各真珠養殖漁業協同組合職員の方々には、本研究を実施するにあたり格別のご配慮頂いた。これらの方々に対しても厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Acosta-Salmón H., Southgate P. C. 2006. Wound healing after excision of mantle tissue from the Akoya pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **143**: 264-268.
- 赤松 蔚 2003. カルチャード・パール. 真珠新聞社, 東京.
- Alagarwami K., Victor A. C. C. 1976. Salinity tolerance and rate of filtration of the pearl oyster *Pinctada Fucata*. *Journal of the Marine Biological Association of India* **18**, 149-158.
- 青木秀夫, 林 政博, 岩城 豊, 山本満彦, 伊藤孝男, 竹内章浩, 出口明彦, 小賀史哉, 西川一生, 野村清孝, 大山清孝, 山下雅彰, 岩城秀夫 2007. 日本産アコヤガイと交雑アコヤガイの養殖特性および真珠品質の比較. 全真連技術研究会報 **21**: 1-5.
- 青木秀夫, 林 政博, 北村 淳, 南 雄吉, 北村栄基, 山際伸孝, 喜田勝明, 濱口 健, 喜田幸一, 山際 定, 伊藤俊弥, 山際正孝 2008. 日本産アコヤガイと交雑アコヤガイの養殖特性および真珠品質の比較-II. 全真連技術研究会報 **22**:9-12.
- 青木秀夫, 渥美貴史, 阿部久代, 神谷直明, 石川 卓, 古丸 明 2010a. 挿核時のアコヤガイの閉殻力と養殖特性および真珠品質との関係. 全真連技術研究会報 **24**:1-5.
- Aoki H., Ishikawa T., Fujiwara T., Atsumi T., Nishikawa H., Okamoto C., Komaru A 2010b. Utility of shell-closing strength as the indicator of good health in breeding and culture management of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Aquaculture* **308**: 115-118.
- 青木 駿 1956. 真珠袋形成に関する研究. 特に秋と初冬に作業を

- 行った場合について. 国立真珠研報 **1**:41-46.
- 青木 駿 1961. 真珠養殖における挿核施術に関する研究 V. 挿入された核の周辺に間隙が生じた際の変化. 国立真珠研報 **6**: 647-656.
- 青木 駿 1966. 異常真珠の出現防止に関する研究. 真珠技術研究会会報 **53**:1-204.
- 渥美貴史, 石川 卓, 井上誠章, 石橋 亮, 青木秀夫, 西川久代, 神谷直明, 古丸 明 2011a. 低塩分海水養生によるキズ・シミの無い真珠の生産率向上効果. 日水誌 **77**:68-74.
- 渥美貴史, 石川 卓, 井上誠章, 石橋 亮, 青木秀夫, 西川久代, 神谷直明, 古丸 明 2011b. 水温一定の水槽を用いた養生によるアコヤガイの脱核低減法. 日水誌 **77**:381-386.
- 渥美貴史, 青木秀夫, 田中真二, 古丸 明 2014. 低塩分海水養生期間と真珠のキズ・シミ, 巻きとの関係. 日水誌 **80**: 761-768.
- Atsumi T., Ishikawa T., Inoue N., Ishibashi R., Aoki H., Abe H., Kamiya N., Komaru A 2014. Post-operative care of implanted pearl oysters *Pinctada fucata* in low salinity seawater improves the quality of pearls. *Aquaculture* **422-423**: 232-238.
- Cochennec-Laureau N., Montagnani C., Saulnier D., Fougereuse A., Levy P., Lo C 2010. A histological examination of grafting success in pearl oyster *Pinctada margaritifera* in French Polynesia. *Aquatic Living Resources* **23**: 131-140.
- Crawley M. J. 2005. *Statistics: An Introduction using R*. John Wiley & Sons. West Sussex.
- 林 政博, 出口明彦, 小賀史哉, 山本隆文, 岩城 豊, 岩城秀夫, 伊藤孝男, 山本満彦, 野村清孝, 西川一生, 竹内章浩 2005.

- 系統間の巻きの差違および左右の外殻膜による巻きの差違．全真連技術研究会報 **19**:1-4.
- 林 政博 2008a. 仕立て・養生期間中の飼育海水比重が歩留まりと真珠品質に与える影響-I. 三重水研研報 **16**:1-5.
- 林 政博 2008b. 仕立て・養生期間中の飼育海水比重が歩留まりと真珠品質に与える影響 -II. 全真連技術研究会報 **22**:1-8.
- 船越将二 1974. アコヤガイの血球について. 国立真珠研報 **18**: 2140-2147.
- 船越将二 1987. アコヤガイ血清蛋白質量の年齢差および血清蛋白質量におよぼす低比重海水の影響. 全真連技術研究会報 **3**:49-51.
- 船越将二, 和田浩爾, 山際 優 1991. アコヤガイの年齢ならびに仕立ての程度と皮膚(体表層組織)の強度の関係. 全真連技術研究会報 **7**:15-23.
- 船越将二 2000. 二枚貝類における血球の分類,形態および機能に関する研究. 養殖研報 **29**:1-103.
- Inoue N., Ishibashi R., Ishikawa T., Atsumi T., Aoki H., Komaru A 2011. Can the quality of pearls from the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*) be explained by the gene expression patterns of the major shell matrix proteins in the pearl sac? *Marine Biotechnology* **13**: 48-55.
- 岩永俊介, 平井正史, 細川秀毅 2008. 1才アコヤガイを用いた施術具の生残率および真珠品質の向上. 水産増殖 **56**:73-79.
- Kawakami I. K 1953. Studies on pearl-sac formation II. The effect of water temperature and freshness of transplant on pearl-sac formation. *Annotationes zoologicae Japonenses* **26**: 217-223.
- 川本信之, 中西捨吉 1957. アコヤガイ血球の顕微鏡的観察. 国立

真珠研報 3:201-205.

- 小竹子之助, 河村光保 1957. アコヤガイ養殖真珠に関する研究 -I. 異なる型の外套膜ピースで養殖された真珠の性状について. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries 23: 363-365.
- Kripa V., Mohamed K. S., Appukuttan K. K., Velayudhan T. S. 2007. Production of Akoya pearls from the southwest coast of India. Aquaculture 262: 347-354.
- Kuchel R. P., Raftos D. A., Nair S 2010. Immunosuppressive effects of environmental stressors on immunological function in *Pinctada imbricate*. Fish & Shellfish Immunology 29: 930-936.
- 黒川忠英, 鈴木 徹, 岡内正典, 三輪 理, 永井清仁, 中村弘二, 本城凡夫, 中島員洋, 芦田勝朗, 船越将二 1999. 外套膜片移植及び同居飼育によるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の閉殻筋の赤変化を伴う疾病の人為的感染. 日水誌 65: 241-251.
- 町井 昭, 中原 皓 1957. 真珠袋の組織学的研究 II 季節による真珠袋形成速度の差異. 国立真珠研報 2:107-112.
- 町井 昭 1958. 真珠袋の組織学的研究 VI 核及びピースの大きさによる真珠袋形成速度の差異. 国立真珠研報 4:284-287.
- 町井 昭 1961. あとづけ”に関する研究 III 真珠袋の形成. 国立真珠研報 6:642-646.
- Matlins A. L. 1996. The Pearl Book: The Definitive Buying Guide: How to Select, Buy, Care for & Enjoy Pearls. GemStone Press, Woodstock.
- 宮内徹夫 1962. アコヤガイ濾過水量 II 濾過水量におよぼす水温と比重の影響. 水産増殖 10:7-13.

- 棟朝淳州 1994. 真珠の常識 2000. 柏書店松原, 東京.
- 永井清仁 2004. 低水温漁場を用いたアコヤガイの病害被害軽減方策. 日水誌 **70**:674-677.
- Nava M., Arizmendi E., Farell S., McLaurin D. 2000. Evaluation of success in the seeding of round nuclei in *Pteria sterna* (Gould 1851), a new species in pearl culture. SPC Pearl Oyster Inf. **14**: 12-16.
- 農林水産省統計情報部 1995. 平成 5 年漁業・養殖業生産統計年報. 東京.
- 農林水産省大臣官房統計部 2013. 平成 24 年漁業・養殖業生産統計年報. 東京.
- Norton J. H., Lucas J. S., Turner I., Mayer R. J., Newnham R. 2000. Approaches to improve cultured pearl formation in *Pinctada margaritifera* through use of relaxation, antiseptic application and incision closure during bead insertion. Aquaculture **184**: 1-17.
- Ogimura T., Futami K., Katagiri T., Maita M., Gonçalves A. T., Endo M. 2012. Deformation and blemishing of pearls caused by bacteria. Fish. Sci. **78**: 1255-1262.
- 岡本ちひろ, 古丸 明, 林 政博, 磯和 潔 2006a. アコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の閉殻力とへい死率および各部重量との関連. 水産増殖 **54**:293-299.
- 岡本ちひろ, 古丸 明, 林 政博, 青木秀夫, 磯和 潔 2006b. 家系間におけるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の閉殻力の差違. 水産増殖 **54**:525-529.
- 奥村宏征, 林 政博, 竹内章浩, 伊藤孝男, 小賀史哉, 出口明彦 2003. 挿核数の違いによる真珠の生産性比較. 全真連技術研究会報 **17**:1-7.

- Ruiz-Rubio H., Acosta-Salmón H., Olivera A., Southgate P. C., Rangel-Dávalos C. 2006. The influence of culture method and culture period on quality of half-pearls ('mabé') from the winged pearl oyster *Pteria sterna*, Gould, 1851. *Aquaculture* **254**: 269-274.
- Southgate P. C., Lucas J. S. 2008. *The Pearl Oyster*. Elsevier. Oxford.
- 高橋計介, 室賀清邦 2008. 総説:二枚貝の細胞性生体防御機構. *魚病研究* **43**:1-17.
- 武内恭一 1994. 真珠の加工. 真珠新聞社. 東京.
- 植本東彦 1961. アコヤガイの挿核手術に関する生理学的研究 I-III. *国立真珠研報* **6**:619-635.
- 植本東彦 1962. アコヤガイの挿核手術に関する生理学的研究 IV 術後の養生について. *国立真珠研報* **8**:896-903.
- 植本東彦 1967a. 仕立て作業および挿核手術がアコヤガイの生理状態に及ぼす影響. *日水誌* **33**:705-712.
- 植本東彦 1967b. 真珠養殖技術における仕立て作業の意義とその効果に関する研究. *真珠技術研究会会報* **59**:1-99.
- Wada K. T. 1969. Studies on the crystalline style of Japanese pearl oyster-I. Effect of diluted sea water on the crystalline. *Fish. Sci.* **35**: 133-140.
- 和田浩爾 1962. 真珠形成機構の生鋳物学的研究. *国立真珠研報* **8**:948-1059.
- 和田浩爾 1989. 淡水産二枚貝の同種外套膜移植および異種外套膜移植. *貝雑* **48**:174-190.
- 和田浩爾 1999. 真珠の科学. 真珠新聞社. 東京.
- 和田浩爾, 山下吉宏, 植村作治郎, 蝶野一徳, 堤美香 2002. 日本種アコヤガイと中国種アコヤガイ×日本種アコヤガイの第 1

代交雑貝の生態生理に関する比較．全真連技術研究会報
16:1-18.

山口一登 1959. 「後付け法」に関する研究 I 「後付け」及び「同時
付け」による真珠品質の比較．国立真珠研報 **5:499-502.**

山口一登 1961. “あとづけ”に関する研究 II 卵抜きの程度と真珠
袋形成との関係．国立真珠研報 **6:636-641.**

山口一登 1964. “あとづけ”に関する研究 IV そう核からピースそう
入までの期間について．国立真珠研報 **9:1128-1134.**

特許

林 政博，青木秀夫 2010. 挿核施術した真珠貝の養生方法及び
その養生装置．特許第 45994

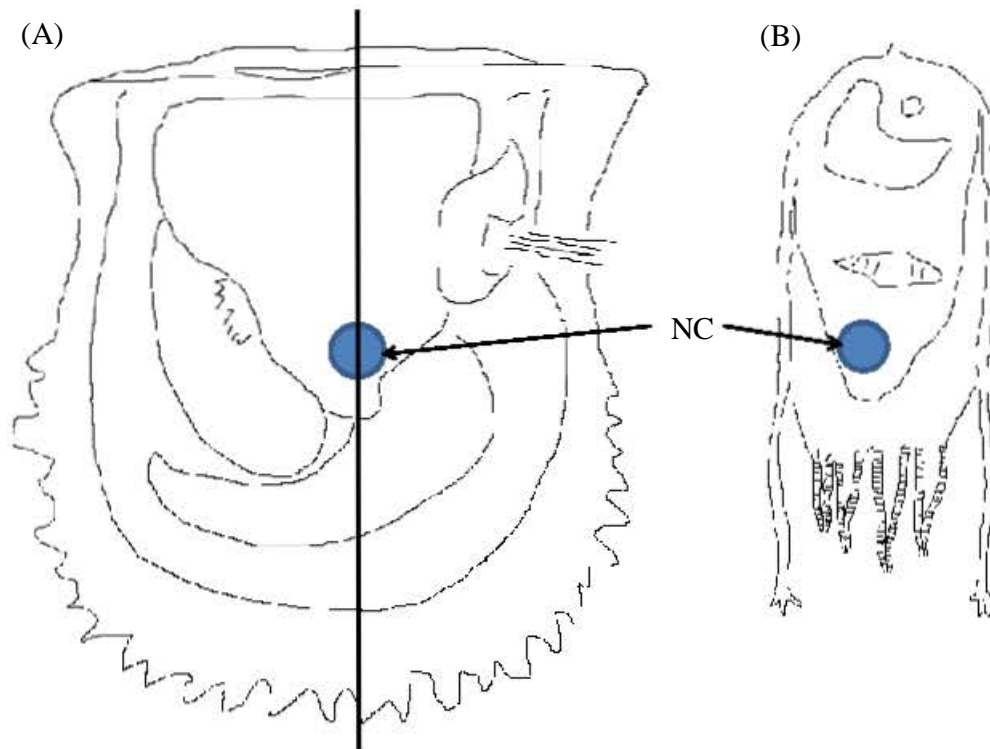


Fig. 1 Diagram of the horizontal and vertical views of the inner parts of the pearl oyster, *Pinctada fucata*, with one set of the mantle and nucleus implanted. (A) Horizontal view; line indicates the cross-sectional plane. (B) Vertical view; NC, nucleus.

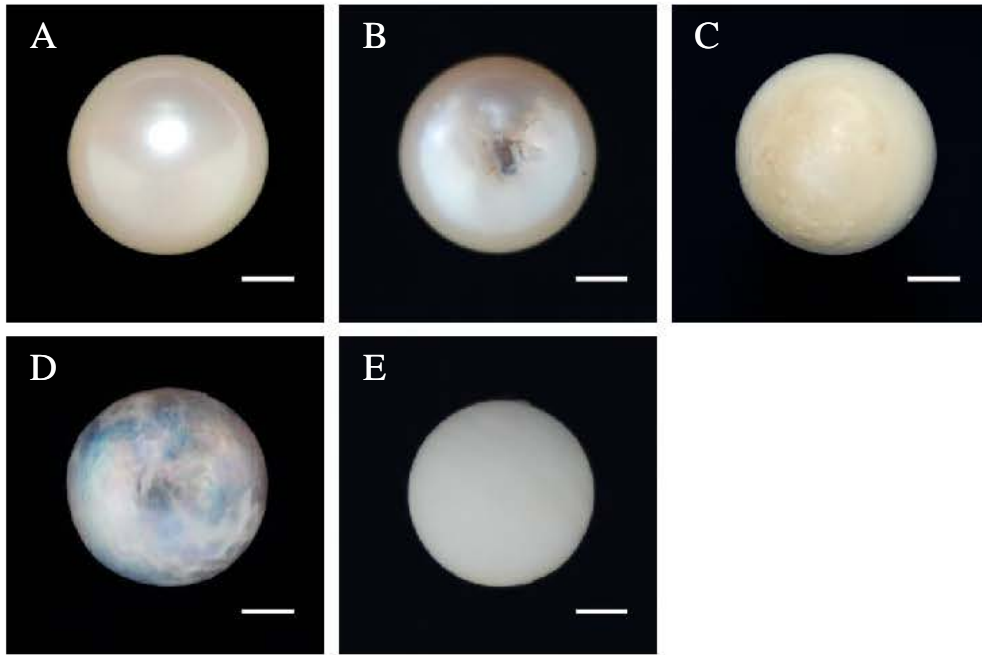


Fig. 2 Classification of pearls obtained in this study. A: high quality pearl, B-D: low quality pearls. (A) Nacreous pearl with no blemish or one blemish smaller than the proportion of the pearl surface 0.5 % or below. (B) Nacreous pearl with one blemish larger than 0.5 % of the pearl surface or plural blemishes. (C) Prismatic pearl. (D) Organic pearl. (E) Nucleus. Scale bars indicate 2 mm.

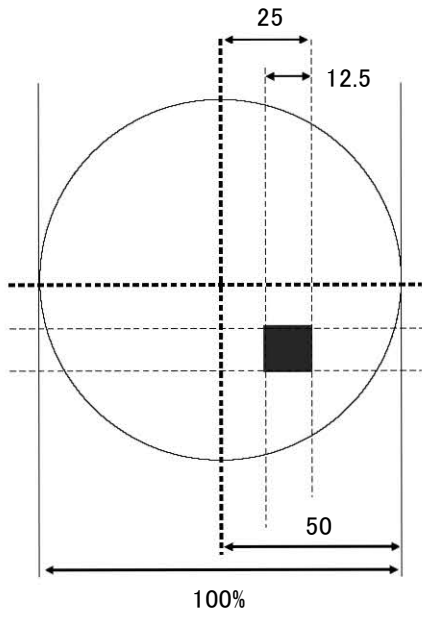


Fig. 3 Criteria for the definition of high quality pearls. Only round, nacreous pearls with no blemishes or only one blemish that was less than 0.5% of the pearl surface (Solid square) were defined as high quality pearls.

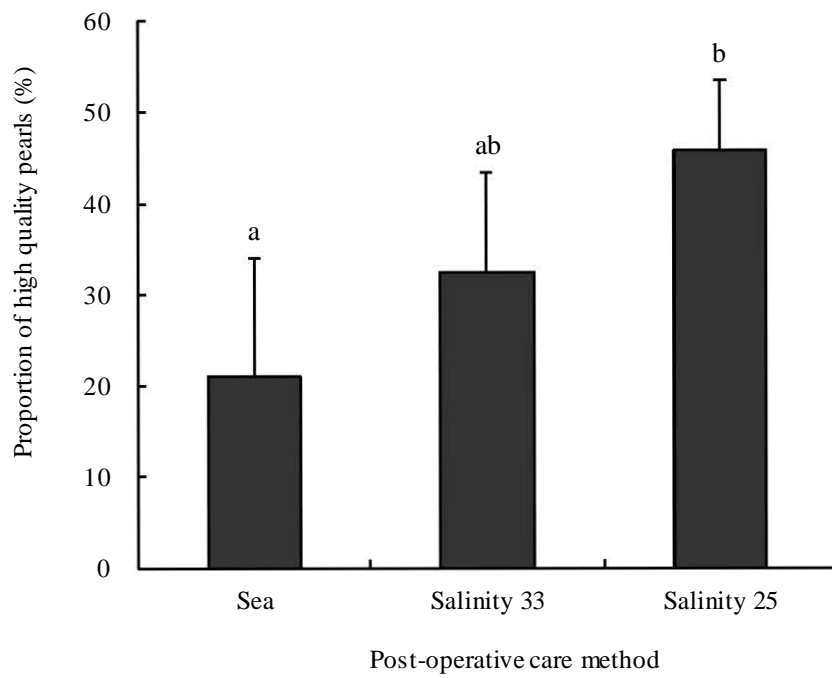


Fig. 4 Proportion of high quality pearls produced by oysters reared for 14 days under three different post-operative care methods after nucleus implantation. Salinity25 represents oysters held in low salinity seawater (25 psu) in a closed recirculating tank. Salinity33 represents oysters held in ambient seawater (33 psu) in a closed recirculating tank. Sea represents oysters suspended from a raft in the sea. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after receiving post-operative care. Pearls were harvested after 60 d of culture in Ago Bay. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$). Values sharing common letters are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA, Tukey's HSD).

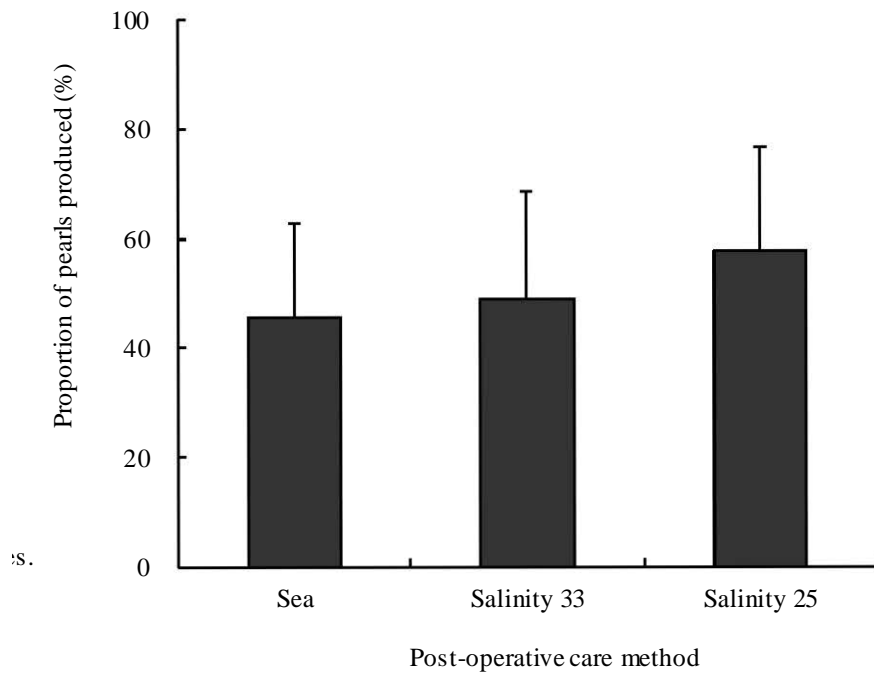


Fig. 5 Proportion of pearls produced by oysters reared for 14 days under three different post-operative care methods after nucleus implantation. Salinity25 represents oysters held in low salinity seawater (25 psu) in a closed recirculating tank. Salinity33 represents oysters held in ambient seawater (33 psu) in a closed recirculating tank. Sea represents oysters suspended from a raft in the sea. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after receiving post-operative care. Pearls were harvested after 60 d of culture in Ago Bay. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

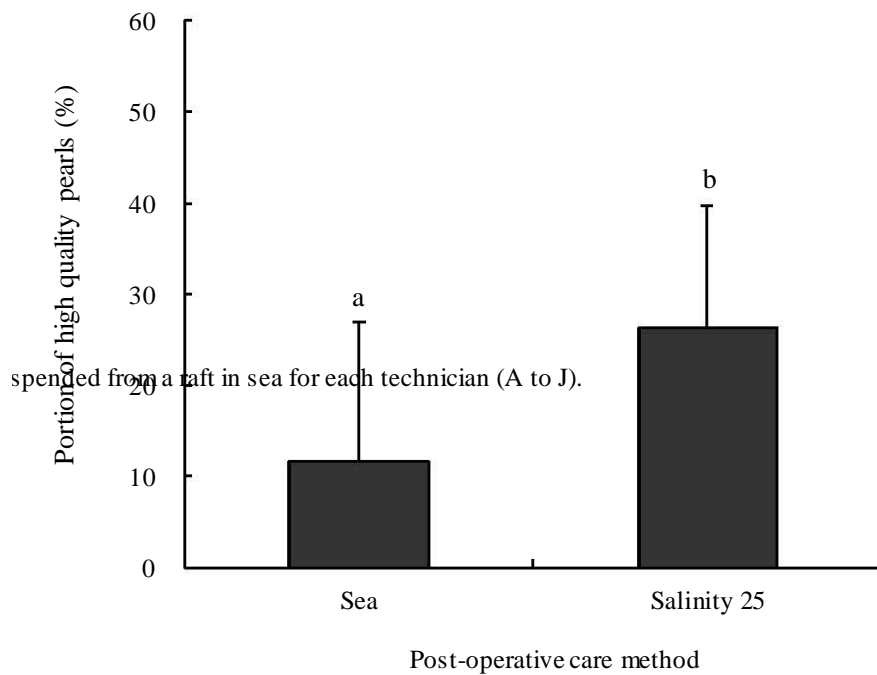


Fig. 6 Proportion of high quality pearls produced by oysters reared for 14 days under two different post-operative care methods after nucleus implantation. Salinity25 represents oysters held in low salinity seawater (25 psu) in a closed recirculating tank. Sea represents oysters suspended from a raft in the sea. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay, Gokasho Bay and Aso-ura after receiving post-operative care. Pearls were harvested from December in 2008 to January in 2009. Implantation of nucleus was performed by ten different technicians ($n = 10$). Values are means \pm standard deviations ($n = 10$). Values sharing different letters are significantly different at $p < 0.01$ (two-way ANOVA, Tukey's HSD).

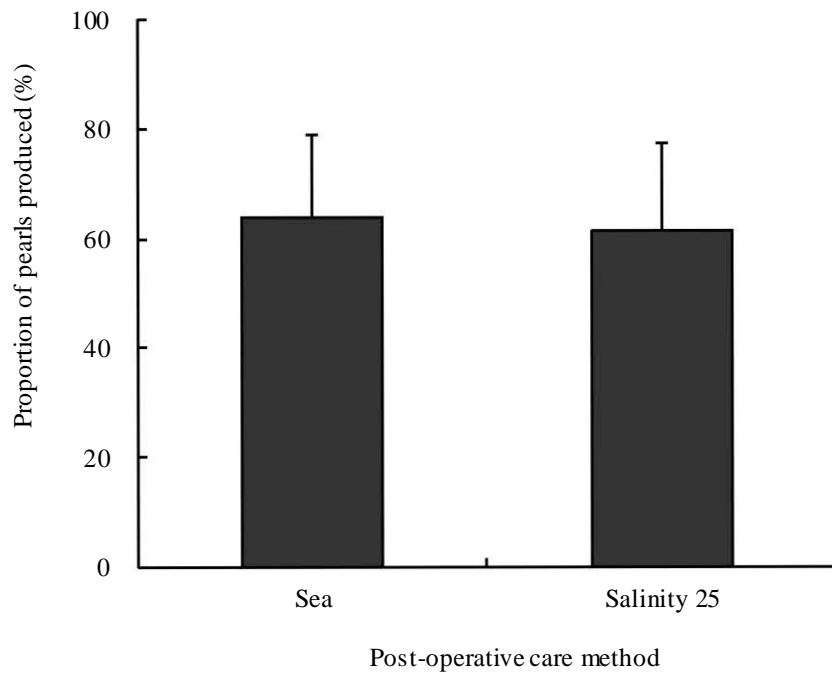


Fig. 7 Proportion of pearls produced by oysters reared for 14 days under two different post-operative care methods after nucleus implantation. Salinity25 represents oysters held in low salinity seawater (25 psu) in a closed recirculating tank. Sea represents oysters suspended from a raft in the sea. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay, Gokasho Bay and Asoura after receiving post-operative care. Pearls were harvested from December in 2008 to January in 2009. Implantation of nucleus was performed by ten different technicians ($n = 10$). Values are means \pm standard deviations ($n = 10$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

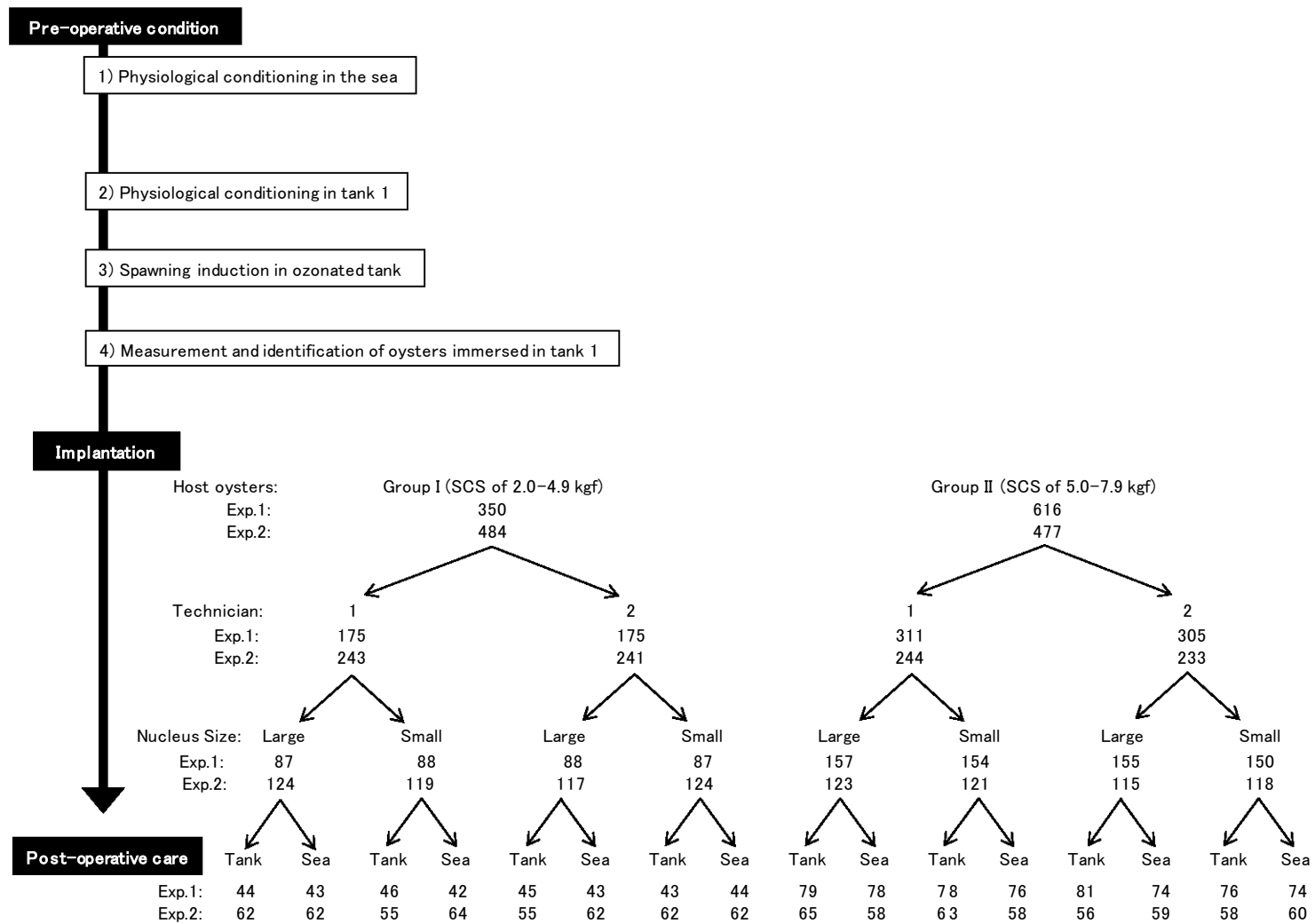


Fig. 8 Outline of experimental procedure from the pre-operative conditioning to the post-operative care in this study. Numbers of oysters implanted were indicated how all groups were split up in each experiment.

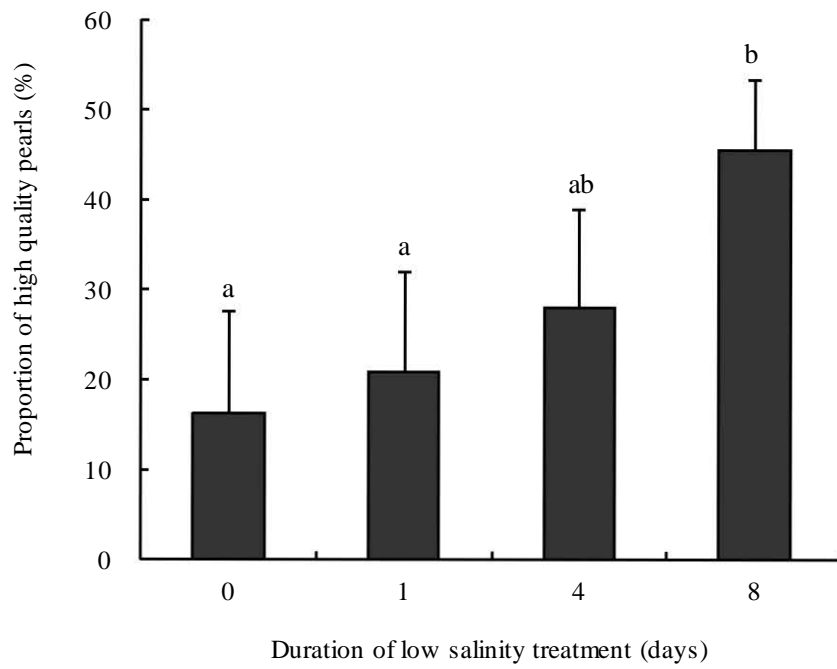


Fig. 9 Proportion of high quality pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 1, 4, or 8 d after nucleus implantation in 2011. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after the treatment. Pearls were harvested after 60 d of culture in Ago Bay. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$). Values sharing common letters are not significantly different at $p < 0.01$ (two-way ANOVA, Tukey's HSD).

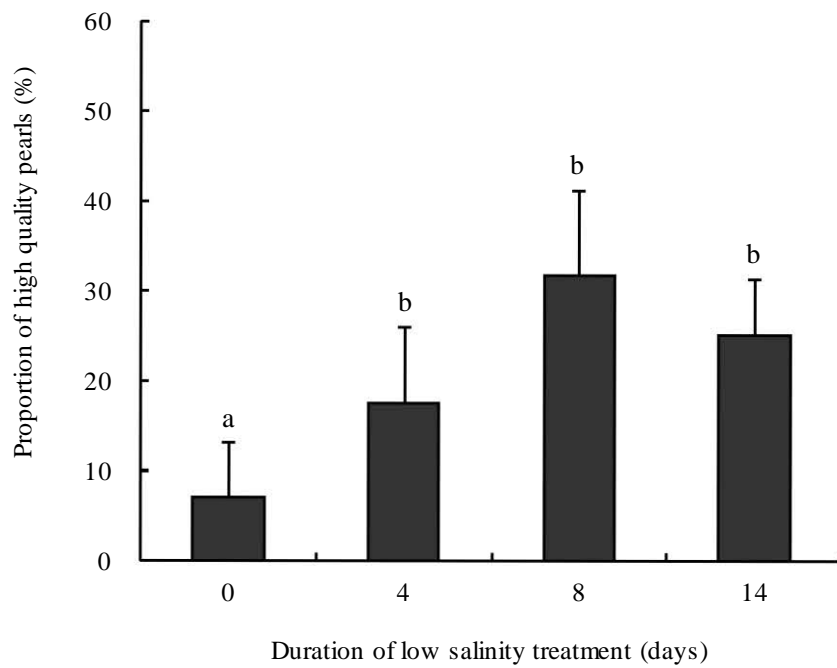


Fig. 10 Proportion of high quality pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 4, 8, or 14 d after nucleus implantation in 2012. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after the treatment. Pearls were harvested after 60 d of culture in Ago Bay. Values are means \pm standard deviations ($n = 4$). Values sharing common letters are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA, Tukey's HSD).

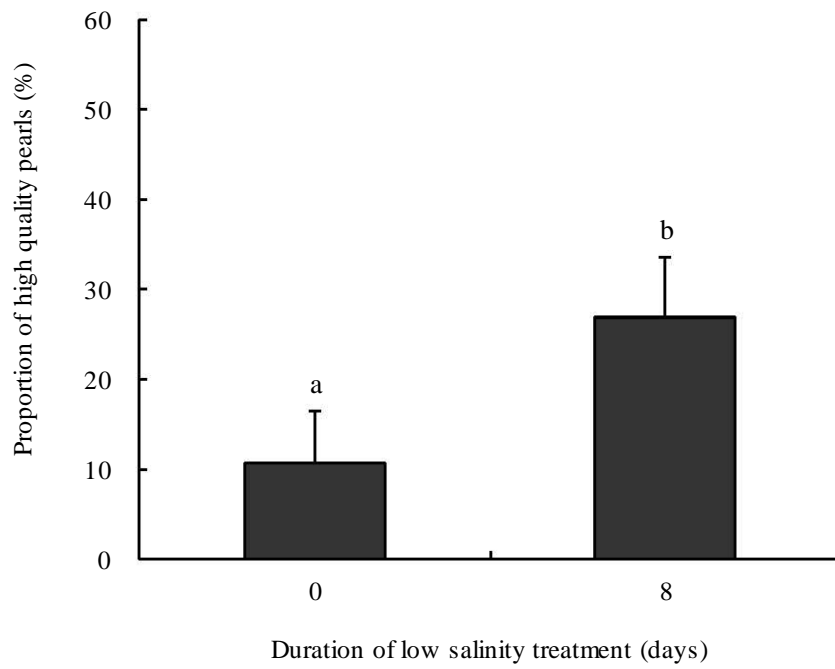


Fig. 11 Proportion of high quality pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control) or 8 d after nucleus implantation in 2012. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after the treatment. Pearls were harvested in December 2012. Values are means \pm standard deviations ($n = 4$). Values sharing common letters are not significantly different at $p < 0.01$ (two-way ANOVA, Tukey's HSD).

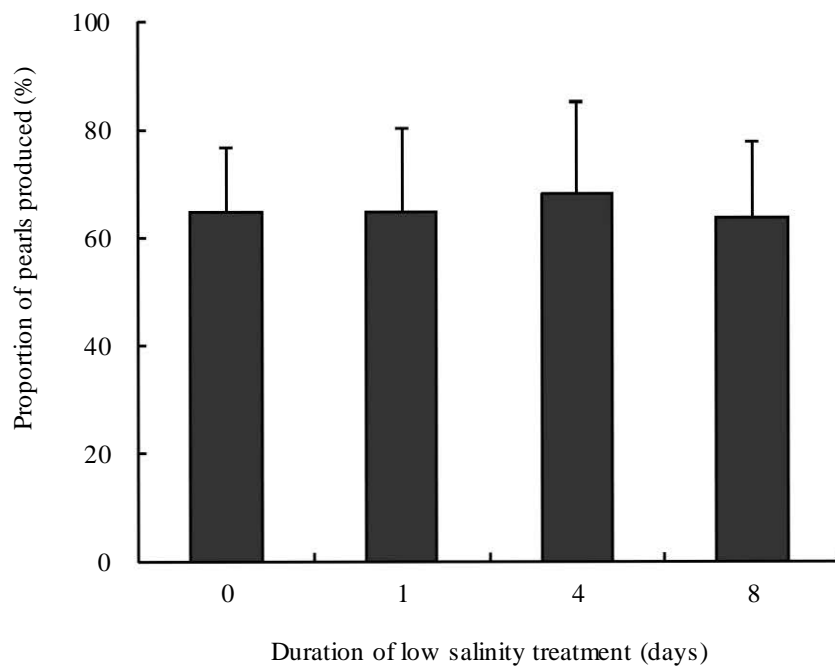


Fig. 12 Proportion of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 1, 4, or 8 d after nucleus implantation in 2011. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after the treatment. Pearls were harvested after 60 d of culture in Ago Bay. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

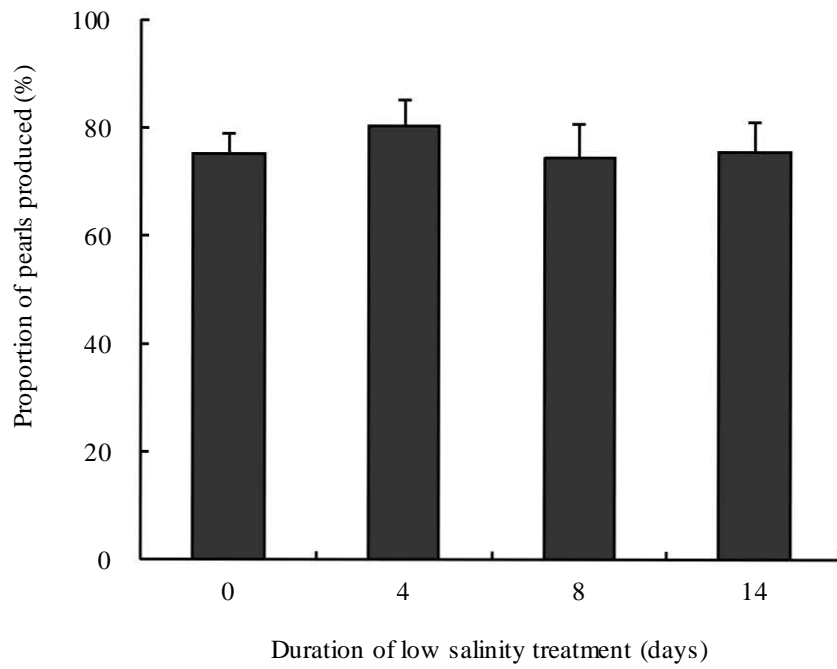


Fig. 13 Proportion of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 4, 8, or 14 d after nucleus implantation in 2012. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after the treatment. Pearls were harvested after 60 d of culture in Ago Bay. Values are means \pm standard deviations ($n = 4$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

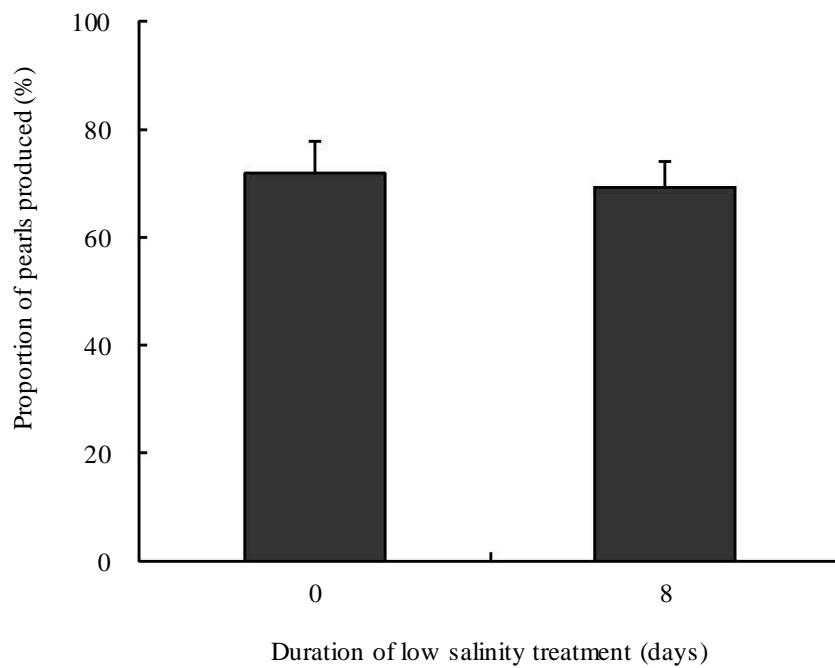


Fig. 14 Proportion of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control) or 8 d after nucleus implantation in 2012. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after the treatment. Pearls were harvested in December 2012. Values are means \pm standard deviations ($n = 4$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

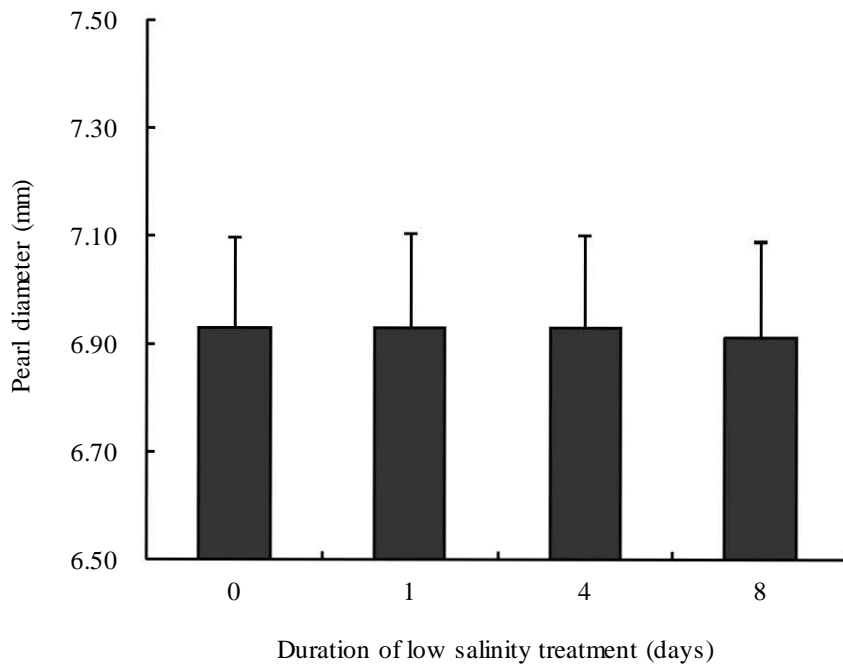


Fig. 15 Mean (\pm standard deviation [SD]) diameter of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 1, 4, or 8 d after nucleus implantation in 2011. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after the treatment. Pearls were harvested after 60 d of culture in Ago Bay. Values are means \pm SDs ($n = 142 - 162$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

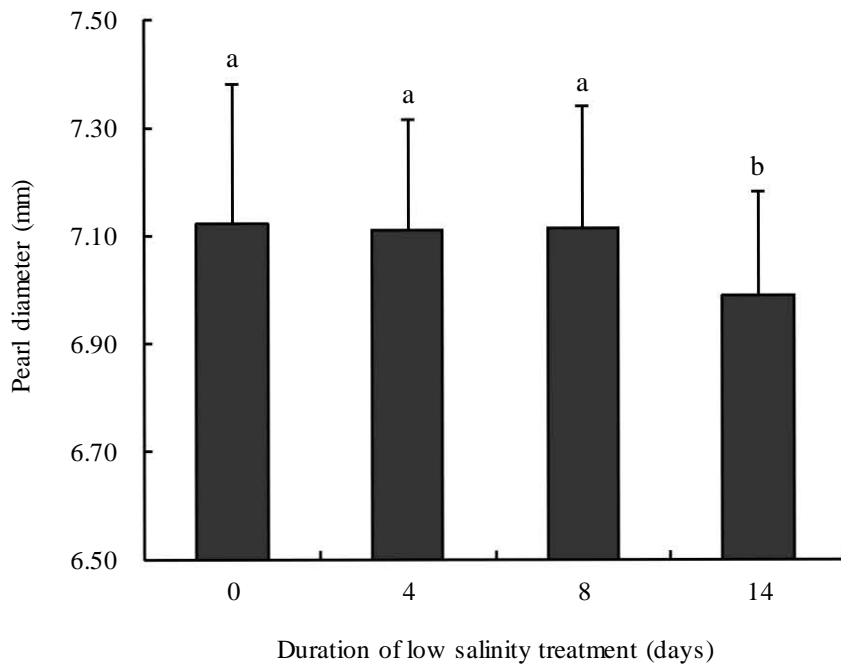


Fig. 16 Mean (\pm standard deviation [SD]) diameter of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 4, 8, or 14 d after nucleus implantation in 2012. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after the treatment. Pearls were harvested after 60 d of culture in Ago Bay. Values are means \pm SDs ($n = 96 - 115$). Values sharing common letters are not significantly different at $p < 0.01$ (two-way ANOVA, Tukey's HSD).

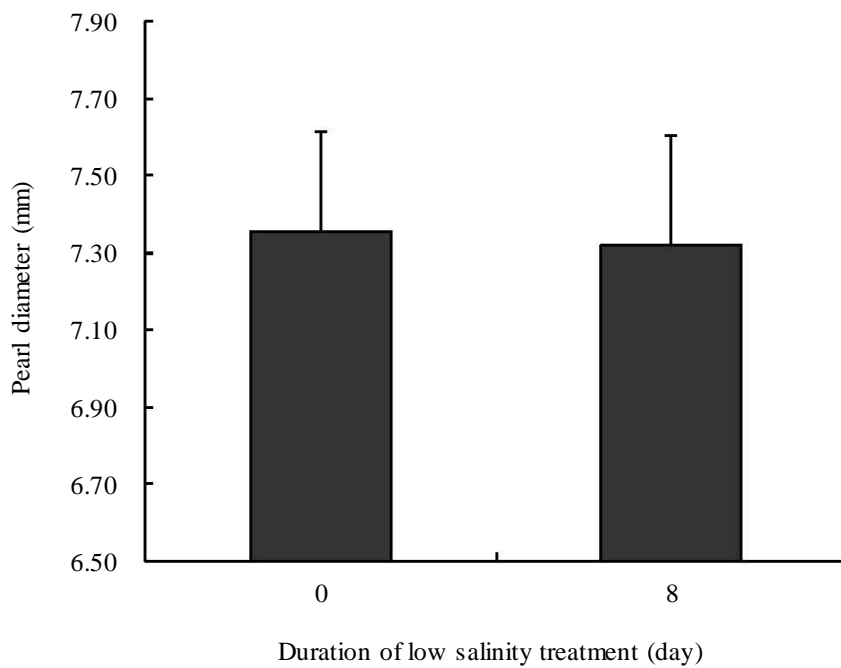


Fig. 17 Mean (\pm standard deviation [SD]) diameter of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control) or 8 d after nucleus implantation in 2012. The oysters were suspended from a raft in Ago Bay after the treatment. Pearls were harvested in December 2012. Values are means \pm SDs ($n = 101, 111$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

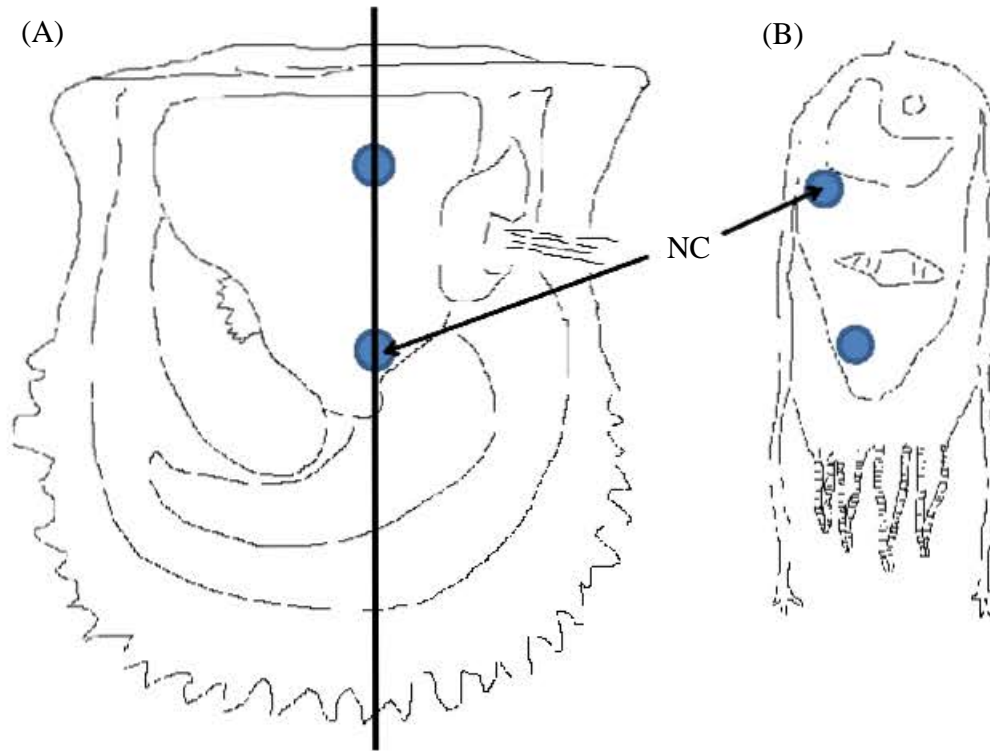


Fig. 18 Diagram of the horizontal and vertical views of the inner parts of the pearl oyster, *Pinctada fucata*, with two sets of the mantle and nucleus implanted. (A) Horizontal view; line indicates the cross-sectional plane. (B) Vertical view; NC, nucleus.

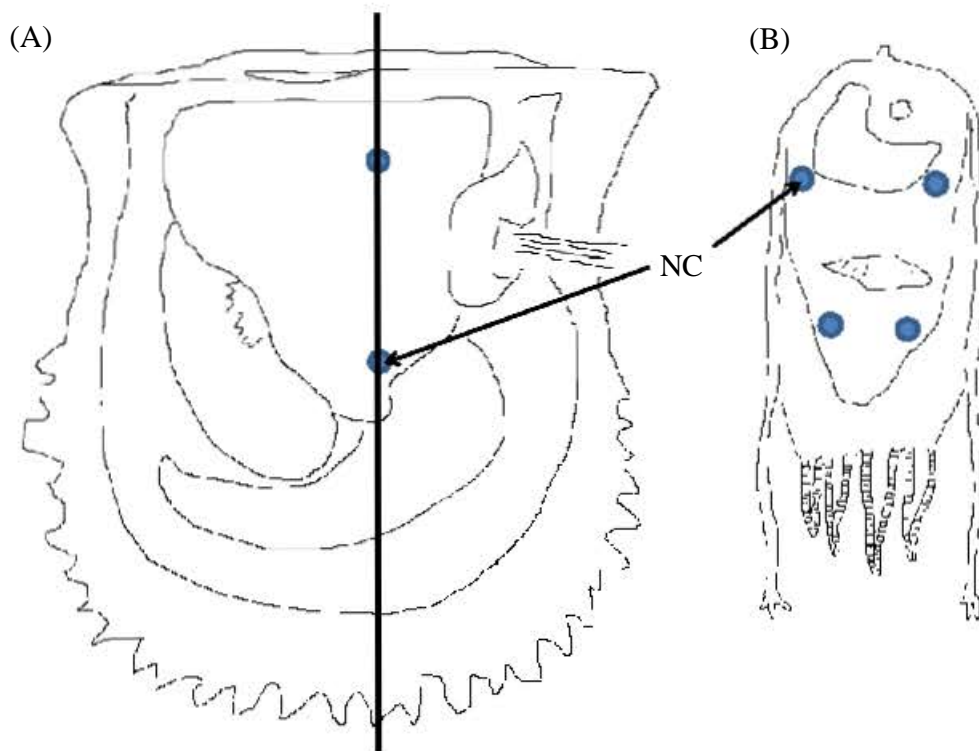


Fig. 19 Diagram of the horizontal and vertical views of the inner parts of the pearl oyster, *Pinctada fucata*, with four sets of the mantle and nucleus implanted. (A) Horizontal view; line indicates the cross-sectional plane. (B) Vertical view; NC, nucleus.

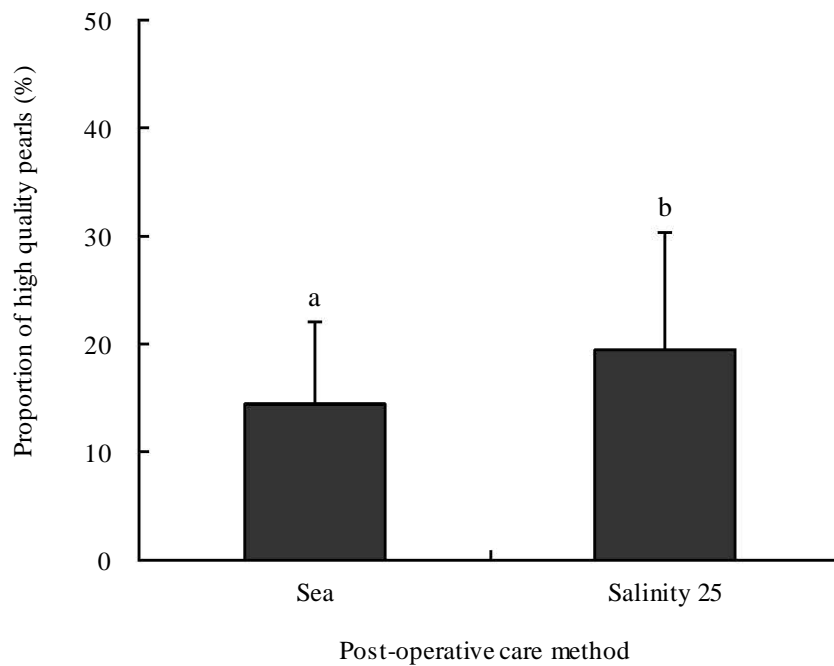


Fig. 20 Proportion of high quality pearls produced by oysters held in low salinity seawater (25 psu) in a tank or the sea after nucleus implantation in 2013. A small piece of mantle tissue and a nucleus (4.27 - 4.51 mm diameter) were implanted. Two pairs were implanted into the gonads of oysters following conventional methods. The post-operational period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in the tank after nucleus implantation before they were suspended from rafts in Ago Bay. The conventional post-operative method was no low salinity treatment. Oysters were cultured in Ago Bay after the treatment, and the pearls were harvested in December 2013. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$). Values sharing different letters are significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA, Tukey's HSD).

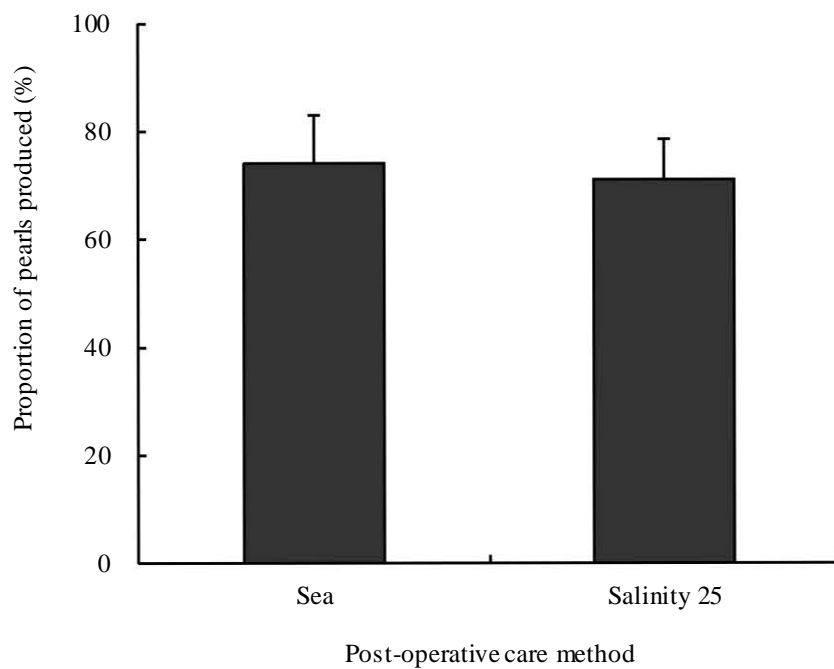


Fig. 21 Proportion of pearls produced by oysters held in low salinity seawater (25 psu) in a tank or the sea after nucleus implantation in 2013. A small piece of mantle tissue and a nucleus (4.27 - 4.51 mm diameter) were implanted. Two pairs were implanted into the gonads of oysters following conventional methods. The post-operational period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in the tank after nucleus implantation before they were suspended from rafts in Ago Bay. The conventional post-operative method was no low salinity treatment. Oysters were cultured in Ago Bay after the treatment, and the pearls were harvested in December 2013. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

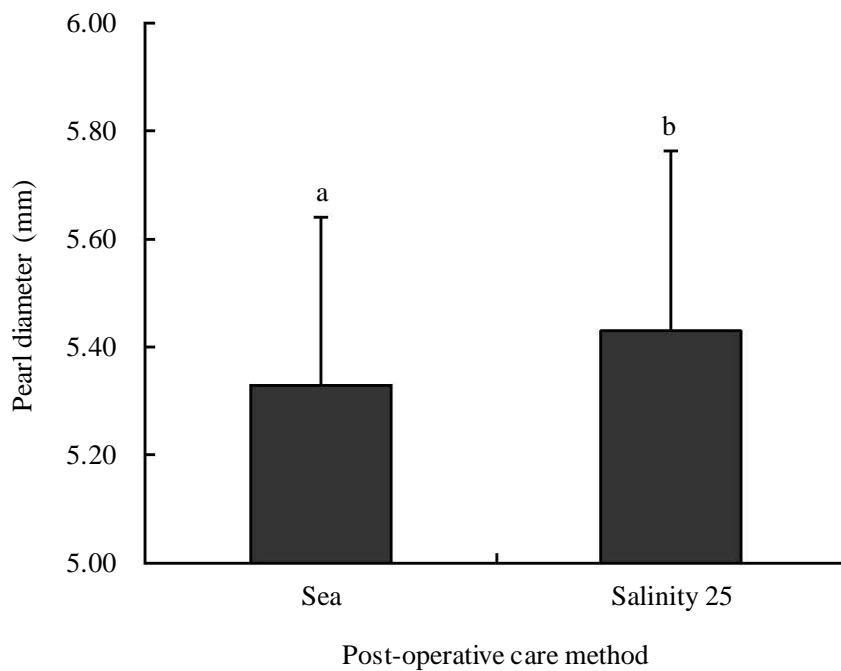


Fig. 22 Mean (\pm standard deviation [SD]) diameter of pearls produced by oysters held in low salinity seawater (25 psu) in a tank or the sea after nucleus implantation in 2013. A small piece of mantle tissue and a nucleus (4.27 - 4.51 mm diameter) were implanted. Two pairs were implanted into the gonads of oysters following conventional methods. The post-operational period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in the tank after nucleus implantation before they were suspended from rafts in Ago Bay. The conventional post-operative method was no low salinity treatment. Oysters were cultured in Ago Bay after the treatment, and the pearls were harvested in December 2013. Values are means \pm SDs ($n = 201, 211$). Values sharing common letters are not significantly different at $p < 0.01$ (two-way ANOVA, Tukey's HSD).

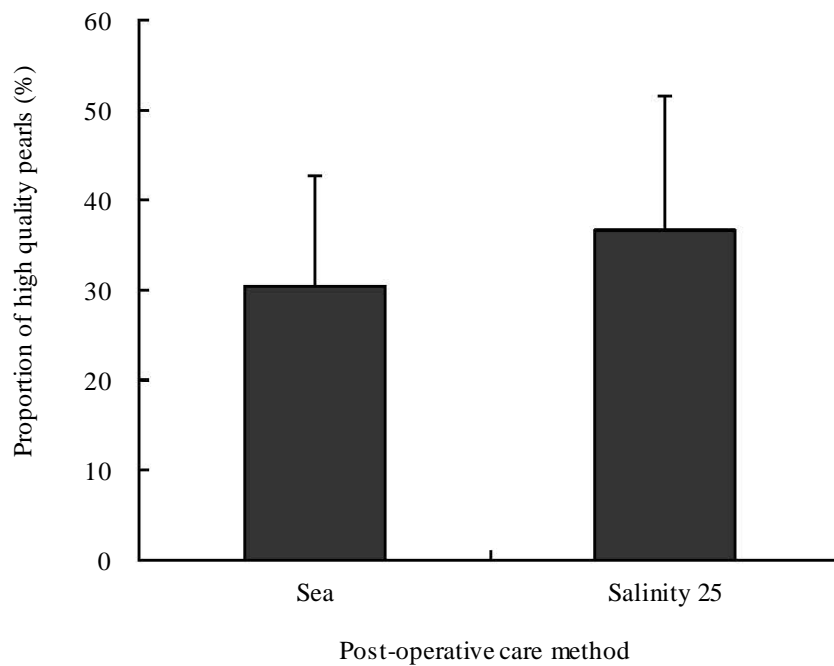


Fig. 23 Proportion of high quality pearls produced by oysters held in low salinity seawater (25 psu) in a tank or the sea after nucleus implantation in 2013. A small piece of mantle tissue and a nucleus (2.50 - 2.67 mm diameter) were implanted. Four pairs were implanted into the gonads of oysters following conventional methods. The post-operational period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in the tank after nucleus implantation before they were suspended from rafts in Ago Bay. The conventional post-operative method was no low salinity treatment. Oysters were cultured in Ago Bay after the treatment, and the pearls were harvested in December 2013. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

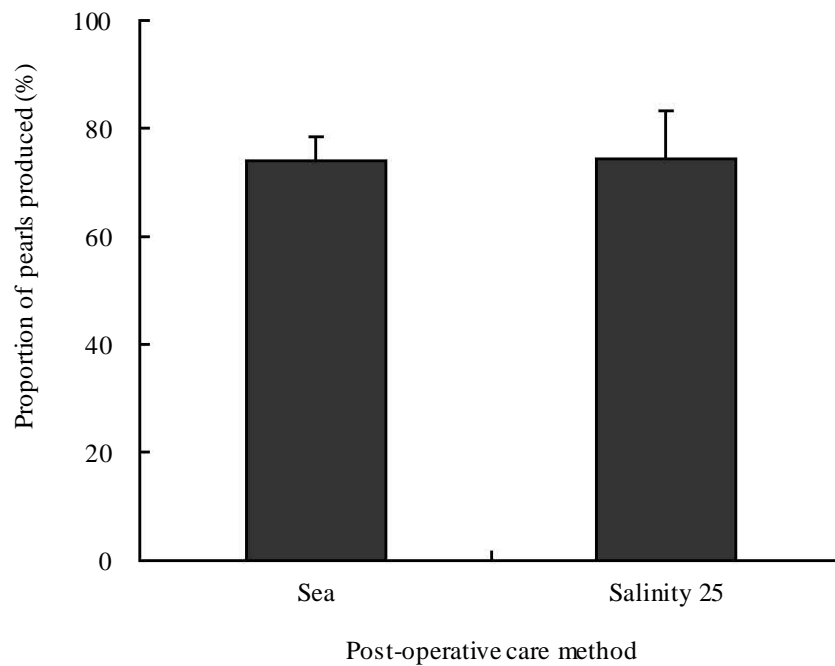


Fig. 24 Proportion of pearls produced by oysters held in low salinity seawater (25 psu) in a tank or the sea after nucleus implantation in 2013. A small piece of mantle tissue and a nucleus (2.50 - 2.67 mm diameter) were implanted. Four pairs were implanted into the gonads of oysters following conventional methods. The post-operational period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in the tank after nucleus implantation before they were suspended from rafts in Ago Bay. The conventional post-operative method was no low salinity treatment. Oysters were cultured in Ago Bay after the treatment, and the pearls were harvested in December 2013. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

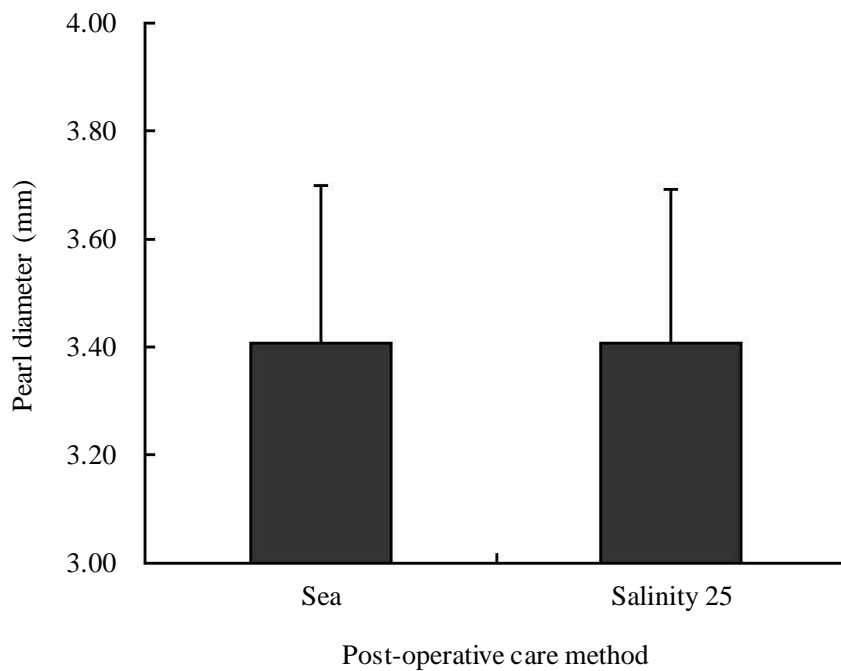


Fig. 25 Mean (\pm standard deviation [SD]) diameter of pearls produced by oysters held in low salinity seawater (25 psu) in a tank or the sea after nucleus implantation in 2013. A small piece of mantle tissue and a nucleus (2.50 - 2.67 mm diameter) were implanted. Four pairs were implanted into the gonads of oysters following conventional methods. The post-operational period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in the tank after nucleus implantation before they were suspended from rafts in Ago Bay. The conventional post-operative method was no low salinity treatment. Oysters were cultured in Ago Bay after the treatment, and the pearls were harvested in December 2013. Values are means \pm SDs ($n = 283, 311$). Values are not significantly different at $p < 0.05$ (two-way ANOVA).

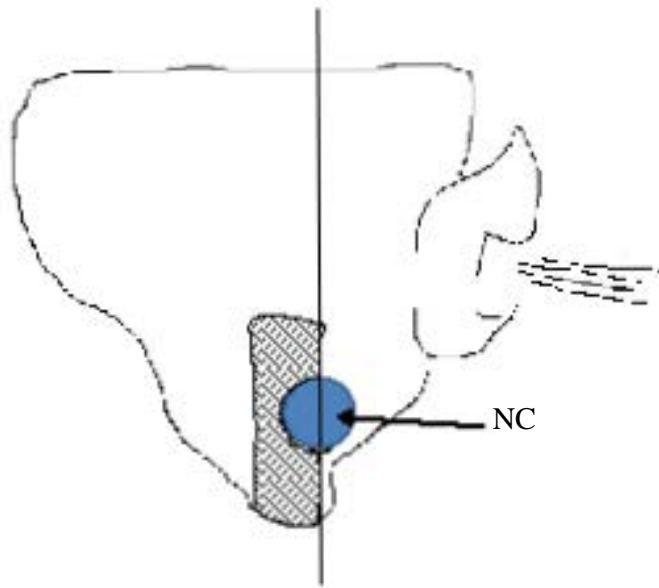


Fig. 26 Diagram of the horizontal view of the inner parts of the pearl oyster, *Pinctada fucata*. The tissue sampled for histology is indicated by the hatched lines. Vertical line indicates the sliced plane. NC, nucleus.

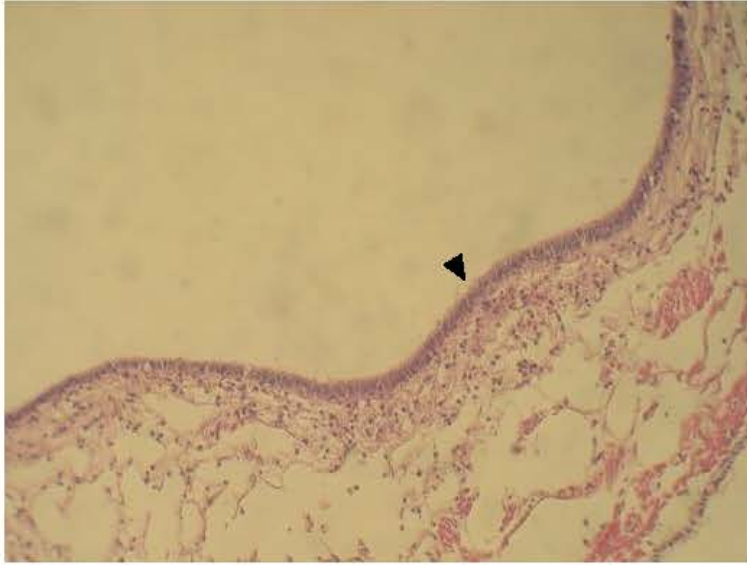


Fig. 27 Pearl-sac formation. An arrow indicates pearl-sac produced from implanted mantle piece.

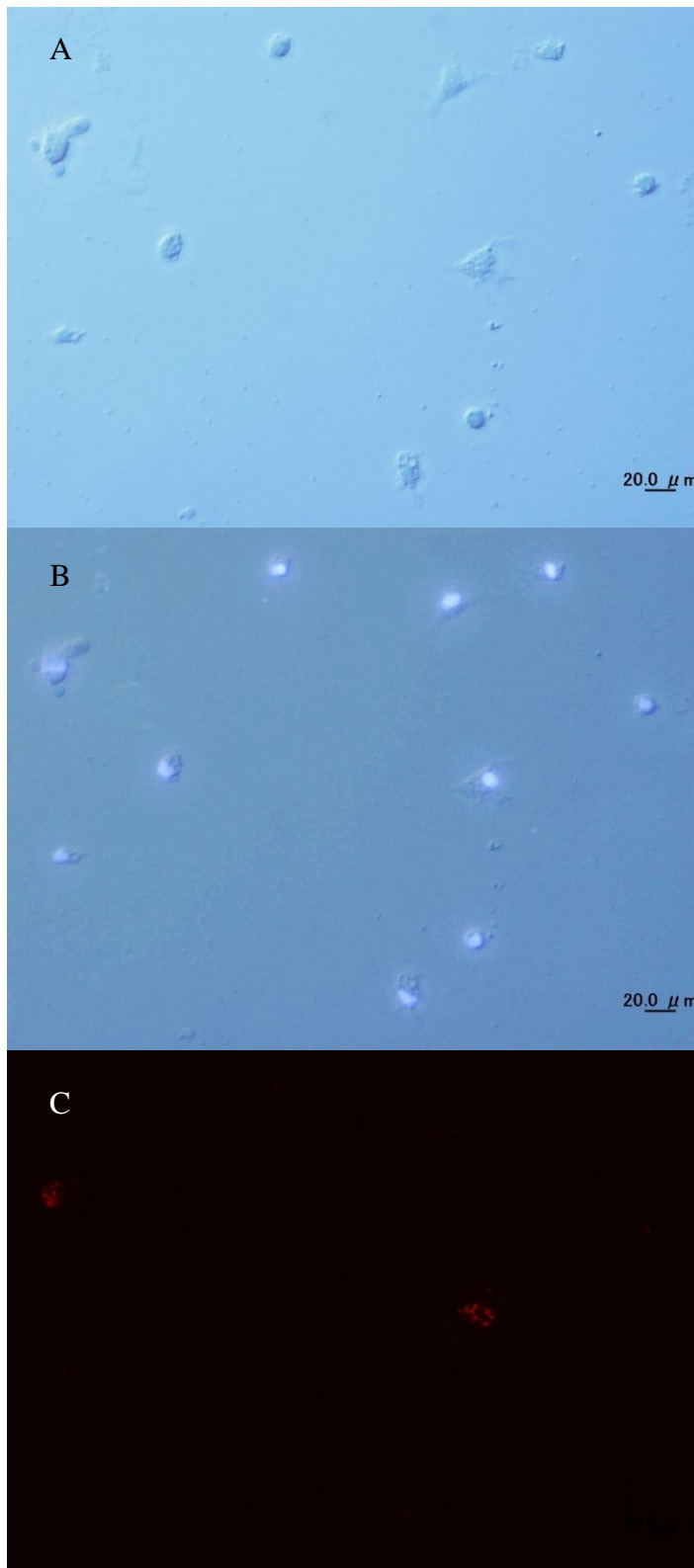


Fig. 28 Microscopic detection of phagocytosis in pearl oyster hemocytes. Phagocytosis was examined in pearl oyster hemocytes using pHrodo-labeled *Escherichia coli*. (A) The hemocytes were visualized using differential interference contrast microscopy. (B) Nuclear Hoechst-stained and merged blue fluorescence images show the hemocytes. (C) Red fluorescence-labeled particles are hemocytes.

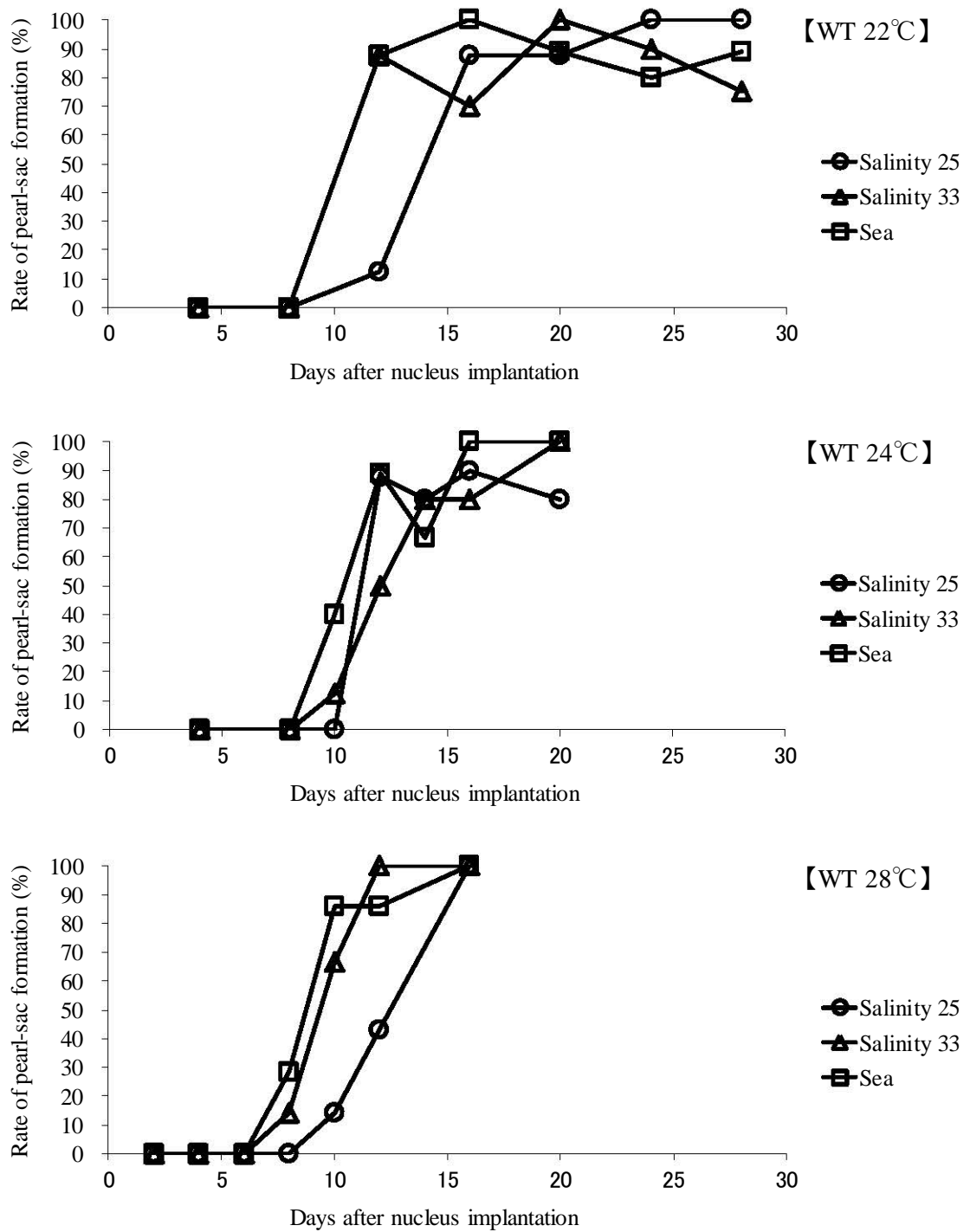


Fig. 29 Rate of pearl-sac formation by oysters held in tanks containing low salinity seawater (25 psu), normal salinity seawater (33 psu), and those suspended from a raft in Ago Bay (sea) in various water temperatures.

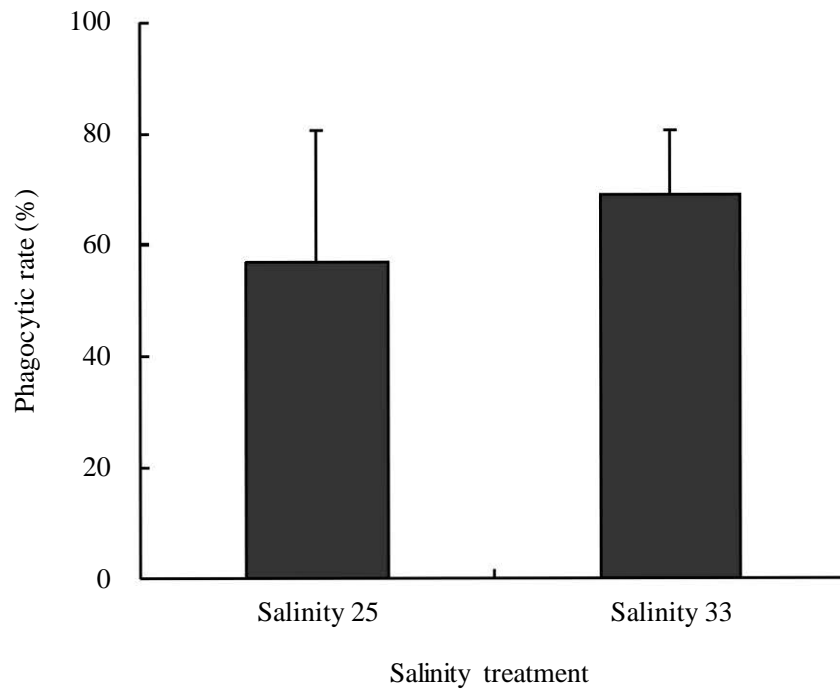


Fig. 30 Phagocytic rate by oysters maintained in tanks containing low salinity seawater (25 psu) or normal salinity seawater (33 psu) for 8 d. The oysters were hold in a pearl net (20 oysters/net) prior to examination. Then, the oysters were suspended from a raft in Ago Bay. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$). No significant difference was detected ($p > 0.05$).

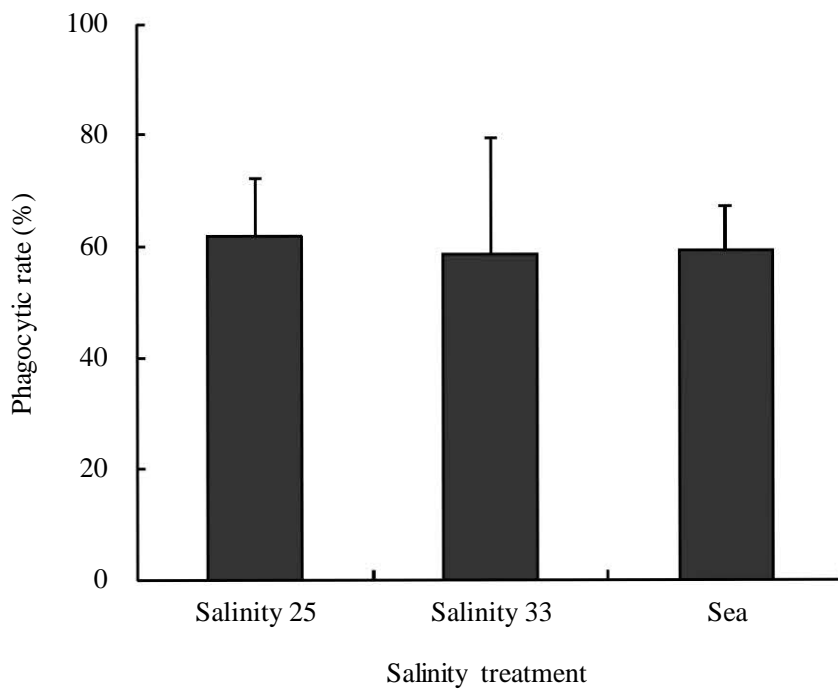


Fig. 31 Phagocytic rate by oysters maintained in tanks containing low salinity seawater (25 psu), normal salinity water (33 psu) for 8 d, or those suspended from a raft in Ago Bay (sea) for 8 d. The oysters were deliberately crowded in a plastic conditioning box with a lid (120 oysters/box) prior to examination. Then, the oysters were suspended from a raft in Ago Bay for 44 d. Values are means \pm standard deviations ($n = 6$). No significant differences were detected ($p > 0.05$).

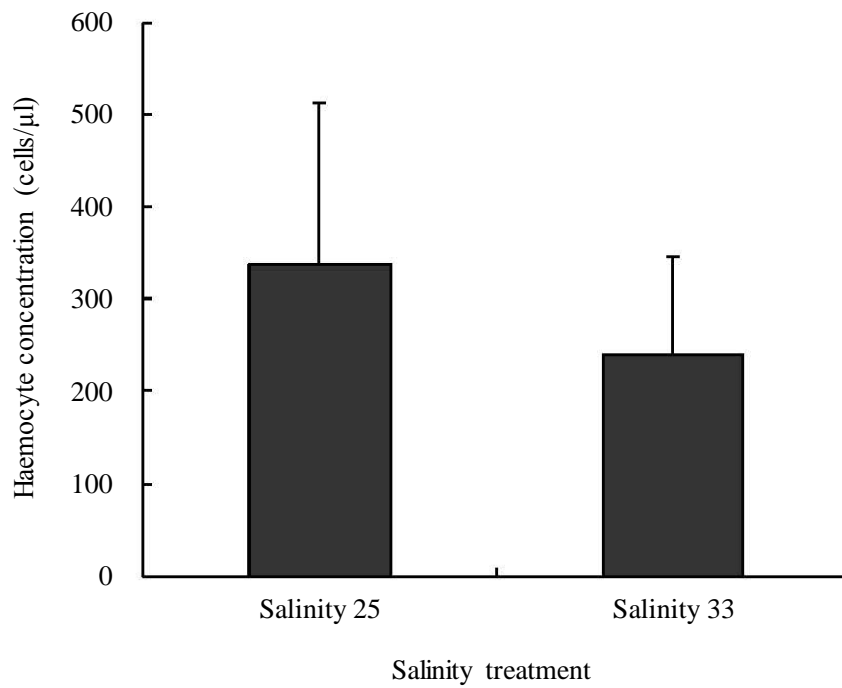


Fig. 32 Haemocyte concentration by oysters maintained in tanks containing low salinity seawater (25 psu) or normal salinity seawater (33 psu) for 8 d. The oysters were held in a pearl net (20 oysters/net) prior to examination. Then, the oysters were suspended from a raft in Ago Bay. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$). No significant difference was detected ($p > 0.05$).

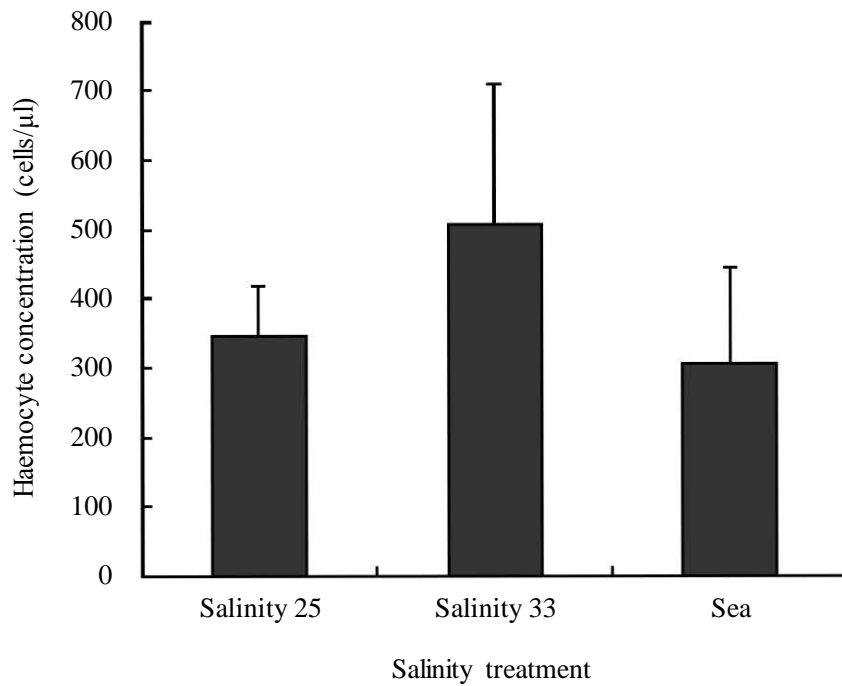


Fig. 33 Haemocyte concentration by oysters maintained in tanks containing low salinity seawater (25 psu), normal salinity water (33 psu) for 8 d, or those suspended from a raft in Ago Bay (sea) for 8 d. The oysters were deliberately crowded in a plastic conditioning box with a lid (120 oysters/box) prior to examination. Then, the oysters were suspended from a raft in Ago Bay for 44 d. Values are means \pm standard deviations ($n = 6$). No significant differences were detected ($p > 0.05$).

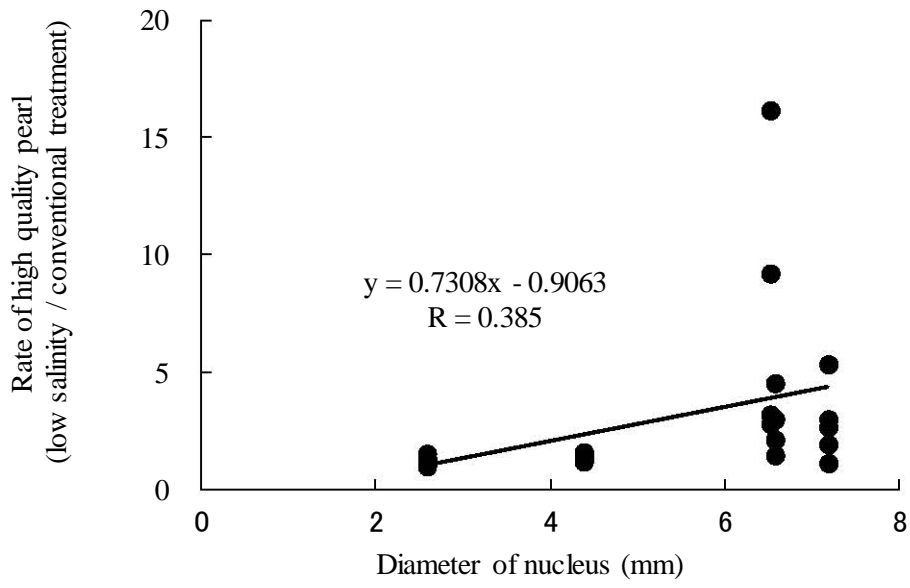


Fig. 34 Relationship between diameter of nucleus and ratio of high quality pearl

Table 1 Proportions of high quality pearls produced and proportions of pearls produced by post-operative oysters treated with low salinity seawater (25 psu) or ambient salinity (33 psu) in a tank for 14 days after nucleus implantation

	Salinity		Comparison
	25	33	
Proportion of high quality pearls (%) ^{*1}	21.3 ± 3.1 ^{*3}	10.8 ± 2.8	<i>p</i> < 0.01
Proportion of pearls produced (%) ^{*2}	47.8 ± 4.7	48.5 ± 5.3	<i>n.s.</i> ^{*4}

^{*1} Proportion of high quality pearls = (high quality pearls / pearls) × 100

^{*2} Proportion of pearls produced = (harvested pearls / implanted nuclei) × 100

^{*3} Mean ± standard deviation (*n* = 5)

^{*4} *n.s.*, not significant (Student's *t*-test, *p* > 0.05)

Table 2 Proportion (%) of high quality pearls produced by oysters reared under three different post-operative care methods for 14 d after nucleus implantation

Nucleus implantation date	Post-operative care method		
	Sea	Salinity 33	Salinity 25
29-Jul	17.5	46.5	52.5
19-Aug	10.0	41.4	53.1
9-Sep	15.0	26.7	39.4
1-Oct	43.3	20.0	48.0
23-Oct	18.9	27.5	35.9

Table 3 Proportion (%) of pearls produced by oysters reared under three different post-operative care methods for 14 d after nucleus implantation

Nucleus implantation date	Post-operative care method		
	Sea	Salinity 33	Salinity 25
29-Jul	57.1	61.4	84.3
19-Aug	28.6	41.4	45.7
9-Sep	28.6	21.4	47.1
1-Oct	46.9	47.6	39.7
23-Oct	67.3	72.7	70.9

Table 4 Salinity and temperature in three post-operation methods

Nucleus implantation date	post-operation method	Salinity (psu)		Temperature (°C)	
		Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range
29-Jul	Salinity 25	25.1 \pm 0.0	25.1 - 25.2	28.2 \pm 0.3	27.6 - 28.6
	Salinity 33	33.3 \pm 0.0	33.2 - 33.4	28.3 \pm 0.4	27.5 - 28.6
	Sea ^{*1}	32.6 \pm 0.5	31.7 - 33.2	29.2 \pm 0.9	26.3 - 31.7
19-Aug	Salinity 25	25.3 \pm 0.0	25.2 - 25.4	28.4 \pm 0.3	27.6 - 28.6
	Salinity 33	33.4 \pm 0.1	33.3 - 33.5	28.5 \pm 0.3	27.7 - 29.0
	Sea	33.3 \pm 0.2	32.9 - 33.5	26.3 \pm 1.1	25.2 - 29.5
9-Sep	Salinity 25	25.3 \pm 0.1	25.1 - 25.4	28.4 \pm 0.3	27.5 - 28.5
	Salinity 33	33.1 \pm 0.1	33.0 - 33.3	28.5 \pm 0.2	27.9 - 29.0
	Sea	31.8 \pm 0.2	31.4 - 32.3	26.8 \pm 0.4	25.3 - 27.8
1-Oct	Salinity 25	25.1 \pm 0.1	25.0 - 25.2	25.1 \pm 0.3	24.5 - 25.7
	Salinity 33	33.3 \pm 0.1	33.3 - 33.5	25.1 \pm 0.3	24.7 - 26.0
	Sea	32.6 \pm 0.2	32.2 - 33.0	24.3 \pm 0.6	22.3 - 25.7
23-Oct	Salinity 25	25.0 \pm 0.1	25.0 - 25.1	22.0 \pm 0.4	21.4 - 23.0
	Salinity 33	33.1 \pm 0.1	33.1 - 33.2	22.0 \pm 0.5	21.2 - 22.8
	Sea	32.8 \pm 0.2	32.4 - 32.9	21.7 \pm 0.7	18.6 - 23.9

^{*1} Ago Bay, Mie Prefecture

Table 5 Comparison of the proportions (%) of high quality pearls produced by oysters maintained in low salinity seawater (25 psu) in a tank for 14 d after nucleus implantation and those suspended from rafts in Ago Bay, Gokasho Bay, and Aso-ura for 14 d after nucleus implantation

Pearl farmer	Culture site	Post-operative care method	
		Sea	Salinity 25
A	Gokasho Bay	2.1	23.3
B	Ago Bay	5.7	2.6
C	Gokasho Bay	0.0	11.9
D	Ago Bay	4.5	36.2
E	Ago Bay	0.0	31.7
F	Ago Bay	34.4	39.2
G	Ago Bay	36.9	39.1
H	Ago Bay	3.6	15.9
I	Ago Bay	0.0	20.3
J	Aso-ura	29.4	42.3

Table 6 Comparison of the proportions (%) of pearls produced by oysters maintained in low salinity seawater (25 psu) in a tank for 14 d after nucleus implantation and those suspended from rafts in Ago Bay, Gokasho Bay, and Aso-ura for 14 d after nucleus implantation

Pearl farmer	Culture site	Post-operative care method	
		Sea	Salinity 25
A	Gokasho Bay	48.0	43.0
B	Ago Bay	35.0	39.0
C	Gokasho Bay	69.0	67.0
D	Ago Bay	67.0	58.0
E	Ago Bay	72.0	63.0
F	Ago Bay	82.6	74.0
G	Ago Bay	84.0	90.6
H	Ago Bay	57.1	44.0
I	Ago Bay	57.0	64.0
J	Aso-ura	68.0	71.0

Table 7 Numbers of implanted oysters and harvest statistics by treatment

Experiment	Category	Numbers of total samples	Numbers of sample for variables												
			<i>Post-operative care method</i>		<i>Shell-closing strength</i>		<i>technician</i>		<i>Nucleus diameter</i>		<i>Oyster whole wet weight (g)</i>				
			The low salinity treatment	The conventional treatment	2.0-4.9 kgf	5.0-7.9 kgf	1	2	Large 7.73-7.77 mm	Small 6.36-6.40 mm	<40	40≤,<50	50≤,<60	60≤,<70	70≤
1st	Implanted oysters	966	492	474	350	616	486	480	487	479	0	66	606	291	3
	Harvested pearls	634	302	332	228	406	311	323	307	327	-	31	385	215	3
	High quality pearls	27	22	5	16	11	11	16	18	9	-	5	17	5	0
	Proportion of harvested pearls (%) ^{*1}	65.6	61.4	70.0	65.1	65.9	64.0	67.3	63.0	68.3	-	47.0	63.5	73.9	100
	Proportion of high quality pearls (%) ^{*2}	4.3	7.3	1.5	7.0	2.7	3.5	5.0	5.9	2.8	-	16.1	4.4	2.3	0.0
2nd	Implanted oysters	961	476	485	484	477	487	474	479	482	1	30	576	346	8
	Harvested pearls	474	210	264	244	230	207	267	246	228	0	5	269	193	7
	High quality pearls	27	25	2	19	8	8	19	18	9	0	0	21	6	0
	Proportion of harvested pearls (%)	49.3	44.1	54.4	50.4	48.2	42.5	56.3	51.4	47.3	0.0	16.7	46.7	55.8	87.5
	Proportion of high quality pearls (%)	5.7	11.9	0.8	7.8	3.5	3.9	7.1	7.3	3.9	0.0	0.0	7.8	3.1	0.0

^{*1} harvested pearls / implanted oysters (%)

^{*2} high quality pearls / harvested pearls (%)

Table 8 Estimates of the variables and Akaike information criteria (AIC) values for each model in the first experiment

Model ^{*1}	Estimate of the variables						AIC ^{*4}
	β_0 [<i>Intercept</i>]	β_1 [<i>PO</i> ^{*2} ‘the conventional treatment’ (relative to ‘the low salinity treatment’)]	β_2 [<i>technician</i> ‘technician 2’ (relative to ‘technician 1’)]	β_3 [<i>SCS</i> ^{*3} ‘5.0–7.9kgf’ (relative to ‘2.0–4.9kgf’)]	β_4 [<i>weight</i>]	β_5 [<i>nucleus</i> ‘small’ (relative to ‘large’)]	
i	-2.544	-1.637					213.5
ii	-3.306		0.352				226.5
iii	-2.584			-0.997			221.0
iv	3.929				-0.125		218.0
v	-2.776					-0.789	223.5
vi	4.990	-1.721	0.523	-0.874	-0.123	-0.953	201.4
vii	5.143	-1.708	ns	-0.870	-0.121	-0.900	201.0

^{*1} Model i-v indicate simple models obtained using each variable; Model vi indicates multiple model obtained using all variables; Model vii indicates adjusted model obtained using variables except technician.

^{*2} *PO*, post-operative care.

^{*3} *SCS*, shell closing strength.

^{*4} AIC, Akaike information criteria. Blanks show the variables was not selected.

Table 9 Estimates of the variables and Akaike information criteria (AIC) values for each model in the second experiment

Model ^{*1}	Estimate of the variables						AIC ^{*4}
	β_0 [<i>Intercept</i>]	β_1 [<i>PO</i> ^{*2} ‘the conventional treatment’ (relative to ‘the low salinity treatment’)]	β_2 [<i>technician</i> ‘technician 2’ (relative to ‘technician 1’)]	β_3 [<i>SCS</i> ^{*3} ‘5.0–7.9kgf’ (relative to ‘2.0–4.9kgf’)]	β_4 [<i>weight</i>]	β_5 [<i>nucleus</i> ‘small’ (relative to ‘large’)]	
i	-2.002	-2.874					180.8
ii	-3.214		0.645				208.8
iii	-2.472			-0.852			206.9
iv	0.438				-0.056		209.6
v	-2.539					-0.653	208.6
vi	2.747	-3.085	0.934	-0.956	-0.080	-0.631	175.4

^{*1} Model i-v indicate simple models obtained using each variable; Model vi indicates the multiple model obtained using all variables and the adjusted model .

^{*2} *PO*, post-operative care.

^{*3} *SCS*, shell closing strength.

^{*4} AIC, Akaike information criteria. Blanks show the variables was not selected.

Table 10 Estimate, standard error (S.E.), p value, and adjusted odds ratio (AOR) for each of the factors in the optimum model in the first experiment

Variable	Estimate	S.E.	p value	AOR
β_0 [<i>Intercept</i>]	5.143	2.369	0.030	
β_1 [<i>PO</i> ‘the conventional treatment’ (relative to ‘the low salinity treatment’)]	-1.708	0.511	0.001	0.181
β_3 [<i>SCS</i> ‘5.0–7.9kgf’ (relative to ‘2.0–4.9kgf’)]	-0.870	0.417	0.037	0.419
β_4 [<i>weight</i>]	-0.121	0.043	0.004	0.886
β_5 [<i>nucleus</i> ‘small’ (relative to ‘large’)]	-0.900	0.431	0.037	0.407

Table 11 Estimate, standard error (S.E.), *p* value, and adjusted odds ratio (AOR) for each of the factors in the optimum model in the second experiment

Variable	Estimate	S.E.	<i>p</i> value	AOR
β_0 [<i>Intercept</i>]	2.747	3.000	0.360	
β_1 [<i>PO</i> ‘the conventional treatment’ (relative to ‘the low salinity treatment’)]	-3.085	0.753	0.000	0.046
β_2 [<i>technician</i> ‘technician 2’ (relative to ‘technician 1’)]	0.934	0.463	0.043	2.546
β_3 [<i>SCS</i> ‘5.0–7.9kgf’ (relative to ‘2.0–4.9kgf’)]	-0.956	0.453	0.035	0.385
β_4 [<i>weight</i>]	-0.080	0.052	0.128	0.923
β_5 [<i>nucleus</i> ‘small’ (relative to ‘large’)]	-0.631	0.442	0.154	0.532

Table 12 Proportion (%) of high quality pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 1, 4, or 8 d after nucleus implantation on one of four dates and harvested after 60 d of culture in 2011

Nucleus implantation date	Duration of low salinity treatment (days)			
	0 d	1 d	4 d	8 d
19-May	29.8	34.8	42.9	42.9
9-Jun	21.7	31.3	29.4	45.2
30-Jun	18.2	12.5	21.9	54.3
14-Jul	11.4	14.3	31.8	51.3
28-Jul	0.0	11.1	14.3	34.6

Table 13 Proportion (%) of high quality pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 4, 8, or 14 d after nucleus implantation on one of four dates and harvested after 60 d of culture in 2012

Nucleus implantation date	Duration of low salinity treatment (days)			
	0 d	4 d	8 d	14 d
14-Jun	8.5	26.1	27.1	28.9
21-Jun	2.3	13.0	21.4	27.3
5-Jul	14.9	23.1	41.5	28.6
12-Jul	2.3	8.2	37.5	16.0

Table 14 Proportion (%) of high quality pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control) or 8 d after nucleus implantation on one of two dates and harvested in December in 2012

Nucleus implantation date	Duration of low salinity treatment (days)	
	0 d	8 d
14-Jun	10.6	22.0
21-Jun	2.3	21.1
5-Jul	15.8	35.6
12-Jul	13.6	28.6

Table 15 Proportion (%) of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 1, 4, or 8 d after nucleus implantation on one of four dates and harvested after 60 d of culture in 2011

Nucleus implantation date	Duration of low salinity treatment (days)			
	0 d	1 d	4 d	8 d
19-May	79.7	76.7	81.7	81.7
9-Jun	75.4	80.0	85.0	70.0
30-Jun	55.0	53.3	53.3	58.3
14-Jul	58.3	70.0	73.3	65.0
28-Jul	55.0	44.3	46.7	43.3

Table 16 Proportion (%) of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 4, 8, or 14 d after nucleus implantation on one of four dates and harvested after 60 d of culture in 2012

Nucleus implantation date	Duration of low salinity treatment (days)			
	0 d	4 d	8 d	14 d
14-Jun	78.3	76.7	80.0	75.0
21-Jun	71.7	76.7	70.0	73.3
5-Jul	78.3	86.7	68.3	70.0
12-Jul	71.7	81.7	80.0	83.3

Table 17 Proportion (%) of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control) or 8 d after nucleus implantation on one of two dates and harvested in December in 2012

Nucleus implantation date	Duration of low salinity treatment (days)	
	0 d	8 d
14-Jun	78.3	68.3
21-Jun	71.7	63.3
5-Jul	63.3	75.0
12-Jul	73.3	70.0

Table 18 Mean (\pm standard deviation) diameter (mm) of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 1, 4, or 8 d after nucleus implantation on one of four dates and harvested after 60 d of culture in 2011

Nucleus implantation date	Duration of low salinity treatment (days)							
	<i>n</i>	0 d	<i>n</i>	1 d	<i>n</i>	4 d	<i>n</i>	8 d
19-May	36	6.89 \pm 0.13	35	6.93 \pm 0.15	38	6.91 \pm 0.13	44	6.89 \pm 0.16
9-Jun	27	6.86 \pm 0.15	37	6.88 \pm 0.15	39	6.86 \pm 0.15	32	6.86 \pm 0.17
30-Jun	27	6.88 \pm 0.14	20	6.89 \pm 0.17	22	6.86 \pm 0.17	27	6.85 \pm 0.16
14-Jul	27	6.94 \pm 0.15	34	6.95 \pm 0.20	36	6.99 \pm 0.17	37	6.95 \pm 0.20
28-Jul	25	7.09 \pm 0.19	21	7.03 \pm 0.18	21	7.05 \pm 0.18	22	7.01 \pm 0.17

Table 19 Mean (\pm standard deviation) diameter (mm) of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control), 4, 8, or 14 d after nucleus implantation on one of four dates and harvested after 60 d of culture in 2012

Nucleus implantation date	Duration of low salinity treatment (days)							
	<i>n</i>	0 d	<i>n</i>	4 d	<i>n</i>	8 d	<i>n</i>	14 d
14-Jun	27	7.23 \pm 0.27	23	7.21 \pm 0.23	29	7.15 \pm 0.22	24	7.02 \pm 0.19
21-Jun	20	7.08 \pm 0.21	24	7.06 \pm 0.18	24	7.06 \pm 0.26	28	6.97 \pm 0.17
5-Jul	25	7.18 \pm 0.31	28	7.09 \pm 0.17	30	7.19 \pm 0.22	31	7.02 \pm 0.23
12-Jul	24	6.98 \pm 0.14	31	7.08 \pm 0.21	28	7.04 \pm 0.18	32	6.95 \pm 0.18

Table 20 Mean (\pm standard deviation) diameter (mm) of pearls produced by oysters held in low salinity seawater for 0 (control) or 8 d after nucleus implantation on one of two dates and harvested in December in 2012

Nucleus implantation date	Duration of low salinity treatment (days)			
	<i>n</i>	0 d	<i>n</i>	8 d
14-Jun	33	7.40 \pm 0.28	25	7.35 \pm 0.29
21-Jun	21	7.33 \pm 0.26	24	7.29 \pm 0.24
5-Jul	25	7.38 \pm 0.24	36	7.44 \pm 0.30
12-Jul	22	7.30 \pm 0.23	26	7.17 \pm 0.24

Table 21 Proportion (%) of high quality pearls produced post-operatively by oysters maintained in low salinity seawater (25 psu) in a tank or in the sea after nucleus implantation in 2013. Two nuclei were implanted in the gonad of each oyster following conventional methods.

Nucleus implantation date	Post-operative care method	
	Sea	Salinity 25 ^{*1}
24-June	6.9	9.7
2-Jul	5.3	7.2
9-Jul	19.7	31.6
16-Jul	22.1	28.4
23-Jul	17.7	20.6

^{*1} The post-operative period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in a tank just after nucleus implantation and were then suspended from rafts in Ago Bay after the low salinity treatment.

Table 22 Proportion (%) of pearls produced post-operatively by oysters maintained in low salinity seawater (25 psu) in a tank or in the sea after nucleus implantation in 2013. Two nuclei were implanted in the gonad of each oyster following conventional methods.

Nucleus implantation date	Post-operative care method	
	Sea	Salinity 25 ^{*1}
24-June	72.0	62.0
2-Jul	75.0	69.0
9-Jul	76.0	76.0
16-Jul	86.0	81.0
23-Jul	62.0	68.0

^{*1} The post-operative period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in a tank just after nucleus implantation and were then suspended from rafts in Ago Bay after the low salinity treatment.

Table 23 Mean (\pm standard deviation) diameter (mm) of pearls produced by oysters maintained in low salinity seawater (25 psu) in a tank or in the sea after nucleus implantation in 2013. Two nuclei were implanted in the gonad of each oyster following conventional methods.

Nucleus implantation date	Post-operative care method			
	<i>n</i>	Sea	<i>n</i>	Salinity 25 ^{*1}
24-June	32	5.48 \pm 0.32	29	5.67 \pm 0.33
2-Jul	34	5.31 \pm 0.26	32	5.37 \pm 0.25
9-Jul	49	5.33 \pm 0.35	51	5.50 \pm 0.34
16-Jul	49	5.29 \pm 0.34	58	5.37 \pm 0.27
23-Jul	37	5.26 \pm 0.22	41	5.30 \pm 0.37

^{*1} The post-operative period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in a tank just after nucleus implantation and were then suspended from rafts in Ago Bay after the low salinity treatment.

Table 24 Proportion (%) of high quality pearls produced post-operatively by oysters maintained in low salinity seawater (25 psu) in a tank or in the sea after nucleus implantation in 2013. Four nuclei were implanted in the gonad of each oyster following conventional methods.

Nucleus implantation date	Post-operative care method	
	Sea	Salinity 25 ^{*1}
2-Jul	14.7	17.9
9-Jul	20.2	26.0
16-Jul	39.8	39.6
23-Jul	41.8	44.6
30-Jul	35.9	55.2

^{*1} The post-operative period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in a tank just after nucleus implantation and were then suspended from rafts in Ago Bay after the low salinity treatment.

Table 25 Proportion (%) of pearls produced post-operatively by oysters maintained in low salinity seawater (25 psu) in a tank or in the sea after nucleus implantation in 2013. Four nuclei were implanted in the gonad of each oyster following conventional methods.

Nucleus implantation date	Post-operative care method	
	Sea	Salinity 25 ^{*1}
2-Jul	72.5	83.8
9-Jul	71.3	79.4
16-Jul	76.9	60.0
23-Jul	68.8	75.6
30-Jul	80.0	72.5

^{*1} The post-operative period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in a tank just after nucleus implantation and were then suspended from rafts in Ago Bay after the low salinity treatment.

Table 26 Mean (\pm standard deviation) diameter (mm) of pearls produced by oysters maintained in low salinity seawater (25 psu) in a tank or in the sea after nucleus implantation in 2013. Four nuclei were implanted in the gonad of each oyster following conventional methods.

Nucleus implantation date	Post-operative care method			
	<i>n</i>	Sea	<i>n</i>	Salinity 25 ^{*1}
2-Jul	46	3.64 \pm 0.30	53	3.64 \pm 0.24
9-Jul	44	3.43 \pm 0.21	57	3.52 \pm 0.28
16-Jul	57	3.43 \pm 0.30	50	3.48 \pm 0.27
23-Jul	66	3.34 \pm 0.32	74	3.23 \pm 0.22
30-Jul	70	3.29 \pm 0.21	77	3.28 \pm 0.23

^{*1} The post-operative period was 14 d. The oysters spent an additional 8 d in a tank just after nucleus implantation and were then suspended from rafts in Ago Bay after the low salinity treatment.

Table 27 Estimates of the variables and Akaike information criteria (AIC) values for each model

Model ^{*1}	Estimate of the variables					AIC ^{*2}
	β_0 [<i>Intercept</i>]	β_1 [<i>PO1</i> ‘the ambient seawater treatment’ (relative to ‘the conventional treatment’)]	β_2 [<i>PO2</i> ‘the low salinity treatment’ (relative to ‘the conventional treatment’)]	β_3 [<i>WT</i>]	β_4 [<i>Day</i>]	
i	0.205	-0.205	-0.405			733.0
ii	3.920			-0.161		716.1
iii	-4.850				0.407	392.9
iv	-10.224	-0.509	-1.012	0.213	0.460	377.0

^{*1} Model i-iii represent simple models each containing a single variable;
Model iv indicates the multiple model obtained using all variables and the adjusted model.

^{*2} AIC, Akaike information criteria.

Table 28 Estimate, standard error (S.E.), p value, and adjusted odds ratio (AOR) for each of the factors in the adjusted model

Variable	Estimate	S.E.	p value	AOR
β_0 [<i>Intercept</i>]	-10.224	1.766	0.000	
β_1 [<i>PO1</i> ‘the ambient seawater treatment’ (relative to ‘the conventional treatment’)]	-0.509	0.319	0.111	0.601
β_2 [<i>PO2</i> ‘the low salinity treatment’ (relative to ‘the conventional treatment’)]	-1.012	0.332	0.002	0.363
β_3 [<i>WT</i>]	0.213	0.062	0.001	1.238
β_4 [<i>Day</i>]	0.460	0.040	0.000	1.583